



Volume

4

CONCEITOS E MÉTODOS para formação de profissionais em laboratórios DE SAÚDE

Organização
Elizabeth Molinari
Lucília Caputo
Regina Assunção

IOC
Instituto Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente

Paulo Ernani Gadelha Vieira

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Diretora

Isabel Brasil Pereira

Vice-diretor de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Maurício Monken

Vice-diretora de Ensino e Informação

Márcia Valéria Morosini

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Institucional

Sergio Munck



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diretora

Tânia Cremonini Araújo Jorge

Vice-diretora de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação

Mariza Gonçalves Morgado

Vice-diretora de Ensino, Informação e Comunicação

Helene dos Santos Barbosa

Vice-diretora de Serviços de Referência e Coleções Científicas

Elizabeth Ferreira Rangel

Vice-diretor de Desenvolvimento Institucional e Gestão

Christian Maurice Gabriel Niel





CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Volume 4

ORGANIZADORAS

Etelcia Moraes Molinaro

Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Maria Regina Reis Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Dantas Cruz



Copyright © 2010 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz

Conselho Editorial

Dr.^a. Ana Luzia Lauria Filgueiras
Dr.^a. Clarissa Menezes Maya Monteiro
Dr.^a. Fátima Conceição Silva
Dr. Herman Gonçalves Schatzmayr
Dr.^a. Léa Camillo-Coura
Dr.^a. Lycia de Brito Gitirana
Dra. Marcia Cristina Ferrão Alexandre
Dr. Marco Antonio Ferreira da Costa
Dr.^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
Dr.^a. Maria Helena Miguez da Rocha Leão
Dr.^a. Maria Regina Reis Amendoeira (presidente)
Dr. Otílio Machado Pereira Bastos

Fotos

Maria Eveline Castro Pereira
Moyses Gomes Marcelino
Ortrud Monika Bart Schatzmayr
Raphael dos Santos Stephens
Rodrigo Mexas

Desenhos

Newton Marinho da Costa Júnior

Revisão

Luciana Duarte

Secretária Executiva da Coleção

Josane Ferreira Filho

Capa

Zé Luiz Fonseca

Projeto Gráfico e Editoração

Marcelo Paixão

Catálogo na fonte
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Biblioteca Emília Bustamante

M722c Molinaro, Etelcia Moraes

Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

290 p. : il. , tab. , graf.
ISBN: 978-85-98768-41-0

1. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 2. Pessoal de Laboratório. 3. Laboratórios. 4. Formação de Técnicos. 5. Saúde e Educação. I. Título. II. Caputo, Luzia Fátima Gonçalves. III. Amendoeira, Maria Regina Reis.

CDD 542.1



Autores

Antônio Teva

Biólogo, Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz. Tecnologista em Saúde Pública do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. (Egresso do Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária/Instituto Oswaldo Cruz/IOC, 1984).

Aurea Maria Lage de Moraes

Bióloga, Doutora em Ciências pela Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz. Pesquisadora Titular e Chefe do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz.

Flávia Coelho Ribeiro

Medica Veterinária, Doutora em Ciências em Diagnóstico de doenças infecciosas pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/IPEC/Fiocruz. Professora/pesquisadora da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPJSV/Fiocruz.

José Carlos Couto Fernandez

Biólogo, Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz. Pesquisador Titular em Saúde Pública pelo Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. (Egresso do Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária/Instituto Oswaldo Cruz/IOC, 1983).

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Bióloga, Doutora em Ciências pela Escola Nacional de Saúde Pública/ENSP/Fiocruz. Tecnologista Sênior, do Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública/ENSP/Fiocruz.



Leila Abboud Dias Carneiro

Bióloga, Mestre em Ciências em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz; Pesquisadora Colaboradora integrante do Grupo da Rede Microbicidas do Laboratório de Imunologia Clínica do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz.

Lucieny de Faria Souza Miguel

Bióloga e Farmacêutica, especialista em bacteriologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ. Microbiologista do Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels setor de Bacteriologia do Laboratório Central de Saúde Pública/LACEN.

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira

Biomédica, Mestre em Educação /UNESA. Doutora em Ensino em Biociências e Saúde/IOC/Fiocruz. Tecnologista Sênior da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPJSV/Fiocruz.

Paulo Roberto Soares Stephens

Biólogo, Mestre em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ. Tecnologista Sênior em Saúde Pública do Laboratório de Imunologia Clínica do Instituto Oswaldo Cruz /IOC/Fiocruz.

Rodrigo de Almeida Paes

Microbiologista e Imunologista, Mestre em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. Técnico em Saúde Pública II do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/IPEC/Fiocruz.

Valmir Laurentino Silva

Biólogo, Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ. Tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública/ENSP/Fiocruz. (Egresso do Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária/Instituto Oswaldo Cruz/IOC, 1984)

Verônica Leite de Holanda

Bióloga, Mestranda no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ. Professora do Governo do Estado do Rio de Janeiro/SEE-RJ.



Sumário

Prefácio	9
Apresentação da coleção	13
Apresentação pelas organizadoras	15
Capítulo 1. Imunologia	19
Capítulo 2. Virologia	125
Capítulo 3. Bacteriologia	221
Capítulo 4. Micologia	399





PREFÁCIO

O Chico Trombone costumava me dizer:

– Isso eu sei fazer, Dr. Luiz Fernando, aprendi com Joaquim Venâncio.

E era com orgulho que se referia a seu mestre.

Vimos, portanto, que a formação de técnicos já vem dos tempos de Oswaldo. É claro que não era institucionalizado como hoje. Eram outros tempos.

Joaquim Venâncio nasceu na fazenda Bela Vista, em Minas Gerais. Era a fazenda da mãe de Carlos Chagas, pai. Em 1916, veio trabalhar no Instituto Oswaldo Cruz. Veio e deu certo. O Dr. Lutz teria dito certa vez:

– Não troco o Venâncio por nenhum doutor de Oxford ou de Cambridge.

Se não disse, pensou.

Eficiência nos processos de seleção de pessoal? Competência do serviço de recursos humanos? Evidentemente que não. Não havia nada disso nessa época. As coisas eram muito mais simples, e davam certo. Veio porque era amigo do velho Carlos Chagas. Amigos de infância. Brincaram juntos na fazenda.

Quando Joaquim Venâncio faleceu, em 27 de agosto de 1955, teve seu necrológio publicado na *Revista Brasileira de Biologia*. Lugar de ne-

crologio de cientista famoso. Cito textual: “Joaquim Venâncio conseguiu, durante cerca de 35 anos que trabalhou ativamente, aprender zoologia que conhecia de modo invejável. Como decorrência das contingências da vida, não teve oportunidade de instruir-se, mas sua mentalidade era de um homem culto. Pela convivência com o Dr. Lutz, pela observação direta do que via nas excursões e no laboratório, adquiriu conhecimento detalhado de vários grupos zoológicos, principalmente anfíbios, moluscos fluviais e trematódeos. Chegou a conhecer muito bem os anfíbios e, com grande facilidade, os classificava nas excursões pela voz. Dadas as indicações feitas pelo Dr. Lutz em seus trabalhos, há casos em que foi citado na literatura como colaborador direto”.

Joaquim Venâncio era, sem dúvida, um naturalista. Era competente, tinha o domínio do ofício, a maestria da arte.

E gostava de ensinar. Ensinou muita gente.

Certa vez, o Venancinho me disse:

– Era a Escola do Venâncio, né? Foi muito boa, né?

* * *

Na presidência de Sergio Arouca, resolvemos atualizar a “Escola de Venâncio”. E foi assim que surgiu a Escola Politécnica, com o nome do seu patrono. Cresceu e abriu várias frentes, desde a vocação científica aos cursos de nível médio complementados pela formação de técnicos. Foi um êxito, como a antiga. Aparece sempre nos primeiros lugares nas avaliações e já se estendeu a outras instituições.

* * *

E agora surgem os livros didáticos. Organizado por Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoira, vem à luz a coleção **Conceitos e Métodos para a Formação de**



Técnicos em Laboratórios de Saúde, reunindo professores de várias unidades da Fiocruz.

Os capítulos oferecem a história da técnica, os seus fundamentos, a maneira moderna de realizá-la, as suas aplicações, a organização do laboratório etc.

É útil para os cursos da Fundação e para outros externos. Mostra, também, o quanto as unidades da Fiocruz estão integradas na realização de suas tarefas.

Ensino é questão primordial. Sem ele, o país não se desenvolve.

Está de parabéns a Fiocruz pela realização de mais uma tarefa de primordial importância.

Oswaldo Cruz está orgulhoso dos seus continuadores.

Luiz Fernando Ferreira

Pesquisador Emérito da Fundação Oswaldo Cruz





Apresentação

A coletânea de livros intitulada **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, organizada por Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira é antes de tudo uma obra original, importante e necessária. Original porque não existe na literatura técnica em saúde, na área biomédica brasileira e internacional, pelo menos que eu saiba, algo semelhante em abrangência, profundidade e seleção dos temas abordados; importante pelo público alvo a que se destina, muito além da “Formação de Técnicos de Laboratórios”, abrangendo certamente todos os profissionais de saúde, e é necessária porque servirá como obra de referência para a formação dos mencionados técnicos e de consulta obrigatória para todos os profissionais de saúde que necessitem de esclarecimento dos aspectos técnicos ali abordados.

Versada em cinco volumes e 22 capítulos, organizados em sequência lógica, desde a biossegurança e boas práticas de laboratório, passando por todos os fundamentos das técnicas laboratoriais, bioquímica básica, biologia celular e molecular, histologia e ultraestrutura, até atingir o cerne da prática laboratorial, da imunologia à infectoparasitologia – virologia, bacteriologia, micologia, protozoologia e helmintologia e seus vetores, com a entomologia médica e a malacologia. Os autores que escrevem os respectivos capítulos,

são do melhor nível intelectual e científico, com a titulação de mestres, doutores e especialistas, com grande experiência prática nos assuntos de que tratam.

Parabenizo o Instituto Oswaldo Cruz e a Escola Politécnica Joaquim Venâncio, que patrocinaram esta obra de referência, os quais, desde seus primórdios, valorizaram a qualidade da formação dos seus técnicos e com eles povoaram e estão povoando o Brasil de Norte a Sul e de Leste a Oeste com o que temos de melhor – os fundamentos para uma boa pesquisa. Aproveito esta oportunidade para homenagear a figura de Henry Willcox, que no início da década de 1980, quando o convidei para me ajudar na coordenação dos cursos de pós-graduação em Biologia Parasitária e Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, foi o grande incentivador para criarmos paralelamente o Curso de Técnico em Pesquisa, do qual foi o seu primeiro coordenador.

Igualmente parabenizo as organizadoras desta coletânea e a Fiocruz como um todo, pelo lançamento desta obra pioneira.

José Rodrigues Coura

Pesquisador Titular Emérito
Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC/Fiocruz



“Um sonho quase realizado”

(Oswaldo Cruz 1872-1917)

As alterações pelas quais passa o mundo com a globalização trazem como consequência o surgimento de novos paradigmas tecnológicos, fazendo-se necessário que o ensino da área da saúde atenda às exigências do mundo moderno, do trabalho e do atual perfil do técnico da área.

Os cursos para a formação de técnicos da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz buscam demonstrar os princípios científicos envolvidos com as técnicas laboratoriais, preparando os alunos para as transformações no mundo do trabalho em saúde, decorrentes do desenvolvimento tecnológico e científico. Neste contexto, duas Unidades Técnicas Científicas desta instituição, o Instituto Oswaldo Cruz – IOC e a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – EPSJV, historicamente são as responsáveis por coordenarem cursos e especializações técnicas que se firmaram como modelos desses princípios. Essas Unidades, na área de ensino técnico, sempre estiveram intrinsecamente ligadas, e os professores realizam permanente parcerias entre si. Muitos de nós, egressos desses cursos, são hoje docentes e autores desta coleção.

Além da formação técnica de profissionais em nível regional e nacional, intensificou-se, na Fiocruz, a demanda para o estabelecimento de cooperações técnicas internacionais, que por sua *expertise* e capacidade de produzir, pas-

sou a divulgar conhecimentos, elaborando cursos, metodologias e tecnologias educacionais. A Escola Politécnica é Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a educação de técnicos em saúde, desde 2004.

A ideia da publicação dessa coleção surgiu da necessidade conjunta das duas Unidades da Fiocruz de produzir material didático, que atendesse aos alunos dos cursos de Nível Técnico em Saúde da Fiocruz e de outros locais. Desse modo, o nosso principal desafio é oferecer conteúdo que abarque toda a área técnica de saúde utilizada nos principais cursos de nível médio, e, que ao mesmo tempo, possa manter-se suficientemente atualizado.

Dada a complexidade da estrutura instrumental e pedagógica dos Cursos Técnicos, se fez necessária a publicação de uma coleção, escolhendo-se tópicos de importância básica. Para tanto, foram convidados pesquisadores/professores com experiência em ensino de Cursos de Nível Técnico e de destacado conhecimento nos temas abordados nos 22 capítulos, que constituem os cinco volumes da coleção.

A coleção **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde** tem como objetivo integrar conhecimentos teóricos e práticos, proporcionando ao aluno informações que possibilitem uma permanente reflexão de seu papel como agente transformador dos processos e atividades de ensino, pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. Outro objetivo inconteste destes livros é servir para professores, como norteadores da definição curricular de seus cursos.

Visando garantir a autonomia dos autores, e respectivas responsabilidades, foi mantida a formatação original dos textos, inclusive fotos, figuras, diagramas. Podem ocorrer também, algumas repetições de conteúdo em alguns capítulos, mas, a nosso ver, a retirada de partes de capítulos já abordadas poderia descontextualizar o texto.



O pontapé inicial deste sonho só foi possível pelo incondicional apoio dado pelo professor André Paulo da Silva Malhão, pela Dra. Isabel Brasil Pereira, pessoa-chave desencadeadora do processo, e pela Dra. Tânia Cremonini de Araújo Jorge, que apoiaram e incentivaram institucionalmente o projeto. Agradecemos especialmente aos autores que abraçaram este trabalho com muito entusiasmo e que possibilitaram a sua concretização. É um carinho especial para Josane Ferreira Filho pela organização paciente de nossas reuniões e textos, com a gratidão das organizadoras e autores.

Agradecemos em especial aos renomados cientistas eméritos da Fundação Oswaldo Cruz, doutores Luiz Fernando Ferreira – patrono da EPSJV – e José Rodrigues Coura, que nos deram a honra de apresentar esta coleção.

Esperamos assim, estar contribuindo para a sistematização do conhecimento dos leitores sobre os diversos tópicos abordados em cada capítulo, apresentando cada assunto de forma didática e sintética, recomendando a consulta à literatura especializada sempre que houver necessidade de aprofundamento do conhecimento em determinados temas.

Etelcia Moraes Molinaro
Luzia Fátima Gonçalves Caputo
Maria Regina Reis Amendoeira

Organizadoras



Capítulo 1

Imunologia

Antônio Teva

José Carlos Couto Fernandez

Valmir Laurentino Silva

1. Introdução à Imunologia

A imunologia é uma ciência recente. Sua origem é atribuída, por alguns autores, a Edward Jenner, que, em 1796, verificou proteção induzida pelo *cowpox* (vírus da varíola bovina) contra a varíola humana, nomeando tal processo da vacinação. No entanto, é sabido que, na antiguidade, os chineses já inalavam o pó das crostas secas das pústulas de varíola ou as inseriam em pequenos cortes na pele, em busca de proteção.

O sistema imune é o conjunto de células, tecidos, órgãos e moléculas que os humanos e outros seres vivos usam para a eliminação de agentes ou moléculas estranhas, inclusive o câncer, com a finalidade de se manter a homeostasia do organismo. Os mecanismos fisiológicos do sistema imune consistem numa resposta coordenada dessas células e moléculas diante dos organismos infecciosos e dos demais ativadores, o que leva ao aparecimento de respostas específicas e seletivas, inclusive com memória imunitária, que também

pode ser criada artificialmente, através das vacinas. Na ausência de um sistema imune funcional, infecções leves podem sobrepujar o hospedeiro e levá-lo à morte. Porém, mesmo com um sistema imune funcional, o homem, por exemplo, pode adquirir uma doença infecciosa ou um câncer, pois a resposta imune específica, diante de um agente agressor, leva tempo para se desenvolver e, além disso, tanto organismos estranhos, como células neoplásicas, desenvolvem mecanismos de evasão para fugir da resposta imune.

Neste capítulo, serão abordados conceitos básicos dos principais componentes do sistema imune, os mecanismos de resposta específica ante os diversos agentes infectoparasitários, como também a investigação dos vestígios da passagem desses agentes, por meio de métodos laboratoriais para pesquisa de antígenos e anticorpos específicos, principal propósito desse texto, uma vez que se destina a alunos de escolas técnicas de nível médio.

2. Órgãos, tecidos e células envolvidos na resposta imunitária

2.1. Células que participam do sistema imunitário

As respostas imunes são mediadas por uma variedade de células e por moléculas que estas células expressam (Figura 1). Os **leucócitos** são as células que desempenham as principais ações, mas outras células, que se encontram nos tecidos, também participam da resposta imunitária, enviando sinais e recebendo estímulos dos leucócitos. As células que participam do sistema imunitário se originam na medula óssea, onde muitas evoluem para a fase adulta. A partir da medula, e por meio de vasos sanguíneos, elas migram junto com todos os elementos celulares do sangue. Inclusive as hemácias, que transportam o oxigênio, e as plaquetas que participam da coagulação, uma vez que estes elementos se originam das células-tronco progenitoras da medula. As células que derivam do progenitor mieloide e do progenitor linfóide são as que mais

interessam para o entendimento das ações do sistema imunitário, de modo que, neste texto, não serão considerados os megacariócitos e os eritrócitos.

O progenitor mielóide é o precursor dos granulócitos, fagócitos mononucleares (macrófagos), células dendríticas e mastócitos do sistema imune. Os **macrófagos** são as células fagocitárias mais relevantes. Estas células são a forma diferenciada dos monócitos sanguíneos, que se encontram estrategicamente distribuídos em vários tecidos para dar origem ao **sistema fagocitário mononuclear**. Os microgliócitos são os macrófagos do cérebro, as células de Kupffer são os macrófagos do fígado, os macrófagos alveolares fazem parte do tecido pulmonar, entre outros macrófagos residentes em diferentes tecidos. As funções dos macrófagos se caracterizam pela neutralização, ingestão e destruição de partículas, incluindo os biopatógenos, além de processar e apresentar antígenos para os linfócitos T. Neste contexto, são as **células dendríticas** as mais especializadas na captura e na apresentação de antígenos para os linfócitos T. As células dendríticas imaturas migram do sangue para residirem nos tecidos e realizam tanto a fagocitose quanto a micropinocitose. Após o encontro com um patógeno, maturam rapidamente e migram para os nódulos linfáticos, onde encontram o ambiente adequado para a apresentação de antígenos.

Os **granulócitos** recebem essa denominação por possuírem grânulos em seu citoplasma que se coram densamente por corantes hematológicos tradicionais. São também chamados de **leucócitos polimorfonucleares**, devido às formas de seus núcleos. Existem três tipos de granulócitos, sendo eles os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos; todos com um tempo de vida relativamente curto e produzidos em grande número durante as respostas inflamatórias.

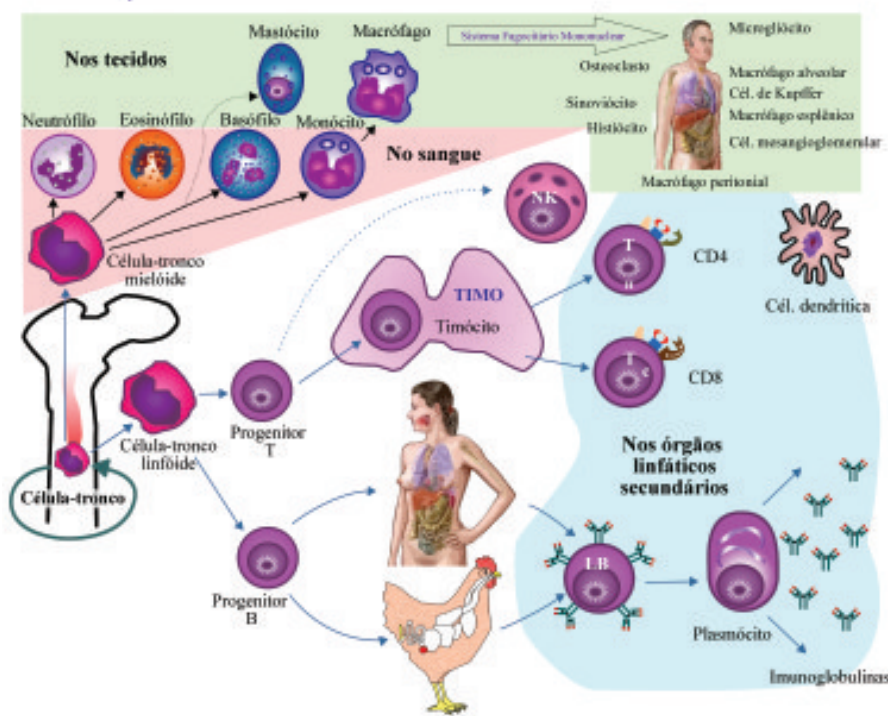
Os **neutrófilos**, assim como os macrófagos e as células dendríticas, são representantes do grupo de células fagocitárias do sistema imunitário, mas, diferentemente destas células, não apresentam antígenos para os linfócitos T. Os neutrófilos são os elementos celulares mais numerosos e importantes da resposta inata.

Os **eosinófilos** parecem ser importantes, principalmente na resposta diante de infecções parasitárias ou processos alérgicos, já que seu número aumenta no curso destas reações.

A função dos **basófilos** provavelmente é similar e complementar à dos eosinófilos e mastócitos.

Os **mastócitos**, cujo precursor parece ser comum aos basófilos, devido a semelhanças funcionais, também se diferenciam ao chegar aos tecidos onde residem. Eles se localizam principalmente à margem dos vasos sanguíneos e liberam mediadores que agem nas paredes vasculares quando ativados.

Figura 1. Células que participam do sistema inunitário



O progenitor linfoide comum dá origem aos linfócitos. Os **linfócitos** são as células que reconhecem, especificamente, os antígenos. Sua morfologia típica consiste em uma pequena célula redonda com núcleo esférico. Apesar da aparência uniforme à microscopia ótica, vários tipos de linfócitos podem ser distinguidos com base nas suas propriedades funcionais e proteínas específicas que expressam. A distinção mais fundamental consiste na classificação destas células em duas linhagens principais, conhecidas como linfócitos B e linfócitos T.

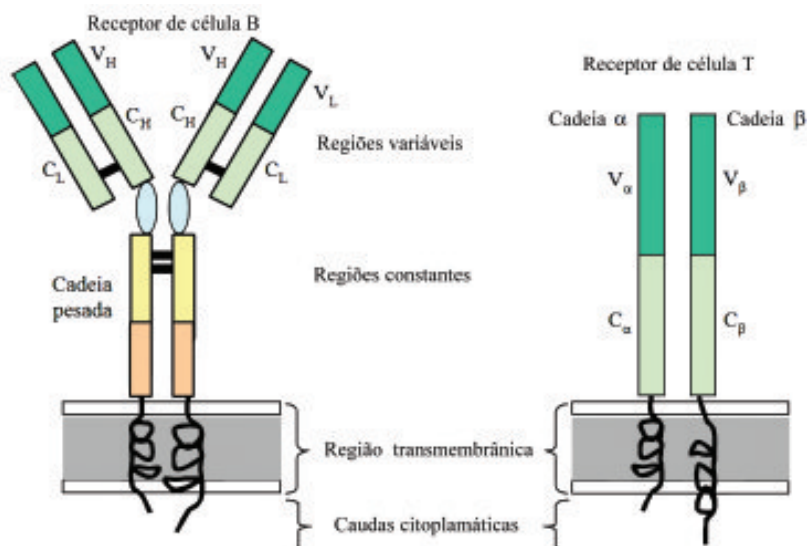
Os **linfócitos B**, também chamados de células B (de bursa ou bolsa de Fabricius, nas aves, e derivadas da medula óssea, nos mamíferos), quando ativadas, proliferam e se diferenciam em células plasmáticas ou **plasmócitos**, que são as células efectoras da linhagem B, cuja função principal é a secreção de anticorpos. Os **linfócitos T**, ou células T (derivados do timo), se apresentam em duas classes principais. Uma se diferencia, quando ativada, em **células T CD8+** ou **citotóxicas**, que matam as células infectadas, ao passo que a outra classe de células T, chamadas de **células T CD4+** ou **auxiliares**, atuam na ativação de outras células, como os linfócitos B e os macrófagos, além de coordenar a resposta imunitária.

O **receptor de antígeno da célula B** (BCR) (Figura 2) é uma forma de anticorpo ligada à membrana que a célula B passa a produzir, após sua ativação e diferenciação em célula plasmática. Os **anticorpos** são moléculas agrupadas em uma classe de substâncias denominadas **imunoglobulinas**, e o receptor de antígeno do linfócito B é também conhecido como **imunoglobulina de membrana**. A **imunidade humoral** é a principal função das células B e dos plasmócitos, e consiste em secretar anticorpos no sangue e em outros líquidos orgânicos, resultando efeitos protetores, mediados por líquidos teciduais.

O **receptor de antígeno da célula T** (TCR) (Figura 2) constitui uma classe heterogênea de proteínas de membrana que, embora estejam relacionadas evolutivamente com as imunoglobulinas, são diferentes delas, já que estão

adaptadas para detectar antígenos derivados de proteínas estranhas ou patógenos que entram nas células hospedeiras. Todavia, em contraste com as imunoglobulinas, os TCRs nunca são secretados, de modo que a célula T precisa migrar até as áreas de lesão para exercer seus efeitos protetores, por meio de contato direto com a célula alvo ou para influenciar as atividades de outras células do sistema imunitário. Juntamente com os macrófagos, as células T desenvolvem uma categoria de resposta imune denominada **imunidade mediada por células**.

Figura 2. Estruturas básicas do receptor de superfície da célula B e do receptor T.



A maioria dos linfócitos virgens possui uma sobrevivência muito curta, sendo programada para morrer em poucos dias após ter saído da medula óssea ou do timo. No entanto, se uma dessas células receber sinais indicando a presença de um imunógeno (antígeno que estimula uma resposta imune específica), ela poderá responder por meio de um fenômeno conhecido como **ativação**, durante o qual pode sofrer vários ciclos de divisão celular.

Algumas das células-filhas retomam ao estado de repouso, tornando-se **células de memória**, que podem sobreviver por vários anos. Estes linfócitos de memória representam uma grande proporção das células do sistema imunitário. A outra progênie do linfócito virgem ativado diferencia-se em **células efetoras**, que sobrevivem apenas alguns dias, mas que, durante este período, executam atividade que resultam em defesa.

Outra classe de células linfoides, chamada de **células matadoras naturais** ou células *natural killer* (NK), é desprovida de receptores antígeno-específicos, sendo parte do sistema imune inato. Essas células circulam no sangue como grandes linfócitos, com diferentes grânulos citotóxicos, e são capazes de reconhecer e matar algumas células anormais, tais como células tumorais e células infectadas por vírus. E parecem ser importantes na defesa contra biopatógenos intracelulares na imunidade inata.

2.2. Os órgãos linfoides e a rede linfática

Os **órgãos linfoides** (Figura 3) são tecidos organizados que contêm grandes quantidades de linfócitos em um ambiente de células não linfoides. Nesses órgãos, as interações que os linfócitos têm com as células não linfoides são importantes, tanto para o desenvolvimento dos linfócitos e o início da resposta imune adaptativa, como para a manutenção dos mesmos. Tais órgãos podem ser divididos em **órgãos linfoides centrais** ou **primários**, produtores de linfócitos, e **órgãos linfoides periféricos** ou **secundários**, que desempenham a função de maximizar o encontro entre os linfócitos e os produtos processados pelas células apresentadoras de antígenos, dando início à resposta imune. Os órgãos linfoides centrais são a **medula óssea vermelha** e o **timo**, um grande órgão localizado na porção superior do tórax. Tanto os linfócitos B como as células T surgem na medula óssea, mas apenas os linfócitos B ali se diferenciam. Os linfócitos T migram para o timo para sofrer seu processo de diferenciação. Uma vez completada sua maturação

celular, os dois tipos de linfócitos entram na corrente sanguínea, migrando para os órgãos linfoides periféricos. Durante a vida intrauterina, o **fígado fetal** desempenha o papel que a medula óssea vermelha passa a desenvolver plenamente após o nascimento.

Os órgãos linfoides periféricos são especializados na captura do antígeno para possibilitar o início das respostas imunes adaptativas. Os microrganismos patogênicos podem penetrar no hospedeiro por muitas portas de entrada, instalando o processo infeccioso em qualquer sítio, mas o encontro do antígeno com os linfócitos acontecerá nos órgãos linfoides periféricos: os nódulos linfáticos, o baço e vários tecidos linfoides associados às superfícies das mucosas. Os linfócitos estão em contínua recirculação entre esses tecidos, para os quais o antígeno também é carregado, vindo de todos os locais de infecção, primariamente dentro de macrófagos e células dendríticas. Dentro dos órgãos linfoides, células especializadas, como as células dendríticas maduras, apresentam o antígeno para os linfócitos.

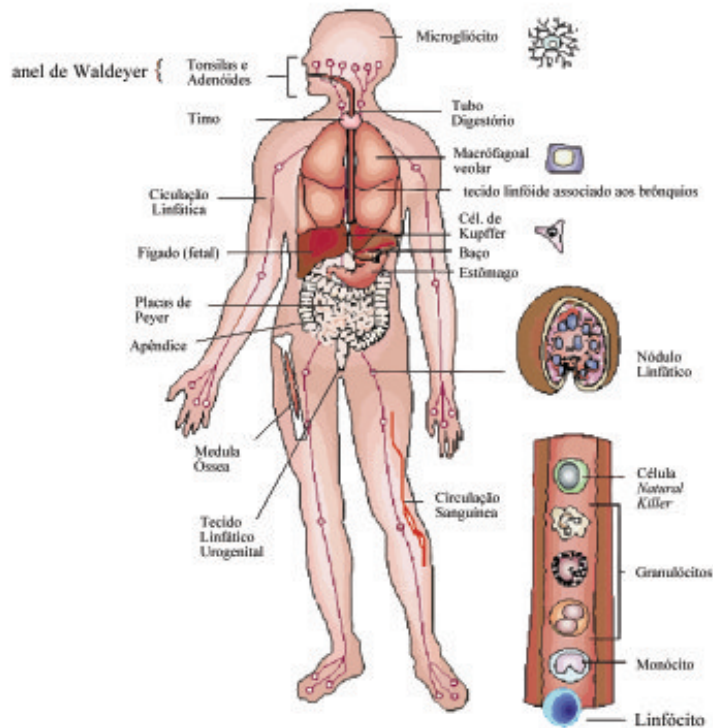
A **rede linfática** consiste em um extenso sistema de vasos que coletam o líquido intersticial, fazendo-o retornar para o sangue. Esse líquido intersticial é produzido continuamente pela passagem de água e solutos de baixo peso molecular através das paredes vasculares que penetram no espaço intersticial, pela secreção celular e outros fatores de excreção. Ao ser parcialmente drenado para os vasos linfáticos, passa a ser chamado de linfa. A linfa flui lentamente pelos vasos linfáticos primários, deságua em vasos linfáticos de calibre progressivamente maior, que convergem para o ducto torácico, e desemboca na veia cava superior, que, por sua vez, devolve todo o volume para a corrente sanguínea, num fenômeno denominado **recirculação**.

Localizados em pontos de convergência da rede vascular, os **nódulos linfáticos** constituem uma série de órgãos encapsulados em forma de “caroço de feijão”, que se distribuem ao longo dos vasos linfáticos. Os

vasos linfáticos aferentes drenam o fluido dos tecidos e carregam antígenos e células infectadas aos seios dos nódulos linfáticos, onde os antígenos são capturados. Os **seios** são revestidos por orifícios minúsculos, que permitem a linfa e seu conteúdo atravessarem o nódulo linfático e entrarem em contato com os linfócitos. Nos nódulos linfáticos, os linfócitos B se localizam em folículos nas áreas corticais, também denominadas **áreas timo-independentes**; as células T são mais difusamente distribuídas em torno das áreas paracorticais, também conhecidas como zonas de células T ou **áreas timo-dependentes**. Alguns dos folículos de células B contêm áreas centrais, denominadas centros germinativos, onde ocorre intensa proliferação dos linfócitos B, após seu encontro com o antígeno específico e células T auxiliares. Por fim, a linfa sai por um vaso linfático eferente no lado oposto do nódulo linfático, numa região conhecida como hilo.

O **baço** encontra-se situado atrás do estômago e filtra o sangue da mesma forma como os nódulos linfáticos filtram a linfa e coletam antígenos. Também captura e se desfaz de células vermelhas senescentes. A massa principal deste órgão é composta pela polpa vermelha e os linfócitos circundam as arteríolas que o penetram, formando áreas da polpa branca, cuja região mais interna é dividida em uma camada linfoide periarteriolar, contendo principalmente células T e revestidas por uma coroa de células B.

Figura 3. Órgãos, tecidos e células envolvidos na resposta imunitária.



2.3. Tecido linfóide associado à mucosa

A expressão **tecido linfóide associado à mucosa** (MALT = *mucosal-associated lymphoid tissue*) é uma descrição geral para os tecidos linfóides não encapsulados, que existem nas regiões subjacentes às mucosas. Os MALTs se distribuem anatomicamente e seus componentes individuais incluem:

- **Anel de Waldeyer** - Anel de estruturas linfóides que circunda a faringe. É formado pelas **tonsilas e adenóides**.
- **Tecido linfóide associado aos brônquios** (BALT = *bronchial-associated lymphoid tissue*) - Agregados linfocitários semelhantes, mas organizados difusamente, que protegem o epitélio respiratório.

- **Tecidos linfoides associados ao intestino** (GALT = *gut-associated lymphoid tissues*) - Incluem **folículos linfoides isolados** e o **apêndice cecal**, além de estruturas especializadas do intestino delgado, as **placas de Peyer**.
- **Tecido linfático urogenital**
- **Entre outros MALTs** (Figura 3).

Coletivamente, estima-se que o sistema imune de mucosa contenha tantos linfócitos quanto o resto do corpo. Esses linfócitos formam um grupo especial de células que seguem leis um tanto diferentes. Embora notavelmente diferentes em sua aparência, os nódulos linfáticos, o baço e os tecidos linfoides associados à mucosa demonstram a mesma arquitetura básica. Cada um deles opera segundo o mesmo princípio, capturando o antígeno nos locais de infecção e apresentando-o a pequenos linfócitos migratórios para, assim, induzirem as respostas imunes adaptativas. Os tecidos linfoides periféricos também proveem sinais de sobrevivência aos linfócitos que não encontram seu antígeno específico. Isto é importante para manter o número correto de linfócitos T e B circulantes, e assegura que somente os linfócitos com o potencial de responder ao antígeno estranho sejam mantidos.

2.4. Recirculação de linfócitos

Os pequenos linfócitos T e B que se diferenciaram na medula óssea e no timo, mas que ainda não se encontraram com o antígeno, são referidos como **linfócitos virgens** ou em repouso. Estes elementos circulam continuamente do sangue para os tecidos linfoides periféricos, nos quais penetram por meio de interações adesivas especiais com os capilares e retornam para o sangue através dos vasos linfáticos ou, no caso do baço, diretamente ao sangue. Na presença de uma infecção, os linfócitos que reconhecem o agente infeccioso são retidos no tecido linfoide, onde proliferam e se diferenciam em **células efectoras**, capazes de controlar a infecção.

Quando ocorre uma infecção tecidual, os antígenos são capturados por células dendríticas, que se deslocam do sítio da infecção pelos vasos linfáticos aferentes para os nódulos linfáticos. Nos nódulos linfáticos, essas células processam e apresentam o antígeno aos linfócitos T que estão recirculando, os quais elas ajudam a ativar. As células B que encontram o antígeno, à medida que migram através do nódulo linfático, também são detidas e ativadas com o auxílio de algumas células T ativadas. Uma vez que esses linfócitos específicos tenham passado por um período de proliferação e diferenciação, eles deixam os nódulos linfáticos como células efetoras através dos vasos linfáticos eferentes.

3. Células T: desenvolvimento, diversidade e ativação

Os linfócitos são as únicas células do organismo que expressam receptores altamente diversificados para o antígeno, o que permite o reconhecimento de uma grande variedade de substâncias estranhas. Essa diversidade é gerada durante o processo de desenvolvimento dos linfócitos T e B, a partir de células precursoras. O desenvolvimento dos linfócitos T *alfa beta* ($\alpha\beta$) e *gama delta* ($\gamma\delta$) segue estágios sequenciais, consistindo na recombinação somática e expressão dos genes do TCR, proliferação celular, seleção induzida pelo antígeno e aquisição de fenótipos de capacidade funcional. Essas células se originam de precursores do fígado fetal ou da medula óssea de adultos e completam o seu desenvolvimento no timo. As células T em desenvolvimento no timo são chamadas de **timócitos**. A maioria dos timócitos imaturos não expressa o TCR ou os correceptores CD4 e CD8 e migram através do córtex, onde os eventos de maturação ocorrem quando expressam pela primeira vez o TCR e iniciam a maturação em células CD4 ou CD8.

Os níveis de proliferação e apoptose são extremamente altos nos timócitos corticais, onde cerca de 95% morrem antes de chegar à região medular do timo. O resultado desse processo seletivo é a restrição ao MHC próprio e a tolerância a muitos autoantígenos. A diferenciação funcional e fenotípica em

células T CD4 ou CD8 ocorre na medula tímica, e as células T maduras são liberadas para a circulação.

3.1. Receptores de antígenos e moléculas acessórias dos linfócitos T

Os linfócitos T respondem aos antígenos peptídicos, que são expostos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). O início desta resposta requer o reconhecimento específico do antígeno pelas células T, a adesão estável das células T às APCs e a transdução dos sinais ativadores. Cada um desses eventos é mediado por moléculas distintas, expressas pelas células T. As moléculas de MHC e os peptídeos formam um complexo na membrana plasmática das APCs. O receptor que reconhece esse complexo peptídeo-MHC é o TCR (Figura 2), que é distribuído clonalmente, ou seja, os clones de linfócitos que apresentam diferentes especificidades expressam distintos TCRs. Os sinais bioquímicos, que são acionados na célula T pelo reconhecimento do antígeno, não são transduzidos pelo TCR, mas por proteínas não variáveis chamadas CD3 e *dzeta* (ζ), que estão ligadas de forma não covalente ao receptor do antígeno para formar o complexo TCR. Portanto, nas células T, o reconhecimento do antígeno é basicamente realizado por dois grupos de moléculas: um receptor para o antígeno altamente variável, o TCR, e proteínas sinalizadoras não variáveis (CD3 e cadeia ζ). Outras moléculas acessórias funcionam como moléculas de adesão para estabilizar a ligação das células T às APCs, permitindo que o TCR mantenha íntimo contato com o antígeno durante o tempo suficiente para a transdução dos sinais necessários à ativação dessas células.

As células T que expressam o TCR $\Upsilon\delta$ pertencem a uma linhagem distinta das células T restritas ao MHC. A percentagem das células T $\Upsilon\delta$ é muito variável nos diferentes tecidos das diferentes espécies, normalmente não excedendo mais do que 5%. Elas não reconhecem os antígenos peptídeos

associados às moléculas MHC e não são restritas ao MHC. Alguns clones dessas células reconhecem uma pequena molécula que pode ser apresentada por moléculas similares às da classe I do MHC, ou seja, uma apresentação não clássica de moléculas normalmente encontradas nas microbactérias e em outros microrganismos. A diversidade limitada das células $\Upsilon\delta$ sugere que os ligantes desses receptores são bem conservados. Elas podem iniciar a resposta imune contra um pequeno número de microrganismos antes mesmo do recrutamento das células T antígeno-específicas $\alpha\beta$.

Além dos componentes do complexo TCR, as células T apresentam várias proteínas de membrana, as quais exercem papel crucial na resposta destas células no reconhecimento do antígeno. Essas moléculas presentes na membrana de linfócitos ligam-se especificamente a outras moléculas da membrana de outras células, como as APCs, células do endotélio de vasos e da matriz extracelular. Essas moléculas não apresentam regiões variáveis, não são polimórficas, são idênticas em todas as células T de todos os indivíduos de uma mesma espécie, e são responsáveis pela transdução de sinais bioquímicos para o interior das células T. Essa propriedade assegura que as células T e as APCs permaneçam ligadas o tempo suficiente para permitir aos TCRs a oportunidade de localizar, reconhecer e responder ao complexo peptídeo-MHC na APC.

3.2. Correceptores CD4 e CD8: Receptores envolvidos na ativação

As moléculas CD4 e CD8 são proteínas das células T que se ligam às regiões não polimórficas das moléculas de MHC e transduzem os sinais que, juntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR, iniciam a ativação das células T. Normalmente, as células T $\alpha\beta$ maduras expressam CD4 ou CD8, embora existam referências da expressão de ambos os marcadores. Esses correceptores interagem com as moléculas de MHC, quando o TCR reconhe-

ce de forma específica o complexo peptídeo-MHC na APC. Cerca de 65% das células T $\alpha\beta$ maduras do sangue e dos tecidos expressam o correceptor CD4 e 35% do CD8.

4. Natureza dos antígenos

O **antígeno** (do grego *anti*, contra e *gen*, gerar) é qualquer substância solúvel, celular ou particulada que pode ser especificamente ligada por um anticorpo ou por um receptor de antígeno de célula T. Os antígenos possuem duas propriedades: a da **imunogenicidade**, que é a capacidade de induzir uma resposta imune específica, e a da **antigenicidade**, que é a capacidade de interagir com os linfócitos T ou linfócitos B já sensibilizados. Assim, todas as substâncias imunogênicas são também antigênicas. As moléculas que desencadeiam a resposta imune são chamadas de **imunógenos**. Pequenas substâncias químicas não são capazes de estimular uma resposta e, portanto, recebem o nome de **hapteno**. Para ter capacidade de induzir uma resposta imune, o hapteno é ligado a uma macromolécula, que é chamada de **carreadora**. O complexo hapteno-carreador, ao contrário do hapteno livre, pode atuar como um imunógeno.

4.1. Determinante antigênico

Os sítios de ligação dos anticorpos e dos TCRs interagem com uma área muito pequena das macromoléculas antigênicas, que é chamada de **determinante antigênico** ou **epitopo**. Portanto, é a menor porção da molécula responsável pela ligação ao linfócito ou anticorpo. A presença de vários determinantes iguais é chamada de polivalência ou multivalência e cada um pode ser ligado por uma molécula com região variável. As superfícies celulares, incluindo os microrganismos, geralmente possuem uma grande quantidade de determinantes antigênicos.

4.2. Relação filogenética dos antígenos

A estimulação de linfócitos de galinhas com proteína de pato resulta em uma resposta imune muito baixa. Por outro lado, se inoculadas em galinhas, proteínas de coelho, a resposta imune é bastante elevada. Isto acontece porque quanto mais próxima for a relação filogenética, menor será o estímulo e vice-versa. Existe pouca diferença entre as proteínas de galinhas e patos e muita diferença entre as proteínas de aves e mamíferos. Embora este conceito da relação filogenética reflita boa parte das aplicações imunológicas, não pode ser tomado como regra. A indução de uma resposta imune muito específica é função direta da semelhança biológica entre a fonte do antígeno e o animal receptor, ainda que seja menos intensa. Lebres e coelhos pertencem à mesma família e são bastante semelhantes, tanto morfológica quanto fisiologicamente. Portanto, ao se injetar proteínas de coelho em lebre, poderá se obter anticorpos muito específicos, ou seja, anticorpos que só reagem contra proteína de coelho.

4.3. Peso molecular e complexidade molecular

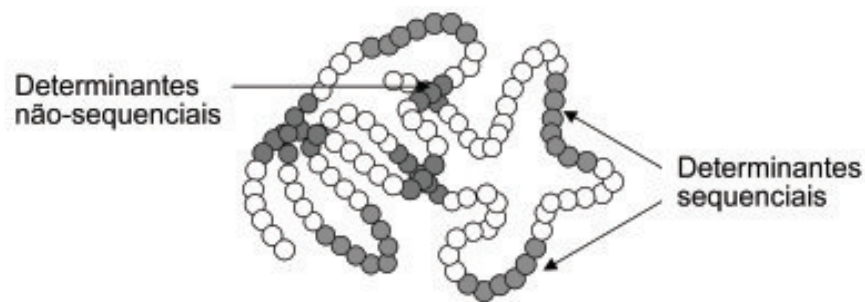
Na maioria dos antígenos, quanto maior for a molécula, maior será o número de epitopo; e quanto maior a complexidade, maior será a imunogenicidade. Um antígeno complexo contém vários determinantes antigênicos, onde alguns dos quais são mais eficientes na indução da resposta imune e são chamados imunodominantes.

4.4. Configuração espacial e acessibilidade

A imunogenicidade e a antigenicidade de uma proteína não depende apenas de sua estrutura primária (isto é, da sequência de aminoácido), mas também das estruturas secundárias, terciárias e até quaternárias. Assim, se tratarmos uma proteína pelo calor, ou agentes químicos desnaturantes, e inocularmos esta em um animal, poderemos obter a formação de anticorpos com especificidade diferente do que se inoculássemos a proteína intacta. A configuração espacial de

diversos epitopos em uma única molécula de proteína pode influenciar a ligação do anticorpo de várias formas (Figura 4). A área importante para a imunogenicidade deve ficar acessível, na superfície da molécula.

Figura 4. Distribuição dos determinantes antigênicos sequenciais e não sequenciais em uma macromolécula proteica



4.5. Forma de administração e adjuvantes

A dose do antígeno, a via e o esquema de imunização, assim como o uso de adjuvantes, são fatores atuantes na indução da resposta imune. As vias de inoculação subcutânea, intradérmica e intramuscular levam geralmente os imunógenos para os nódulos linfáticos regionais, e, mais frequentemente, induzem a imunidade celular. Os antígenos inoculados por via endovenosa e intraperitoneal acumulam-se predominantemente no baço, e mais frequentemente induzem a uma imunidade humoral. O adjuvante melhora a imunogenicidade de compostos com ele misturado, sem interferir na especificidade da resposta. Em medicina preventiva, são muitas vezes adicionados às vacinas para reduzir a dose e a frequência de injeções dos antígenos utilizados para a imunoprofilaxia de doenças infecciosas. Normalmente, o antígeno é aprisionado por ele, formando depósitos, o qual é liberado aos poucos por período de tempo mais extenso. Com isso, há o aumento do tempo de exposição do antígeno no organismo pelo retardamento de sua

destruição, estimulando, assim, a migração de células para o local de inoculação e aumentando a interação destas células com o mesmo. O tipo de adjuvante mais comumente usado em estudos experimentais é o adjuvante de Freund, que pode ser classificado em dois tipos: AIF (Adjuvante Incompleto de Freund), que é constituído por óleo mineral neutro e lanolina ou Arlacel; e o ACF (Adjuvante Completo de Freund), que além do óleo mineral neutro mais lanolina, é adicionado um componente bacteriano, normalmente o *Mycobacterium*, morto pelo calor. Além desses, outros adjuvantes são utilizados, como o sulfato de alumínio, o hidróxido de alumínio, a IL-12, entre outros. Dependendo da composição, adjuvantes podem ou não ser usados em seres humanos.

Bases químicas da especificidade antigênica

Anticorpos formados contra determinadas substâncias têm uma reação forte contra elas, principalmente se os anticorpos interagem com os antígenos específicos que induziram a sua formação (**antígenos homólogos**), mas podem reagir com a mesma ou menor intensidade com outros antígenos, que são chamados de **antígenos heterólogos**, porém com estrutura semelhante. Essas reações com antígenos heterólogos são denominadas **reações cruzadas**. As reações cruzadas podem ocorrer basicamente em função da similaridade entre dois diferentes determinantes antigênicos, ou ainda pelo fato de dois antígenos diferentes apresentarem o mesmo determinante antigênico.

5. Diversidade das imunoglobulinas

Os **anticorpos** são conceituados como glicoproteínas globulares com função imunitária e pertencem à superfamília das imunoglobulinas. São sintetizados por linfócitos B e, principalmente, por plasmócitos, em resposta ao estímulo imunogênico. Interagem, especificamente, com os imunógenos, que estimulam sua biossíntese; desencadeiam vários mecanismos na fase efetora

da resposta imune que, frequentemente, resultam em anular a ação de biopatógenos, por meio da ativação do sistema complemento, opsonização dos antígenos para fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em que os anticorpos marcam os microrganismos para serem destruídos pelas células do sistema imune inato e reações de hipersensibilidades, entre outras ocorrem.

Estas funções são estruturalmente separadas na molécula e a região de ligação ao antígeno varia amplamente, sendo conhecida como região variável ou região V. A região molecular que participa da função efetora é conhecida como região constante ou C, e não varia do mesmo modo, embora apresente cinco formas principais que se especializaram na ativação de diferentes mecanismos.

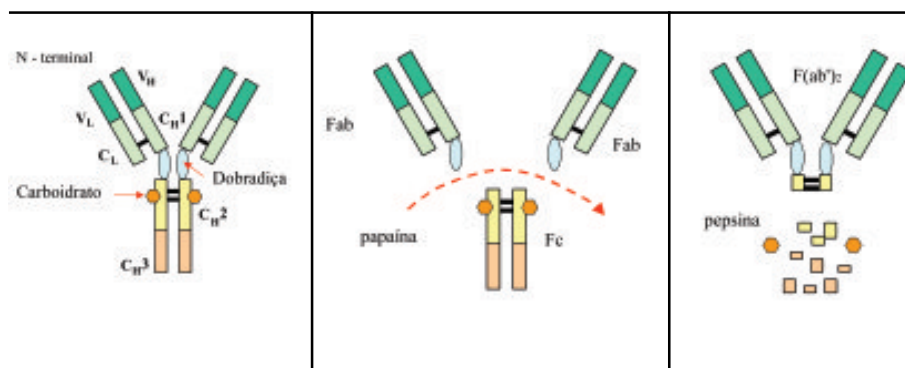
A notável diversidade das moléculas dos anticorpos é consequência de um mecanismo altamente especializado, pelos quais os genes expressos são reunidos por rearranjos de DNA, que juntam dois ou três diferentes segmentos para formar um gene de região variável durante o desenvolvimento das células B. Subseqüentes rearranjos nucleicos podem reunir o gene composto da região variável e qualquer gene da região constante, produzindo assim anticorpos de cada um dos 5 isotipos.

Estruturalmente (Figura 5), a imunoglobulina é formada por duas cadeias leves (L-*light*-leve), idênticas, constituídas de polipeptídeos de cerca de 25 mil Daltons e de duas cadeias pesadas (H- *heavy*- pesado), também idênticas, com peso molecular de 50 mil Daltons ou mais. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por pontes dissulfídricas. O número exato e as posições destas pontes entre as cadeias diferem entre as classes e subclasses de Imunoglobulinas. Além disso, ambas as cadeias, leves e pesadas, possuem uma região variável e outra constante. Portanto, a imunoglobulina possui na cadeia leve uma região constante (C_L) e uma variável (V_L). O mesmo na cadeia pesada, uma região constante (C_H) e uma variável (V_H). Existem dois tipos de cadeias leves, a *kappa* (κ) e a *lambda* (λ). Em humanos, 60% das

cadeias leves são do tipo *kappa*, e 40% são do tipo *lambda*. Os primeiros 110, ou mais, aminoácidos da região aminoterminal das cadeias leves ou pesadas variam muito entre os anticorpos de especificidade diferentes e por isto são chamadas de região variável.

A molécula de imunoglobulina pode ser digerida por enzimas proteolíticas. A digestão pela papaína quebra a molécula em três fragmentos (Figura 5): dois fragmentos chamados **Fab** (*fragment antigen binding*), que se liga ao antígeno específico, e um fragmento denominado **Fc** (*fragment crystallizable*, fragmento cristalizável), por formar cristais quando armazenado em locais frios. Os fragmentos Fab são os que contêm as cadeias leves (L) completas, emparelhadas com os domínios V (variável) e C (constante) da cadeia pesada, enquanto o Fc, contém apenas o domínio C (constante). A papaína cliva a molécula na porção aminoterminal das pontes de enxofre, permitindo que as metades carboxiterminais da Fc permaneçam unidas, deixando o fragmento Fc livre. Já a pepsina, cliva na mesma região, mas na porção carboxiterminal das pontes dissulfídicas, produzindo o $(Fab)'_2$, onde os dois braços dos Ac permanecem unidos.

Figura 5. Estrutura básica de uma imunoglobulina e a formação dos fragmentos pela digestão enzimática.



5.1. Geração da diversidade na resposta imune humoral e maturação da afinidade

Mesmo a resposta a um Ag simples é diversa, com muitas moléculas de Igs, cada uma com afinidade única e especificidade acurada. Durante a organização dos diferentes segmentos genéticos necessários para produzir uma molécula de Ig, combinações ao acaso dos diferentes componentes gênicos produzem uma enorme diversidade potencial.

Durante as fases iniciais do desenvolvimento do linfócito B, a IgM de membrana é produzida como receptor. A mudança de isotipo em células B ocorre ao serem estimuladas pelo antígeno. Isto assegura a manutenção da mesma região variável, garantindo a especificidade ao Ag correspondente, expressa nos diferentes isotipos, aos quais orientam diferentes funções efetoras. Uma diferença básica entre o Ac produzido na resposta primária e na resposta secundária é a sua afinidade. O Ac da classe IgM, produzido para um Ag na resposta primária, tende a ser de afinidade relativamente baixa e pode contar com uma avidéz adicional, causada por sua estrutura pentamérica, para ligar-se eficientemente ao Ag. Entretanto, a IgG e outras classes produzidas na resposta secundária tendem a ter uma afinidade maior. Vale ressaltar que o aumento gradual da afinidade do Ac pelo Ag indutor, que é observado no curso de uma resposta, acontece no nódulo linfático. Este fenômeno (maturação da afinidade) é a consequência da hipermutação somática dos genes de Ig acoplada com a seleção das células B com Ig de superfície de alta afinidade. A maturação da afinidade, no curso de uma resposta imune, pode ser encarada como um processo darwiniano, requerendo primeiro a geração de variabilidade nos receptores de células B e então a seleção daqueles com maior afinidade pelo Ag. Após esse processo, as células B, que se ligam ao Ag de modo bem-sucedido e sobrevivem à seleção, saem do centro germinativo do nódulo linfático para tornarem-se células B de memória ou células plasmáticas secretoras de Ac.

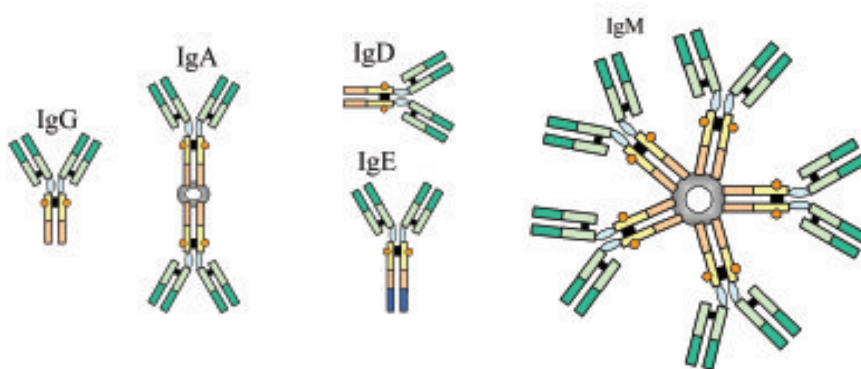
5.2. Distribuição e propriedades dos isotipos

Os agentes infectoparasitários devem achar seus caminhos para a maior parte dos locais do organismo hospedeiro, e os anticorpos também devem ser amplamente distribuídos para contê-los. Os anticorpos são distribuídos por difusão através de mecanismos especiais, para levá-los, por exemplo, para os pulmões e o intestino. Anticorpos de diferentes isotipos (Figura 6) operam em locais diferentes. Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune humoral são sempre as IgMs. Estes são produzidos antes que a célula B tenha sofrido hipermutação somática; portanto, tendem a ser de baixa afinidade, como visto anteriormente. Estas moléculas formam pentâmeros, cujos 10 sítios de ligação com o Ag podem se unir simultaneamente a antígenos multivalentes, tais como os polissacarídeos de parede celular bacteriana. Esta estrutura pentamérica também torna a IgM capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, o que contribui para o controle mais eficiente de uma infecção. Quanto à IgD, não se conhece muito bem a sua função, mas parece exercer um papel na diferenciação dos linfócitos B induzida pelo Ag. O principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos fluidos extracelulares é a IgG, considerando todas as subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). A IgG tem propriedades diversas, dentre as quais, confere proteção ao feto, pois é a única classe de imunoglobulina humana que pode ser transportada através da placenta diretamente para a corrente circulatória do feto. A IgG também atua na neutralização de toxinas, imobilização de bactérias, sensibilização para NK, ativação do complemento e opsonização.

A IgA é a principal imunoglobulina presente em secreções externas, como saliva, muco, suor, suco gástrico e lágrimas. Além disso, é a principal imunoglobulina contida no colostro e no leite, e deve ser no neonato a principal fonte de proteção contra patógenos no intestino. A IgA se divide em duas subclasses, IgA1 e IgA2. A IgA presente no plasma é encontrada na forma monomérica e em pequenas concentrações, enquanto a forma dimérica é

encontrada em grandes concentrações nas regiões mucosas do organismo. Estas previnem a invasão de bactérias ou a penetração de toxinas nas células epiteliais. A IgE está difundida de maneira moderada nos espaços extravasculares e tem como principal propriedade a sensibilização de mastócitos e basófilos, promovendo reação inflamatória, através da liberação de mediadores químicos como a histamina, que, por sua vez, promove vasodilatação, permitindo a passagem de Acs do vaso para a área lesada, e fatores quimioatraentes que recrutam fagócitos para o local de infecção. Além disso, podem estar envolvidas em processos alérgicos e na ajuda para eliminação de helmintos, quando sensibilizam eosinófilos.

Figura 6. Estrutura dos cinco principais isotipos de imunoglobulinas humanas



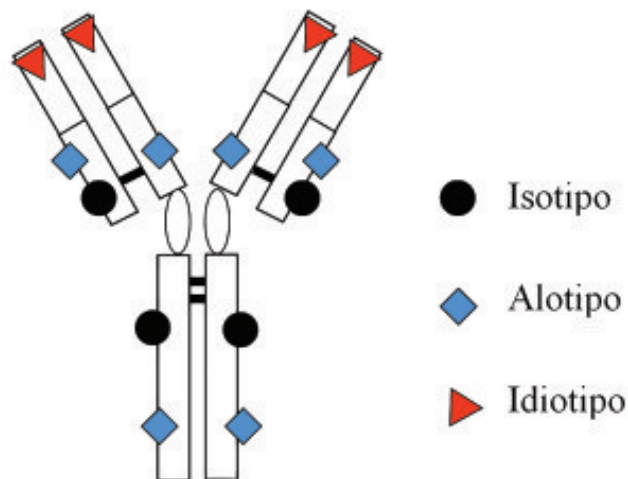
5.3. Polimorfismo das imunoglobulinas

Quando uma Ig é usada como Ag, ela é tratada como qualquer outra proteína estranha e faz desencadear uma resposta de Ac. Pode ser produzido Ac anti-Ig que reconheça aminoácidos característicos do **isotipo** do Ac injetado. Também é possível gerar Acs que reconhecem diferenças no Ac de membros da mesma espécie e tal fenômeno se deve à variação genética ou polimorfismo. Tais variantes alélicas são chamadas de **alotipos** e representam

pequenas diferenças polimórficas nos loci, que codificam as regiões constantes das cadeias leves e pesadas. Contrastando com os Acs anti-isotipos, os Acs anti alotipos reconhecerão Ig de um dado isotipo em alguns representantes de uma dada espécie. Finalmente, as variações na sequência dos epitopos de uma Ig são conhecidas como **idiotipos** (Figura 7).

Para a produção de Acs altamente específicos, a clivagem pela papaína (Figura 5) é essencial, pois esta enzima, como já foi dito anteriormente, corta a molécula antes das pontes de sulfeto, o que mantém a porção Fc inteira, e a produção dos Ac serão altamente específicas contra a região Fc daquele isotipo. Quando se deseja uma molécula de Ac que não reaja com o sistema complemento e não se fixe em receptores para Fc de superfície celular, cliva-se a Ig com a pepsina, que corta depois das pontes de sulfeto, o que mantém a fração $(Fab')_2$ íntegra, permitindo a ligação específica com o alvo desejado e impossibilitando as ações efectoras características do isotipo.

Figura 7. Localização das variações isotípicas, alotípicas na molécula de imunoglobulina.



5.4. Anticorpos monoclonais

Em 1975, Georges Köhler e Cesar Milstein planejaram um método para a preparação do **anticorpo monoclonal (Ac mo)**, através da fusão da célula B ativada normal produtora de anticorpo com uma célula do mieloma (uma célula plasmática cancerosa). Neste evento, produziram uma célula híbrida (hibridoma), que possuía as propriedades de crescimento imortal da célula do mieloma e secretava o Ac produzido pela célula B.

Os clones resultantes das células do hibridoma que secretam grandes quantidades de **Ac mo** podem ser indefinidamente cultivadas. Os hibridomas de células B são produzidos utilizando polietilenoglicol (PEG) para fundir as células do mieloma com as células B de animais que foram imunizados com o Ag, através do qual se deseja produzir os anticorpos. As células do mieloma contribuem para o crescimento imortal das células fusionadas, e as células B contribuem com a informação genética para a síntese do Ac específico de interesse. As condições do procedimento devem permitir seletivamente a sobrevivência e o crescimento somente dos hibridomas. Para tal, é utilizado o meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). Neste meio, a aminopterina bloqueia a síntese de DNA pela via de *novo*. Na presença de aminopterina, as células devem usar a via de salvamento, onde as enzimas catalisadoras são a fosforribosiltransferase hipoxantina-guanina (HGPRT) ou a timidina quinase (TK), para produzir o DNA. Uma mutação em qualquer uma destas duas enzimas bloqueia a habilidade da célula em usar a via de salvamento. Portanto, células do mieloma sozinhas morrerão, pois são deficientes para as enzimas HGPRT ou TK, essenciais para a via de salvamento. Somente as híbridas irão sobreviver, pois a célula B contribui com a enzima que falta para a via de salvamento. Embora as células B não fusionadas sejam capazes de sobreviver no meio HAT, estas não vivem por períodos extensos *in vitro* e morrem.

Após a obtenção dos hibridomas, estes devem ser diluídos e distribuídos em placas de cultura apropriada numa concentração de 0,5 célula por poço. Tal procedimento nos dará a certeza de que o Ac produzido seja oriundo de

um único clone, pois como não existe meia célula, teoricamente, teremos um poço vazio e outro com apenas uma célula. Feito isso, cada hibridoma, após multiplicação e produção de Ac, será examinado por teste sorológico, tendo em vista a identificação dos hibridomas desejados, ou seja, aqueles que sintetizam o anticorpo monoclonal que reaja com o Ag correspondente. Uma vez identificados, os hibridomas são induzidos à proliferação, tornando-se assim uma fonte inesgotável de anticorpos altamente específicos.

Os **Ac mo** são muito úteis como reagentes para diagnóstico, exames de imagem e procedimentos terapêuticos na clínica médica. Para diagnóstico, podem ser utilizados na detecção de gravidez, diagnóstico de numerosos microrganismos patogênicos, medidas de níveis sanguíneos de várias drogas, tipagem sanguínea, tipagem de antígenos de histocompatibilidade, caracterização fenotípica de diversos tipos celulares e detecção de antígenos produzidos por determinados tumores. Por exemplo, para esse propósito, **Ac mo** radiomarcados podem ser utilizados *in vivo* na detecção ou localização de antígenos tumorais, permitindo diagnósticos precoces de alguns tumores primários ou metastáticos nos pacientes. Na imunoterapia, o **Ac mo** específico para um determinado Ag tumoral de superfície, acoplado com um quimio ou radioterápico, pode ser potente agente terapêutico.

6. Sistema completo

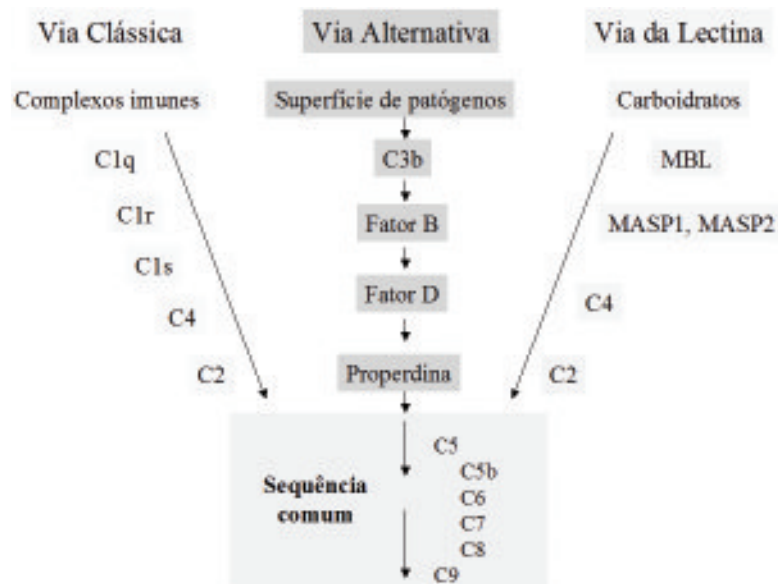
O nome complemento foi originado a partir da atividade complementar de proteínas na ação bactericida de alguns Acs. O sistema complemento é um complexo proteico existente no plasma, sob a forma inativa, constituído por substâncias termolábeis e/ou termoestáveis; e que tem como função a eliminação de um agente estranho pela ativação de mecanismos inespecíficos, que se constitui de:

- **Fagocitose** - quando algumas proteínas ativadas do complemento unem-se a bactérias, opsonizando-as para ingestão pelos fagócitos portadores de receptores do complemento;

- **Reação inflamatória** - quando os pequenos fragmentos de proteínas promovem eventos vasculares e recrutam fagócitos ao local da atividade inflamatória.
- **Lise** - quando uma vez desencadeada a cascata, os componentes terminais do complemento lesam certas bactérias, vírus e células com a formação de poros na membrana celular.

Além dessas três funções, o sistema complemento também é responsável pela **depuração imune**, que consiste na remoção de complexos imunes da circulação no baço e no fígado. Este sistema, com cerca de 30 proteínas ou mais, interage por ativação enzimática. O complemento pode agir sozinho ou com Ac e são conhecidas 3 vias, a clássica, a alternativa e a via das lectinas. A via clássica é ativada por complexos imunes, enquanto as vias alternativa e das lectinas são ativadas por microrganismos. Todas as vias de ativação convergem para uma etapa final de reação em cadeia denominada **sequência comum** (Figura 8).

Figura 8. Vias de ativação do sistema complemento



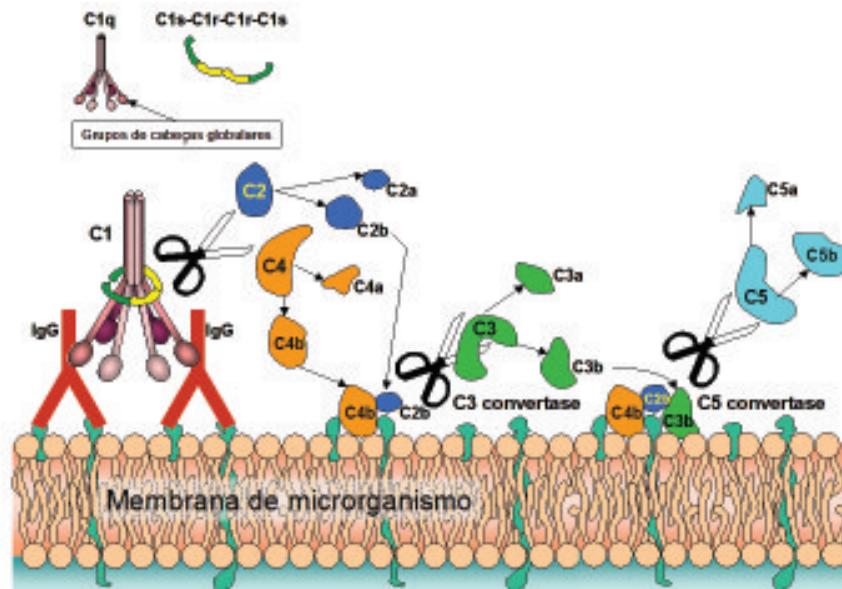
No processo de ativação, que envolve uma série de etapas proteolíticas, uma proteína precursora inativa é clivada para fornecer um grande fragmento ativo; esta se une à superfície celular e contribui para a próxima clivagem, e um pequeno fragmento peptídico que é liberado serve como mediador de resposta inflamatória. Cada uma das três vias de ativação gera uma convertase de C3 por um caminho diferente, determinando que as principais moléculas efetoras e os eventos tardios sejam os mesmos para as três vias. É importante lembrar que a ativação inadequada e a persistência dos efeitos inflamatórios são potencialmente prejudiciais ao organismo, de modo que a sua regulação precisa ser bem rigorosa. E uma das maneiras de controle se resume ao pouquíssimo tempo que os componentes-chaves permanecem ativos (milésimos de segundos), a menos que se liguem a uma superfície celular. Além da curta vida-média dos fragmentos do complemento, existem vários pontos na via de ativação, nos quais podem atuar proteínas reguladoras, o que previne a ativação inadvertida do complemento sobre células do hospedeiro e evita a lesão de células do organismo.

Quanto à nomenclatura, todos os componentes da via clássica são designados pela letra C, seguida por uma designação numérica simples: C1, C2. Os componentes foram numerados pela ordem de descoberta e não segundo a sequência de reações (C1, 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9). Quanto aos produtos de clivagem, são designados por letras minúsculas, onde o maior fragmento recebe a letra **b** (exceto o fragmento C2, que recebe a letra **a**) e o menor, a letra **a**. Os componentes iniciais da via alternativa, em vez de serem numerados, são indicados pelas letras maiúsculas **B** e **D**, e seus produtos de clivagem também são designados pelas letras **b** e **a**, onde o maior fragmento é **Bb** e o menor, **Ba**. Quanto aos componentes ativados, recebem uma linha horizontal superior, por exemplo, \overline{Bb} .

6.1. Ativação da via clássica

O componente C1 é um complexo formado por três proteínas C1q, C1r e C1s. Uma vez formado o complexo Ag-Ac, o componente C1q se liga na região Fc do Ac, dando início a uma reação em cascata, onde C1q ativa duas moléculas de C1r capazes de se ligar a outras duas de C1s, resultando no complexo **C1q-C1s-C1r-C1r-C1s**, que é uma serina protease. Desta forma, **C1s** atua em C4 e C2, dissociando-as em C4a e C4b, C2a e C2b. Nesta etapa, a união de **C4b** a **C2b** (em alguns livros, C2a) forma a C3 convertase. Após a formação da **C3 convertase**, esta cliva C3 em C3a e C3b. O **C3** é a fração mais abundante no plasma e o mais importante entre os componentes do complemento, pois inúmeras moléculas de C3b podem se ligar à superfície de um patógeno. Alguns fragmentos C3b se ligam a receptores da membrana e atuam como opsoninas, facilitando a fagocitose, outros fragmentos de C3b se ligam a C3 convertase, originando a C5 convertase (C4bC2bC3b) da via clássica (Figura 9), que vai atuar em C5 dissociando-o em C5a e C5b. Com a dissociação de C5, inicia-se uma etapa comum a todas as vias de ativação do complemento, onde a fração C5b interage com C6, que abre um sítio de ligação para C7. Por sua vez, o complexo C5bC6C7 deposita-se na superfície da membrana e abre o sítio de ligação para C8, que penetra na membrana da célula. O C8, então, abre um sítio para C9, que, após a ligação de vários C9, forma um canal transmembrânico ou poro hidrofílico, chamado de complexo de ataque à membrana (MAC), ocasionando lise celular e desequilíbrio osmótico. É importante ressaltar que no curso da cascata do sistema complemento, os fragmentos menores C4a, C2a, C3a e C5a liberados no interstício, são potentes mediadores inflamatórios.

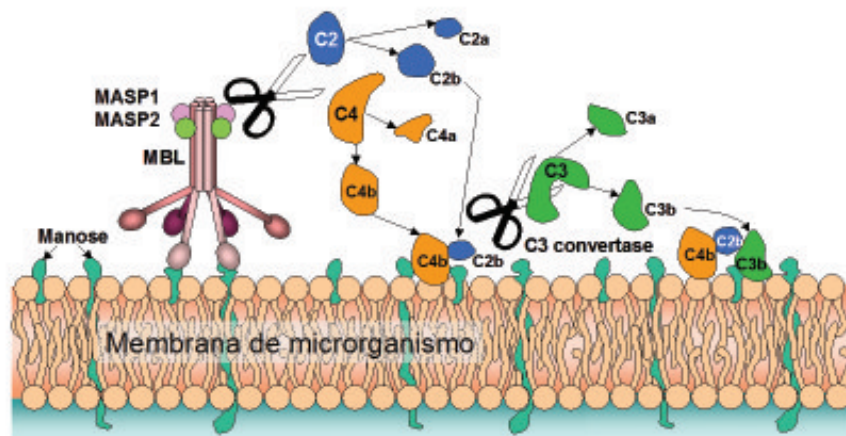
Figura 9. Ativação da cascata do complemento pela via clássica.



6.2. Via das Lectinas

A via das lectinas (Figura 10) é semelhante à via clássica. As lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, que se ligam a carboidratos e podem ativar a via clássica do complemento na ausência do complexo antígeno-anticorpo. A principal lectina é a proteína ligadora de manose (**MBL**), que faz o papel de C1q ao se ligar à resíduos de carboidratos da superfície de uma bactéria ativadora ou outras substâncias. A MBL está associada com duas pró-enzimas MASP-1 e MASP-2 (Serina Protease Associada a MBL). Quando a MBL se liga aos grupamentos manose terminais nos carboidratos bacterianos, MASP-1 e MASP-2 são ativadas e continuam a ativar a via clássica.

Figura 10. Ativação da cascata do complemento pela via das lectinas



6.3. Via Alternativa

Com exceção da etapa inicial, os eventos da via alternativa (Figura 11) são homólogos aos da via clássica e das lectinas. A via alternativa é constantemente ativada, em taxa muito reduzida, a qual aumenta drasticamente na presença de superfícies ativadoras adequadas, como as membranas celulares de microrganismos. Esta via pode ser ativada pela ligação do C3b ou de uma forma hidrolizada espontaneamente, conhecida como iC3b, à superfície do patógeno. Este se liga ao fator B, formando C3bB, componente suscetível ao fator D, uma protease do plasma. O fator D cliva o componente B em Ba e Bb, onde Bb permanece ligado ao C3b, formando a molécula C3bBb que é a C3 convertase da via alternada. A C3 convertase da via alternativa produzirá mais C3b, tornando o sistema mais ativo, pois muitos fagócitos possuem receptores para este componente. A C3 convertase da via alternativa é extremamente instável e, por isso, costuma sofrer rápida dissociação. No entanto, uma proteína plasmática denominada properdina se liga a esta convertase e a estabiliza, diminuindo sua degradação e permitindo a continuação da cascata.

Nesta via, alguns C3b se ligam ao C3bBb e formam a C5 convertase da via alternada **C3b₂Bb** ou **C3bBbC3b**. Este complexo cliva C5 em C5a e C5b, dando início a sequência comum, onde C5b inicia o complexo de ataque à membrana, ligando-se a C6, C7, C8 e C9 (Figura 12).

Figura 11. Ativação da cascata do complemento pela via alternativa.

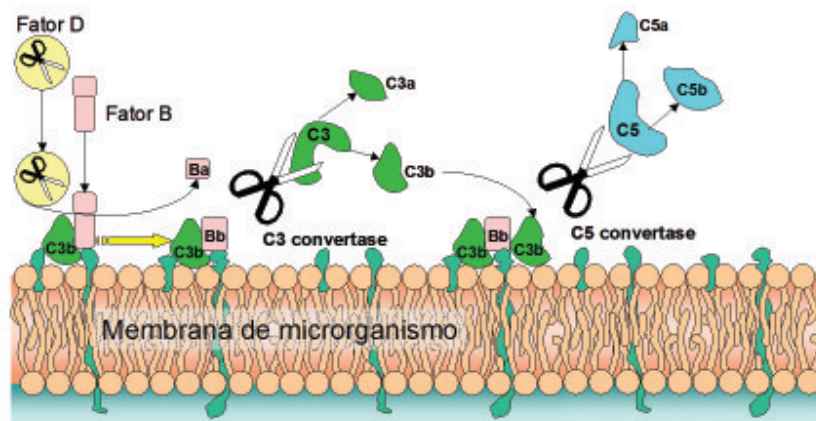
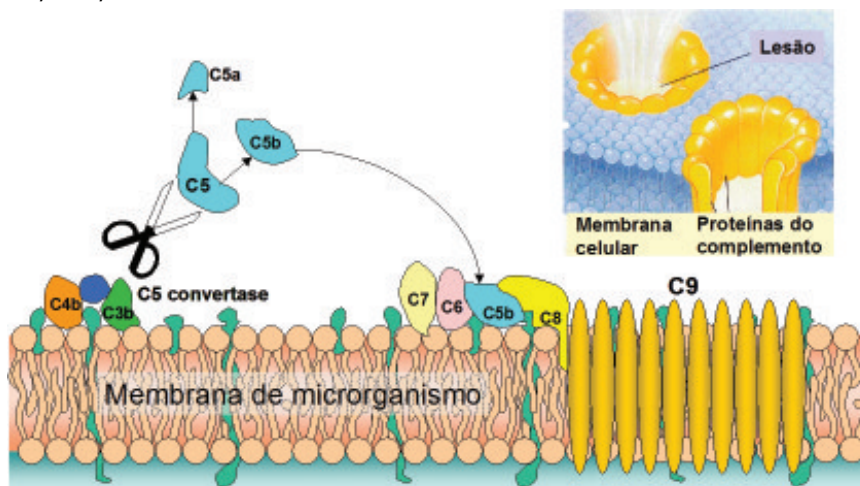


Figura 12. Sequência final da cascata do complemento comum a todas as vias de ativação, onde C5b inicia o complexo de ataque à membrana, ligando-se a C6, C7, C8 e C9.



7. Complexo principal de histocompatibilidade

Todo organismo multicelular possui algum sistema de defesa que distingue agentes infectoparasitários e elimina-os do hospedeiro. Mais ainda, os grandes vertebrados têm um sistema imune mais evoluído que pode discriminar o que é estranho e fazer uma resposta seletiva para o mesmo. A vantagem de tal imunidade específica é a rápida adaptação do sistema imune aos agentes patogênicos que são mais frequentemente encontrados no meio ambiente local. Esta capacidade é conseguida através do complexo principal de histocompatibilidade, cujos produtos desempenham um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio e não próprio. A identificação das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) aconteceu pela investigação da sua função na resposta imunológica aos tumores, na rejeição de transplantes de pele e no controle da resposta imune.

7.1. Estrutura das moléculas do MHC

Os genes que codificam as moléculas do MHC estão localizados no cromossomo 6 humano e no 17 em camundongos, denominados antígenos leucocitários humanos (HLA) e de histocompatibilidade (H-2), respectivamente. O MHC pode ser dividido em quatro subconjuntos de genes ou classes: classes I, II, III e IV, sendo os de classe I e II ligados ao processamento e apresentação de antígenos, enquanto os genes que compõem as classes III e IV codificam para outras proteínas, estando algumas relacionadas com a resposta imune, tais como componentes do sistema complemento, algumas citocinas, etc. Em humanos, existem três *loci* que codificam as moléculas de classe I, os quais são denominados HLA-A, HLA-B e HLA-C, e três *loci* gênicos do MHC de classe II, que são denominados HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Normalmente, um indivíduo herda duas cópias de cada *locus* gênico (um de cada progenitor). Assim, em humanos, temos seis *loci* de classe I e seis *loci* de classe II. Todos esses *loci* apresentam alto grau de polimorfismo, ou seja,

apresentam múltiplos alelos na população. As moléculas do MHC de classe I, que estão presentes na maioria das células nucleadas, são reconhecidas principalmente pelo TCR de linfócitos T CD8, ao passo que as moléculas de classe II, presentes principalmente na superfície das células apresentadoras de antígenos profissionais, são reconhecidas pelo TCR dos linfócitos T CD4.

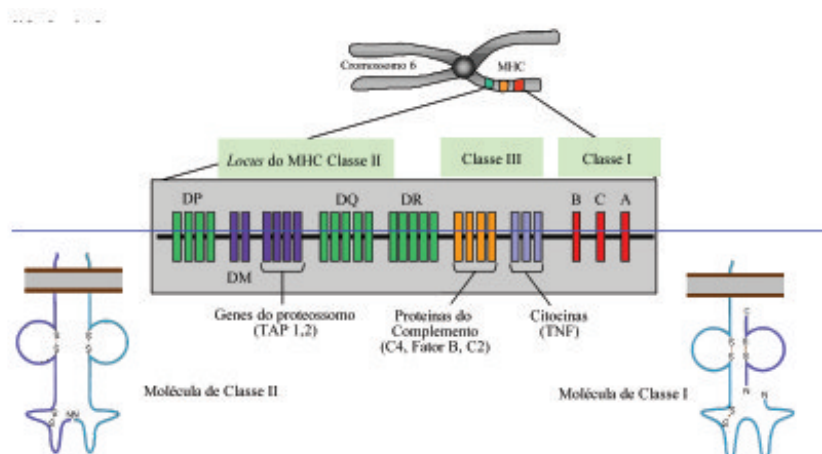
7.2. MHC de classe I

As moléculas do MHC de classe I são expressas na membrana celular da maioria das células nucleadas dos vertebrados. Sua estrutura é constituída por uma cadeia α (*alfa*) de aproximadamente 45kDa, que atravessa a membrana plasmática. A outra é a $\beta 2$ -microglobulina de 12kDa que se encontra fracamente ligada à membrana. Os genes que codificam a cadeia α (variável) estão localizados dentro da região genômica do MHC, enquanto os genes que codificam a $\beta 2$ -microglobulina (invariável) estão localizados fora da região do MHC no cromossomo 15 humano. A cadeia α é formada por três segmentos $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. A região em que o peptídeo se liga corresponde à região amino-terminal e é composta pelos segmentos $\alpha 1$ e $\alpha 2$, que formam uma fenda ou bolsa onde ele se encaixa. O tamanho dessa fenda permite ligar peptídeos de 8 a 11 aminoácidos e corresponde à região do MHC de classe I que interage com o TCR do linfócito T. Por essa razão, os antígenos proteicos precisam ser processados para gerar peptídeos, pequenos o suficiente para se ligarem à molécula do MHC. A região invariável, que corresponde ao segmento $\alpha 3$, se liga ao correceptor CD8 do linfócito T. Essa ligação confere a especificidade da molécula de classe I com a célula T CD8. O domínio α , também se liga de forma não covalente à molécula $\beta 2$ -microglobulina, sendo esse complexo estabilizado pelo peptídeo processado que se liga nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (Figura 13). Somente nessa forma estável a molécula do MHC de classe I é expressa na superfície das células.

7.3. MHC de classe II

As moléculas do MHC de classe II também são expressas na membrana celular. Mas estas são expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos profissionais. Essas células incluem as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B. A molécula de classe II é formada por uma cadeia α e uma β . A cadeia α tem 32-34kDa, enquanto a cadeia β tem 29-32kDa (Figura 13). As duas cadeias do MHC de classe II são codificadas dentro da região genômica do MHC e ambas são polimórficas, ou seja, são variáveis. As cadeias α e β , na porção extracelular, possuem domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e $\beta 1$ e $\beta 2$, onde a porção variável das duas cadeias são os segmentos $\alpha 1$ e $\beta 1$, conforme pode ser visto na Figura 13. Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ interagem para formar a fenda de ligação ao peptídeo, que estruturalmente é bastante similar à molécula do MHC de classe I. Esta fenda, ou bolsa é onde se encaixa o peptídeo a ser apresentado à célula T. Assim, como é de se esperar, esta também é a região da molécula do MHC de classe II que apresenta maior variabilidade. Na molécula de classe II, as extremidades da fenda de ligação do peptídeo são abertas, o que permite a ligação de peptídeos de 10-30 aminoácidos, mas pode ocorrer ligação de peptídeos maiores, o que não acontece com a molécula de classe I que tem as extremidades fechadas.

Figura 13. As três classes de genes no MHC humano e a expressão dos produtos de classe I e II.



7.4. Processamento e apresentação de antígenos às células T CD8

Antígenos apresentados pelas moléculas de MHC de classe I são, na maioria das vezes, gerados dentro da mesma célula que produziu a molécula de classe I. Os peptídeos gerados são derivados de proteínas que se encontram no citosol da célula, que podem ser da própria célula, de origem viral ou de outros microrganismos intracelulares e antígenos tumorais. Os antígenos, em geral proteínas presentes no citoplasma, são degradados em peptídeos por um complexo multiproteolítico denominado proteassoma. Esses peptídeos são transportados do citoplasma para o retículo endoplasmático rugoso por intermédio de uma proteína transportadora de antígeno (TAP). Os peptídeos transportados pela TAP para dentro do retículo endoplasmático se ligam à molécula nascente do MHC classe I, tornando-a estável. Assim, o complexo resultante, MHC classe I e peptídeo, deixam o retículo endoplasmático e movem-se para o complexo de Golgi, do qual é transportado para a superfície da célula onde é reconhecido pela célula T CD8.

7.5. Processamento e apresentação de antígenos às células T CD4

As moléculas do MHC de classe II também se ligam a peptídeos originados da degradação proteica, mas, geralmente, os peptídeos resultam da proteólise de moléculas endocitadas ou partículas fagocitadas pelas APC. As partículas são internalizadas em vesículas intracelulares, denominadas endossomas, que se fundem com lisossomas, contendo enzimas proteolíticas. A vesícula resultante dessa fusão é chamada fagolisossoma. O processo de degradação do antígeno ocorre em condições ácidas, que é o pH ótimo para a ação das enzimas proteolíticas, e os peptídeos originados da degradação se ligam na fenda da molécula do MHC de classe II. Quando recém-sintetizada no retículo endoplasmático, a molécula do MHC de classe II tem a fenda protegida por uma proteína denominada cadeia invariante (Ii). Desse modo, a fenda do MHC classe II não pode acomodar peptídeos presentes no retículo

endoplasmático. Essa molécula de classe II é, então, direcionada para os fagolisossomas, onde se encontram os peptídeos exógenos resultantes da proteólise dos antígenos. Nos fagolisossomas, as enzimas proteolíticas digerem a cadeia II; porém, não totalmente, restando o fragmento chamado peptídeo de classe II, associado à cadeia invariante (CLIP = *class II associated invariant chain peptide*). Com a remoção do CLIP, por meio da molécula HLA-DM, o peptídeo processado pode se ligar à fenda da molécula de classe II e ser reconhecido especificamente pelos linfócitos T CD4.

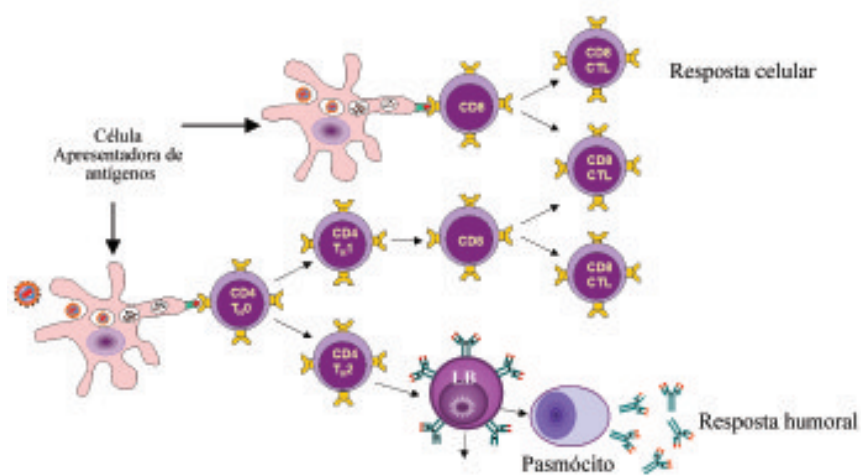
8. Resposta celular e resposta humoral

Se a resposta inata for suficiente para anular a ação de um agente infectoparasitário, não ocorrerá ativação da resposta imune adaptativa e, portanto, não formará memória imunitária. Por outro lado, caso ocorra persistência da infecção, devido aos mecanismos de escape desse agente, haverá a necessidade da ativação da resposta imune adaptativa. Em função da natureza do agente infectoparasitário e da forma com que seus antígenos são processados, a resposta imune adaptativa pode seguir dois caminhos distintos, que levam à proliferação de células CD8+ (resposta celular predominantemente Th1) e à secreção de anticorpos por células B e plasmócitos (resposta humoral predominantemente Th2) (Figura 14). Th1 e Th2 não são sinônimos de resposta celular e humoral. Existe predomínio, mas células Th2 são funcionais, e existem anticorpos IgG ligados ao Th1.

A imunidade mediada por células se desenvolve por uma rede de interações que resulta em defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro de fagócitos ou de outras células. Os antígenos de patógenos processados no citosol, fora de vesículas ácidas, são conduzidos até a superfície celular pela molécula de classe I e apresentados para as células T CD8+ que eliminam diretamente a célula infectada, enquanto os antígenos de patógenos processados em vesículas ácidas são apresentados pelas moléculas de classe II às células

T CD4+, que podem se diferenciar em dois tipos: CD4+Th1, que ativam células mononucleares (macrófagos e linfócitos) e CD4+Th2, que induzem a proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos produtores de anticorpos.

Figura 14. Esquema geral da resposta celular e humoral

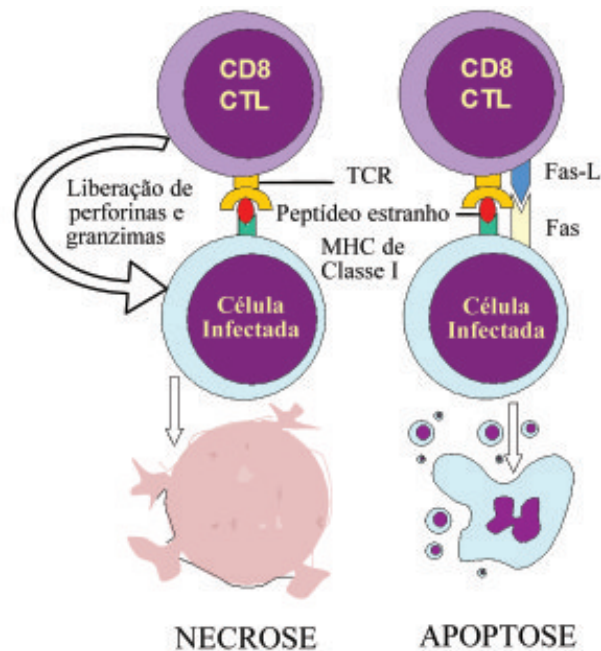


8.1. Resposta celular e o mecanismo de ação das células T CD8+

Os linfócitos T CD8+ ativados se diferenciam em células T citolíticas (CTL), que destroem somente as células portadoras do antígeno associado a produtos de classe I do MHC, não danificando a célula vizinha durante o evento. O mecanismo de ação pode ocorrer pela lise direta através das **enzimas perforinas** e **granzimas**, como também pela indução de **apoptose**. No primeiro processo, após a ligação do TCR/CD3 com o antígeno via MHC I, os microtúbulos da célula CD8+ se movem para a área de contato com a célula alvo, e os grânulos contendo as enzimas citolíticas também se aglomeram nesta região. Neste contato, as proteínas formadoras de poros (perforinas) entram em contato com concentrações de Ca⁺⁺ e sofrem polimerização. Esta

polimerização forma um canal permeável a íons na membrana plasmática da célula alvo, levando a um desequilíbrio osmótico e lise (Figura 15). Além de lise direta, as células CD8+ CTL produzem IFN- γ , que estimula a atividade fagocitária de macrófagos, inibe diretamente a replicação de vírus e induz a expressão de moléculas de classe I. O segundo mecanismo de destruição de célula-alvo envolve a interação da molécula ligante de Fas, denominada Fas-L e presente no CTL, com a molécula Fas (CD95), presente na célula alvo. Essa interação leva a célula-alvo à apoptose, que também pode ser induzida pela ação das granzimas. Neste evento, as células acometidas condensam o citoplasma e a cromatina, formando os corpos apoptóticos, que serão fagocitados rapidamente por células vizinhas sem a formação de reação inflamatória adjacente (Figura 15). Um efeito adicional da apoptose é a ativação de enzimas celulares que degradam genomas virais em até 200 pares de bases e seus múltiplos.

Figura 15. Necrose e apoptose induzidas por células T citotóxicas



8.2. Mecanismo de ação das células CD4+ Th1 e CD4+ Th2

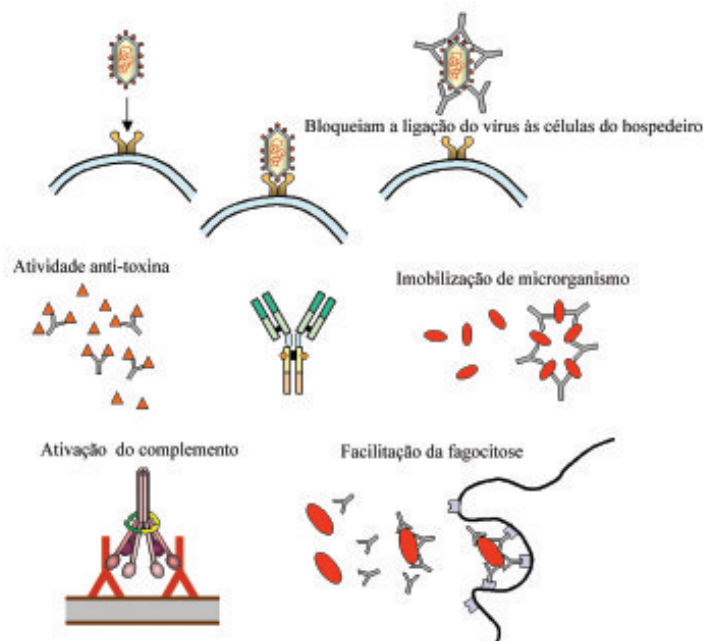
Alguns microrganismos como *Mycobacterium* spp são patógenos intracelulares que crescem em vesículas, onde são parcialmente protegidos da ação dos anticorpos e das células CD8 CTL. Estes normalmente inibem a fusão destas vesículas com o lisossomo, prevenindo sua destruição. Diante disso, esses microrganismos são eliminados normalmente quando estas células são ativadas através de citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , produzido pelas células CD4+Th1.

O processo de ativação, através do contato dos macrófagos com as células CD4+Th1, gera uma série de ações bioquímicas que convertem o macrófago numa potente célula anti bacteriana. Estas reações são: fusão do fagossomo com o lisossomo, expondo as bactérias às enzimas lisossomais; aumento da expressão de MHC de classe I e classe II; expressão de receptor de TNF- α e secreção de TNF- α , que junto com o IFN- γ , sinergiza para o aumento da ação bactericida, resultando na produção de óxido nítrico (NO) e oxigênio reativo (O_2); secreção de IL-12, que orienta a diferenciação de células Th0 para Th1; e secreção de IL-10, que inibe a produção de IFN- γ e serve para amortecer os efeitos lesivos da ativação exacerbada de macrófagos nos tecidos. Quando um patógeno resiste aos efeitos iniciais da resposta imune celular, pode-se evoluir para uma inflamação crônica, consistindo intenso infiltrado mononuclear e proliferação de tecido conjuntivo característico de inflamação inespecífica ou por um padrão de inflamação crônica que se distingue pela formação de granuloma que se caracteriza por agregados de macrófagos ativados, os quais assumem uma aparência epitelióide circundados por linfócitos T. Frequentemente, mas não invariavelmente, células gigantes multinucleadas, que derivam da fusão de vários macrófagos, são encontradas em granulomas mais antigos. As células CD4 Th1 e Th2 participam regulando tais granulomas com produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, prevenindo a disseminação dos patógenos e lesões tissulares.

8.3. Resposta humoral

Muitas bactérias importantes nas doenças infecciosas humanas se multiplicam nos espaços extracelulares do organismo, e a maior parte dos patógenos intracelulares se dissemina de uma célula para outra através dos fluídos extracelulares. A resposta imune humoral conduz à destruição dos microrganismos extracelulares e seus produtos, como, por exemplo, as toxinas; além de também prevenir ou diminuir a disseminação das infecções intracelulares, através da **neutralização** desses agentes. Os anticorpos também facilitam o reconhecimento de microrganismos por células fagocitárias, permitindo que assim sejam ingeridos e digeridos, como ativam o **sistema complemento**, potencializando a opsonização, recrutando células inflamatórias para o local da infecção e lisando certos microrganismos pela formação dos poros em suas membranas (Figura 16).

Figura 16. Alguns mecanismos efetores da resposta mediada por anticorpos



Nesta resposta, a ativação das células B e sua diferenciação em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas é deflagrada pelo antígeno específico e requer a participação de células CD4 Th2 (Figura 14), que também controlam a mudança de isotipo e desempenham papel importante na hipermutação somática, o que é necessário para a maturação da afinidade dos anticorpos, que ocorre no curso da resposta humoral. A imunoglobulina de superfície funciona como receptor de antígenos, ou BCR, e realiza dois papéis na ativação: a transdução de sinal direto para o interior da célula, quando se une ao antígeno e a condução desses antígenos aos sítios intracelulares, para ser degradado e levado à superfície do linfócito B, onde, por sua vez, são reconhecidos por CD4 Th2 antígenos específicos. Esta resposta dependente da célula T é chamada de **timo-dependente (TD)**. Porém, alguns antígenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, podem ativar diretamente linfócitos B, e tal resposta é chamada de **timo-independente (TI)**.

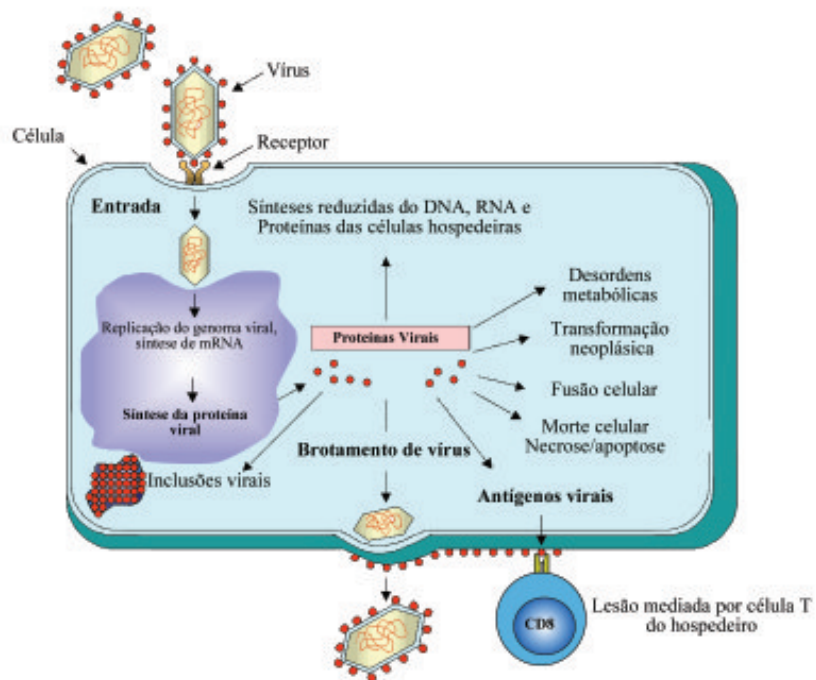
Anticorpos de alta afinidade neutralizam toxinas, vírus e bactérias. Mas, podem não resolver o problema, pois muitos agentes não são neutralizados pelos anticorpos e devem ser removidos por outros meios. Assim, o papel dos anticorpos nestas situações é ativar outras células (células efetoras acessórias), que tenham receptores para Fc de Imunoglobulina. Dentre essas, podemos citar macrófagos e neutrófilos, que ingerem bactérias recobertas por IgG; assim como as NK, que lisam diretamente parasitos recobertos por IgG; e ainda células infectadas com vírus, recobertas também com IgG. Tal fenômeno acontece por um mecanismo denominado citotoxicidade celular, dependente de anticorpo (ADCC). Além da ADCC, via IgG, exercida pela NK, o mesmo fenômeno pode ser observado por meio da IgE, onde as células citotóxicas são os eosinófilos, e a importância da ADCC via IgE se deve ao fato de que alguns parasitos não são mortos diretamente por fagocitose, somente através dos mediadores liberados por estas células. A IgE também participa na sensibilização e ativação de mastócitos promovendo liberação de substâncias que dilatam vasos sanguíneos e recrutam células inflamatórias.

9. Resposta imune aos agentes infectoparasitários

O ambiente em que vivemos é povoado por muitas espécies de microrganismos onde uma pequena parcela tem a capacidade de causar doenças. O sistema imune evoluiu no sentido de promover ações que resultem na defesa contra estes microrganismos, contribuindo para a recuperação e manutenção da homeostase. Os agentes infectoparasitários diferem em sua patogenicidade e virulência. A patogenicidade refere-se à capacidade de um organismo causar doença, e a virulência é o grau de patogenicidade. Portanto, a patogenicidade depende das características do agente, do estado imunitário do hospedeiro e dos determinantes socioambientais. Em indivíduos com sistema imunitário normal, os agentes infectoparasitários devem ser suficientemente virulentos para se estabelecer e causar infecção. Por outro lado, indivíduos com sistema imunitário debilitado, agentes pouco virulentos, tais como os comensais, podem causar lesões graves. Neste tópico serão abordados os principais mecanismos de resposta às ações dos vírus, bactérias, protozoários e helmintos que parasitam o organismo humano.

Os vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios, que se replicam no interior das células e podem causar lesão tecidual e doença, por vários mecanismos (Figura 17). A replicação viral interfere com a síntese e com as funções normais das proteínas celulares, levando à lesão da célula infectada e à morte. Este é o efeito citopático, e se diz que a infecção é lítica. Vírus não citopáticos podem causar infecções latentes, durante as quais residem nas células do hospedeiro e produzem proteínas estranhas ao mesmo tempo em que estimulam a imunidade específica. Em decorrência, as células infectadas são reconhecidas e mortas pelas células CTL. As proteínas virais também podem estimular as reações de hipersensibilidade tardia (DTH), e a lesão celular é uma consequência direta das respostas imunes fisiológicas contra os vírus.

Figura 17. Mecanismos pelos quais os vírus lesionam as células



Os principais mecanismos de imunidade inata aos vírus envolvem a estimulação direta de IFN α/β pelas células infectadas, que funcionam inibindo a replicação viral e lise das células infectadas pelas células NK. Além desses mecanismos, a ativação do sistema complemento e a fagocitose servem para eliminar vírus de locais extracelulares. Na imunidade específica, combina-se a resposta celular com a resposta humoral. Os anticorpos específicos se ligam às proteínas do envelope ou do capsídeo, impedindo a fixação do vírus na célula hospedeira e, conseqüentemente, impedindo sua penetração (Figura 16). Além disso, os anticorpos IgG opsonizantes também podem potencializar a remoção pela fagocitose (Figura 16) ou destruição das células infectadas através da ADCC via células NK. Embora os anticorpos sejam importantes na imunidade contra vírus, eles não são suficientes para eliminar infecções virais.

Contudo, o principal mecanismo contra uma infecção viral estabelecida é através de uma resposta celular via CD8⁺ citolíticos específicos, que destroem as células infectadas, estimulam a ação de enzimas intracelulares que degradam genomas virais e secretam citocinas com ação de interferon.

As bactérias extracelulares causam doença de duas maneiras: induzindo reação inflamatória que resulta na destruição tecidual no local da infecção e produzindo toxinas, que possuem diversos efeitos patológicos. Estas podem ser **endotoxinas** (componentes da parede celular bacteriana) ou **exotoxinas** (ativamente secretadas pelas bactérias). Portanto, as respostas imunes contra bactérias extracelulares visam eliminar a bactéria e o efeito de suas toxinas.

O principal mecanismo de imunidade inata é a fagocitose por neutrófilos, monócitos e macrófagos, mas a resistência destas bactérias à fagocitose e a sua digestão é um determinante na virulência. A ativação do sistema complemento na ausência do anticorpo é importante, pois a produção de C3b opsoniza a bactéria e favorece a fagocitose. O MAC lisa diretamente a bactéria e os subprodutos do complemento (fragmentos menores), que participam da resposta inflamatória recrutando e ativando leucócitos. A imunidade humoral específica é a principal resposta protetora contra essas bactérias e consiste do reconhecimento de antígenos proteicos por células CD4⁺ Th2, apresentados via MHC de classe II. Os anticorpos específicos, além de neutralizarem bactérias e suas toxinas, impedindo sua ligação às células alvo, ativam o sistema complemento potencializando suas ações.

Quanto às bactérias que sobrevivem no interior de células hospedeiras, as mais patogênicas são aquelas que sobrevivem no interior dos macrófagos, como as microbactérias. Por serem praticamente inacessíveis aos anticorpos, sua eliminação requer mecanismos diferentes daqueles observados para bactérias extracelulares. O principal mecanismo de imunidade inata contra essas bactérias é através da fagocitose, mas estas podem ativar diretamente ou indiretamente células NK, que promovem uma defesa precoce contra bactérias intracelulares

antes da resposta específica. A principal resposta específica contra essas bactérias é a resposta celular, com atuação de células Th1 (CD4+ e/ou CD8+) que estimulam os macrófagos a produzirem diversas substâncias bactericidas. Desta maneira, as células CD4+ Th1 e CD8+ Th1 atuam em conjunto na resposta celular contra bactérias intracelulares e o mecanismo exercido por uma pode complementar o da outra. É importante salientar que a ativação de macrófagos também pode causar lesão tecidual, manifestada pela reação de hipersensibilidade tardia (DTH ou HT), assim como as observadas nas infecções virais e em outros agentes infectoparasitários.

Em termos muito genéricos, os anticorpos são mais eficazes contra os parasitos extracelulares e os CTLs, contra os intracelulares. Em outras palavras, as citocinas produzidas pelas células T CD4+ podem ser importantes na determinação do resultado da infecção, uma vez que as células Th1 e Th2 possuem um perfil de citocinas contrastante e de contrarregulação, mostrando que o papel das células Th1 e Th2 na determinação do resultado da infecção sugere que as respostas das células Th1 levem à morte dos patógenos intracelulares e que as respostas das células Th2 eliminem os patógenos extracelulares. Todavia, isto é muito mais uma simplificação didática do que o quadro real.

O tipo de resposta que conferirá maior proteção depende da natureza e da fase evolutiva do parasito. Por exemplo, o anticorpo por si só, ou combinado com o complemento, pode danificar alguns parasitos extracelulares, mas será sempre melhor quando atuando com uma célula efetora. Diferentes mecanismos efetores atuarão em uma única infecção contra os diferentes estágios do ciclo de vida do parasito. Assim, na malária, os anticorpos contra as formas livres bloqueiam sua capacidade para invadir novas células, mas as respostas mediadas por células impedem o desenvolvimento da fase hepática nos hepatócitos. A imunidade protetora na malária não se correlaciona simplesmente com os níveis de anticorpos e pode até ser induzida na ausência deles.

O parasito precisa superar os mecanismos de defesa preexistentes no hospedeiro, para que possa se estabelecer com sucesso antes da iniciação da resposta imune específica do hospedeiro. O complemento exerce um papel nesta fase, uma vez que vários tipos de parasitos, incluindo os vermes adultos e as larvas infectantes, possuem moléculas em sua superfície de revestimento que ativam a via alternativa. Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas constituem a primeira linha de defesa. Anticorpos e citocinas, produzidos especificamente em resposta aos antígenos parasitários, potencializam as atividades antiparasitárias de todas estas células efetoras. Entretanto, os macrófagos teciduais, monócitos e granulócitos possuem alguma atividade intrínseca antes mesmo da potencialização.

Os tripanossomos e os parasitos da malária (plasmódios) que penetram no sangue são removidos da circulação por células fagocíticas no fígado e no baço. Antes de agirem como células apresentadoras de antígenos na iniciação de uma resposta imune, os macrófagos atuam como células efetoras que inibem a multiplicação dos parasitos ou até mesmo os destroem. Estas células também secretam moléculas que regulam a resposta inflamatória e potencializam a imunidade através da ativação de outras células. A fagocitose pelos macrófagos fornece uma defesa importante contra os parasitos menores; entretanto, estas células também secretam muitos fatores tóxicos que permitem a destruição dos parasitos sem a internalização. Quando ativados pelas citocinas, os macrófagos podem destruir parasitos extracelulares relativamente pequenos, como os estágios eritrocitários do plasmódio, e também os parasitos maiores, como os estágios larvais do esquistossomo. Os macrófagos também atuam como células exterminadoras através da ADCC.

A ativação dos neutrófilos e macrófagos é uma característica geral dos estágios iniciais da infecção. Todas as funções efetoras dos macrófagos são potencializadas logo após a infecção. Embora sua ativação específica seja induzida por citocinas secretadas pelas células T, como $IFN\gamma$, GM-CSF, IL-3 e IL-4,

mecanismos T-independentes também podem ativá-los. Neste caso, células NK secretam $IFN\gamma$ quando estimuladas pela IL-12 produzida pelos macrófagos.

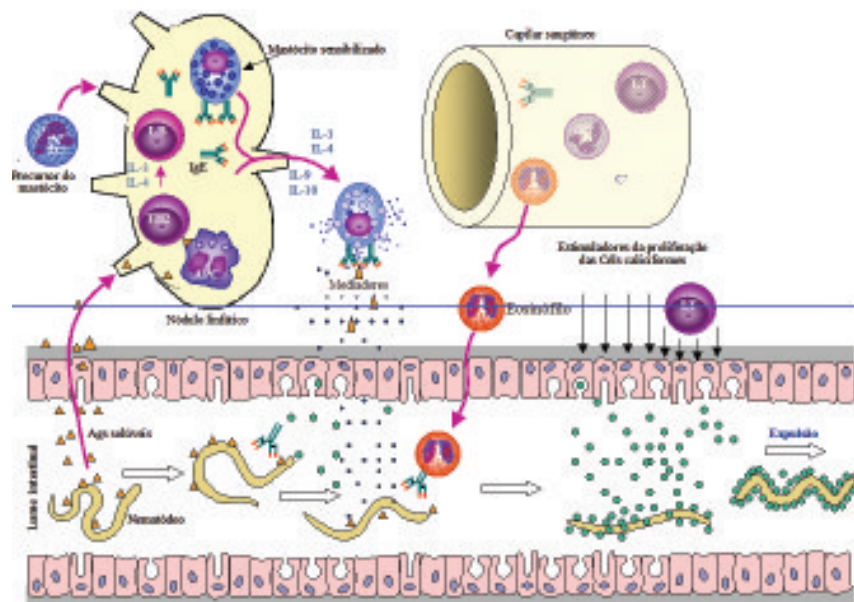
As propriedades efetoras exibidas pelos macrófagos também podem ser apresentadas pelos neutrófilos. Os neutrófilos são células fagocíticas que podem destruir os agressores, seja por mecanismos dependentes de oxigênio, seja por independentes, como o óxido nítrico. Os neutrófilos produzem uma explosão oxidativa mais intensa do que os macrófagos e seus grânulos secretores contêm proteínas altamente citotóxicas. A destruição extracelular pelos neutrófilos é mediada por H_2O_2 , enquanto os componentes granulares estão envolvidos na destruição intracelular dos organismos internalizados. Os neutrófilos estão presentes nas lesões inflamatórias causadas por parasitos e provavelmente atuando na eliminação desses parasitos das células rompidas. Como os macrófagos, os neutrófilos possuem receptores para Fc e receptores para complemento e podem participar das reações citotóxicas dependentes de anticorpo, a fim de destruir as larvas de *Schistosoma mansoni*, por exemplo. Dessa forma, os neutrófilos são mais destrutivos do que os eosinófilos para várias espécies de nematódeos, embora a eficácia relativa dos dois tipos celulares possa depender do isótipo e da especificidade do anticorpo.

Os eosinófilos estão associados a infecções helmínticas e se encontram envolvidos especificamente na defesa contra os estágios teciduais de helmintos, que são grandes demais para serem fagocitados. A reação do mastócito dependente de IgE consta primariamente em localizar os eosinófilos próximos ao parasito e, então, potencializar suas funções antiparasitárias.

Os eosinófilos são células de menor potencial fagocítico perante os neutrófilos, no entanto, sofrem um processo de desgranulação em resposta a distúrbios em sua membrana celular, liberando o conteúdo granular sobre a superfície dos parasitos. O dano aos helmintos pode ser causado pela proteína básica principal (MBP). A MBP não é específica para um determinado alvo, mas o dano às células do hospedeiro é muito pequeno, uma vez que a

proteína fica confinada a um espaço diminuto entre o eosinófilo e o verme. Os eosinófilos e os mastócitos podem agir em conjunto na destruição das larvas de helmintos, onde os produtos dos mastócitos potencializam a ação dos eosinófilos. Desta forma, os antígenos liberados provocam desgranulação local dos mastócitos dependentes de IgE e a liberação de mediadores, que atraem seletivamente os eosinófilos para o local, potencializando ainda mais suas atividades (Figura 18).

Figura 18. Expulsão de helmintos parasitos do lume intestinal



A resposta imune contra *Trypanosoma cruzi* depende não apenas das células T CD4+ e CD8+, mas também das NK e da produção de anticorpos. O mesmo é verdadeiro para a resposta imune contra o *Toxoplasma gondii*. As células NK, estimuladas pela IL-12 secretadas pelos macrófagos, constituem outra fonte de IFN γ . As infecções crônicas normalmente estão associadas com produção reduzida de IFN γ e provavelmente explicam a alta incidência de

tuberculose e toxoplasmose em pacientes com AIDS, os quais possuem números reduzidos de células T CD4+.

Em algumas infecções parasitárias, o sistema imunitário não consegue eliminar o parasito, mas reage isolando o organismo com células inflamatórias. O hospedeiro reage ao antígeno localmente, o que estimula a liberação de citocinas, que por sua vez recrutam as células de defesa para o local afetado. Na esquistossomose, a formação do granuloma é outro exemplo da reação do hospedeiro contra o parasito. Essa reação é uma resposta crônica mediada por células aos antígenos solúveis liberados pelos ovos do parasito no fígado. Os macrófagos se acumulam no local e liberam fatores fibrogênicos que estimulam a formação do tecido granulomatoso. Embora essa reação possa ser benéfica para o hospedeiro, no sentido que isola as células hepáticas das toxinas secretadas pelos ovos dos helmintos, também constitui a maior fonte de dano, provocando alterações irreversíveis no fígado e perda da função hepática.

Em muitas infecções a distinção entre uma resposta mediada por células ou por anticorpo pode ser difícil, dado que ambas atuam em conjunto contra o parasito. A expulsão de alguns nematódeos intestinais ocorre espontaneamente poucas semanas após a infecção primária. Parece haver dois estágios na expulsão, alcançados por uma combinação de mecanismos T-dependentes e T-independentes. Células T (predominantemente Th2) respondem aos antígenos do parasito e induzem a produção de anticorpo pelas células que sofreram proliferação. Ocorre proliferação dos mastócitos da mucosa e hiperplasia das células caliciformes secretoras de muco no epitélio intestinal. Os vermes são danificados por anticorpo e produtos dos mastócitos sensibilizados por IgE, que desgranulam após o contato com o antígeno e liberam a histamina que, por sua vez, aumenta a permeabilidade do epitélio intestinal onde o verme se encontra. Esses processos não são suficientes para eliminar os vermes; portanto, moléculas inflamatórias inespecíficas, secretadas pelos macrófagos, incluindo TNF e IL-1, contribuem para a proliferação das células caliciformes e

provocam aumento na secreção de muco. O muco reveste os vermes e leva à sua expulsão.

Existem inúmeros exemplos de estratégias físicas simples e protetoras nos parasitos. Os nematódeos possuem uma cutícula extracelular espessa que os protege da agressão tóxica. O tegumento dos esquistossomos sofre um espessamento durante a maturação, oferecendo uma proteção semelhante. A superfície frouxa de revestimento de muitos nematódeos pode se desintegrar sob o ataque imune.

A maioria dos parasitos interfere na resposta imune e a imunossupressão é uma característica universal da infecção parasitária, comprometendo tanto as respostas mediadas por anticorpo como as mediadas por células.

Os antígenos solúveis dos parasitos, quando liberados em enormes quantidades, podem prejudicar a resposta do hospedeiro por um processo denominado “distração imune”. Assim, os antígenos solúveis de vários agentes infectoparasitários parecem inativar os anticorpos circulantes, fornecendo uma “cortina de fumaça” e desviando o anticorpo do parasito. Muitos destes antígenos de superfície liberados são formas solúveis de moléculas inseridas na membrana do biopatógeno.

Além dos efeitos destrutivos diretos de alguns parasitos e de seus produtos aos tecidos do hospedeiro, muitas respostas imunes, por si só, possuem efeitos patológicos. Na malária, na tripanossomose e na leishmaniose visceral, o número e a atividade aumentados dos macrófagos e linfócitos, no fígado e no baço, levam ao aumento de tamanho destes órgãos. Na esquistossomose, grande parte da patologia resulta dos granulomas dependentes de linfócitos que se formam ao redor dos ovos no fígado. As alterações significantes que ocorrem nos indivíduos com elefantíase são provavelmente resultado de respostas imunopatológicas às larvas adultas nos linfáticos. A formação de complexos imunes é comum, eles podem ser depositados nos rins, como na síndrome nefrótica da malária, e podem dar origem a várias outras alterações patológicas.

A IgE das infecções helmínticas pode promover desde efeitos brandos à reações severas no hospedeiro, por meio da liberação de mediadores pelos mastócitos, caracterizados por pruridos, eritemas, dificuldades respiratórias ou mesmo choque anafilático.

10. Aplicação e importância do diagnóstico imunossorológico das doenças infecto parasitárias

O diagnóstico sorológico das doenças transmissíveis consiste na investigação da infecção no indivíduo ou na população, mediante a detecção, quantificação e caracterização de variáveis (imunoglobulinas, antígenos, citocinas) presentes no plasma/soro sanguíneo ou em outros materiais biológicos, tais como amostra fecal, urina, saliva, escarro ou tecidos.

O desenvolvimento de novas informações científicas está relacionado com os progressos na metodologia pelo desenvolvimento de novos procedimentos, novas técnicas ou instrumentos. Os primeiros métodos de identificação e medida de imunoglobulinas foram desenvolvidos por *Von Behring & Kitasato*, influenciados pelos experimentos de Pasteur sobre a Teoria dos Germes, ao encontrarem no soro de animais imunizados contra difteria e tétano, substâncias neutralizantes e específicas que denominaram *anticorpos*. As pesquisas desenvolvidas por vários cientistas se voltaram imediatamente para a caracterização bioquímica dessas substâncias neutralizantes e o desenvolvimento de técnicas capazes de induzir a formação de elevadas concentrações de anticorpos em animais de laboratório. Este foi o período fundador do diagnóstico sorológico.

Neste tópico, as técnicas sorológicas serão abordadas, principalmente, sob o ponto de vista dos profissionais que realizam o diagnóstico sorológico das doenças infectoparasitárias.

10.1. Aplicações dos testes sorológicos

Os testes sorológicos vêm sendo constantemente empregados para auxiliar na confirmação diagnóstica das suspeitas clínicas de infecções, permitindo a obtenção de resultados em curto espaço de tempo, em função de algumas características que incluem a simplicidade de execução, baixo custo operacional e a possibilidade de automação. Suas contribuições, entretanto, são inestimáveis, principalmente quando o patógeno, ou seus produtos, dificilmente podem ser demonstrados nos fluidos biológicos ou na estrutura hística do hospedeiro.

Estes métodos são utilizados na qualificação e quantificação de diversos componentes, incluindo antígenos, anticorpos, imunocomplexos, enzimas e hormônios, entre outras moléculas relacionadas ao processo inflamatório. O conhecimento dos fundamentos gerais para adequada aplicação e criteriosa interpretação dos resultados exige que estas técnicas sejam realizadas por profissionais bem treinados, a fim de se prevenir a ocorrência dos falsos resultados, que conduzem para o diagnóstico e tratamento incorretos dos pacientes.

O método sorológico pode ser **qualitativo** ou **quantitativo**. O método qualitativo indica uma resposta do tipo “ou tudo ou nada”, por exemplo: aglutinou ou não aglutinou, infectado ou não infectado. O ensaio quantitativo mede a concentração de antígeno ou anticorpos, podendo ser expressa sob a forma de cruzes, titulações, densidades óticas em reações fotolorimétricas ou outras unidades de medida que se aplicam. A expressão do resultado sob a forma de cruzes, ou por titulações, que correspondem a maior diluição em que ainda se observa a reação antígeno-anticorpo, é bastante subjetiva, por retratar a intensidade de uma reação determinada visualmente por critérios pessoais. A utilização de aparelhos que realizam a leitura automática das reações sorológicas traduz em números os resultados obtidos de maneira visual, reduzindo, por um lado, a probabilidade dos erros, mas por outro, elevando (em alguns casos) o custo do exame laboratorial.

10.2. A importância do diagnóstico individual

O indivíduo sintomático ou assintomático com níveis de anticorpos específicos detectáveis é denominado **soropositivo**. Aquele que não possui anticorpos detectáveis é o **soronegativo**. No caso do indivíduo diagnosticado soronegativo (em uma primeira análise), que ao reavaliar a primeira amostra junto com uma segunda, de coleta mais recente (processo conhecido como **sorologia pareada**), e no caso de resultado da primeira amostra se repetir e a segunda resultar positiva, diz-se que ocorreu **soroconversão**. O diagnóstico individual normalmente se realiza com a finalidade de elucidar processos patológicos com sinais e sintomas comuns a várias doenças, procedimento este denominado **diagnóstico diferencial**. Como exemplos, podem-se distinguir sorologicamente doenças como a leishmaniose tegumentar difusa e a hanseníase lepromatosa, a leishmaniose visceral e a hepatite viral, a hepatite B e a hepatite C, a toxoplasmose e a rubéola, entre outras.

Em algumas situações torna-se importante determinar a **fase clínica da doença**, principalmente aquelas em que os patógenos possuem habilidade para atravessar a barreira placentária e gerar embriopatias ou fetopatias. A presença de anticorpos específicos é uma evidência da exposição atual ou anterior aos agentes infecciosos, caracterizada pela diversidade funcional das várias classes de imunoglobulinas e a ordem em que se apresentam nos fluidos biológicos. Determinada por fatores genéticos, a IgM, regra geral, é a primeira a apresentar níveis que possibilitam a detecção após estímulo imunogênico e caracterizar fase inicial na maioria das infecções. O seu decréscimo é compensado pelo surgimento da IgG, normalmente encontrada ao final de um processo agudo, permanecendo durante a fase crônica, e podendo ser detectada durante longo período no plasma do hospedeiro, mesmo após a cura, como imunoglobulina de memória. Nor-

malmente, nas solicitações de exame laboratorial, pedem-se a pesquisa de IgM e IgG específicas. Porém, em infecções recentes por *Toxoplasma gondii* ou por citomegalovírus, a IgM e IgG podem eventualmente resultar negativas, mas a IgA positiva pode corrigir falhas no diagnóstico. Por estas razões, imunoglobulinas como a IgE e a IgA específicas têm sido pesquisadas e utilizadas com maior precisão na determinação de fase inicial das infecções, uma vez que possuem vida média menor e permanecem na circulação após o início do processo infeccioso, por um período ainda mais curto que o da IgM.

Os testes sorológicos são também utilizados para verificação do potencial de virulência e de invasividade dos enteroparasitos. A *Entamoeba histolytica*, por exemplo, enquanto parasita o lume intestinal, parece não induzir, ou pouco induz, a formação de anticorpos específicos. Por outro lado, a ulceração, a penetração tecidual e a conseqüente multiplicação e disseminação deste parasito no hospedeiro, pode proporcionar elevados títulos de IgG anti ameba no plasma sanguíneo, facilmente detectáveis.

Além das imunoglobulinas, as **Proteínas de Fase Aguda (PFA)**, presentes normalmente em baixas concentrações no plasma sanguíneo, alteram-se em resposta aos estímulos inflamatórios após lesão tecidual ou infecção. Em linhas gerais, as PFA constituem um vasto número de proteínas plasmáticas de origem hepática, cuja síntese aumenta em 25% ou mais e podem ser classificadas em função do incremento de sua produção após estímulo inflamatório (Quadro 1). Tradicionalmente, a quantificação da **Proteína C Reativa (PCR)** na prática clínica tem vários objetivos, entre eles, a avaliação da extensão e a atividade da inflamação, o que permite o acompanhamento do processo patológico, diferenciação entre doença inflamatória e não inflamatória e estimativa de seu respectivo prognóstico.

Quadro 1. Características cinéticas das proteínas de fase aguda

Proteínas de fase aguda	Tempo de resposta entre estímulo e elevação dos níveis plasmáticos	Peso molecular (kDa)
Grupo 1: aumenta menos de uma vez		
Ceruloplasmina	48-72 horas	132
C3	48-72 horas	180
C4	48-72 horas	206
Grupo II: aumenta de duas a quatro vezes		
a-1 - glicoproteína ácida	24 horas	41
a-1 - antitripsina	10 horas	54
a-1 - antiqumotripsina	10 horas	68
Haptoglobina	24 horas	86
Fibrinogênio	24 horas	340
Grupo III: aumenta acima de cinco mil vezes		
Proteína C reativa	6-10 horas	110
Encefalites viróticas, citomegalia, herpes sistêmica e tuberculose Amiloide sérico A	2-10 horas	180

Os testes sorológicos também são utilizados para **selecionar** doadores e receptores de sangue e de órgãos, não só no contexto de quem desempenha a determinação de grupos sanguíneos ou antígenos de histocompatibilidade, como também para quem se compromete na detecção e prevenção de doenças infecciosas transmissíveis por meio da transfusão sanguínea e hemoderivados, como tecidos e órgãos transplantados. No Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu estratégias de controle apoiadas na triagem clínica, epidemiológica e sorológica para prevenção das doenças transfusionais, que incluem a doença de Chagas, a sífilis, as hepatites B e C, a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), o vírus da leucemia T do adulto (HTLV-I e II), em todo o território nacional, e a malária, em regiões endêmicas. As condições que constituem contraindicação absoluta para doação de órgãos, relacionadas às doenças infecciosas, além das empregadas na prevenção de doenças transmissíveis por meio da transfu-

são sanguínea e hemoderivados, incluem avaliação laboratorial de septicemia bacteriana ou fúngica, ativa.

As moléculas liberadas pelo parasito e os anticorpos correspondentes encontrados no hospedeiro são chamados de **marcadores sorológicos**. Estes marcadores podem ser utilizados para avaliar o **prognóstico de doenças** e alguns marcadores indicam evolução para **cura**, enquanto outro **agravamento**. Baseando-se nestes princípios, pode-se avaliar a **eficácia terapêutica**.

Os anticorpos protetores, induzidos por parasitos em processos infecciosos ou por vacinas, podem ser pesquisados e utilizados como marcadores para avaliar a **imunidade específica**, naturalmente adquirida ou artificialmente induzida por vacinas. Os testes sorológicos realizados em paciente pré-natal são de fundamental importância na pesquisa de doenças congênitas, como a toxoplasmose, a sífilis, a citomegalia, entre outras; e na avaliação da imunidade específica, principalmente para doenças imunopreveníveis com a aplicação de vacinas (hepatite B, rubéola, difteria, tétano).

10.3. A importância do diagnóstico coletivo

A aplicação dos testes sorológicos em inquéritos epidemiológicos denomina-se **soroepidemiologia** e serve para estimar a **soroprevalência**, que corresponde ao número de indivíduos positivos em um período de tempo determinado, sem distinguir os casos novos dos antigos. Como a soroprevalência está intimamente relacionada com a taxa de infecção e a permanência dos anticorpos circulantes, este indicador auxilia nos seguintes propósitos em relação às doenças infectoparasitárias: estabelecer prevalência sorológica, identificar os principais problemas sanitários, estabelecer prioridades de vacinação, demarcar a distribuição e verificar a erradicação de doenças, verificar a reintrodução de doenças em áreas consolidadas, determinar a periodicidade das epidemias, avaliar as campanhas de vacinação,

investigar enfermidades descobertas recentemente (doenças emergentes) e estimar as perdas econômicas atribuídas à enfermidade.

Testes sorológicos também são aplicados na análise do conteúdo intestinal de insetos hematófagos, para identificação das fontes alimentares dos vetores envolvidos na transmissão de doenças. Estabelecer o padrão alimentar dos insetos hematófagos é de grande importância para o entendimento de sua biologia, além de possuir valor fundamental para a Saúde Pública, no delineamento de estratégias de controle de vários agravos gerados por esses vetores.

11. Fundamentos gerais do imunodiagnóstico

A pesquisa laboratorial da resposta imune pode ser empregada para a verificação da resposta humoral e da resposta celular. A pesquisa da resposta humoral pode ser realizada de duas maneiras. Uma dessas maneiras refere-se ao emprego de anticorpos específicos para identificar um antígeno parasitário ou outras substâncias que desempenham o papel de antígenos na reação, tais como drogas, hormônios, ácidos nucleicos, citocinas, receptores de células, etc. Uma outra maneira é a detecção de anticorpos específicos na amostra a ser testada, passível de determinar se um indivíduo foi exposto a um organismo específico. A medida das interações entre antígeno-anticorpo com o propósito de diagnóstico é conhecida como **imunoserologia**.

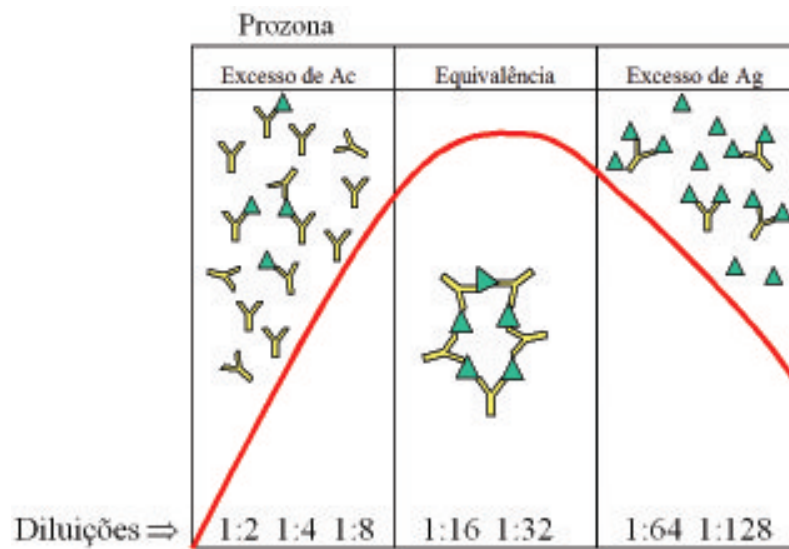
As técnicas imunossorológicas fundamentam-se na natureza da interação antígeno-anticorpo, nas quais podem expressar-se de duas formas distintas, em decorrência da utilização de imunorreagentes livres de marcação ou de reagentes marcados. As técnicas em que não se empregam marcadores demonstram-se por fenômenos visíveis. Portanto, ao se combinar anticorpos com antígenos solúveis, os complexos resultantes podem

formar precipitados insolúveis. Se os antígenos são particulados (bactérias, protozoários, hemácias), os anticorpos os aglutinam. Se o anticorpo pode ativar a via clássica do sistema complemento e o antígeno se encontra em uma superfície celular, o resultado pode ser a citólise. As técnicas que empregam imunorreagentes marcados caracterizam-se pela simples combinação do antígeno com o anticorpo, necessitando que um deles esteja marcado convenientemente. O imunorreagente pode ser marcado com corantes fluorescentes ou quimioluminescentes, radioisótopos, enzimas, ouro ou prata coloidais, entre outros marcadores.

11.1 Reações de precipitação

As reações de precipitação ocorrem entre antígenos solúveis e seus anticorpos correspondentes, com formação de agregados insolúveis que se precipitam. Os determinantes mais importantes das reações de precipitação consistem nas concentrações relativas de antígeno e anticorpo. Esta relação é ilustrada esquematicamente na Figura 19. Ocorre precipitação máxima quando a quantidade de antígenos e de anticorpos são equivalentes (zona de equivalência), com quantidades decrescentes nas zonas de excesso de antígeno ou excesso de anticorpo. O fenômeno de **prozona** refere-se à precipitação subótima, invisível aos nossos olhos, que ocorre na região de excesso de anticorpo. Portanto, é necessário que diluições de antissoros reajam com quantidades fixas de antígeno a fim de obter o máximo de linha de precipitação. O fenômeno de prozona pode ser responsável pelo aparecimento de resultados falso-negativos em outros testes sorológicos, além dos testes de precipitação, como nas reações de aglutinação. Existem vários sistemas disponíveis para a prática da reação de precipitação, dentre estes, destacam-se a precipitação em meios líquidos, meios semissólidos, como ágar ou agarose, e outros suportes, tais como o acetato de celulose.

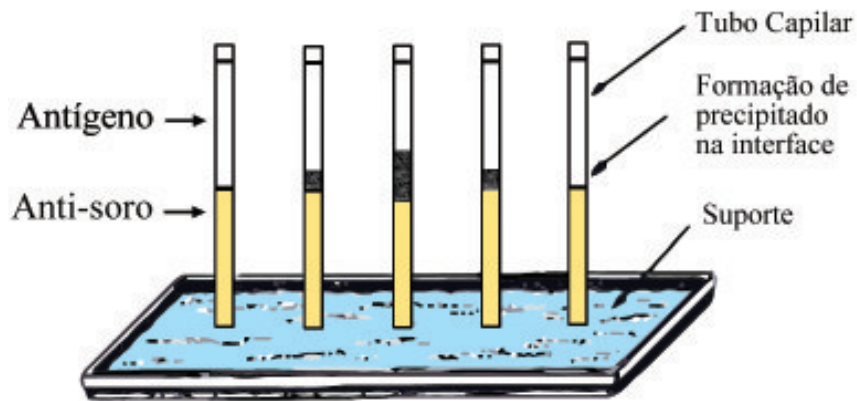
Figura 19. Curva de formação de imunocomplexos visíveis



11.2. Reação de precipitação em meio líquido

Conhecida também como técnica da precipitina ou técnica do anel, a reação de precipitação em meio líquido (Figura 20) consiste em se colocar em tubos de ensaio ou em tubos capilares uma solução de anticorpos conhecidos (soro hiperimune) e sobre ela se adicionar, cuidadosamente, a solução antigênica que se deseja pesquisar, de modo a constituir-se uma interface entre ambas. As moléculas da solução antigênica irão difundir-se através da outra solução, formando um gradiente de concentração. Ao nível em que a equivalência antígeno/anticorpo for a ideal, se formará uma faixa de precipitado visível (um anel de turvação branco leitoso na interface).

Figura 20. Imunodifusão em meio líquido (Teste de Precipitina)



11.3. Reação de imunodifusão simples em meio semissólido

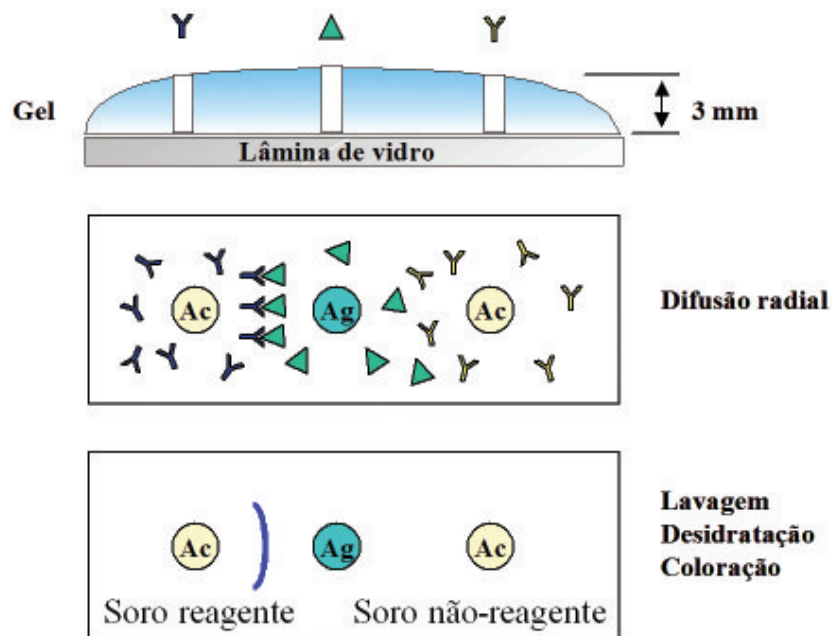
Neste sistema, também chamado imunodifusão unidirecional ou técnica de Oudin, a solução antigênica é sobreposta a uma coluna de ágar, em um tubo de 35 a 45 mm de altura contendo o soro hiperimune. As moléculas de antígeno penetram no gel e se difundem com velocidade característica para cada espécie molecular (coeficiente de difusão) influenciada pela concentração do gel. Ao final de certo tempo de difusão, que em geral é de uma semana, cada antígeno terá formado, com o seu anticorpo correspondente, um disco ou zona de precipitação.

11.4. Reação de imunodifusão dupla (imunodifusão de OUCHTERLONY)

Em uma delgada camada de gel sobre uma lâmina de vidro escavam-se pequenos orifícios. Em um deles, coloca-se soro ou plasma e, em outro orifício, coloca-se o antígeno. Um difunde em direção ao outro, formando precipitados brancos em forma de linhas ou arcos, também chamados de

bandas de precipitação (Figura 21). Quando a concentração de antígenos e anticorpos é muito pequena, as bandas não são visíveis, necessitando, nesse caso, que se use solução corante para proteínas. Quando necessário, corar o gel para visualizar as bandas deve-se retirar do gel os imunorreagentes que não formaram imunocomplexos (imunorreagentes solúveis) por processos de lavagem com solução fisiológica. O imunocomplexo (agregado insolúvel), em função do seu tamanho efetivo, fica retido nas malhas do gel, onde, em seguida, é submetido ao corante adequado, o que possibilita a visualização das bandas quando formadas. A velocidade de difusão de cada imunorreagente é regida pelas leis da difusão e depende da concentração e do tamanho dos poros do gel, da temperatura, da concentração do ágar e de sua pureza.

Figura 21. Representação esquemática da reação de imunodifusão dupla Ouchterlony.



11.5. Reação de imunodifusão radial simples (imunodifusão de MANCINI)

Nesta técnica, o anticorpo específico para determinado antígeno é incorporado ao gel e distribuído sobre uma lâmina de vidro ou placa de Petri. Em posições adequadas, são feitos orifícios onde se colocam soluções antigênicas a serem testadas, bem como soluções padrão, com pelo menos três concentrações conhecidas do antígeno. A partir desse momento, ocorre difusão radial do antígeno, resultando na opacificação em forma circular (halo ou anel) em torno do orifício. O diâmetro deste anel de precipitação é proporcional à concentração do antígeno e, deste modo, a quantidade deste pode ser determinada por comparação com os diâmetros obtidos por padrões conhecidos por meio de uma curva de referência.

11.6. Reação de imunoelektroforese (método de GRABAR e WILLIAMS)

A imunoelektroforese é uma técnica de imunoprecipitação em meio gelatinoso que combina a eletroforese com a imunodifusão radial. A técnica é realizada em duas etapas: na primeira, os antígenos são fracionados por eletroforese, enquanto na segunda etapa, ocorre a difusão dos antígenos contra o antissoro específico, presente nas canaletas abertas no gel. A reação antígeno-anticorpo nesse sistema é evidenciada pela formação de linhas ou bandas de precipitação no gel, correspondendo cada banda a um complexo imune específico.

11.7. Reação de imunoelektroforese unidimensional simples

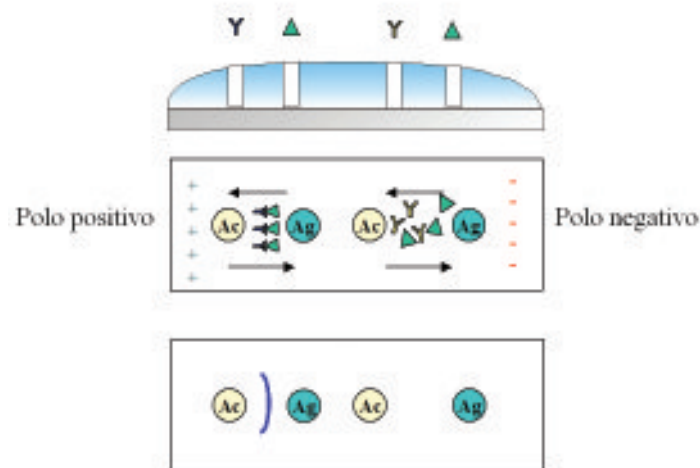
Também conhecida como eletroforese de foguete ou técnica de Laurell, a imunoelektroforese unidimensional utiliza antissoro específico para o antígeno, ou o anticorpo que se quer quantificar, incorporado ao gel de agarose, que é colocado em lâminas de vidro. Assim como na técnica de

Grabar e Williams, o pH do gel é determinado de modo que a molécula a ser analisada fique com carga negativa, migre para o polo positivo e a substância incorporada não migre ao gel. As amostras a serem quantificadas, bem como os controles, são distribuídos em pequenos orifícios do gel e submetidos à eletroforese. A partir dos orifícios de aplicação, formam-se cones de precipitação, cujas extensões variam de acordo com as concentrações das substâncias pesquisadas. O padrão de precipitação se assemelha a um foguete, por se formar nas margens laterais do curso da migração eletroforética, até que se esgote a substância em análise, resultando na convergência das margens laterais em forma de ponta.

11.8. Reação de contraimunoeletroforese

Também chamada de eletroimunodifusão dupla unidimensional. Nesta técnica, antígenos e anticorpos migram por eletroforese, simultaneamente, em direções opostas, a partir de orifícios separados do gel, no mesmo eixo, resultando na precipitação no ponto de encontro dos imunorreagentes entre os orifícios. Para a realização deste método, antígenos e anticorpos devem apresentar diferentes mobilidades eletroforéticas. Os anticorpos possuem propriedades de migrar para o polo negativo (cátodo) em um campo elétrico, enquanto os antígenos devem ser previamente tratados com solução tampão de pH adequado para otimizar os efeitos eletroendosmóticos que orientem sua migração para o polo positivo (ânodo). Este fenômeno pode ser induzido com o uso de tampões alcalinos (Figura 22). Este método permite a realização de várias análises em uma única lâmina, fornece resultados mais rápidos e mais sensíveis que a imunodifusão convencional e pode ser realizado em outros suportes, como o acetato de celulose.

Figura 22. Representação esquemática da reação de contraimunoeletroforese



11.9. Reações de aglutinação

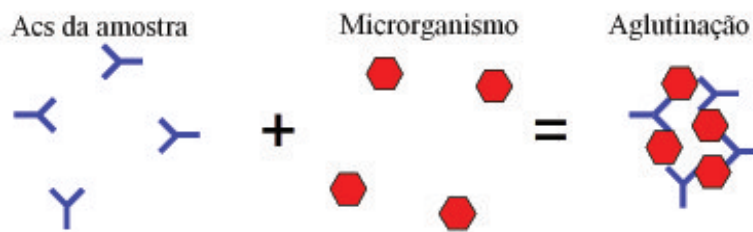
A aglutinação é a formação de redes de células ou partículas inertes (látex ou gelatina), interligadas por pontes moleculares de anticorpos, que se combinam simultaneamente com dois determinantes antigênicos nas superfícies de células ou partículas adjacentes.

11.10. Reação de aglutinação direta

A aglutinação direta é a formação de agregados suficientemente grandes que ocorre entre partículas insolúveis, em sua forma íntegra ou fragmentada, contendo antígenos naturais de superfície. Hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpos, os quais, sendo bivalentes, formam pontes, ligando determinantes antigênicos nas superfícies de partículas vizinhas. Para se detectar anticorpos específicos, diluições seriadas das amostras são postas para reagir junto a uma quantidade constante de antígeno. Após um período de incubação, a reação se concretiza

(Figura 23) e o resultado é geralmente expresso como título da amostra, ou seja, a máxima diluição em que ocorre aglutinação.

Figura 23. Representação esquemática da reação de aglutinação direta

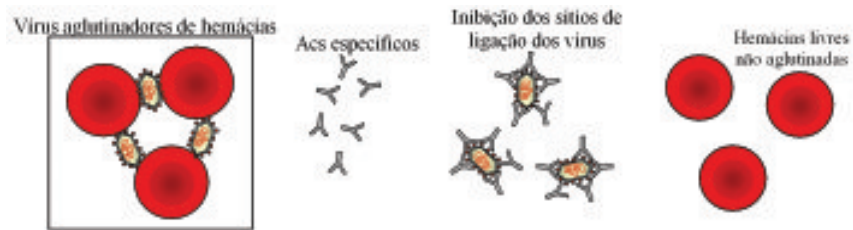


11.11. Reação de inibição da aglutinação direta de hemácias por antígenos virais

Diversos antígenos virais encontram receptores na superfície de hemácias, principalmente hemácias aviárias, e induzem sua aglutinação. Esta propriedade particular de muitos vírus é aproveitada para a titulação de anticorpos produzidos contra esses antígenos virais, na vigência dos processos infecciosos ou na convalescença, para fins diagnósticos e de segmento evolutivo.

Todas as reações de inibição baseiam-se na competição, seja de dois determinantes antigênicos semelhantes por um mesmo sítio de combinação ou de dois anticorpos diferentes por um mesmo determinante antigênico. A reação se efetua entre os imunorreagentes que formam o composto mais estável. Neste caso, o soro do paciente, contendo anticorpos específicos, em diluição seriada, é misturado a quantidades fixas de antígeno viral padronizado, sendo incubado a 37°C e, em seguida, as hemácias são adicionadas (Figura 24). Verifica-se até qual diluição houve neutralização, ou seja, inibição da propriedade aglutinante para hemácia.

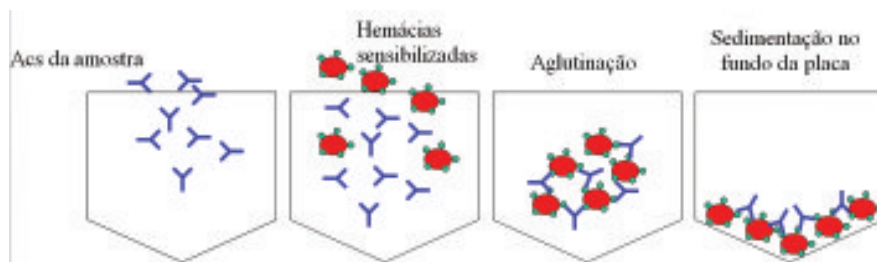
Figura 24. Representação da inibição da aglutinação viral das hemácias



11.12. Reação de aglutinação passiva de hemácias e suportes inertes

A reação se baseia na aglutinação de hemácias ou de partículas inertes (látex, gelatina) que funcionam como suporte, recobertas por um antígeno específico solúvel, em presença de amostra de soro ou plasma contendo os anticorpos correspondentes. A formação de pontes de anticorpos entre as partículas adjacentes indica a ocorrência da reação (Figura 25).

Figura 25. Esquema da reação de aglutinação passiva de hemácias e suportes inertes



11.13. Reação de inibição passiva de partículas inertes (látex)

Partículas de látex tendo antígenos ancorados à sua superfície podem ser aglutinadas pela formação de ponte anticórpica, do mesmo modo que a aglutinação direta de hemácias, como já foi exposto. No entanto, ao se

misturar antígenos solúveis aos soros contendo anticorpos, haverá bloqueio dos sítios de combinação das moléculas de anticorpo e inibição da aglutinação.

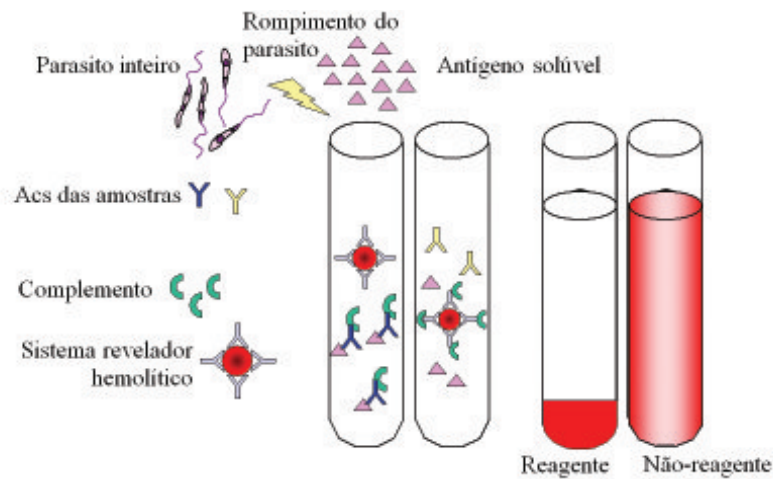
11.14. Reação de fixação do complemento

A fixação do complemento ocorre após a interação antígeno-anticorpo. O consumo de complemento *in vitro* pode ser utilizado como um teste para detectar e medir concentrações de anticorpos e antígenos. A reação se manifesta em três momentos: no primeiro, o antígeno se combina com o anticorpo. No segundo, se os imunocomplexos estiverem presentes, os componentes do sistema complemento ligam-se, sendo assim consumidos. Finalmente, adiciona-se o sistema revelador que consiste de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo antieritrocitário). Após um período de incubação, observa-se se ocorreu ou não lise das hemácias sensibilizadas e a atividade hemolítica pode então ser medida, a fim de se determinar a quantidade do imunorreagente pesquisado (Figura 26).

Ao se pesquisar a presença de anticorpos em fluídos biológicos, a ausência de lise do sistema hemolítico indica a sua presença na amostra, pois como os principais componentes do sistema complemento foram consumidos na lise do imunocomplexo inicial, não estarão disponíveis para a lise do sistema hemolítico e a reação será positiva.

Tanto os anticorpos como os antígenos devem ser destituídos de atividade anti-complementar para não ativar o complemento, independentemente do imunocomplexo. O complemento é obtido de soro de cobaia, colhido e estocado de maneira apropriada para preservar a atividade hemolítica.

Figura 26. Representação da reação de fixação de complemento



11.15. Reações de imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi descrita pela primeira vez por Albert H. Coons e seus colaboradores, em 1941. Estes pesquisadores objetivavam empregar corantes em técnicas sorológicas e utilizaram para isso, além dos corantes comuns, radicais fluorescentes.

Neste período, já era conhecida a capacidade dos anticorpos de se ligarem a radicais químicos sem perder sua característica de reconhecimento e ligação aos antígenos. Já haviam sido descritos trabalhos utilizando conjugados de anticorpos e corantes em técnicas de aglutinação. O produto resultante desta conjugação não só mantinha suas propriedades aglutinantes originais como ainda coloria os grumos aglutinados. Porém, esta coloração foi considerada de fraca intensidade, o que levou Coons a optar pelos corantes fluorescentes.

Uma das grandes vantagens da técnica é a intensa luminosidade emitida por quantidades muito pequenas de corantes fluorescentes, permitin-

do identificar estruturas fluorescentes entre várias outras estruturas presentes em cortes de tecidos ou esfregaços.

A técnica de imunofluorescência representou um grande avanço no imunodiagnóstico, principalmente no que diz respeito à sorologia. Até a elaboração deste método, as reações ocorridas entre antígeno e anticorpo só podiam ser evidenciadas através de reações secundárias, como a precipitação ou a aglutinação, que geram fenômenos decorrentes da formação de imunocomplexos em grande quantidade ou utilizando partículas relativamente grandes. Uma das vantagens da imunofluorescência foi o fato de ter maior sensibilidade que os métodos existentes na ocasião, permitindo distinguir uma única célula bacteriana corada por fluoresceína entre 10^7 bactérias não coradas.

Só foi possível o desenvolvimento da técnica de imunofluorescência devido a características especiais que algumas substâncias possuem de armazenar energia luminosa e liberá-la mais tarde. A este fenômeno foi dado o nome de **luminescência**. Se a substância é capaz de armazenar e emitir luminescência por períodos mais longos, chama-se então **fosforescência**; se o período de emissão da luminosidade é mais curto, chama-se a isso **fluorescência**. Entre os corantes fluorescentes mais utilizados destacam-se a **rodamina** (isotiocianato de tetrametil rodamina – TRICT) e a **fluoresceína** (isotiocianato de fluoresceína – FITC), esta última supera a primeira por possuir maior eficiência quântica, ou seja, maior capacidade de absorção e de emissão de luminosidade. Porém, com a modernização dos equipamentos, não só de microscópios como também de citômetros, foram feitas modificações para aumentar a eficiência quântica dos demais corantes para utilizá-los em testes que buscam mais de um marcador em superfícies celulares.

A intensidade da luz emitida por este corante sofre grande interferência do meio em que ele se encontra. O pH é um dos fatores que mais interfere, pois há um mínimo de fluorescência em pH ácido e máxima fluorescência em

pH alcalino, por isso o material deve ser montado em glicerina tamponada alcalina antes da observação em microscópio de fluorescência.

Para se obter bons resultados com as técnicas imunofluorescentes, é fundamental a utilização de um bom microscópio ótico equipado com acessórios e filtros que permitam a boa visualização e captação da fluorescência. Atualmente, existem vários modelos de variadas procedências. Para a escolha do equipamento que mais se adapte às necessidades do laboratório, deve-se ter em mente qual o objetivo do teste, que tipo de material será utilizado como antígeno ou como amostra (para que seja feita a escolha das objetivas e oculares), qual o corante ou corantes que serão utilizados (para que sejam definidos os filtros do equipamento), quantos exames serão realizados em média e quantas vezes por semana, uma vez que tal escolha irá interferir na vida útil e escolha da lâmpada a ser utilizada, entre outros fatores.

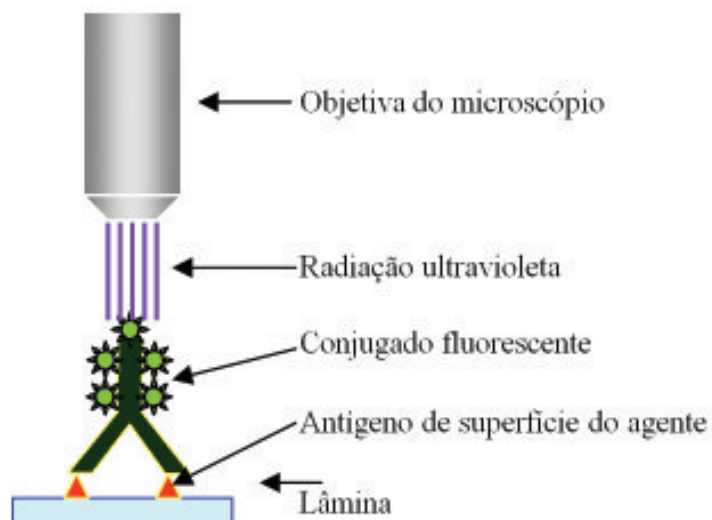
A ligação química de anticorpos a corantes dá origem a um composto chamado conjugado, que associa a capacidade de reconhecimento e ligação do primeiro às propriedades corantes do segundo, sem que ocorra nenhum tipo de prejuízo para ambos. Apesar de processo de conjugação ser relativamente simples, há uma série de cuidados que precisam ser seguidos devido às variações que podem ocorrer em cada um dos reagentes a cada associação. Um dos cuidados principais é a imunização dos animais com os antígenos mais purificados possíveis para evitar a reatividade cruzada com outros antígenos. Atualmente existem no mercado compostos conjugados de extrema pureza e alta especificidade, direcionados contra os mais variados antígenos e que atendem perfeitamente às necessidades da grande maioria dos laboratórios.

A partir do método descrito por Coons e seus colaboradores, surgiram numerosas variações, das quais, a **imunofluorescência direta** foi a mais simples e a primeira a ser descrita. Nesta técnica, o conjugado reage diretamente com antígenos presentes na superfície de células (Figura 27). Como esta técnica se presta à pesquisa de substâncias que atuam como antígenos para o conjugado,

torna-se necessária, a cada procura de um antígeno diferente, a produção de um conjugado diferente. Além disso, de todas as variações da imunofluorescência, esta é a menos específica, já que principalmente em tecidos ou esfregaços, devido à grande quantidade de material na amostra, pode ocorrer a presença de antígenos homólogos ao que se está pesquisando. Quando se trata de células íntegras, há certa facilidade no reconhecimento, porém em fragmentos celulares ou estruturas muito pequenas é necessário grande conhecimento e intenso treinamento para diminuir a inespecificidade.

Esta variação do método ainda é bastante aplicada no diagnóstico de infecções por *Chlamydia trachomatis* em esfregaços cervicais e uretrais. Este método também foi largamente utilizado na identificação de antígenos do MHC e na tipagem de linfócitos B e linfócitos T.

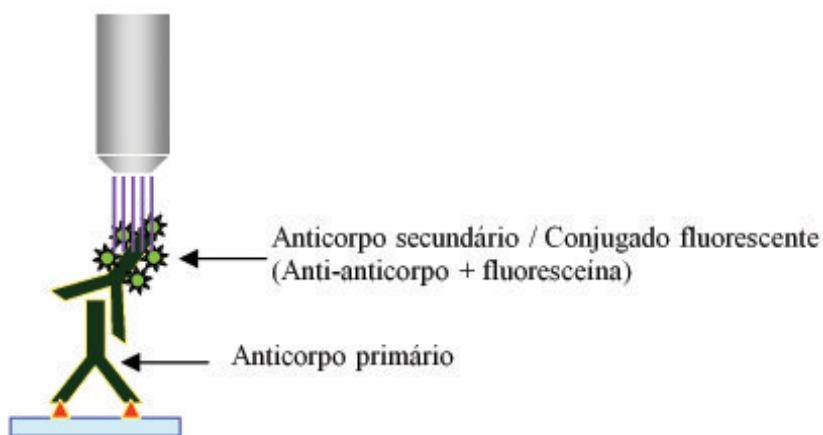
Figura 27. Esquema da reação de imunofluorescência direta



Outra variedade do método é a **imunofluorescência indireta**. Nesta modalidade, pode-se realizar a pesquisa de anticorpos contra os mais variados antígenos. O conjugado é uma imunoglobulina que reconhece a outra

imunoglobulina como antígeno, ou seja, é uma anti-imunoglobulina ou anticorpo secundário (Figura.28). A vantagem deste método é que o anticorpo pode estar ancorado à superfície de qualquer antígeno e ainda assim será reconhecido pelo conjugado. Assim, um único conjugado pode ser utilizado na pesquisa de anticorpos contra várias infecções diferentes, tornando o método mais barato. Uma vez que o reconhecimento de uma imunoglobulina por outra se dá pela região estável do fragmento cristalizável (porção Fc), a ligação é espécie específica, conferindo ao método grande especificidade. Ele também é mais sensível do que o método direto, porque existem normalmente mais epítopos na imunoglobulina para o conjugado se ligar. Quanto maior a quantidade de conjugado maior será a emissão de fluorescência.

Figura 28. Esquema da reação de imunofluorescência



Esta modalidade do método auxilia o diagnóstico de várias doenças e permite a pesquisa de diferentes isotipos de imunoglobulinas, sendo que, neste caso, há a necessidade de utilizar um conjugado para cada um dos isotipos. Desta forma, o método é utilizado no acompanhamento da doença e, em alguns casos, pode ser também utilizado como critério de cura.

De uma maneira geral, a técnica de imunofluorescência apresenta níveis de sensibilidade que variam de 70% a 90%, e especificidade que varia de 85% a 99%. Por ser um método com perfil mais específico, este é mais utilizado em confirmações sorológicas. Deve-se utilizar o método de imunofluorescência sempre aliado a outro método mais sensível para a realização da triagem e fornecer os dois resultados em combinação. A sua utilização pesquisando IgM e IgG séricas pode aumentar a sensibilidade, uma vez que a primeira aparece mais precocemente.

11.16. Ensaios imunoenzimáticos - *Enzyme-linked immunosorbent assay* - **ELISA**

Os estudos preliminares que tornaram passíveis de execução os métodos imunoenzimáticos foram realizados, simultaneamente, em 1966, por Nakane e Pierce, nos Estados Unidos, e por Avrameas e Uriel, na França, com a utilização da **peroxidase** (*horseradish peroxidase* - HRP) para a confecção de conjugados proteicos, tendo como precursor o processo de marcação de proteínas com corantes fluorescentes, criado por Coons, em 1941.

Em 1971, dois grupos de pesquisadores, um holandês, formado por Van Weemen e Schurs, e um sueco, formado por Engvall e Perlmann, idealizaram e introduziram, pioneiramente, o método imunoenzimático para detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos específicos. Estes grupos observaram que proteínas poderiam ser imobilizadas em uma superfície sólida de poliestireno e a reação imune, ser revelada pela formação de produtos coloridos da reação enzima-substrato, na presença de um componente doador de elétrons, denominado cromógeno.

O método ELISA, quando efetuado em ótimas condições (enzimas altamente ativas, antígenos puros, substratos de alta qualidade, anticorpo e conjugado), apresenta sensibilidade semelhante ao radioensaio, com a vantagem de não ser necessário utilizar material radioativo. Entretanto, esse

método apresenta algumas desvantagens, pois alguns substratos usados nessas reações são teratogênicos e a presença de enzimas endógenas interferem nos resultados quando se usa células inteiras como antígenos.

A reação é desenvolvida frequentemente em placas plásticas de microdiluição (suporte), contendo séries de orifícios, onde são depositados os imunorreagentes, antígenos ou anticorpos, dependendo do objetivo do método. O processo de revestimento da placa com o imunorreagente adequado denomina-se sensibilização. Para sensibilizar a placa deve-se tratar o imunorreagente com solução alcalina, deixando-o com carga efetiva negativa, e assim promover, passivamente, a adsorção à placa por interações eletrostáticas (forças coulômbicas), as quais ocorrem em virtude das cargas positivas do poliestireno ou polivinil (*polyvinyl chloride* - PVC) utilizado para confeccioná-las. Além das placas de microdiluição de 96 cavidades, também são utilizados outros suportes, entre os quais, esferas de sefarose, esferas de poliestireno ou de PVC, ou tubos de poliestireno ou PVC, que possibilitam a adsorção adequada da maioria dos imunorreagentes.

As etapas de lavagem das placas de microdiluição interpõem-se às demais etapas de execução do método e servem para retirar excessos de imunorreagentes não ligados. Podem ser usados procedimentos manuais ou automáticos, que vão desde o uso de jorradeiras contendo a solução de lavagem, ou de pente multicanal adaptado a um sistema de vácuo (lavadora semiautomática), até a utilização de lavadoras de placas automáticas, que reduzem o tempo de realização do teste e proporcionam maior uniformidade ao processo.

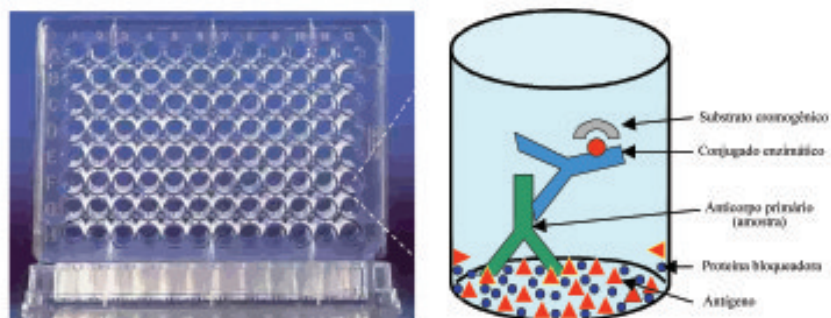
O revestimento da superfície interna da placa de ELISA, pelo menos no plano teórico, não é absoluto e, portanto, algumas regiões permanecem livres de ligação. Estes espaços devem ser ocupados com qualquer molécula alheia ao sistema reacional, no sentido de reduzir, ou mesmo evitar, a ligação inespecífica, não imune, de componentes da amostra, geradores de reações indesejáveis que possibilitam falsas interpretações. A cobertura destes espaços

vazios é chamada de **bloqueio**. Entre as proteínas mais empregadas nesta etapa destacam-se a soro albumina bovina (BSA), a ovalbumina e a caseína, além de um complexo proteico, como o soro de cobaia.

Dependendo do material a ser pesquisado, pode-se conjugar antígenos com enzimas (Ag-E) e anticorpos ou anti anticorpos com enzimas (Ac-E). Enzimas são macromoléculas de natureza proteica, com função biológica de alto poder catalítico de reações químicas e elevada especificidade ao substrato correspondente. As mais usadas nestes testes são a fosfatase alcalina e a peroxidase.

Para revelar a presença da enzima no complexo formado, utiliza-se uma solução reveladora, que consiste em um tampão adequado, onde se adicionam o substrato correspondente à enzima conjugada e um componente doador de elétrons (cromógeno). A enzima conjugada quebra o substrato e seus produtos atuam no cromógeno, alterando a coloração do sistema (Figura 29).

Figura 29. Esquema do ensaio imunoenzimático ELISA indireto, para pesquisa de anticorpos específicos



A leitura da reação em condições de trabalho de campo pode ser feita de forma visual, simplesmente pela observação da alteração da coloração. Em condição laboratorial utiliza-se espectrofotômetro apropriado para leitura dos

orifícios das placas, que transforma a intensidade de cor em números. Quanto maior a leitura, maior será a concentração de enzima conjugada e, conseqüentemente, maior será a concentração da substância pesquisada em técnicas não competitivas.

○ método **ELISA** pode ser classificado de acordo com sua atividade de amplificação, ou seja, por métodos diretos não competitivos, ou baseados em sua atividade moduladora, que são métodos competitivos.

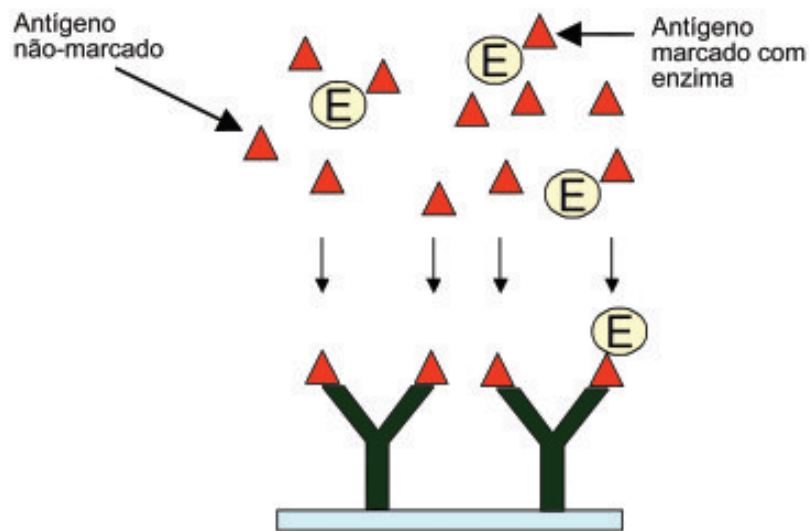
○ **ELISA direto** é mais usado em imuno-histoquímica. Seu fundamento consiste na utilização de anticorpos primários marcados com enzima, que se combinam especificamente aos antígenos presentes em cortes histológicos. A aplicação da solução reveladora destaca o material pesquisado.

○ **ELISA indireto** é empregado para a pesquisa de anticorpos, onde amostras de soro ou plasma são colocadas para reagir com antígenos imobilizados em uma fase sólida (placas de ELISA). Posteriormente, são revelados com auxílio de conjugado enzimático específico levando a formação de um produto corado ao agir sobre substratos cromogênicos. Para pesquisa de antígenos presentes em material biológico, a amostra é posta para reagir com anticorpos específicos imobilizados na fase sólida.

○ **ELISA competitivo** consiste na pesquisa de antígeno, onde o anticorpo é mobilizado na fase sólida e o antígeno correspondente compete com uma quantidade padronizada e marcado para sítios de combinação disponível. Nesse caso, a redução da reação indica maior quantidade de antígeno na solução. Para pesquisar anticorpos, o antígeno é imobilizado e poderá se ligar ao anticorpo da amostra ou ao já conhecido e marcado (conjugado enzimático), para, assim, decrescer a intensidade de coloração da reação. Em ambos os métodos competitivos (Figura 30), dois procedimentos podem ser seguidos: a competição simultânea, cujo antígeno ou anticorpo marcado é adicionado junto com a amostra; ou a saturação sequencial, onde o antígeno

ou anticorpo é adicionado primeiro, seguido de uma incubação com o imunorreagente marcado.

Figura 30. Modelo de método competitivo, onde antígenos marcados e antígenos não marcados de uma amostra competem pelos sítios de ligação dos anticorpos imobilizados em um suporte



11.17. Western blotting - WB

A técnica de *Western Blotting*, também chamada de *immunoblotting* ou **imunoeletrotransferência**, é uma ferramenta de grande utilidade para a caracterização de antígenos, ou para pesquisa de anticorpos específicos para um determinado componente antigênico.

A técnica de *WB* baseia-se numa combinação de três métodos muito aplicados em biologia molecular: a separação de macromoléculas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de duodecil-sulfato de

sódio (*SDS-PAGE*); sua transferência eletrolítica para membranas (geralmente de nitrocelulose); e o ensaio de revelação, utilizando anticorpos ou proteína A, marcados por enzimas, radionuclídeos, fluorocromos, metais coloidais ou complexo biotinina-avidina-peroxidase.

Assim, as proteínas de um dado antígeno são separadas, transferidas eletroliticamente para membranas de nitrocelulose e postas a reagir com anticorpos marcados. No final, a reação antígeno-anticorpo é revelada por meio de imunocomplexos formados com proteínas definidas, e facilmente identificadas pelos seus pesos moleculares característicos.

A origem do nome *Western Blotting* partiu de uma brincadeira acadêmica baseada no nome Southern, do autor de um método de eletrotransferência de fragmentos de ácidos nucleicos (DNA), que recebeu o nome de ***Southern Blot***. Pouco tempo mais tarde, Alwine e cols conseguiram fazer uma adequação na técnica de *Southern Blotting*, que se consistiu na eletrotransferência de ácido ribonucleico (RNA), o qual, por sua vez, foi analisado através de sondas de DNA. Assim, seguindo o princípio da brincadeira inicial, resolveu-se chamar a nova técnica de ***Northern Blotting***. Pouco mais tarde, em 1979, Towbin, Staehelin e Gordon desenvolveram o método de eletrotransferência de proteínas. Para seguir a já então tradicional forma de referir-se ao método resolveu-se batizar a nova técnica de ***Western Blotting***.

A razão para transferirem-se proteínas, a partir de um gel de poliacrilamida para uma membrana sintética, está na possibilidade de manuseio contínuo do material para análise, além de se poder trabalhar com vários reveladores ao mesmo tempo, ou com sondas de elevado peso molecular, uma vez que a poliacrilamida não é um material muito adequado para que moléculas de grande tamanho sejam difundidas.

As membranas mais utilizadas para o *blotting* são derivadas da nitrocelulose. Apesar disso, elas são frágeis e apresentam uma baixa capacidade de ligação às macromoléculas eletrotransferidas. As membranas de *nylon*

são muito mais resistentes e ligam-se muito fortemente às proteínas. Sua capacidade de ligação é seis vezes maior que a das membranas de nitrocelulose. Sua limitação está relacionada a não impregnação por corantes, comumente empregados na revelação de proteínas (azul de Comanssie e negro de amido), e à grande quantidade de reações inespecíficas, requerendo, assim, um bloqueio muito bem feito antes de se desenvolver o ensaio imunoenzimático para a revelação do *Western Blotting*. Outro aspecto muito importante é a porosidade da membrana. Recomenda-se a utilização de membranas com 0,45mm para o uso genérico e com diâmetros bastante menores (0,2mm) para estruturas proteicas, com pesos moleculares inferiores a 20 kDa. As melhores membranas, embora sendo bastante caras, são as de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Elas combinam a excelente capacidade ligante e a resistência mecânica à manipulação necessária para a elaboração das fitas, contendo proteínas eletrotransferidas.

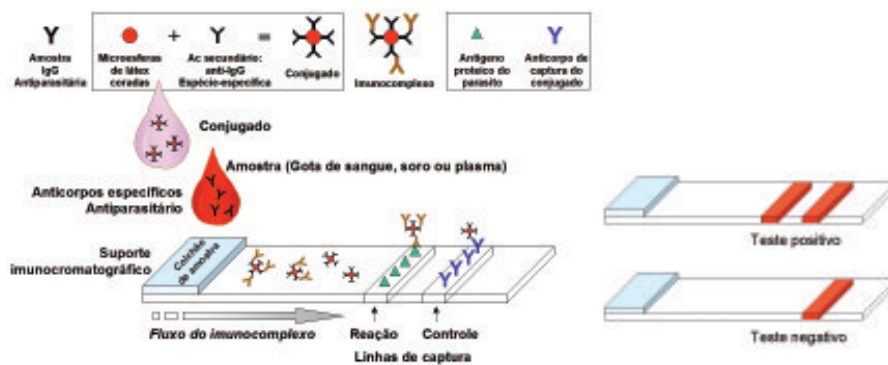
11.18. Teste imunocromatográfico

O dispositivo de imunocromatografia é composto de uma membrana porosa de celulose modificada e membranas absorventes acessórias de fibra de vidro, contendo os elementos de reação, ajustadas em um invólucro plástico apropriado com uma janela para se acrescentar a amostra de teste e outra para leitura do resultado da reação. O princípio de funcionamento do teste imunocromatográfico baseia-se na reação específica antígeno-anticorpo e se constitui por uma fase sólida (membrana porosa), onde estão imobilizados elementos de captura, e por uma fase móvel, onde estão suspensos o conjugado (que pode ser a proteína A, ligada ao ouro coloidal ou outros conjugados disponíveis) e a molécula alvo da amostra.

A fase móvel migra sobre a fase sólida por efeito de capilaridade, conduzindo o complexo formado entre a molécula alvo e o conjugado, que, por sua vez, será retido na linha de captura da fase sólida, formando um

complexo macromolecular colorido visível ao olho humano. Caso a amostra não contenha a molécula alvo, esta linha de reação não se formará. Uma segunda linha de reação, denominada linha de controle, se forma pela captura do conjugado livre, que permite a confirmação da migração da fase móvel (Figura 31).

Figura 31. Princípio do Teste Imunocromatográfico



11.19. Imuno-histoquímica

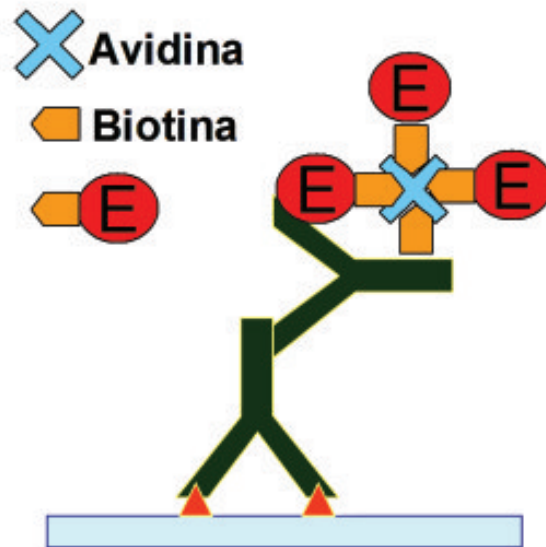
A imuno-histoquímica (IHQ) reúne a interação antígeno anticorpo *in vitro*, técnicas histológicas e reações químicas, em um método que permite detectar diferentes estruturas de tecidos, revelados por diversos tipos de processos de visualização. É utilizada no diagnóstico anatomopatológico de várias doenças degenerativas ou parasitárias, bem como na identificação de estruturas normais em estudos de histologia básica. As técnicas de IHQ permitem a localização de proteínas nas células de uma seção de tecido, fixados em formol ou incluído em blocos de parafina. Existe, atualmente, a disponibilidade de um número crescente de anticorpos para uso em IHQ, o que vem possibilitado uma maior precisão diagnóstica.

Existem dois tipos de técnicas de imuno-histoquímica:

- **Técnica direta** – Os anticorpos primários são ligados a um marcador apropriado, e o corte de tecido, que contém antígenos específicos, é incubado com o anticorpo durante algum tempo. Após a interação entre os anticorpos e as proteínas, os anticorpos que não se ligaram são removidos por lavagem. Dependendo do marcador utilizado, a leitura da reação será realizada pela microscopia adequada; para marcadores fluorescentes, por exemplo, o corte é observado por microscopia de imunofluorescência, enquanto para outros marcadores, utiliza-se a microscopia ótica convencional.
- **Técnica indireta** – Nesta técnica, se utiliza o anticorpo primário específico para uma determinada proteína e para o anticorpo secundário, uma anti-imunoglobulina marcada que reconhece o anticorpo primário. O corte de tecido é incubado com o anticorpo específico para determinada proteína. Depois de lavado, é incubado com o imunocombinado, que se vai ligar ao anticorpo primário. Em seguida, há a observação por microscopia adequada, dependendo do marcador utilizado.

A técnica de IHQ pode também estar associada a um processo enzimático de coloração, como ao complexo avidina-biotina-enzima-cromógeno (Figura 32). O complexo é formado pela ligação de uma molécula de estreptavidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final colorido. O cromógeno mais utilizado é o DAB (diaminobenzidina), que confere cor marrom-ferruginosa ao precipitado permanente.

Figura 32. Amplificação de sinal devido ao maior número de moléculas de enzimas biotinaladas ligadas à avidina



O anticorpo marcado com a peroxidase pode se ligar a sítios teciduais inespecíficos, prejudicando o resultado do exame. A utilização de proteínas inertes alheias ao sistema reacional, tais como soro fetal bovino, soro albumina bovina ou caseína, ao competirem com os sítios de ligação inespecíficos, reduzem a reação inespecífica. A peroxidase endógena, encontrada em diferentes tecidos, também pode mascarar uma reação e deve ser inibida pela incubação prévia do corte com peróxido de hidrogênio. A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos e é encontrada em altas concentrações na mucosa intestinal e nos túbulos proximais dos rins, entre outros tecidos. A biotina endógena, assim como as outras proteínas utilizadas na IHQ, também é encontrada em tecidos, particularmente no fígado, pulmão, baço, tecido adiposo, glândula mamária, rim e cérebro. A atividade da biotina pode ser suprimida pelo uso de tampões alcalinos, pela pré-incubação com avidina ou com leite desnatado.

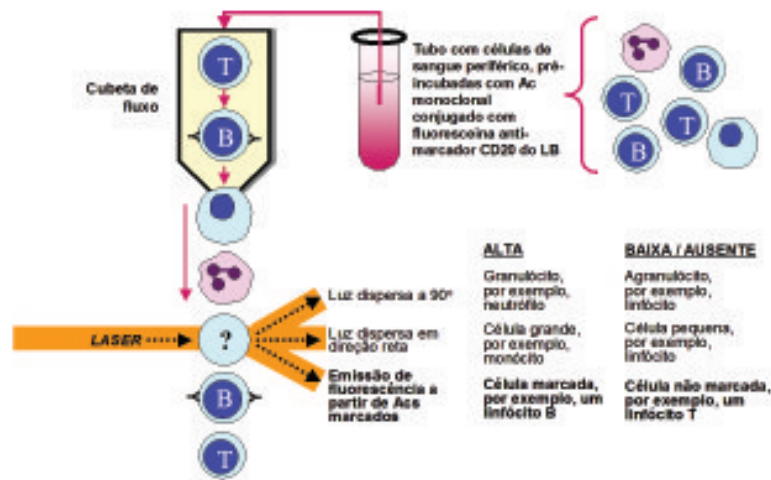
A avidina é uma glicoproteína básica com PM de aproximadamente 68 mil, obtida a partir da clara do ovo de várias espécies de aves. A molécula de avidina é quadrivalente e simétrica, onde cada lado da molécula contém um par de receptores para a biotina. A estreptavidina, obtida a partir do *Streptomyces avidinii*, possui ponto isoelétrico próximo ao neutro e mantém as propriedades de ligação da avidina sem apresentar prejuízos ao resultado final. O sistema avidina-biotina permite a amplificação de sinal, pois muitas moléculas de biotina podem se ligar a um anticorpo. E a adição da avidina marcada com corantes fluorescentes, ou com enzimas, resultam em uma amplificação da reação, facilitando a visualização do corte corado.

11.20. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas, em fluxo, em um meio líquido. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por “citometria de fluxo multiparamétrica”. A versão mais aplicada da citometria de fluxo é denominada **FACS** (*fluorescence-activated cell sorter*, separador de célula ativado por fluorescência), que foi projetada para automatizar a análise e a separação das células coradas com anticorpo fluorescente. O FACS utiliza um feixe de *laser* e um detector de luz para contar as células intactas únicas em suspensão. Através de um aparelho de detecção ótico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula.

Em sistemas celulares, as principais propriedades analisadas são o tamanho relativo, a granulosidade relativa, a complexidade interna das partículas e a intensidade relativa da fluorescência. Essas características são determinadas por meio de um sistema de acoplamento óptico-eletrônico que registra a forma como a célula, ou partícula, dispersa a luz do *laser* incidente, emitindo fluorescência (Figura 33).

Figura 33. Detecção de linfócitos B fluorescente, por citometria de fluxo



O fundamento da citometria de fluxo consiste na emissão de um feixe de luz (normalmente *laser*), de único comprimento de onda (cor), direccionado a um meio líquido em fluxo. Um número de detectores é apontado ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz. Um na linha do feixe (*Forward Scatter* ou FSC) e vários perpendiculares a este (*Side Scatter* ou SSC), além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa passando através do feixe dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula, ou juntos à partícula, podem ser excitados, emitindo luz de menor frequência do que o da fonte de luz.

Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detectores e, analisando as flutuações de brilho de cada detector (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula, individualmente. FSC correlaciona-se com o volume celular e SSC depende da complexidade interna da partícula (Ex: forma do núcleo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana). Atualmente, alguns citômetros de

fluxo têm eliminado a necessidade da fluorescência e usado somente dispersão de luz para sua medição. Outros citômetros de fluxo formam imagens de cada fluorescência da célula, dispersão de luz e transmissão de luz.

○ citômetro de fluxo é dividido fundamentalmente em cinco sistemas:

- **Sistema fluido** – Local onde ocorrerá a introdução e o alinhamento das células por diferença de pressão, e que serão interceptadas pela luz do *laser*.
- **Sistema óptico** – Contém a fonte de luz do *laser*. Normalmente são usadas lâmpadas de mercúrio ou xenon, *lasers* de alto poder (argônio, kripton), *lasers* de poder baixo (argônio-488nm, red-HeNe-633nm, green-HeNe e HeCd-UV) e *lasers* diodo (azul, verde, vermelho e violeta).
- **Sistema eletrônico** – Responsável por converter os sinais óticos detectados em sinais eletrônicos proporcionais, através de um sistema analógico para digital (ADC), gerando FSC e SSC, assim como sinais fluorescentes.
- **Sistema de amplificação** – Codifica e processa as informações recebidas em escala linear ou escala logarítmica.
- **Sistema computacional** – Responsável pela análise, processamento dos sinais e emissão do resultado, utilizando *softwares* específicos. Existe ainda um filtro e um sistema detector que capta a luz proveniente das células. A emissão de luz frontal mede o tamanho da célula e a luz lateral avalia a sua granulosidade e complexidade interna.

Modernos citômetros de fluxo são capazes de analisar várias partículas em cada segundo, em “tempo real”, e podem separar e isolar partículas com propriedades específicas. Os parâmetros possíveis de medir são: volume e complexidade morfológica das células, pigmentos celulares (como a

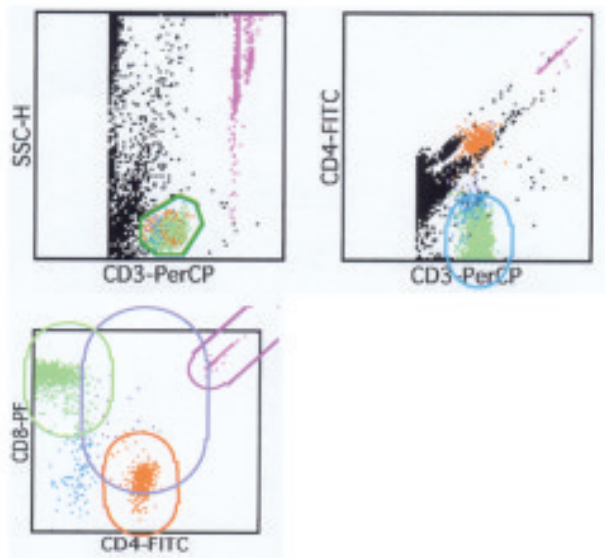
clorofila), DNA, RNA, análise e classificação de cromossomas, proteínas, antígenos à superfície celular (marcadores CD) e antígenos intracelulares, entre outras moléculas.

A hematologia foi uma das primeiras modalidades biomédicas a se beneficiar das aplicações clínicas da citometria de fluxo. Algumas destas aplicações são utilizadas regularmente para o diagnóstico ou o acompanhamento terapêutico de diferentes afecções. Em cancerologia, a detecção da célula tumoral é a aplicação mais desenvolvida. Esta detecção repousa essencialmente sobre a medição de conteúdo anormal de DNA no núcleo da célula tumoral e da expressão proteica dos antígenos tumorais.

Atualmente, a imunologia, a biologia molecular e as análises clínicas são as áreas da ciência que mais utilizam a citometria de fluxo para a detecção ou identificação de subtipos de células implicadas na imunidade. A contagem de linfócitos T consiste em classificar e quantificar as subpopulações desses linfócitos, pela pesquisa imunofenotípica dos CDs, por meio de conjugados fluorescentes específicos. Dependendo dos fluorocromos que estarão ligados aos anticorpos monoclonais, as fluorescências emitidas por eles, quando excitados pelo *laser*, terão comprimentos de ondas diferentes e, conseqüentemente, cores diferentes. Há diversos tipos de fluorocromos, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE), a proteína Clorofil peridina (PerCP) e o *Texas Red*.

Os sinais eletrônicos são usados para analisar as células de acordo com seus marcadores de superfície, e esta análise é interpretada através de um gráfico de separação dividido em janelas (*gates*) (Figura 34). O citômetro fornece o número absoluto de linfócitos, por exemplo, linfócitos T CD3+/CD4+ e de linfócitos T CD3+/CD8+, porque em cada tubo de amostra existe um número conhecido de partículas de referência conjugadas com fluorocromos (valor padrão).

Figura 34. Análise do linfócito feita pelo Citômetro de Fluxo mostrando os Gates e as populações marcadas com FITC, PE e PerCP



11.21. Testes de hipersensibilidade celular cutânea tardia

Embora existam métodos *in vitro* para o exame da imunidade celular, como, por exemplo, a linfoproliferação e a citometria de fluxo, a resposta celular também pode ser verificada *in vivo* por meio de **testes de hipersensibilidade celular cutânea tardia**. Estes testes são muito simples e podem ser empregados na avaliação geral da imunidade celular em estudos de deficiência imunológica e na verificação da exposição a determinados agentes infectoparasitários individuais ou em inquéritos epidemiológicos. É importante ressaltar que um teste positivo para um agente infeccioso não significa necessariamente diagnóstico de doença ativa ou infecção por este agente, mas apenas a presença de células Th1 de memória, cuja origem foi induzida por uma infecção primária assintomática ou de uma doença curada. O teste negativo indica que o indivíduo não deve ter tido contato com o agente que se investiga.

Estes testes, além de representarem o principal exame complementar para o diagnóstico e acompanhamento do curso de várias enfermidades infectoparasitárias, são indicados também para a avaliação da diminuição da imunidade celular Th1, ou anergia, que se configura pela ausência de resposta a uma bateria de antígenos comuns, determinada por fatores genéticos ou ambientais. Como ocorre, por exemplo, em indivíduos com infecções recorrentes, com infecções causadas por microrganismos que normalmente não são patogênicos, indivíduos em uso de imunossuppressores, indivíduos com imunodeficiências primárias ou com doenças que levam à imunodeficiência secundária, como a AIDS, neoplasias, doenças autoimunes, etc. Na suspeita de anergia, é feita a aplicação na pele, de certos produtos químicos que reagem com proteínas que induzem sensibilização sistêmica a vários metabólitos do agente sensibilizante. O dinitroclorobenzeno (DNCB) é um agente que tem sido utilizado desta maneira, com a finalidade de testar a imunidade celular em pacientes com suspeita de anergia. Este não deve ser um procedimento de rotina, e deve ser reservado a pacientes que apresentaram ausência de resposta celular aos antígenos comumente testados.

Dentre os antígenos mais utilizados, para a avaliação da resposta celular de hipersensibilidade tardia, figuram os seguintes: a tuberculina, também chamada de PPD (derivado proteico purificado), empregada no teste de Mantoux, que é utilizado para a avaliação da exposição ao *Mycobacterium tuberculosis*; a lepromina, ou antígeno de Mitsuda ou mitsudina, que é utilizada diante da suspeita de hanseníase; o extrato de *Leishmania* contido no teste de Montenegro, utilizado no diagnóstico complementar e em inquéritos epidemiológicos de leishmaniose tegumentar; os antígenos de *Candida albicans*, candidina ou oidiomicina, empregados diante da suspeita de candidíase; a tricofitina, para as dermatofitoses causadas por fungos; a paracoccidiodina, utilizada sob a forma de filtrado de cultura na avaliação da resposta celular ao *Paracoccidioides brasiliensis*, e outros.

O teste se procede pelo inóculo, após antissepsia da pele com álcool, de 0,1 mL de antígeno específico, por via intradérmica na face anterior do antebraço, usando seringas de 1 mL com agulhas nº 8x0,25mm, estéreis e descartáveis. Como controle, deve-se injetar o mesmo volume de solução salina em outro ponto do antebraço. A formação de uma pápula pequena e uniforme indica injeção correta. A injeção subcutânea leva à diluição do antígeno e pode gerar resultados falso-negativos. A leitura é realizada por medição dos maiores diâmetros do eritema e da endureção após 48-72 horas na maioria dos procedimentos. Endureção maior que 5 mm de diâmetro geralmente indica resposta positiva.

12. Alguns parâmetros utilizados no controle de qualidade do diagnóstico sorológico

O controle de qualidade para o diagnóstico sorológico das doenças infectoparasitárias, da mesma maneira que para todos os outros procedimentos laboratoriais, deve ser criteriosa em todas as etapas do processo. Começando pela fase **pré-analítica**, que inclui a indicação e solicitação corretas do teste adequado, coleta da amostra do paciente convenientemente preparado, além do transporte e manuseio da amostra em condições apropriadas até o laboratório de análise. A fase **analítica** compreende a escolha do método adequado, a realização do teste de acordo com as recomendações do fabricante e o registro do resultado obtido. A fase **pós-analítica** inclui os eventuais cálculos e a apresentação do resultado em forma de laudo final. A partir desta fase, deve ser feita a interpretação do resultado, em conjunto com os dados clínicos e demais exames laboratoriais, para que seja definida a melhor conduta.

12.1. Construção de banco de soros

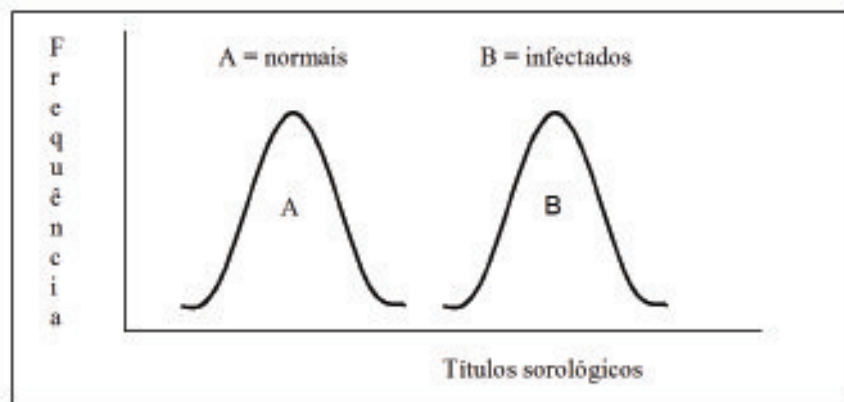
O banco de soros é uma coleção catalogada de amostras representativas de uma população que se mantém para preservar suas características imunológicas.

Para a adequada constituição, é necessário a inclusão de amostras provenientes de pessoas infectadas e de pessoas não infectadas. As amostras de pessoas infectadas, chamadas **controles positivos**, devem ser pertencentes às áreas endêmicas (se a doença possuir tal característica) e vir com diagnóstico conclusivo que demonstre o parasito ou por provas que deem tais indicações, como, por exemplo, os testes intradérmicos de hipersensibilidade celular, reação de hibridização ou a reação polimerásica em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). As amostras de indivíduos não infectados, considerados “normais” e chamados de **controles negativos**, são selecionadas mediante a apresentação de resultados negativos obtidos com as mesmas provas utilizadas para seleção das amostras positivas e, se possível for, provenientes de áreas não endêmicas da modalidade estudada. Se houver a inclusão de soros provenientes de indivíduos com outras doenças, para a verificação de respostas cruzadas, as mesmas provas diagnósticas de certeza devem ser realizadas. Todo banco de amostras necessita da aprovação de comissão de ética em pesquisa envolvendo seres humanos, bem como da aprovação de comissão de ética para uso de animais (CEUA), quando envolve amostras não humanas.

12.2. Avaliação dos métodos sorológicos

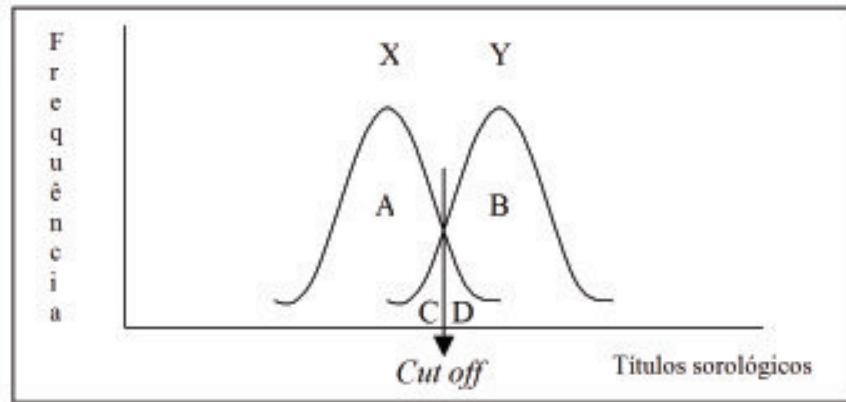
Ao analisar o comportamento sorológico de duas populações, onde uma delas seja constituída por amostras provenientes de pessoas infectadas e a outra de pessoas não infectadas, ao se comparar os resultados sorológicos obtidos em ambas, com frequência relativa em porcentagem, encontram-se duas curvas gaussianas bem definidas (Figura 35).

Figura 35. Distribuição de frequências dos títulos sorológicos de duas populações hipotéticas, uma normal A e outra infectada B, encontradas com um teste sorológico hipoteticamente ideal



Entretanto, estes dados hipotéticos ideais não refletem o que se observa em uma rotina de diagnóstico sorológico. Os resultados dos testes sorológicos se agrupam em quatro categorias, de acordo com a existência ou não da doença e a positividade ou não do teste. Para qualquer infecção que se analise, observa-se sobreposição entre as curvas de distribuição da população normal (A) e a de infectados (B), como se mostra na Figura 36, onde os soros, com resultados positivos ao teste e provenientes de pacientes nos quais o diagnóstico de certeza era positivo, denominam-se **verdadeiros-positivos**. Soros com resultados negativos obtidos de controles normais são chamados **verdadeiros-negativos**. Soros com resultados negativos provenientes de pacientes infectados são denominados **falsos-negativos** e aqueles com resultado positivo ao teste sorológico, porém obtidos de controles normais, são os **falsos-positivos**.

Figura 36. Distribuição de frequências dos títulos sorológicos, semelhantes ao que se encontra habitualmente: uma normal A e outra infectada B, obtidas com um teste sorológico hipoteticamente ideal



Neste exemplo hipotético, a sobreposição das curvas é simétrica e a linha de corte (*cut off*) encontra-se marcada ao centro, fornecendo assim, igual quantidade de resultados falsos-negativos (C) e falsos-positivos (D). Os dados com que se obtêm as curvas podem ser extraídos de um quadro de dupla entrada, como apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Demonstração de populações de indivíduos infectados e não infectados, onde: a = Verdadeiros-positivos, b = Falsos-positivos, c = Falsos-negativos, d = Verdadeiros-negativos e P = Prevalência.

TESTE	INDIVÍDUOS		TOTAL
	INFECCÃO		
	PRESENTE	AUSENTE	
POSITIVO	a	b	$a + b$
NEGATIVO	c	d	$c + d$
TOTAL	$a + c (P)$	$b + d$	n

Apesar de testes sorológicos produzirem muitos resultados verdadeiros, alguns resultados falsos, como já mencionado, podem ser gerados, sejam eles positivos ou negativos; e, por conseguinte, é comum dizer que os testes sorológicos são presuntivos, ou seja, de valor probabilístico. Estes testes, obrigatoriamente, devem ser avaliados para definir parâmetros importantes quanto às suas qualidades fixas (sensibilidade, especificidade e acurácia), uma vez que estes valores independem da prevalência da infecção estudada na população.

Um teste de triagem sorológica ideal deve ser capaz de identificar todos os indivíduos com a condição estudada e de excluir todos os indivíduos que não apresentem esta condição. A probabilidade do teste em identificar corretamente, em uma população, os indivíduos que apresentem a infecção, denomina-se **sensibilidade** (S) e pode, também, ser conceituada como a capacidade de um teste sorológico proporcionar resultados positivos nos indivíduos infectados ou, ainda, como a capacidade do método sorológico em detectar quantidades mínimas do material desejado. Calcula-se a sensibilidade com a seguinte relação:

$$\text{Sensibilidade} = a : (a + c)$$

De acordo com os dados do quadro 3

$$\text{Sensibilidade} = 300 : 400 = 0,75 \text{ ou } 75\%$$

Os resultados podem ser apresentados em uma escala de 0 a 1, mas normalmente são expressos em porcentagem.

A capacidade do teste para excluir aqueles que não são afetados é chamada **especificidade** (E), que também pode ser conceituada como a qualidade que um teste apresenta em distinguir moléculas diferentes, porém, com elevado grau de homologia. Aproveitando os dados do Quadro 3, a especificidade calcula-se por:

Especificidade = $d : (b + d)$ onde Especificidade = $540 : 600 = 0,9$ ou 90%

Quadro 3 – Resultados sorológicos hipotéticos encontrados em duas populações de indivíduos infectados e não infectados

TESTE	INDIVÍDUOS		TOTAL
	INFECÇÃO		
	PRESENTE	AUSENTE	
POSITIVO	300 a	60 b	360 a + b
NEGATIVO	100 c	540 d	640 c + d
TOTAL	400 a + c (P)	600 b + d	1000 n

A **acurácia** (A), também chamada de confiabilidade ou eficiência do teste, refere-se ao somatório dos resultados verdadeiros positivos e negativos em relação à população estudada.

Acurácia = $(a + d) : n$ onde Acurácia = $(300 + 540) : 1000 = 0,84$ ou 84%

O coeficiente de **prevalência** (P) pode ser conceituado como a porcentagem de indivíduos infectados, parasitologicamente comprovados em uma população. Esse conceito difere da soroprevalência, (SP) que considera a porcentagem de indivíduos soropositivos na população estudada.

Prevalência = $(a + c) : n$ onde Prevalência = $400 : 1.000 = 40\%$

Soroprevalência = $(a + b) : n$ onde Soroprevalência = $360 : 1.000 = 36\%$

A determinação das qualidades fixas de um teste sorológico, por si só, não satisfaz suficientemente às necessidades do controle sob os resultados sorológicos, uma vez que a ocorrência de resultados falsos pode alterar, em função da prevalência de infecção. Como as técnicas sorológicas são utilizadas em diversos lugares do mundo em áreas com diferentes coeficientes de

prevalência, é importante conhecer a probabilidade de que os resultados positivos segundo a técnica empregada sejam realmente positivos, bem como os resultados negativos sejam realmente negativos. Estas probabilidades são os valores de predição (VP) da técnica. O parâmetro mais frequentemente utilizado é o valor de predição de positividade (VPP), que permite identificar os doentes em um grupo de indivíduos considerados soropositivos. O valor de predição de negatividade (VPN) é conceituado como a probabilidade de que a doença estudada não exista em um grupo de indivíduos considerados como soronegativos. Disto deduz-se que o valor de predição pode ser dado pelo teorema de Bayes:

$$VPP = (P \times S) : (P \times S) + (1 - P) \times (1 - E)$$

$$VPN = E \times (1 - P) : E \times (1 - P) + (1 - S) \times P$$

Por outro lado, os cálculos podem expressar-se de uma forma mais simples, mediante os valores do Quadro 3 apresentado anteriormente:

$$VPP = a : (a + b) \quad \text{onde } VPP = 300 : 360 = 0,83 \text{ (83\%)}$$

$$VPN = d : (c + d) \quad \text{onde } VPN = 540 : 640 = 0,84 \text{ (84\%)}$$

É feita a aplicação do mesmo teste sorológico, com sensibilidade e especificidade invariáveis, em duas áreas endêmicas para uma determinada doença, onde a única diferença entre estas populações seja a prevalência de infecção encontrada, representada por uma população (A) de baixa prevalência e uma (B) de alta prevalência. A alteração no comportamento do teste se verifica pela modificação dos valores de predição de positividade e de negatividade. A partir dos valores apresentados no quadro 4, pode-se verificar tais modificações.

Quadro 4 - Quadro explicativo para os cálculos do valor de predição de positividade em duas populações hipotéticas: população A = baixa prevalência e população B = alta prevalência, para uma determinada infecção.

Resultado do teste	(A) Prevalência de infecção = 1%			(B) Prevalência de infecção = 10%		
	Infectados	Não infectados	total	Infectados	Não infectados	total
Positivo	980	990	1970	9800	900	10700
Negativo	20	98010	98030	200	89100	89300
Total	1000	99000	100000	10000	90000	100000
P = 1% S = 98% SP = 99% P = 10% S = 98% SP = 99% VPP = $980 / 1970 \times 100 = 49,7\%$ VPP = $9800 / 10700 \times 100 = 91,6\%$						

Conforme demonstrado, embora o teste sorológico tenha sensibilidade e especificidade elevadas, 98% e 99% respectivamente, sua aplicação em área de baixa prevalência gerou valor de predição de positividade inferior a 50%. Contrariamente, em área de alta prevalência o valor de predição de positividade elevou-se acima de 90%.

O Quadro 5 ilustra, com maiores detalhes, como o valor de predição de positividade dos testes sorológicos, com diferentes níveis de sensibilidade e de especificidade, sofrem alterações em função dos valores crescentes do coeficiente de prevalência. Via de regra, o teste sorológico não deve ser empregado em áreas de baixa prevalência em consequência da geração de numerosos resultados falsos-positivos.

Em técnicas parasitológicas dificilmente ocorrem resultados falso-positivos, como, por exemplo, a identificação de hemoparasitos em exames microscópicos pela extensão sanguínea em lâmina, ou enteroparasitos em fezes, é definitivo para comprovar uma infecção. Por outro lado, não podem ser utiliza-

dos para estimar a prevalência real de infecção, por apresentarem resultados falso-negativos.

Quadro 5 - VPP de testes com diferentes índices de sensibilidade e especificidade para diversas taxas de prevalência

VARIACÃO DO VALOR DE PREDIÇÃO DE POSITIVIDADE										
Prevalência %	especificidade = 99%					sensibilidade = 99%				
	sensibilidade %					especificidade 99%				
	70	80	90	95	99	70	80	90	95	99
0,5	2	2	5	9	33	26	29	31	22	33
1,0	3	5	9	17	50	41	45	48	49	50
5,0	15	21	34	51	84	79	81	83	83	84
10,0	27	35	52	69	92	89	90	91	91	92
20,0	45	55	71	83	96	95	95	96	96	96
Valores de predição de positividade										

Os resultados dos testes sorológicos também podem ser confrontados para a verificação da copositividade, da conegatividade e da concordância bruta. Estes parâmetros podem ser obtidos em função da distribuição dos resultados dos testes sorológicos, como representados no Quadro 6 de maneira semelhante à sensibilidade, especificidade e confiabilidade. A concordância ajustada *Kappa* (K) é um parâmetro que se baseia na comparação do índice de concordância esperada com o índice de concordância observada.

Quadro 6 - Quadro explicativo para os cálculos da Cointeratividade, e da Cointeratividade, Cointeratividade bruta e Cointeratividade ajustada – *Kappa* (K.)

TESTE 2	TESTE 1 (Teste de referência)		
	PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
POSITIVO	a	b	a + b (p1)
NEGATIVO	c	d	c + d (q1)
TOTAL	a + c (p2)	b + d (q2)	a + b + c + d
Cointeratividade = a : (a + c) Cointeratividade = d : (b + d) Cointeratividade bruta = (a + d) : (a + b + c + d) Kappa = [2 (ad + bc) : (p1q2 + p2q1)]			

Pode-se utilizar o seguinte critério para conceituar os resultados do controle de qualidade: valores $\leq 40,0\%$ são considerados pobres, de 40,1 até 79,9% regulares, valores $\geq 80,0$ a 89,9% são considerados bons e $\geq 90\%$ são considerados excelentes.

Resumo do capítulo

O sistema imunitário, assim como os demais sistemas do organismo, possui suas próprias células, tecidos, órgãos e moléculas. A principal célula desse sistema é o linfócito. Os linfócitos são as únicas células do organismo que expressam receptores altamente diversificados para o antígeno, o que permite o reconhecimento de uma grande variedade de substâncias estranhas.

A ativação do sistema imune adaptativo depende da apresentação de antígenos. Um antígeno é qualquer substância que pode ser reconhecida por um anticorpo ou por um receptor de célula T. Os antígenos possuem duas propriedades: a imunogenicidade e a antigenicidade. Os que não são capazes de induzir uma resposta imune são chamados de haptenos e precisam ser acoplados às moléculas carreadoras para adquirirem tal capacidade. O determinante antigênico, ou epitopo, é a menor porção da molécula e é responsável pela propriedade de estimular uma resposta imune. As superfícies celulares, incluindo os microrganismos, geralmente possuem uma grande quantidade de determinantes antigênicos.

Os anticorpos atuam na resposta imune ligando-se especificamente ao agente patogênico ou seu subproduto, ativando o sistema complemento, opsonizando para aumentar a fagocitose e a citotoxicidade dependente de anticorpo, e permitindo, assim, que microrganismos e parasitos sejam destruídos pelas células do sistema imune.

Os anticorpos se encontram distribuídos por todo o organismo, pois os agentes infecciosos podem vencer as diversas barreiras naturais e estabelecer uma infecção em qualquer parte do corpo. Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune são as IgM e tendem a ser de baixa afinidade, mas são muito potentes na ativação do sistema complemento. A IgG é o principal isotipo no sangue e fluidos extracelulares, e é transportada através da placenta diretamente para a corrente circulatória do feto durante a vida intrauterina. A IgA tem papel importante na proteção das superfícies

mucosas contra patógenos ou seus subprodutos. A IgE tem como principal função o recrutamento de células inflamatórias através da ativação de mastócitos e basófilos, como também pode estar envolvida na eliminação de parasitos e processos alérgicos.

Existem vários sistemas proteicos de reação em cadeia no plasma sanguíneo, dentre estes, o sistema complemento, que é um complexo sistema constituído por moléculas termolábeis e termoestáveis, e que tem como função a eliminação de um agente estranho, facilitando a fagocitose, quando algumas proteínas ativadas do complemento opsonizam a superfície do patógeno; por reação Inflamatória, quando os pequenos fragmentos de proteínas recrutam fagócitos ao local da atividade inflamatória; ou por lise direta, quando, uma vez desencadeada a cascata, os componentes terminais do complemento lesam a membrana dos microrganismos.

Todo organismo multicelular possui algum sistema de defesa que distingue os patógenos e elimina-os do hospedeiro. A vantagem de tal imunidade específica é que o sistema imune pode rapidamente adaptar-se àqueles patógenos que são mais frequentemente encontrados no meio ambiente local. Esta capacidade é conseguida através do complexo principal de histocompatibilidade, cujos produtos desempenham um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio e o não próprio.

Didaticamente, a imunidade adaptativa se organiza em imunidade humoral e imunidade celular. A imunidade mediada por células se desenvolve por uma rede de interações que resulta em defesa contra microrganismos, os quais sobrevivem dentro de fagócitos ou de outras células. A resposta é iniciada pelo reconhecimento do antígeno de microrganismos intracelulares por células T através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Na resposta via CD8, somente a célula alvo que porte o antígeno associado à classe I pode ser lisada ou induzida a entrar em apoptose. Em outro mecanismo da resposta celular, as células T CD4+ Th1 ativam, por exemplo, macrófagos

infectados através de citocinas como o IFN- γ . Quando um patógeno resiste aos efeitos dos macrófagos ativados, pode-se desenvolver uma infecção crônica. Já a resposta imune humoral conduz à destruição dos microrganismos extracelulares e previne ou diminui a disseminação das infecções intracelulares, por meio da neutralização, opsonização e ativação do sistema complemento. A ativação das células B e sua diferenciação em células secretoras de imunoglobulinas são deflagradas pelo antígeno específico e requer a participação de células CD4+ Th2, que também controlam a mudança de isotipo e desempenham papel importante na hipermutação somática, o que é necessário para a maturação da afinidade dos anticorpos.

Em algumas infecções, o sistema imunitário não consegue eliminar o parasito, mas reage isolando o agente com células inflamatórias. Na esquistossomose, a formação do granuloma é um exemplo da reação do hospedeiro contra o parasito. A maioria dos parasitos desenvolve mecanismos de escape do sistema imune para garantir sua sobrevivência e alguns comprometem tanto as respostas mediadas por anticorpos como as mediadas por células.

A medida das interações entre antígeno-anticorpo com o propósito de diagnóstico é conhecida como imunossorologia. As técnicas imunossorológicas fundamentam-se na natureza da interação antígeno-anticorpo nas quais podem expressar-se em duas formas distintas, em decorrência da utilização de imunorreagentes livres de marcação ou de reagentes marcados. As técnicas que não empregam marcadores demonstram-se por fenômenos visíveis. Portanto, ao se combinar anticorpos com antígenos solúveis, os complexos resultantes podem formar precipitados insolúveis. Se os antígenos são particulados (bactérias, protozoários, hemácias), os anticorpos os aglutinam. Se o anticorpo pode ativar a via clássica do sistema complemento e o antígeno se encontra em uma superfície celular, o resultado pode ser a citólise. As técnicas que empregam imunorreagentes marcados caracterizam-se pela simples combinação do antígeno com o anticorpo, necessitando que um deles esteja marcado convenientemente.

O imunorreagente pode ser marcado com corantes fluorescentes ou quimioluminescentes, radioisótopos, enzimas, ouro ou prata coloidais, entre outros marcadores.

Apesar de testes sorológicos produzirem muitos resultados verdadeiros, alguns resultados falsos podem ser gerados, sejam eles positivos ou negativos e, por conseguinte, é comum dizer que os testes sorológicos são presuntivos, ou seja, de valor probabilístico. Estes testes, obrigatoriamente, devem ser avaliados para definir parâmetros importantes quanto às suas qualidades fixas (sensibilidade, especificidade e acurácia), uma vez que estes valores independem da prevalência da infecção estudada na população.

Questões

- 1) Descreva o processo de maturação das células T_H no timo.
- 2) Comente sobre a importância das moléculas de adesão na resposta imune.
- 3) Defina **imunogenicidade** e **especificidade**.
- 4) Defina **adjuvante** e sua função na resposta imune.
- 5) Descreva as principais propriedades das cinco classes de Imunoglobulinas.
- 6) Como você prepararia um anticorpo contra IgG humana?
- 7) Descreva o processo de ativação da via clássica e da via alternativa do complemento.
- 8) Descreva os principais mecanismos de atuação do sistema complemento na eliminação de patógenos.
- 9) Descreva o processamento e apresentação de um antígeno intracelular presente no citoplasma da célula.

- 10) Descreva o processamento e apresentação de um antígeno, oriundo de uma bactéria extracelular, que foi ativamente fagocitada por um macrófago.
- 11) Descreva os principais mecanismos de atuação da resposta humoral.
- 12) Descreva os mecanismos de ação exercidos pelas células CD8 na resposta celular.
- 13) Descreva os principais mecanismos de imunidade inata e adaptativa contra vírus.
- 14) Descreva os principais mecanismos de imunidade adaptativa e específica contra bactérias extracelulares e bactérias intracelulares.
- 15) Como os helmintos parasitas do lume intestinal são expulsos do organismo?
- 16) Sempre que encontramos uma reação imunológica positiva, ela determina a presença do agente etiológico? Justifique.
- 17) que é conversão sorológica?
- 18) Explique o fenômeno **prozona** e como fazemos sua neutralização.
- 19) que causa reação cruzada em provas sorológicas? você sugere para impedir esse fenômeno?
- 20) Quais as provas sorológicas realizadas em banco de sangue para prevenção de doenças transmissíveis?
- 21) Quais as vantagens e desvantagens do uso de anticorpos monoclonais em provas sorológicas?
- 22) Como se processam as reações de aglutinação direta? Dê um exemplo de teste comumente usado para fins de diagnósticos.
- 23) Qual o fundamento da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)?
- 24) Fale sobre a reação Imunoenzimática (ELISA), quanto ao seu modo de ação, suas vantagens e desvantagens.

25) Na etapa de sensibilização das placas plásticas de microdiluição, da reação imunoenzimática ELISA, utilizamos tampões com pH elevado (por volta de 9,6) para preparar os antígenos proteicos. Por quê?

26) Com que propósito utilizamos caseína (proteína do leite) no desenvolvimento do ELISA?

27) Fale sobre o fundamento do teste de imunoeletrotransferência (*Western-blotting*).

28) Conceitue:

a) Sensibilidade; b) Especificidade

Bibliografia consultada

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. ; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

BACAL, N. S, FAULHARER, M. H. W. *Aplicação prática em citometria de fluxo*. São Paulo: Atheneu, 2003.

BENJAMINI, E. ; COICO, R. ; SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

DUARTE, R. *Ensaio imunoenzimático (ELISA) para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae)*. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

FERREIRA, W.; ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

HALLIWELL, R. E. W. ; GORMAM, N. T. *Imunologia clínica veterinária*. Zaragoza: Acribia, 1992.

JANEWAY, C. A. J.; et al. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

KINDT, T. J. ; GOLDSBY, R. A. ; OSBORNE, B. A. ; *Imunologia de Kuby*. 6.ed. Bookman, 2008.

O'CONNOR, J. E. et al. *The relevance of flow cytometry for biochemical analysis*. *IUBMB Life*. v. 51, n. 4, p. 231-239, 2001.

- PARHAM, P. *O sistema imune*. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- PEAKMAN, M. ; VERGANI, D. *Imunologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.
- PEREIRA, W. A. *Manual de transplantes de órgãos e tecidos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1996.
- ROITT, I. ; BROSTOFF, J. ; MALE, D. *Imunologia*. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003.
- ROSEN, F. ; GEHA, R. *Estudos de casos em imunologia*, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- SILVA, W. D. ; MOTA, I. *Bier: Imunologia básica e aplicada*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- TERR, AI. *et al. Imunologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.
- THUSFIELD, M. *Epidemiologia veterinária*. Zaragoza. Acribia, 1990.
- VAZ, N. M. ; FARIA, A. M. C. *Guia incompleto de imunobiologia: imunologia como se o organismo importasse*. Belo Horizonte: COOPMED, 1993.



Capítulo 2

Virologia

Paulo Roberto Soares Stephens

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira

Flávia Coelho Ribeiro

Leila Abboud Dias Carneiro

1. Introdução

Existem muitas controvérsias na comunidade científica a respeito do vírus ser ou não um ser vivo. Muitos autores consideram que a vida se originou do RNA, pois, a partir desta molécula são formadas novas quantidades dela mesma. Em 1960, o físico alemão Manfred Eigen, ganhador de um prêmio Nobel, descobriu que era possível a replicação de RNA *in vitro*. O RNA, portanto, tornou-se um grande candidato à condição de supermolécula da vida primitiva, capaz de se replicar e sofrer mutações, albergando genes codificadores de enzimas e outras proteínas.

Essa molécula, denominada “RNA de Eigen”, é muito semelhante ao vírus, pois se encontra na fronteira entre o químico e o biológico. Uma das hipóteses da origem do vírus, denominada “Teoria dos Elementos Subcelulares”, é de que o vírus seria proveniente de uma molécula de RNA. Uma outra hipótese defende que o vírus teria se originado de seres unicelulares de vida

livre que, por uma perda progressiva de propriedades celulares, criou uma dependência, tornando-o um parasita intracelular obrigatório.

Os que defendem que o vírus não é um ser vivo partem do princípio de que ele não tem vida livre, pois sua replicação só é possível dentro de uma célula viva. Além disso, alguns desses agentes possuem a capacidade de se cristalizar quando submetido a situações adversas. Entretanto, os que o classificam como ser vivo se apoiam em duas características. A primeira se refere à sua capacidade de replicação que os diferem de outros agentes, tais como as toxinas bacterianas; e a segunda, à presença de uma estrutura protetora de seu material genético, ausente nos plasmídeos (molécula de DNA circular).

Apesar de terem a capacidade de se replicar, os vírus não possuem um aparato enzimático suficiente para a replicação, necessitando, assim, da maquinaria celular para completar o seu ciclo replicativo, o que o torna um parasita intracelular obrigatório.

Sua fragilidade “aparente”, por ser estritamente dependente da célula, é descartada pela capacidade de controle e redirecionamento do metabolismo celular para o seu próprio benefício. Apesar da baixa complexidade estrutural, pode causar grandes danos à célula hospedeira, mesmo apresentando morfológicamente apenas o material genético, um capsídeo e, em alguns vírus, um envelope.

Algumas propriedades distinguem os vírus de outros microrganismos. A primeira está relacionada ao seu tamanho, o qual pode variar de 10 a 300 nm. Dessa forma, são considerados os menores microrganismos existentes, podendo ser visualizados apenas através da microscopia eletrônica. Para fins de comparação, lembramos que as bactérias e as hemácias possuem, em média, 10 a 15 vezes o tamanho dos vírus, o que possibilita a identificação destes por meio da microscopia ótica.

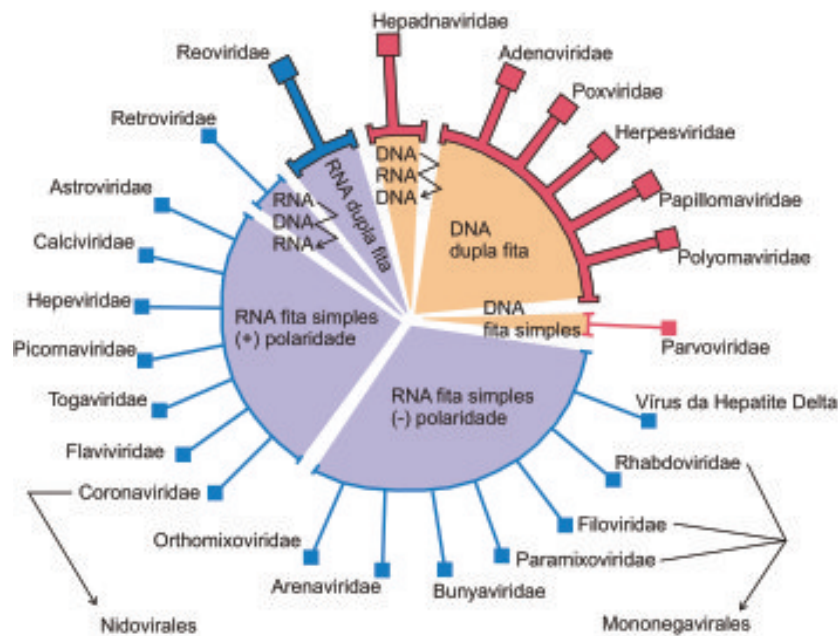
A segunda propriedade se refere ao genoma viral, que pode ser DNA ou RNA, com exceção do *Mimivírus* (família: *Mimiviridae*), o qual apresenta em seu genoma os dois ácidos nucleicos (DNA e RNA), descoberto em 2003, por pesquisadores da Universidade Méditerranée, em Marseille, França (LA SCOLA *et al.*, 2003). O ácido nucleico contém os genes responsáveis pelas informações genéticas para a codificação de proteínas com composição química bem definida, capazes de induzir respostas imunológicas específicas. Esta especificidade é uma das características virais, ou seja, quando somos acometidos por uma infecção viral, o nosso sistema imune produz anticorpos específicos, que podem ser identificados através do diagnóstico sorológico. O mecanismo de replicação viral favorece as frequentes mutações, burlando, assim, o sistema imune.

Outra importante propriedade dos vírus é a sua natureza particulada, já que ele é capaz de se replicar, formando seus componentes separadamente, sendo o ácido nucleico uma das primeiras moléculas a ser formada. Como mencionado anteriormente, o vírus precisa necessariamente de uma célula viva para realizar seu ciclo. Dessa forma, tratam-se de parasitas estritos, não possuindo atividade metabólica fora das células hospedeiras. Estas células podem ser de animais, vegetais ou microrganismos .

As propriedades físico-químicas dos vírus os tornam capazes de infectar o organismo através de receptores de membrana específicos, presentes nas células hospedeiras. O fato de o vírus apresentar tropismo celular vai influenciar no tipo de doença causada. Por exemplo, um vírus que possui afinidade por células do sistema imune compromete a sua função. Assim, a interação vírus-hospedeiro é a chave de muitos aspectos das doenças virais, tanto da transmissão quanto da capacidade de o vírus de se sobrepor às defesas do hospedeiro. Uma resposta imune exacerbada do hospedeiro pode, também, contribuir para causar maiores danos, agravando a enfermidade.

2. Taxonomia Viral

Figura 1. Adaptado do livro *Virologia Humana*, autora Ledy do Horto dos Santos Oliveira



O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) vem aprimorando as normas de classificação viral passo a passo, estabelecendo, assim, uma taxonomia exclusiva para a organização dos vírus. O mais importante de todo esse princípio é que os vírus podem ser agrupados de acordo com as suas propriedades físico, químicas e biológicas, assim como as das células que infectam. Dessa forma, os vírus podem ser classificados de acordo com o tipo de ácido nucleico, simetria do capsídeo, presença ou ausência do envelope, tamanho e sensibilidade às substâncias químicas.

Quanto ao genoma dos vírus, este pode ser constituído por fita simples (ss) ou dupla (ds), linear ou circular, de polaridade positiva ou negativa. As diferentes características do ácido nucleico conduzirão a variadas estratégias de

replicação. Alguns vírus são capazes de realizar recombinações genéticas e montagens incorretas de partículas virais, podendo produzir vírus provenientes de diferentes ancestrais. Certos vírus, como o HIV, têm seus ácidos nucleicos incorporados ao genoma da célula hospedeira. Logo, através da taxonomia, não é possível associarmos uma espécie de vírus a um ancestral comum.

Uma outra classificação viral foi definida por David Baltimore, em 1971, a fim de correlacionar as características do ácido nucleico com as estratégias de replicação. Esta classificação não tem finalidade taxonômica, uma vez que o autor utiliza a já existente.

Classificação de Baltimore:

- Classe I - DNA de fita dupla - Ex: *Adenovírus*, *Herpesvírus* e *Poxvírus*.
- Classe II - DNA de fita simples positiva - Ex: *Parvovírus*
- Classe III - RNA de fita dupla - Ex: *Reovírus*, *Birnavírus*
- Classe IV - RNA de fita simples positiva - Ex: *Picornavírus* e *Togavírus*
- Classe V - RNA de fita simples negativa - Ex: *Orthomixovírus* e *Rhabdovírus*
- Classe VI - RNA de fita simples positiva, com DNA intermediário no ciclo biológico do vírus - Ex: *Retrovírus*
- Classe VII - DNA de fita dupla com RNA intermediário - Ex. *Hepadnavírus*

3. Estrutura viral

Basicamente os vírus são constituídos por dois componentes essenciais: a parte central, que recebe o nome de cerne, onde se encontra o genoma, e que pode ser DNA ou RNA (salvo exceção); associado a uma capa proteica denominada capsídeo, formando ambos o nucleocapsídeo.

Ao final da replicação, a progênie viral é constituída por partículas completas (vírion), as quais são infecciosas, e por outras partículas incompletas e não infecciosas. Em alguns gêneros, com o *Poliovírus* e o *Adenovírus*, os vírions consistem unicamente de nucleocapsídeo. Já em outros gêneros, como o *Mixovírus*, o *Herpesvírus* e o *Poxvírus*, os vírions são constituídos por uma membrana lipoproteica externa, o envelope. Muitos vírus adquirem o envelope durante sua saída da célula hospedeira, para onde levam parte da membrana celular.

Os vírus possuem propriedades físico-químicas e biológicas importantes na interação com a célula hospedeira. Entre elas, podemos destacar: massa molecular, pH, temperatura, estabilidade iônica, densidade, suscetibilidade a agentes físicos e químicos, composição proteica (de carboidratos e de lipídios), natureza e afinidade antigênica, tropismo, transmissão e patogenicidade.

A partir do arranjo estrutural do nucleocapsídeo, os vírus apresentam as seguintes simetrias: icosaédrica, helicoidal e complexa. Na forma icosaédrica, o capsídeo está organizado como um polígono retangular. Nos vértices dos triângulos são encontrados os capsômeros, classificados em Hexâmeros, quando possuem seis lados, e em Pentâmeros, quando constituídos por cinco lados. Dessa forma, os vírus icosaédricos¹ assemelham-se a cristais. O número e a arrumação dos capsômeros são úteis na identificação desses vírus. Como exemplos destes vírus existem os *Adenovírus*, os *Picornavírus*, os *Rinovírus*, dentre outros.

Nos vírus com morfologia helicoidal, o ácido nucleico é circundado por um capsídeo cilíndrico como uma estrutura de hélice. Esta forma pode ser de dois tipos: helicoidal rígido, que se assemelha a bastonetes, e helicoidal frouxo, cujos nucleocapsídeos se dobram em forma de novelos, geralmente irregulares, assumindo um aspecto polimórfico. Exemplificando este grupo de vírus existem o *Influenza* e o vírus do Mosaico do Tabaco, dentre outros.

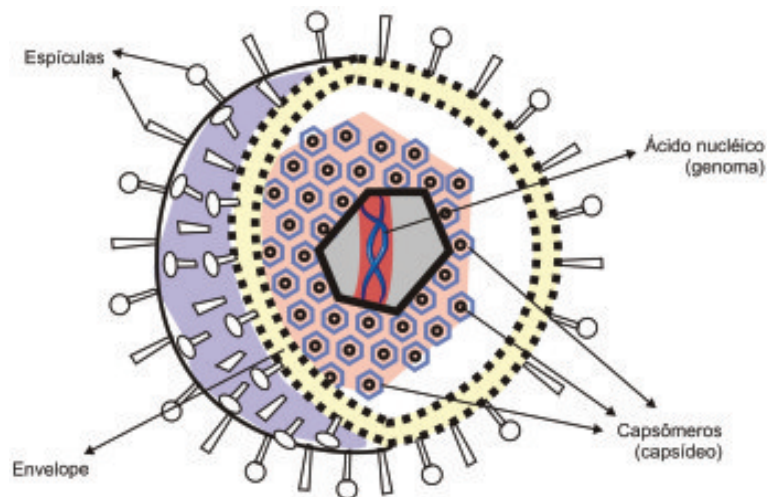
¹ Figura geométrica com vinte faces iguais.

A grande maioria dos vírus tem seus elementos organizados segundo as simetrias icosaédrica ou helicoidal. Entretanto, alguns vírus, como o *Poxvírus*, apresentam uma organização morfológica mais complexa, pois podem apresentar duas cadeias peptídicas na constituição do capsídeo. Sua forma resulta da suborganização de cada um dos componentes da partícula viral, como é o caso dos bacteriófagos. Estes últimos agentes parasitam as bactérias, introduzindo nestas o material genético. Para tanto, os bacteriófagos possuem uma estrutura composta de cabeça poligonal, cauda, bainha contrátil, placa basal e fibras (Figura 3). Existem também bacteriófagos com estrutura icosaédrica.

A estrutura do genoma depende se o vírus é RNA ou DNA, pois o DNA apresenta os nucleotídeos citosina, guanina, adenosina e timina, enquanto que o RNA possui a uracila no lugar da timina. O genoma de RNA ou DNA pode ser constituído por uma única fita (ss) ou por duas fitas (ds). Fitas positivas de RNA são fitas que contêm o código que será traduzido pelos ribossomos. Fitas positivas de DNA são fitas que contêm a mesma base sequencial do RNA mensageiro. Fita negativa de RNA ou DNA é a fita com base sequencial complementar à fita positiva.

Concluindo, o vírus é constituído basicamente por duas estruturas: ácido nucleico e capsídeo, sendo que, em alguns grupos, apresentam também o envelope ou envólucros. A função do ácido nucleico é albergar a informação genética (replicação viral) e a do capsídeo é a proteção do genoma. Além disso, esta estrutura é a principal responsável pela indução da resposta imune do hospedeiro. Em vírus envelopados, os lipídeos se apresentam na forma de fosfolipídeos, o que auxilia a entrada do vírus na célula hospedeira e confere uma maior proteção do microrganismo (Figura 2).

Figura 2. Estrutura viral. Adaptação e arte gráfica por Raphael dos Santos Stephens.



4. Ciclo viral

A replicação viral, que ocorre no interior da célula do hospedeiro, evolui seguindo as etapas de adsorção, penetração, desnudamento, transcrição e tradução (síntese), maturação e liberação (Figura 3).

4.1. Adsorção

É a ligação de uma molécula presente na superfície da partícula viral com os receptores específicos da membrana celular do hospedeiro. Nos vírus envelopados, as estruturas de ligação geralmente se apresentam sob a forma de espículas, como nos *Paramyxovírus* e nos vírus sem envelope. A ligação célula-vírus geralmente está relacionada a um ou grupo de polipeptídeos estruturais, como acontece nos *Papilomavírus*. A presença ou ausência de receptores celulares determina o tropismo viral, ou seja, o tipo de célula em que são capazes de ser replicados. Para haver a adsorção,

é necessária uma ponte entre as proteínas mediadas por íons livres de cálcio e magnésio, uma vez que as proteínas apresentam carga negativa. Outros fatores vão influenciar diretamente na adsorção do vírus na membrana celular, tais como, temperatura, pH e envoltórios com glicoproteínas.

4.2. Penetração

É a entrada do vírus na célula. Esta pode ser feita de duas maneiras: fusão e viropexia. A fusão é quando a membrana celular e o envelope do vírus se fundem, permitindo a entrada deste no citosol da célula. No caso da família *Paramixoviridae*, a proteína F catalisa a ligação da membrana com o envelope. A viropexia é uma invaginação da membrana celular mediada por receptores e por proteínas, denominadas clatrininas, que revestem a membrana internamente. Nos dois mecanismos existe uma dependência em relação à temperatura adequada, que fica em torno de 37°C, em vírus que replicam em células de vertebrado.

4.3. Desnudamento

Neste processo, o capsídeo é removido pela ação de enzimas celulares existentes nos lisossomos, expondo o genoma viral. Além disso, se observa a fase de eclipse, onde não há aumento do número de partículas infecciosas na célula hospedeira. De uma maneira geral, o vírus que possui como ácido nucleico o DNA faz síntese no núcleo, com exceção do *Poxvírus*, uma vez que precisa da enzima polimerase, encontrada no núcleo da célula. O vírus que possui como genoma o RNA faz a síntese viral no citoplasma, com exceção do vírus Influenza, pois já possui a enzima polimerase.

4.4. Síntese viral

A síntese viral compreende a formação das proteínas estruturais e não estruturais a partir dos processos de transcrição² e tradução³. Os vírus foram agrupados em sete classes propostas por Baltimore em 1971, de acordo com as características do ácido nucleico e as estratégias de replicação.

Nos vírus inseridos nas classes I, III, IV e V, o processo de tradução do RNA mensageiro ocorre no citoplasma da célula hospedeira. Já nos vírus da classe II, este processo ocorre no núcleo. Em todas estas classes, o RNA mensageiro sintetizado vai se ligar aos ribossomas, codificando a síntese das proteínas virais. As primeiras proteínas a serem sintetizadas são chamadas de estruturais, pois vão formar a partícula viral. As tardias são as proteínas não estruturais, que participam do processo de replicação viral.

Na classe VI, os vírus de RNA realizam a transcrição reversa formando o DNA complementar ($\text{RNA}' \rightarrow \text{DNA}' \rightarrow \text{RNA}$), devido a presença da enzima transcriptase reversa (família *Retroviridae*). Os vírus da classe VII apresentam um RNA intermediário de fita simples, maior do que o DNA de cadeia dupla que o originou ($\text{DNA}' \rightarrow \text{RNA}' \rightarrow \text{DNA}$).

Resumindo, abaixo estão descritas as características principais de cada classe.

- Classe I: Ocorre no citoplasma, independente do genoma celular, que é bloqueado.
- Classe II: É realizada no núcleo, simultaneamente à síntese do genoma celular.
- Classe III: Processa-se no citoplasma; sendo, no início, apenas umas das fitas do ácido nucleico copiada.

² É o processo de formação do RNA mensageiro a partir do DNA.

³ É o processo de conversão de uma molécula, ou sequência nucleotídica, em aminoácidos, formando uma proteína.

- Classe IV: Ocorre no citoplasma, por meio de um processo complexo, ainda pouco esclarecido.
- Classe V: A fita simples de RNA serve de molde para a formação de genoma viral e síntese de RNA mensageiro.
- Classe VI: Pertence a essa classe a família *Retroviridae*, que possui uma enzima chamada Transcriptase Reversa, responsável pela síntese de DNA a partir de RNA.
- Classe VII: Tem como exemplo a família *Hepadnaviridae*, cuja característica principal é a formação de um RNA intermediário.

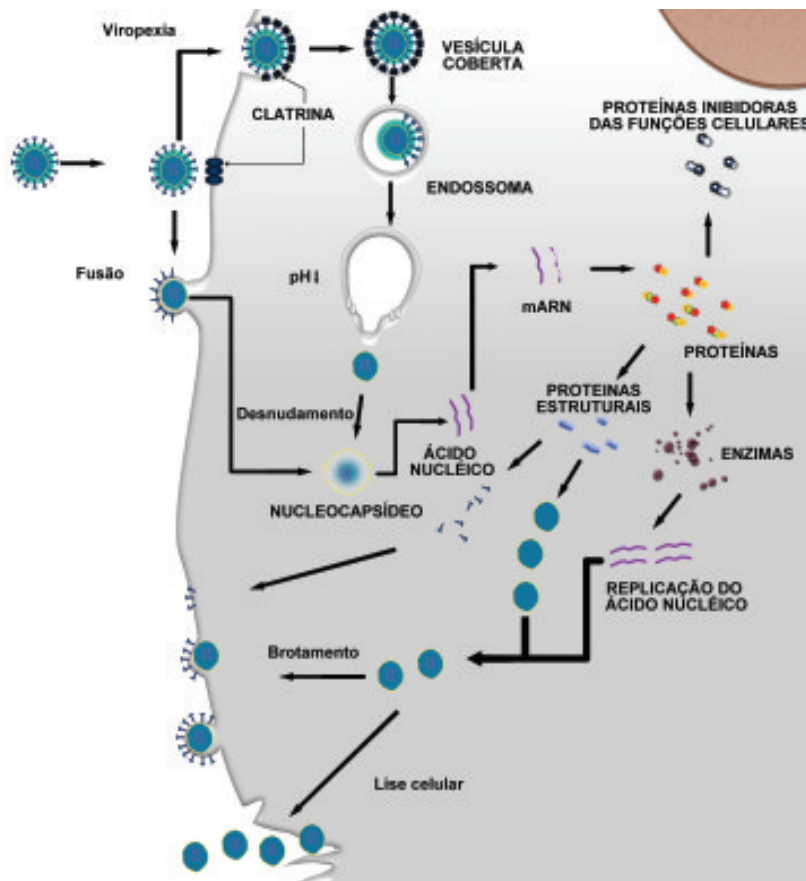
4.5. Montagem e Maturação

Nessa fase, as proteínas vão se agregando ao genoma, formando o nucleocapsídeo. Alguns vírus, como o *Rotavírus*, apresentam mais de um capsídeo. A maturação consiste na formação das partículas virais completas, ou vírions, que, em alguns casos, requerem a obtenção do envoltório lipídico ou envelope. Este processo, dependente de enzimas tanto do vírus quanto da célula hospedeira, podendo ocorrer no citoplasma ou no núcleo da célula. De uma forma geral, os vírus que possuem genoma constituído de DNA condensam as suas partes no núcleo, enquanto os de RNA, no citoplasma.

4.6. Liberação

A saída do vírus da célula pode ocorrer por lise celular ou brotamento. Na lise celular (ciclo lítico), a quantidade de vírus produzida no interior da célula é tão grande que a célula se rompe, liberando novas partículas virais que vão entrar em outras células. Geralmente, os vírus não envelopados realizam este ciclo, ao passo que os envelopados saem da célula por brotamento. Neste caso, os nucleocapsídeos migram para a face interna da membrana celular e saem por brotamento, levando parte da membrana.

Figura 3. Replicação viral



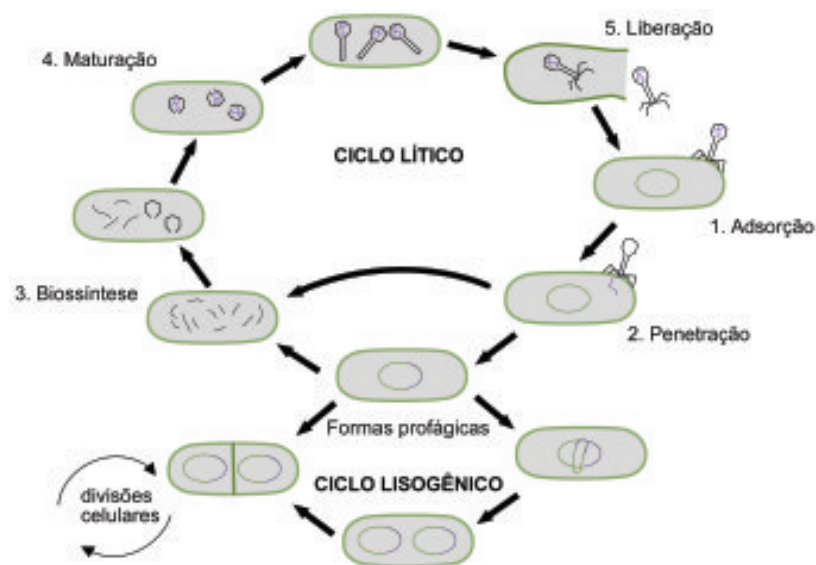
Observação: **Replicação dos bacteriófagos**

Em relação aos bacteriófagos, nos dois ciclos (lítico e lisogênico), as fases de replicação são quase idênticas. Entretanto, no ciclo lítico, o vírus insere o seu material genético na célula hospedeira, onde as funções normais desta são interrompidas pela inserção do ácido nucleico viral, produzindo tantas partículas virais que ao “encher” demasiadamente a célula, a arrebenta, liberando um grande número de novos vírus. Concluindo, no ciclo lítico há uma rápida replicação do genoma viral, montagem e liberação de

vírus completos, levando à lise celular, ou seja, a célula infectada rompe-se e os novos vírus são liberados.

No lisogênico, o vírus insere seu ácido nucleico na célula hospedeira, onde este torna-se parte do DNA da célula infectada e a célula continua com suas funções normais. Durante a mitose, o material genético da célula com o do vírus incorporado sofre duplicação, gerando células-filhas com o “novo” genoma. Logo, a célula infectada transmitirá as informações genéticas virais sempre que passar por mitose e todas as células estarão infectadas também (Figura 4).

Figura 4. Ciclo lítico e Lisogênico



5. Patogênese da infecção viral

A doença viral ocorre em consequência da infecção viral em um hospedeiro, o qual pode apresentar ou não sinais e sintomas clínicos. Em muitos casos, a infecção viral não é capaz de causar alterações clínicas

visíveis no indivíduo, infecção inaparente ou subclínica. Entretanto, quando observamos alterações clínicas no hospedeiro, chamamos de infecção sintomática ou aparente.

Algumas infecções virais podem causar o que chamamos de síndrome, que consiste em um grupo de sinais⁴ e sintomas⁵ específicos, caracterizando uma determinada infecção. Sendo assim, podemos considerar que um mesmo vírus pode causar sintomas clínicos diferentes. Além disso, também é possível que diferentes vírus possam causar os mesmos sintomas (Tabela 1).

Tabela 1- Correlação entre alguns sintomas clínicos da via respiratória e o agente viral

Síndromes	Principais sintomas	Causas virais mais comuns		
		Lactantes	Crianças	Adultos
Laringite/ gripe	Rouquidão, tosse “de cachorro”	Parainfluenza, Influenza	Parainfluenza, Influenza	Parainfluenza, Influenza
Traqueobronquite	Tosse	Parainfluenza, Influenza	Parainfluenza, Influenza	Influenza, Adenovírus
Bronquiolite	Tosse, dispneia	Vírus sincicial respiratório, Parainfluenza	Raro	Raro
Faringite	Faringite	Adenovírus, Herpes simples	Adenovírus, Vírus Coxsackie	Adenovírus, Vírus Coxsackie
Pneumonia	Tosse, dor torácica	Vírus sincicial respiratório, Influenza	Influenza, Parainfluenza	Influenza, Adenovírus
Resfriado comum	Obstrução nasal, secreção nasal	Rinovírus, Adenovírus	Rinovírus, Adenovírus	Rinovírus, Coronavírus

⁴ É o que o médico ou pessoas próximas ao paciente observam, como lesões na pele, vômito, diarreia, etc.

⁵ É o que o paciente relata. Como dor de cabeça, dores no corpo, tontura, etc.

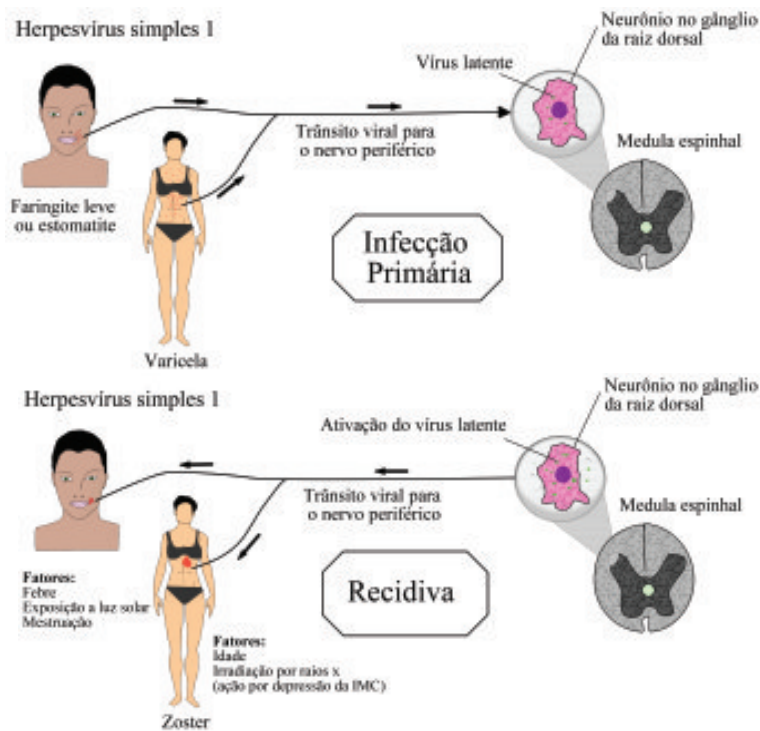
Os diferentes sinais e sintomas da doença viral observados em um hospedeiro são determinados por características específicas do agente, e também do hospedeiro, as quais são influenciadas por fatores genéticos de ambos.

A patogênese viral refere-se à interação de fatores virais e do hospedeiro, que levam à produção de doença. Um vírus patogênico tem que ser capaz de infectar e causar sinais da doença em um hospedeiro suscetível. No processo da patogênese viral podemos observar doenças mais severas ou mais brandas. Isso ocorre devido à existência de cepas virais mais ou menos virulentas, ou às diferentes respostas imunológicas do hospedeiro.

As respostas das células dos hospedeiros suscetíveis às infecções virais podem ocorrer através de três caminhos diferentes: ausência de alterações aparentes, efeito citopático (CPE) seguido de morte e transformação celular (crescimento alterado).

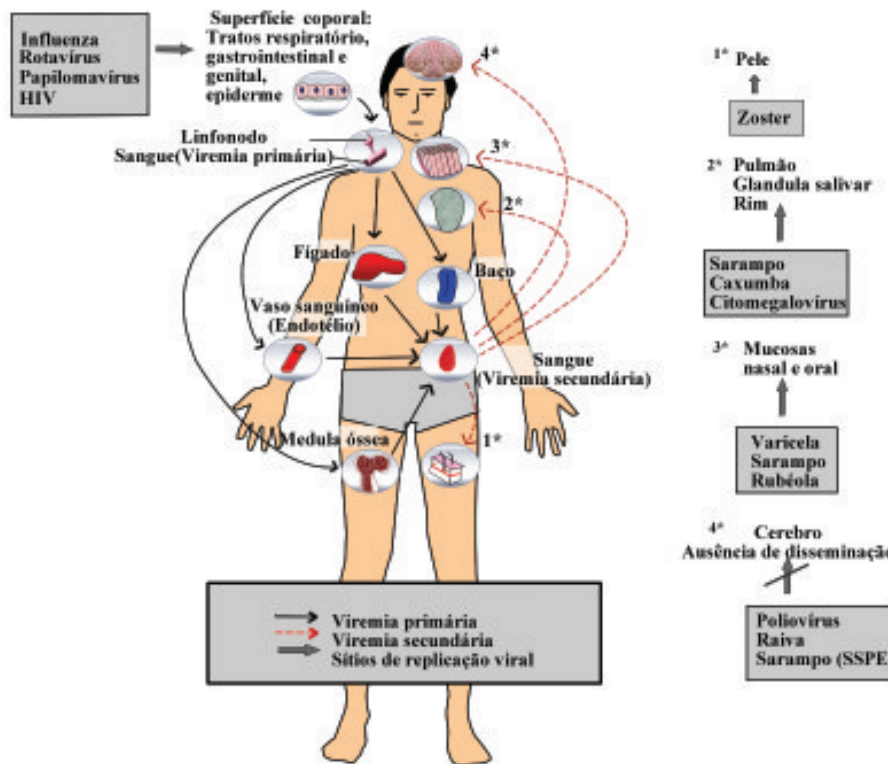
Em relação aos padrões de doenças virais no hospedeiro, as infecções podem se apresentar das seguintes formas: localizada ou disseminada, sintomática ou inaparente, aguda ou crônica. A persistência de um agente viral, sem que o hospedeiro manifeste sintomas clínicos específicos, caracteriza o período de latência (Figura 5).

Figura 5. Latência viral



Na infecção localizada, a replicação viral permanece próxima ao sítio de entrada do vírus. Exemplo: pele, trato respiratório e gastroentérico. Na infecção sistêmica ou disseminada, o espalhamento do agente pelo organismo ocorre em várias etapas, como entrada, disseminação para os linfonodos regionais, viremia primária e disseminação para órgãos suscetíveis. Após a viremia secundária, os vírus são disseminados para outros órgãos, como cérebro, pulmão, pele, etc. (Figura 6). Existe uma predileção dos vírus para determinados órgãos. Os vírus das hepatites, por exemplo, atingem principalmente o fígado. É o que chamamos de tropismo viral.

Figura 6. Sítios de entrada, viremia e disseminação viral



Como já dissemos anteriormente, nas infecções sintomáticas, além do diagnóstico clínico, é necessária também a realização do diagnóstico laboratorial, considerando que os sintomas clínicos sejam inespecíficos para as doenças virais (período prodrômico). No indivíduo assintomático, muitas vezes, a infecção só é confirmada após exame laboratorial. Em gestantes, por exemplo, o Ministério da Saúde brasileiro recomenda que seja feito exame, a fim de avaliar a imunidade para a rubéola e comprovar se a mulher já teve contato com o vírus anteriormente.

A infecção aguda é caracterizada pela presença de sintomas inespecíficos, característicos das doenças virais, tais como febre, cefaleia e mialgia. Este

período é o ideal para serem coletados espécimes clínicos necessários para o diagnóstico laboratorial, já que é a fase onde existe uma maior carga viral no hospedeiro. Nas infecções crônicas, os vírus não são eliminados do organismo, permanecendo quase sempre em níveis baixos, acarretando ou não sintomas clínicos. Como exemplo desta infecção, temos os herpesvírus simples e o HIV, dentre outros.

6- Epidemiologia das infecções virais

De acordo com a Portaria nº 2.259, de novembro de 2005, o Ministro da Saúde, no uso de suas atribuições, aprovou a Resolução 33/05 do Grupo Mercado Comum, intitulada “Glossário de terminologia de Vigilância Epidemiológica MERCOSUL” que, entre outras providências, conceitua termos para serem usados em Vigilância Epidemiológica.

Quadro 1 - Síntese do glossário da Portaria nº 2.259, de novembro de 2005.

Termos	Conceitos
Caso autóctone	Pessoa ou animal que tenha contraído uma doença em sua residência (País)
Caso suspeito	Pessoa ou animal cuja história clínica, sintomas, sinais e possível exposição a uma fonte de contaminação, sugere que pode ter, ou irá desenvolver uma doença infecciosa.
Cobertura vacinal	Indicador que expressa a proporção da população-alvo, que foi vacinada conforme as normas estabelecidas nas estratégias de vacinação.
Comportamento de risco	Comportamento das pessoas que aumenta a probabilidade de adquirir ou transmitir uma doença.
Controle de qualidade	Ações ou intervenções desenvolvidas com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade de doenças ao mais baixo nível possível.



Doença emergente/reemergente	Doença infecciosa recentemente conhecida, cuja incidência esteja aumentando em um determinado local ou em uma pessoa específica.
Endemias	É a presença contínua de uma doença ou um agente infeccioso em uma área geográfica determinada.
Enzootia	Presença contínua, ou prevalência habitual, de uma doença ou agente infeccioso na população animal de uma área geográfica.
Epidemia	Manifestação de um número de casos de alguma doença, que excede claramente a incidência prevista, em um período de tempo determinado, em uma coletividade ou região.
Erradicação	Cessação de toda transmissão de uma infecção pela extinção artificial da espécie do agente em questão. A erradicação pressupõe a ausência completa do risco de reintrodução de uma doença, de forma que permita a suspensão de todas as medidas de prevenção e controle.
Foco natural (nicho)	Um pequeno território, compreendendo uma ou várias zonas, onde a circulação do agente causal se estabelece em um ecossistema por um tempo indefinidamente longo, sem a sua importação de outra região.
Fonte de infecção	É uma pessoa, animal, objeto ou substância a partir da qual o agente infeccioso se transmite a um hospedeiro.
Hospedeiro	Organismo simples ou complexo, incluindo o homem, que em circunstâncias naturais permite a subsistência ou o alojamento de um agente infeccioso.
Hospedeiro definitivo	É aquele em que o parasita chega à sua maturidade ou passa por sua fase sexual.
Hospedeiro intermediário	É aquele no qual o parasita passa por sua etapa larvária ou assexual.
Taxa de incidência	Número de casos novos de uma doença em uma população particular durante um período específico de tempo.

Período de incubação	Intervalo de tempo entre a exposição efetiva do hospedeiro suscetível a um agente biológico, ou seus produtos tóxicos, e o início de sinais e sintomas clínicos da doença neste hospedeiro.
Infestação	Entende-se por infestação de pessoas ou animais, o alojamento, o desenvolvimento e reprodução de artrópodes na superfície do corpo ou na roupa. Os objetos ou locais infestados são aqueles que albergam ou servem de alojamento aos animais, especialmente artrópodes e roedores.
Janela imunológica	Intervalo entre o início da infecção e a possibilidade de detecção de anticorpos, através de técnicas laboratoriais.
Morbidade	Expressa a ocorrência de uma doença em uma população. Os indicadores são as taxas de incidência e prevalência.
Mortalidade	É a medida de frequência de óbitos em uma população durante um determinado período, normalmente um ano.
Oportunista	Organismo que, vivendo normalmente como comensal ou de vida livre, passa a atuar como parasito. Geralmente coincidindo com uma diminuição da resistência natural do hospedeiro.
Pandemias	Epidemia que alcança grandes extensões geográficas, de forma quase simultânea ou com deslocamento de um continente a outro.
Patogenicidade	Capacidade de um agente biológico de produzir doença em um hospedeiro suscetível.
Portador	Pessoa ou animal infectado que alberga um agente infeccioso específico de uma doença, sem apresentar sintomas clínicos desta, e que constitui fonte potencial de infecção.
Taxa de prevalência	Número de casos existentes em um determinado momento, em uma população definida.
Período Prodrômico	Intervalo de tempo entre os primeiros sintomas da doença e o início dos sinais ou sintomas característicos da doença a qual se pode estabelecer o diagnóstico.

Reservatório de agentes infecciosos	Qualquer ser humano, animal, artrópode, solo, matéria ou uma combinação deles, nos quais normalmente vive e se multiplica um agente infeccioso, do qual depende para a sua sobrevivência, de maneira que possa ser transmitido a um hospedeiro suscetível.
Surto	Ocorrência de dois ou mais casos de um evento de saúde vinculados epidemiologicamente.
Transmissão indireta	Transferência do agente etiológico por meio de veículos animados ou inanimados. Para que a transmissão indireta possa ocorrer, é essencial que os germes sejam capazes de sobreviver fora do organismo durante um certo tempo e que exista um veículo apto que leve os germes de um lugar para outro, de modo que permita a sobrevivência do agente.
Vetor	Ser vivo (inseto ou outro animal) que assegura a transmissão de um agente infeccioso.
Virulência	Grau de patogenicidade de um agente infeccioso, indicado pelas taxas de letalidade ou por sua capacidade de invadir e lesar os tecidos do hospede, ou por ambos os parâmetros.
Zoonoses	Infecção ou doença infecciosa transmissível, em condições naturais, dos animais vertebrados para os humanos.

A epidemiologia viral consiste na relação entre o agente viral e o meio ambiente, ou meio externo. Nesta interação, a maioria dos vírus não é viável no ambiente por longos períodos. Dessa forma, a transmissão de um vírus pode ser inviável devido à sua inativação no ambiente.

A epidemiologia é a ciência que estuda as doenças em uma determinada população. Além disso, investiga os fatores envolvidos na manutenção e transmissão das infecções, sua dinâmica e distribuição. A complexidade dessas interações é bastante variável e pode envolver várias espécies. Algumas infecções virais se mantêm em uma população através de uma cadeia de sucessivas infecções agudas entre o hospedeiro de uma única espécie animal. Mas existem vírus que são capazes de infectar várias espécies de hospedeiros.

A fonte de infecção (hospedeiro ou reservatório) é qualquer vertebrado que esteja infectado e seja capaz de transmitir o agente para outros suscetíveis. Esses hospedeiros podem ser classificados como portadores ou doentes. Estes últimos são os que manifestam os sinais clínicos da doença e são considerados epidemiologicamente de menor importância, pois são facilmente reconhecidos e diagnosticados, permitindo a adoção de medidas de controle. Por outro lado, os portadores geralmente são assintomáticos, transmitindo a doença por um maior período, por serem dificilmente identificados.

Com relação aos indivíduos portadores, podemos classificá-los em:

a) Portadores ativos. Podem se dividir em permanentes ou temporários.

Os permanentes excretam os vírus continuamente, como, por exemplo, os animais infectados com o vírus da diarreia bovina (BVDV); e os temporários excretam o agente apenas por determinados períodos.

b) Portadores prodômicos ou em período de incubação.

Estes portadores, além de disseminarem o vírus no ambiente ou a outros hospedeiros suscetíveis, podem continuar disseminando o vírus após a resolução da doença clínica.

6.1. Cadeia de infecção

Para a manutenção do processo infeccioso são necessários:

- Penetração e replicação do agente viral no hospedeiro.
- Produção da progênie viável.
- Progênie deve ser excretada do hospedeiro a tempo, pela via adequada e em quantidade suficiente para permitir sua transmissão a outros hospedeiros.
- O agente viral deve resistir às adversidades do ambiente o tempo necessário para encontrar o hospedeiro suscetível.

6.2. Interação vírus/hospedeiro

O encontro do vírus com o hospedeiro suscetível torna possível a infecção viral. Esta interação consiste das seguintes etapas:

- Penetração do agente viral, a qual deve ocorrer pela via adequada.
- Replicação nos tecidos e órgãos-alvo.
- Resistência à resposta imune do hospedeiro.
- Produção da progênie viral.
- Nova excreção viral.

A transmissão de um agente viral pode ser direta, ou seja, de um hospedeiro para outro. Neste caso, as condições ambientais são menos relevantes. Entretanto, a transmissão pode ser também por contato indireto, através da manipulação de objetos contaminados ou artrópodos. Neste caso, as condições ambientais são mais importantes no processo de transmissão.

Para que o agente viral excretado entre em um novo hospedeiro, a suscetibilidade do indivíduo deve se sobrepor à sua resistência ao vírus. Na suscetibilidade estão associados vários aspectos, como espécie, raça, sexo, idade, exposição prévia ao agente, estado nutricional e fisiológico, e outros. Todos esses aspectos contribuirão para a suscetibilidade ou resistência ao agente viral. A perpetuação de uma determinada infecção viral é dependente do número de hospedeiros suscetíveis. Caso isto não ocorra, o vírus pode ser extinto em uma dada população.

6.3. Mecanismos de Transmissão

Para a entrada do vírus na célula, este deve, inicialmente, se adsorver ou se ligar a receptores existentes na superfície das células do hospedeiro e, a partir daí, penetrar. A maioria dos vírus entra no hospedeiro através das mucosas dos tratos respiratório e gastrointestinal. Alguns vírus invadem o hospedeiro pelas mucosas urogenital e conjuntiva. Nesta primeira, temos como exemplo o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Alguns vírus são introduzidos no

hospedeiro diretamente através do sangue, como é o caso dos vírus da hepatite B e o próprio HIV (Quadro 2).

Quadro 2- Principais vias de entrada dos vírus associados às infecções em humanos

Via de entrada	Grupo de vírus	Produção de sintomas locais na porta de entrada	Produção de infecção generalizada associada à doença de órgãos específicos
Injeção	Retrovírus		Vírus da imunodeficiência humana
	Hepadnavírus		Hepatite B
	Herpesvírus		Vírus Epstein-Barr, citomegalovírus
Picadas e mordidas	Flavivírus		Muitas espécies, incluindo o vírus da febre amarela
	Togavírus		Muitas espécies, incluindo o vírus da dengue e das encefalites equinas
	Rabdovírus		Vírus da raiva
Boca, trato intestinal	Reovírus	Rotavírus	
	Picomavírus		Alguns enterovírus, incluindo poliovírus e vírus da hepatite A
	Herpesvírus	Vírus Epstein-Barr, herpes vírus simples	Citomegalovírus
	Adenovírus	Algumas espécies	
Pele, traumatismo leve	Poxvírus	Vírus do molusco contagioso, vírus orf	
	Herpesvírus	Herpesvírus simples	
	Papovavírus	Papiloma vírus	
Vias respiratórias	Coronavírus	Maioria das espécies	Citomegalovírus
	Paramixovírus	Vírus da parainfluenza, vírus sincial respiratório	Vírus da caxumba, vírus do sarampo
	Ortomixovírus	Vírus da influenza	
	Togavírus		Vírus da rubéola
	Picomavírus	Rinovírus	Alguns enterovírus
	Poxvírus		Vírus da varíola (extinto)
	Herpesvírus	Vírus Epstein-Barr, herpesvírus simples	Vírus da varicela
	Adenovírus	Maioria das espécies	

6.3.1. Mucosa

6.3.1.1. Trato respiratório

O trato respiratório é a principal via de entrada do vírus no organismo. Seus mecanismos de defesa compreendem: a presença de células epiteliais ciliadas, muco, anticorpos secretórios da classe A, células fagocitárias alveolares, dentre outros. Alguns desses mecanismos auxiliam na remoção de partículas estranhas.

Muitas vezes, os vírus ultrapassam essas barreiras, principalmente quando há um imunocomprometimento. Inicialmente, esses agentes se replicam nas células epiteliais, produzindo uma infecção localizada, podendo ser disseminada, rapidamente, com o auxílio dos fluídos locais. A infecção localizada não está, necessariamente, relacionada a uma doença mais amena, pois, em muitos casos, grandes áreas do trato respiratório podem estar acometidas, causando uma enfermidade severa. A excreção das partículas virais, por esta via para o ambiente, favorece a rápida disseminação viral entre os indivíduos.

- Exemplos dos vírus que causam infecção localizada no trato respiratório: *Vírus da influenza*, *Vírus Parainfluenza*, *Rinovírus*, *Vírus Respiratório Sincial* e *Adenovírus*.
- Exemplos de vírus que infectam através do trato respiratório e causam infecção disseminada: *Vírus da Caxumba*, *Vírus do Sarampo* e *Vírus da Rubéola*.

6.3.1.2. Trato gastrointestinal

Nesta via a infecção é dada principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados, podendo ocorrer também pelo compartilhamento de talheres e copos utilizados por pessoas infectadas. A via de entrada é a orofaringe, onde esses agentes se concentram ou são transportados para o trato gastrointestinal. Já a excreção viral é feita pelas fezes, completando o ciclo oral-fecal.

O trato gastrointestinal, por sua vez, é protegido contra os agentes infecciosos por imunoglobulinas secretoras (IgA), muco, ácidos gástricos, sais biliares, enzimas proteolíticas, dentre outros. Além desses, o peristaltismo é um importante mecanismo para manter o alimento e o agente em movimento, dificultando o estabelecimento da infecção. Em situações extraordinárias, pode ocorrer o inverso, ou seja, um movimento antiperistáltico, cuja função é a eliminação do microrganismo. Em geral, os vírus que causam infecção intestinal são ácido-bile resistentes.

- Exemplos dos vírus que causam infecção localizada na boca e orofaringe: *Vírus do Herpes Simplex*, *Vírus Epstein-Barr* e *Citomegalovírus*.
- Exemplos de vírus que infectam o trato gastrointestinal, produzindo enterites: *Rotavírus*, *Vírus Norwalk* e *Astrovírus*.
- Exemplos de vírus que infectam através do trato gastrointestinal e causam infecção disseminada: *Vírus da hepatite A*, *Vírus da Hepatite E* e *Poliovírus*.

6.3.1.3. Trato gêniturinário

É uma via de entrada para vários tipos de vírus, principalmente os que utilizam via sexual. A contaminação é dada pelas diversas formas de contato sexual entre indivíduos e por instrumentos cirúrgicos ginecológicos e roupas íntimas contaminadas (fômites).

O pH, a microbiota e o muco local constituem uma importante proteção desta via. Assim como nos tratos discutidos anteriormente, o vírus pode se alojar localmente ou disseminar para outras áreas.

- Exemplos dos vírus que causam infecção localizada no trato gêniturinário: *Vírus do Herpes simplex*, *Vírus do Papiloma*.
- Exemplos de vírus que infectam o trato gêniturinário, produzindo infecções sistêmicas: *Citomegalovírus*, *Vírus de Hepatite B e C* e *HIV*.

6.3.1.4. Conjuntiva

O acometimento da conjuntiva pode se dar por infecção dos olhos pelas mãos ou objetos contaminados. Pode ser causada, na maior parte das vezes, por um *Adenovírus*, que normalmente causa o resfriado comum, permitindo a transmissão por gotículas de tosse e por espirros.

Embora menos resistente que a pele, a conjuntiva é constantemente lavada pela secreção lacrimal, que funciona como uma barreira bioquímica, contendo principalmente a lisozima⁶ IgA secretória. A conjuntiva é ainda protegida fisicamente pelos cílios e movimentos das pálpebras, os quais auxiliam na manutenção da lubrificação dos olhos.

- Exemplos dos vírus que infectam por meio da conjuntiva: *Enterovírus* e *Adenovírus*.

6.3.2. Pele

Esta é uma porta de entrada de vários agentes microbianos. Apesar de a picada dos artrópodes e a contaminação via sanguínea terem como primeiro acesso a pele, optamos por separá-los deste item para uma melhor compreensão do ciclo de transmissão viral.

A infecção da pele é possível através do contato direto com lesões de pessoas infectadas, mordida de animais vertebrados, objetos contaminados (ex: alicates) e a presença de solução de continuidade, permitindo a penetração do vírus.

Sua proteção se deve ao epitélio estratificado da pele, pH, ácidos graxos (gordura), secreções (suor), e os pelos que revestem a epiderme.

- Exemplos dos vírus que causam lesões cutâneas localizadas: *Papilomavírus*, *Poxvírus*.

⁶ Enzima microbicida

- Exemplos de vírus transmitido por mordida de animal: *Vírus da Raiva (Rhabdovírus)*.

6.3.3. Sangue

A infecção do sangue pode ocorrer por meio de compartilhamento de seringas, transfusão sanguínea e transplante de órgãos. A proteção desta via, além da pele e da mucosa (porta de entrada), é o próprio sistema imunitário, já que envolve componentes sanguíneos (células, sistema complemento, imunoglobulinas, etc.) para o combate da infecção. Esta defesa pode ser burlada pelos vírus, através dos mecanismos de escape ou mesmo pelo fato de alguns vírus possuírem tropismo por células do sistema imune.

- Exemplos de vírus transmitidos por via iatrogênica (agulhas, material cirúrgico): *HIV, Vírus da Hepatite B e C*.

6.3.4. Vetores

Alguns vírus, denominados *Arbovírus*, são transmitidos estritamente por vetores, como os mosquitos, os quais têm o papel de carregá-los e transmiti-los, através da picada, para os hospedeiros vertebrados. Esses agentes são armazenados, podendo se replicar no interior dos artrópodes sem causar danos a estes.

- Exemplos de vírus transmitidos por artrópodes: vírus da dengue e da febre amarela.

6.3.5. Transmissão Vertical

Esta transmissão ocorre da mãe para o filho e pode ser, via placenta ou congênita, no momento do parto ou perinatal⁷, ou ainda pela exposição pós-parto, via amamentação.

⁷ sangue e secreções

Como barreiras de proteção, a mãe passa para seu filho, por via placentária, imunoglobulinas IgG e pela amamentação, em especial no colostro, IgA. O feto e o recém-nascido, por sua vez, produzem a IgM em resposta a uma infecção.

- Exemplos de vírus transmitido por via placentária: vírus da rubéola e citomegalovírus.

7. Profilaxia

A profilaxia das doenças virais segue os mesmos princípios da de outras doenças infectoparasitárias, que englobam a implantação de políticas de saúde pública. Dentro desse contexto, a educação assume um papel fundamental, pois é necessária a informação para a sociedade sobre o agente etiológico, formas de transmissão, a sintomatologia e os fatores de risco para que haja um controle eficaz da doença.

As doenças virais podem ser transmitidas de diversas maneiras, como comentado anteriormente. Dessa forma, aos vírus que são contraídos por via oral, merecem que seja dada uma atenção especial no saneamento básico, controle da água e alimentos ingeridos e higiene de forma geral, principalmente das mãos. Em relação à transmissão por via respiratória, devem-se evitar ambientes fechados e, em casos de epidemias, pacientes infectados devem ser isolados e seus contactantes mantidos em monitoramento. Caso seja necessário, devem ser realizados programas de prevenção, como a distribuição de máscaras para a população.

Para vírus transmitidos via parenteral, a profilaxia enfoca os bancos de sangue, o cuidado no uso de material descartável (luvas, agulhas, etc...) e instrumentos cirúrgicos ou odontológicos. As doenças sexualmente transmissíveis (DST) abrangem as campanhas de uso de preservativos e de vacinação, quando existentes. E ainda, os vírus transmitidos por vetores têm como principal ponto profilático o controle ou a erradicação destes insetos.

A imunização do indivíduo é feita por meio da inoculação do próprio agente viral modificado (atenuado ou morto) ou parte deste. O tempo de imunidade, conferida pelas vacinas, varia de acordo com as características dos respectivos vírus, tornando necessária, em muitos casos, a reimunização (reforço vacinal). A vacinação tem sido a forma mais eficaz de prevenir algumas doenças, as quais podem ser fatais em determinados indivíduos. A infecção pelo vírus influenza em idosos, por exemplo, pode apresentar complicações severas e até mesmo o óbito. Desta forma, a vacinação em idosos, de um modo geral, ameniza a severidade da doença.

Cada país possui uma relação de vacinas em suas campanhas, de acordo com as doenças presentes em seu território. Desde o nascimento do bebê até a terceira idade existe um programa de imunização obrigatório. Algumas vacinas são apenas necessárias em alguns casos como, por exemplo, em viagens para regiões endêmicas. Casos especiais deverão ser avaliados, como os de alergias aos componentes das vacinas, os de gravidez e os de imunização com vírus vivo, o qual não pode ser administrado em indivíduos imunodeprimidos.

Como vimos, várias doenças podem ser prevenidas por vacina, evitando possíveis complicações e até mesmo o óbito em determinadas classes de indivíduos. Dentre estas vacinas, é possível prevenir várias doenças, como febre amarela, hepatite B, sarampo, poliomielite e outras.

Desde 1937, a Fiocruz (antigo Instituto Soroterápico de Manguinhos) desenvolve a técnica da produção da vacina contra febre amarela, inoculando o vírus 17D em ovos de galinha embrionados (SPF). O tempo de imunidade conferida por esta vacina é de 10 anos e é contraindicada em indivíduos com histórico de alergia às proteínas do ovo e da galinha.

Figura 7. Produção de vacina contra febre amarela – 1959 - Fiocruz (arquivo particular do Dr. José Fonseca da Cunha)



Outra doença prevenível por vacina, principalmente para os profissionais da saúde, é a hepatite, causada pelo *Vírus da hepatite B*, que pode levar a um quadro severo, crônico e fatal. Além disso, a hepatite B é uma das principais causas de câncer de fígado. Assim, a vacina para combater esse vírus previne não apenas a hepatite B, mas também o desenvolvimento de câncer hepático. A produção dessa vacina baseia-se no emprego de fragmentos de antígeno “s” do *Vírus da hepatite B* (*HbsAg*), um importante imunógeno, para a indução da formação de anticorpos, o que não representa um risco de causar a doença.

Como também verificado anteriormente, para a febre amarela, a duração da imunização, nesse caso, é de 10 anos, conferida após um correto esquema de vacinação (três doses com intervalos de 1 a 3 meses).

A vacina contra o sarampo é produzida por Biomanguinhos, unidade da Fiocruz desde 1982, empregando a tecnologia fornecida pelo Instituto Biken por cooperação entre o Brasil e o Japão. Nesta vacina, o vírus é inoculado em células denominadas “fibroblastos de pinto”, obtidas de embriões de galinha com 10 a 11 dias de desenvolvimento, utilizando a cepa Biken CAM 70.

As campanhas de vacinação contra o sarampo em crianças menores de um ano permitiram uma redução do número de casos a partir de 1992.

A poliomielite foi considerada erradicada do Brasil, graças às contínuas campanhas de vacinação no nosso país utilizando a vacina Sabin, coordenadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Entretanto, o vírus ainda circula em diversos pontos do mundo, como em alguns países da África e da Ásia. Sabin é a vacina utilizada em imunizações de rotina no Brasil. Os principais alvos das campanhas são as crianças menores de 5 anos que recebem a vacina e começam, então, a eliminar os vírus junto com as fezes por cerca de um mês e meio, o que pode levar a uma “vacinação” secundária de outras pessoas. Os indivíduos imunizados produzem anticorpos contra os três sorotipos (1, 2 e 3).

Atualmente, existem vários tipos de vacinas, como as atenuadas, as inativadas, as de subunidades, as recombinantes e as de ácido nucleico ou de DNA, ainda em fase de estudos clínicos. As atenuadas consistem na presença do agente viral vivo modificado, principalmente por passagens sucessivas do agente viral em culturas celulares, permitindo ao vírus a perda da capacidade patogênica, mas mantendo sua capacidade replicativa. Esta vacina tem como principal vantagem a indução de excelente resposta imunológica pelo hospedeiro. Mas, por outro lado, não deve ser usada por indivíduos imunodeficientes, pois pode haver a reversão de vírus vacinal a selvagem nestes indivíduos. Como exemplo desta vacina temos a Sabin, vacina oral contra a poliomielite.

As vacinas inativadas são constituídas por vírus mortos por processos físicos, como a temperatura, ou por processos químicos, como o formaldeído. A vantagem desta vacina é que pode ser utilizada em qualquer indivíduo, pois não há a possibilidade de reversão do vírus vacinal a selvagem. No entanto, a desvantagem é que a resposta imunológica não é tão boa. A vacina contra a raiva exemplifica esta categoria de vacinas.

As vacinas de subunidades consistem de fragmentos do agente viral, os quais são moléculas importantes na indução de anticorpos protetores como,

por exemplo, a vacina contra a influenza, que consiste das hemaglutininas e neuraminidases do vírus. A grande vantagem destas vacinas é não expor o indivíduo ao agente viral como um todo.

As vacinas atenuadas são as mais antigas, surgiram há mais de 200 anos, marcando o início da imunologia como ciência. Estas vacinas foram desenvolvidas por um pesquisador inglês chamado Edward Jenner, o qual utilizou o vírus da *vaccínia* para imunizações contra a varíola, doença epidêmica, responsável pela morte de milhões de pessoas. O chamado vírus *vaccínia*, causava lesões em bovinos e Jenner observou que ordenhadores raramente tinham varíola. Ele teve a ideia de coletar o vírus de animais e usá-lo, com sucesso, para vacinar pessoas contra a varíola. A varíola é considerada a única doença mundialmente erradicada, pois não existe mais a circulação desse vírus, graças às campanhas de vacinação. A Organização Mundial da Saúde declarou a varíola como erradicada no mundo no dia 8 de maio de 1980. Da mesma forma, havia uma previsão de erradicação da poliomielite até o ano de 2002. Mas, apesar do intenso esforço de todos os países, isso ainda não aconteceu.

Com a introdução da biologia molecular, foi possível a fabricação de vacinas recombinantes, as quais apresentam pequenos peptídeos originados de alguma proteína viral. A obtenção destas moléculas só é possível através da tecnologia da recombinação gênica. A vacina contra a hepatite B, atualmente usada no Brasil, segue esta tecnologia de fabricação.

Ainda em fase de estudos pré-clínicos e clínicos, as vacinas de DNA poderão ser a saída para prevenir algumas doenças virais, as quais são causadas por vírus de alta capacidade de mutação e alto grau de virulência, como o *Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)*.

8. Tratamento

O controle de algumas doenças virais através da quimioterapia foi uma grande conquista das últimas décadas. Devido à característica peculiar dos vírus, que é a de agir como um parasita intracelular obrigatório, durante muito tempo achou-se que seria impossível o desenvolvimento de drogas contra estes agentes. Mas a identificação de enzimas produzidas por estes próprios agentes, e que os possibilitam replicar no interior das células, impulsionou os estudos de drogas capazes de inibir tais enzimas, de modo a não danificar as células do hospedeiro.

Considerando que todas as fases do ciclo de replicação viral requerem a participação de uma enzima, o bloqueio de qualquer uma das referidas fases acarretaria na não formação da partícula infecciosa. Tais etapas do ciclo de replicação viral incluem: adsorção, desnudamento, síntese, maturação e liberação da progênie viral da célula hospedeira.

As drogas antivirais podem atuar interferindo em qualquer uma das etapas da replicação viral, como a adesão à célula, a penetração, a eliminação do envoltório viral para liberar seu material genético e a produção de novas partículas virais por parte da célula. Como os vírus somente replicam no interior das células e utilizam as mesmas vias metabólicas que as células saudáveis, as drogas antivirais são frequentemente mais tóxicas para as células humanas que os antibióticos. Um outro problema das drogas antivirais é que o vírus pode desenvolver rapidamente resistência a elas mesmas.

Na tabela a seguir, encontram-se algumas drogas antivirais, os vírus suscetíveis e os seus respectivos sítios-alvos.

Quadro 4. Mecanismos básicos de ação de drogas antivirais

Drogas antivirais						
A N T I R E T R O V I R A I S	Inibidores de proteases	Saquinavir	Anti-herpéticos	Anti-influenza	Anti-hepatite	Outros
		Indinavir	Aciclovir	Amantadina	Adefovir	Imiquimod
		Azatavir	Cidofovir	Oseltamivir	Lamivudina	Interferons
		Ritonavir	Docosanol	Rimantadina	Entricitabina	Ribavirina
		Nelfinavir	Famciclovir	Zanamivir		
		Amprenavir	Foscarnet	Peramivir		
		Lopinavir	Formivirsen			
		Tipranavir	Ganciclovir			
	Darunavir	Idoxuridina				
	Inibidores de fusão	Enfuvitide	Penciclovir			
	Inibidores de transcriptase reversa	Zidovudina	Trifluridina			
	Análogo de nucleosídeo	Didanosina	Brivudina			
		Estavudina	Valaciclovir			
		Zalcitabina	Valganciclovir			
		Lamivudina	Vidarabina			
		Entricitabina				
		Abacavir				
Não análogo de nucleosídeo	Neviparina					
	Efavirenz					
	Delavirdina					
Análogo de nucleotídeo	Tenofovir					
	Adefovir					

Mecanismos gerais de ação dos antivirais:

- Amantadina (1966) e Rimantadina (1993): inibem a penetração da partícula viral no hospedeiro, bloqueiam a desencapsulação do genoma viral e a sua subsequente transferência para a célula hospedeira.
- Zanamivir e Oseltamivir: inibidores da neuraminidase.
- Paramivir: impede a liberação de novos vírus da célula infectada.
- Aciclovir, Valaciclovir, Penciclovir e Fanciclovir: Inibição competitiva da DNA polimerase. O trifosfato de Aciclovir é incorporado no DNA viral, impedindo o alongamento da cadeia de DNA. No caso do Valaciclovir, este é convertido em Aciclovir quando ingerido. Já o Penciclovir apresenta potência cem vezes menor que o Aciclovir.
- Ganciclovir e Valganciclovir: atuam na terminação da cadeia por fosforilação, até a forma GCV monofosfato na posição 3. A repetição de “cadeia” é redundante, a não ser que seja realmente necessária.
- Cidofovir: atua na terminação da cadeia por fosforilação, até a forma difosfato, e na incorporação na posição 3.
- Foscarnet: inibe a DNA polimerase, a RNA polimerase e a transcriptase reversa.
- Fomivirsem: complementar à sequência de bases, hibridiza-se e bloqueia a expressão (translação) do RNAm do CMV, inibindo a síntese de proteínas e a replicação viral.
- Interferons: liga-se a receptores de superfície em células infectadas, inibindo a transcrição e a tradução de RNAm viral.
- Imiquimod: indutor tóxico de citocinas que potencializa a produção de alfa-interferon, o qual apresenta efeito antiviral, antiproliferativo e antiangiogênico.

9. Diagnóstico Laboratorial

Os diferentes métodos de diagnóstico dos vírus permitem a identificação da morfologia e das proteínas, além do ácido nucleico. Muitas vezes é necessário utilizar mais de um método, a fim de se ter uma melhor definição diagnóstica, já que existem diferentes vírus que apresentam morfologia semelhante. Desta forma, o diagnóstico não pode ser baseado apenas neste aspecto morfológico outros aspectos deverão ser considerados para um diagnóstico preciso.

Com a utilização de animais de laboratório e das culturas de células, é possível isolar e identificar estes agentes. Devido à dificuldade do isolamento de um vírus a partir de espécimes clínicos (secreções diversas, urina, fezes, líquido cefalorraquidiano, pele, líquido pleural, saliva, soro, etc.), os ensaios sorológicos são uma alternativa e permitem a avaliação indireta do vírus, pela detecção de anticorpos específicos, tanto na fase aguda da doença, quanto na de convalescença.

A realização dos ensaios laboratoriais para o diagnóstico viral deve obedecer a todas as normas de Biossegurança e boas práticas de laboratório (ver capítulo 1 do volume 1).

9.1. Isolamento dos vírus

Os vírus, ao contrário de outros microrganismos, só se replicam em células vivas. Desse modo, seu isolamento apenas é possível quando se utiliza um hospedeiro vivo, como a cultura de células, os animais de laboratório e os ovos embrionados.

9.1.1. Cultura de células

As células de mamíferos foram cultivadas pela primeira vez em laboratório há pouco mais de 70 anos. Em meados do século XX, um grupo de pesquisadores isolou o *Poliovírus* em cultura de células. A partir daí, uma

infinidade de famílias virais foi isolada e identificada, sendo algumas destas não associadas às doenças da época (ver detalhes no capítulo 4 do volume 2).

Por meio da microscopia ótica, a presença do vírus é identificada de forma indireta, através de alterações morfológicas na célula, denominadas efeito citopático (CPE).

9.1.2. Animais de laboratório

Esse método não é muito utilizado atualmente por dois motivos principais: o primeiro, pela dificuldade de aprovação do uso pelo Comitê de Ética de Animais de Laboratório e de Biossegurança, que sugere, quando é viável, a utilização de outros métodos; o segundo, pelo tempo demandado para o desenvolvimento da doença no animal. Na maioria das vezes não é possível reproduzir a doença humana em animais, sendo difícil a correlação com a encontrada em humanos. (ver capítulo 4 do volume 1).

9.1.3. Ovos Embrionados

Os ovos utilizados para o cultivo de alguns vírus são os de galinha embrionados, como SPF (*Specific Pathogen Free*). A escolha destes se deve a cinco critérios:

- Disponibilidade do material.
- Facilidade de crescimento e manipulação, uma vez que não é necessário cuidado com manejo e alimentação.
- Meio constante com composição qualitativa, possuindo grande concentração de nutrientes.
- Ausência da produção de anticorpos pelo embrião (livre de patógenos);
- Meio estéril, enquanto o ovo estiver fechado.

Neste hospedeiro, existem diferentes sítios para a inoculação do vírus (saco alantóide, cavidade amniótica, membrana corio-alantoide e gema). A escolha de um deles é dependente do tropismo viral. A confirmação da infecção é baseada na presença de membrana (efeito citopático), deformação e morte do embrião.

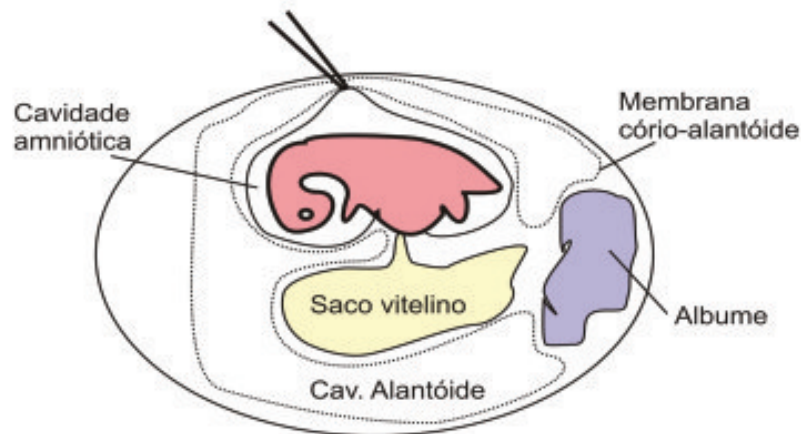
Os procedimentos que devem ser seguidos para a realização desta técnica são:

- Manutenção do ovo de galinha embrionado SPF em estufa a 37 graus Celsius, com umidade de 55% e sob constante movimento, simulando a situação real (chocadeira mecânica).
- Antes da inoculação é indispensável a inspeção dos ovos, através do ovoscópio⁸. Todos os embriões devem estar vivos.
- Em média, o material suspeito é inoculado de 6 a 8 dias após a inspeção dos ovos.
- Escolher a região para a inoculação de acordo com o tropismo do vírus, sendo:

Região	Inoculação de
Saco alantoide	Vírus da gripe e da caxumba
Cavidade amniótica	Vírus da encefalite
Membrana corioalantoide	Vírus da herpes, varíola e sarampo
Saco vitelino	Vírus da raiva

⁸ Equipamento de iluminação utilizado para visualizar o interior do ovo.

Figura 8. Esquema do ovo embrionado de galinha - desenhado por Raphael dos Santos Stephens.



9.2. Identificação direta e indireta dos vírus

O diagnóstico pode ser feito pela detecção direta do vírus, ou por parte dele, como as proteínas e o ácido nucleico. Assim como é possível fazermos o diagnóstico indireto, identificando alterações causadas pelo agente ou pelos anticorpos gerados devido à presença dos vírus.

9.2.1. Microscopia eletrônica (ME)

A ME utiliza o microscópio eletrônico, o qual emite feixes de elétrons sobre o material, de modo que a visualização do objeto seja possível. Este método se subdivide em microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Os elétrons transmitidos, parcialmente absorvidos pelo objeto, servem para formar a imagem no microscópio eletrônico de transmissão. Na microscopia de varredura são produzidas imagens de alta resolução a partir da superfície de uma amostra, demonstrando uma aparência tridimensional característica, que são úteis para avaliar a estrutura superficial de uma determinada partícula (ver capítulo 1 do volume 2).

9.2.2. Ensaios imunológicos

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e constitui o principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com um alto índice de mortalidade. Os métodos mais empregados para o diagnóstico virológico, devido à sua praticidade e seu baixo custo em relação aos outros, são os que se baseiam na interação de alguns antígenos virais com anticorpos específicos. Os anticorpos e os antígenos virais podem ser dosados a partir de secreções seromucosas, como urina, fezes, líquido cefaloraquidiano, tecidos, soro, etc. A quantidade e as características dos anticorpos e antígenos obtidos são determinadas utilizando-se ensaios. Estes ensaios são designados de sorológicos, pois inicialmente utilizou-se soro para a realização de tais métodos. Algumas modalidades destes métodos são: neutralização, precipitação, aglutinação, imunocitologia e imunoenzimáticas (ver capítulo 1 do volume 4).

9.2.2.1. Neutralização de vírus com anticorpos

Em nível celular, as alterações nas células infectadas por vírus variam de morfológicas a de crescimento, como arredondamento celular, presença de inclusões, rompimento e fusões celulares. As técnicas de neutralização com anticorpos se baseiam na infecção viral em cultura de células e o bloqueio da replicação viral por anticorpos neutralizantes. Este método mede a capacidade dos anticorpos, presente nas amostras de soro do paciente, em neutralizar os vírus, ou seja, reduzir ou eliminar o efeito citopático produzido pelos vírus nas células infectadas. A soroneutralização é um ensaio que permite a titulação dos anticorpos para determinados vírus, presentes no sangue do paciente.

9.2.2.2. Precipitação

As reações de precipitação podem ser realizadas em meio líquido ou gelatinoso. Existem duas modalidades desta reação:

A) Imunodifusão Radial Simples

No gel de agarose que recobre uma lâmina de vidro, o soro específico é incorporado e, em orifícios feitos no gel, são adicionadas diferentes concentrações do antígeno. Durante a incubação, ocorre a difusão do antígeno na agarose, com a formação de complexos antígeno-anticorpo. Os complexos precipitam e formam um halo ao redor do orifício. Esta reação é visualizada pela coloração do gel após o término da reação.

B) Imunodifusão Dupla

Introduzem-se anticorpos e antígenos em diferentes zonas de um gel de agar. Durante a incubação, ocorre a difusão do anticorpo em direção ao antígeno, ou vice-versa. Ocorre então a formação de complexos antígeno-anticorpo insolúveis, que precipitam e irão formar linhas entre os orifícios. É a formação da linha de precipitação (identidade) que indica a presença de anticorpos ou antígenos específicos.

9.2.2.3. Inibição de Hemaglutinação

Esta metodologia se baseia na propriedade de certos vírus em aglutinar hemácias. A reação consiste em reagir diluições dos soros dos pacientes com um antígeno hemaglutinante, previamente titulado. Havendo anticorpos na amostra, estes irão inibir a hemaglutinação. Caso contrário, o vírus irá aglutinar as hemácias.

9.2.2.4. Imuno-histoquímica

É uma técnica que permite localizar componentes tissulares *in situ* de forma direta ou indireta, e está baseada na conjugação de marcadores (fluorocromos, enzimas, dentre outras) a moléculas de imunoglobulina, a fim de se visualizar a reação antígeno-anticorpo.

A) Imunoperoxidase

Técnica que utiliza como marcador a enzima peroxidase, originando uma molécula visível ao microscópio óptico. Esta técnica é muito utilizada para o diagnóstico de HPV.

B) Imunofluorescência

Técnica que utiliza como marcadores compostos como a fluoresceína e a rodamina, que ao serem expostos à luz Ultravioleta do microscópio de fluorescência, emitem uma fluorescência que é visível aos nossos olhos. Esta técnica é muito utilizada para o diagnóstico de várias doenças virais como Citomegalovírus e HIV.

9.2.2.5. Ensaio imunoenzimático

A) *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA

Este é um dos principais métodos utilizados para o diagnóstico de doenças virais, permitindo a detecção de anticorpos específicos no soro ou plasma sanguíneo. Este ensaio baseia-se na reação antígeno-anticorpo, onde uma das duas moléculas é marcada com uma enzima como, por exemplo, a peroxidase. Neste ensaio inclui-se também uma substância cromogênica e um substrato específico para a enzima. A positividade do resultado está relacionada à presença de cor, significando que houve reação de um antígeno. A intensidade da cor permite uma análise quantitativa do resultado.

B) *Immunoblotting*

É um método utilizado para determinar a quantidade relativa e o peso molecular de uma proteína presente em uma mistura de proteínas ou de outras moléculas. A mistura é primeiramente submetida a uma separação analítica, geralmente por eletroforese em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE), de modo que as moléculas serão separadas de acordo com os seus pesos moleculares. O espectro de proteínas separadas é então transferido do gel para uma membrana suporte, por ação de capilaridade ou eletricidade (*eletroblotting*), de modo que a membrana adquira uma réplica do espectro das moléculas. A posição do antígeno proteico na membrana pode, então, ser detectado pelo acoplamento de um anticorpo marcado, específico para aquela proteína. Este método pode ser usado como confirmatório para o HIV.

9.3 Ensaios Moleculares

9.3.1- PCR (reação em cadeia da polimerase)

Praticamente qualquer microrganismo pode ser pesquisado pela técnica da PCR. Agentes como vírus, bactérias, fungos e protozoários podem ser identificados nos mais diferentes tipos de amostras e líquidos biológicos.

A capacidade de amplificar muitas vezes o ácido nucleico viral permite que, através desta técnica, uma pequena quantidade de partículas virais sejam detectadas.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica razoavelmente rápida, com elevado grau de sensibilidade e especificidade, utilizando quantidades mínimas de DNA ou RNA. Para esta reação são necessárias algumas enzimas como a DNA polimerase, enzima responsável pela replicação, uma região específica do ácido nucleico pesquisado (*Primer*), nucleotídeos, dentre outros reagentes, além de equipamentos, como o termociclador.

9.3.2. Hibridização

Tendo-se em vista que os vírus possuem ácido nucleico, o emprego de técnicas que sejam capazes de detectar esta molécula viral faz-se importante. A hibridização de fitas de DNA de diferentes fontes forma a base de um conjunto de técnicas essenciais à prática moderna da genética molecular. É possível se detectar uma sequência específica de DNA ou gene alvo, hibridizando aquela região alvo

com uma sequência complementar de bases (sonda), usualmente marcada com alguma molécula. O processo de hibridização molecular pode ocorrer entre duas fitas de DNA /RNA ou entre uma de DNA e outra de RNA. As técnicas de hibridização podem variar para se detectar uma molécula de RNA específico em vez de uma de DNA, o que permitiria verificar se um gene em particular se encontra ativo ou inativo.

A Sonda é um segmento conhecido de DNA ou de RNA, obtido por clonagem molecular ou síntese química, que é complementar a uma sequência de interesse e que contém uma “marcação” (radioisótopo ou marcador químico), a qual permite a sua visualização e o acompanhamento da reação.

Esse processo é altamente específico e controlável, e a sensibilidade dos métodos por sonda pode ser aumentada pela amplificação específica de algumas sequências virais por PCR.

10. Características das principais famílias

A disseminação viral em humanos decorre de milhares de anos, caracterizando a relação mais íntima do homem com outros seres no contexto ambiental. Os vírus têm dimensões em nanômetros, apresentam simplicidade estrutural e dependência pela célula hospedeira. Por este fato, mantém-se a ideia de que são parasitas intracelulares obrigatórios e também são capazes de alterar parcialmente o DNA da célula hospedeira.

Os vírus infectam diferentes espécies de hospedeiros; os que infectam animais, principalmente, são, agrupados de acordo com a estrutura de seu genoma e, assim, classificados em famílias (Quadro 1). Os critérios dessa classificação envolvem a natureza do ácido nucleico, o que possibilita vários mecanismos de replicação. Esse processo, assim como a natureza das infecções que causam, tem contribuído com a organização das características das famílias virais.

A grande maioria dos vírus que infectam vertebrados apresenta o RNA como ácido nucleico devido a esse tipo de ácido apresentar uma alta taxa mutagênica, que durante a sua evolução resultou em uma grande diversidade

viral. Por esses vírus serem menos específicos do que os de DNA, infectam uma variedade maior de espécies animais, acarretando várias zoonoses.

Quadro 5. Classificação dos vírus em famílias, com base em algumas de suas propriedades

Genoma e características físicas				
Ácido Nucleico	Simetria do capsídeo	Envelope	Natureza física dos ácidos nucleicos	Família viral
DNA	Icosaédrica	Ausente	fs	<i>Parvoviridae</i>
				<i>Papillomaviridae</i>
				<i>Polyomaviridae</i>
		Presente	fd	<i>Adenoviridae</i>
				<i>Herpesviridae</i>
				<i>Iridoviridae</i>
		<i>Poxviridae</i>		
Complexa		fd / fs, circular	<i>Hepadnaviridae</i>	
RNA	Desconhecida ou complexa		fs	<i>Coronaviridae</i>
				<i>Flaviviridae</i>
			fs, segmentado	<i>Arenaviridae</i>
	Icosaédrica		fs	<i>Caliciviridae</i>
				<i>Togaviridae</i>
				<i>Picornaviridae</i>
		Ausente	fd	<i>Birnaviridae</i>
	Desconhecida ou complexa	Presente	fs	<i>Retroviridae</i>
	Icosaédrica	Ausente	fs, linear	<i>Astroviridae</i>
			fd, segmentado	<i>Reoviridae</i>
	Helicoidal	Presente		<i>Orthomyxoviridae</i>
			fs	<i>Paramyxoviridae</i>
				<i>Rhabdoviridae</i>
			<i>Filoviridae</i>	
		fs, segmentado	<i>Bunyaviridae</i>	

fs: fita simples; fd: fita dupla

10.1. *Parvoviridae*

A família *Parvoviridae* engloba os menores vírus DNA existentes, considerando que o prefixo *parvo* deriva do latim e significa “pequeno”.

Esta família está dividida em duas subfamílias: *Parvovirinae* e *Densovirinae* (BERNS *et al.*, 1996). A primeira infecta vertebrados e a segunda, invertebrados, principalmente insetos. A subfamília *Densovirinae* está dividida em três gêneros: *Densovírus*, *Interavírus* e *Brevidensovírus*. Já a subfamília *Parvovirinae* constitui-se de outros três gêneros: *Parvovírus*, *Erytrovírus* e *Dependovírus*.

O *Parvovírus* é responsável por infecções de vários animais, incluindo cães, raposas, suínos e outros. O *Erytrovírus*, antes descrito como *Parvovírus B19*, recebeu este nome por seu tropismo pelas células eritropoieticas. Este é o mais estudado, por estar associado, em humanos, a doenças como o eritema infeccioso, a artropatia e a crise aplástica⁹. Além dos problemas causados na gestação, como o aborto espontâneo e a hidropsia fetal¹⁰. Além disso, a infecção por esses vírus causam efeitos citotóxicos e a inibição da eritropoiese

O *Dependovírus* pertence ao grupo vírus Adenoassociado, pois precisam de um vírus auxiliar para uma fase específica do ciclo (replicação do DNA), seja ele um *Adenovírus* ou um *Herpesvírus*.

O vírion é constituído por um genoma de DNA linear de fita simples, o qual apresenta de três a quatro genes. A partícula viral tem um capsídeo com simetria icosaédrica, desprovido de envelope.

Os *Parvovírus* não podem induzir a síntese de DNA na célula hospedeira e requerem a divisão celular para a sua replicação. Devido a isso, seus efeitos patogênicos estão relacionados a um estágio particular da diferenciação celular. Tais efeitos são mais evidentes no desenvolvimento fetal, especificamente no epitélio intestinal e no sistema hematopoiético.

⁹ Evento agudo, transitório, que complica a anemia hemolítica crônica, caracterizado por uma parada transitória da eritropoiese e uma ausência de precursores de eritrócitos na medula óssea (Oliveira 1994).

¹⁰ É caracterizada pelo acúmulo anormal de líquidos nos tecidos ou em determinadas cavidades do corpo.

A disseminação do vírus ocorre pelas fezes, urina, saliva, secreções nasais e provavelmente por contato com fluidos genitais. Os *Parvovirus* não se replicam adequadamente em cultura de células, por isso, geralmente não se consegue detectar seu efeitos citopáticos. Além disso, não são patogênicos na maioria dos hospedeiros adultos. Entretanto, em jovens de algumas espécies, os *Parvovirus* podem causar drásticos efeitos patogênicos.

10.2. *Papillomaviridae*

Até o sexto relatório de 1995, do ICTV, os gêneros *Papillomavirus* e *Polyomavirus* pertenciam à família *Papovaviridae*. No sétimo relatório foi criada a família *Papillomaviridae*, sendo incluído o gênero *Papillomavirus*. O nome papilomavírus deriva da combinação dos termos *papila*, de origem latina, diminutivo de *papula*, projeção ou saliência em forma de mamilo; e *oma*, de origem grega, que representa as tumorações ou os entumescimentos.

Os vírus desta família apresentam capsídeo não envelopado, com simetria icosaédrica, com diâmetro de 40 a 55 nm e com 72 capsômeros. O genoma representa 10-13% do peso do vírion e alberga uma fita dupla de DNA circular, não segmentado, com 5.300 a 8.000 nucleotídeos; sendo a guanina e a citosina responsáveis por 40-50% do conteúdo.

Os vírus dessa família infectam vertebrados, mais especificamente mamíferos, incluindo o homem. A família *Papillomaviridae* é constituída pelos 16 gêneros, incluindo centenas de tipos virais.

Os gêneros definidos pelo ICTV são: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Zetapapillomavirus*, *Etapapillomavirus*, *Thetapapillomavirus*, *Iotapapillomavirus*, *Kappapapillomavirus*, *Lambdapapillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nupapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, *Omikronpapillomavirus* e *Pipapillomavirus*.

As espécies de *Papillomavírus* têm a nomenclatura de acordo com o grupo de seres que elas infectam: *Bovine papillomavirus* (BPV), *Canine papillomavirus*, *Cottonnail rabbit papillomavirus*, *Deer papillomavirus*, *European elk papillomavirus*, *Human papillomavirus* e *Ovine papillomavirus*.

O *Papillomavírus humano* (HPV) é o mais conhecido, sendo o causador de tumores benignos e malignos de pele e das mucosas. O desenvolvimento desses tumores depende de vários fatores, como tabagismo, alcoolismo, múltiplos parceiros sexuais, início precoce da vida sexual e gravidez, principalmente antes dos 18 anos. Pertencem ao gênero *Papillomavirus* e à espécie *Human papillomavirus*. São ainda classificados em genótipos, de acordo com as sequências do gene L1.

O HPV é uma das causas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST). A transmissão do HPV ocorre, na maioria dos casos, pelo contato sexual, não precisando necessariamente haver a penetração, mas apenas com um contato íntimo. Outras formas de contágio, menos frequentes, podem ocorrer pelo uso de instrumentos ginecológicos não esterilizados, compartilhamento de roupas íntimas contaminadas, dentre outros. Após a entrada do vírus no organismo, inicia-se o período de incubação, que varia de três semanas a oito meses. Em alguns casos, não ocorrem sintomas da doença (portador assintomático) e em outros pode levar a neoplasias.

O diagnóstico pode ser feito através dos exames clínico e laboratorial, como Papanicolaou¹¹, Colposcopia¹² e biópsia das lesões suspeitas. Os métodos moleculares, como a PCR, são os mais adequados para a caracterização dos sorotipos virais. O tratamento é feito através de cauterização das lesões e em casos mais graves recomenda-se a retirada cirúrgica da área afetada.

¹¹ Exame ginecológico que consiste na coleta de material do colo uterino para exame em laboratório por microscopia.

¹² Exame clínico onde o médico avalia as alterações, usando uma lente de aumento.

Para a prevenção, o uso da camisinha é o mais adequado, uma vez que outros preservativos não são eficazes. Uma consulta anual pode minimizar as consequências da infecção por HPV.

10.3. *Polyomaviridae*

O prefixo desta família deriva do grego, onde *poli* significa “muito” e *oma*, “tumores”. Apesar do significado do nome, os *Polyomavírus* não costumam produzir tumores nos seus hospedeiros naturais.

Os vírus desta família apresentam em seu genoma o DNA, o qual é circular e de fita dupla, sendo associado às histonas (H2a, H2b, H3 e H4), obtidas do hospedeiro. O vírion com simetria helicoidal, não apresenta envelope e infecta principalmente mamíferos, especialmente humanos. A família *Polyomaviridae* contém apenas um gênero, o *Polyomavírus*. A replicação do vírus ocorre no núcleo e os vírions são liberados por lise celular.

Os *Polyomavírus humanos*, *BKV* e *JCV* são membros do gênero *Polyomavírus*. As infecções primárias por estes vírus ocorrem principalmente na infância e são geralmente assintomáticas. Os vírus podem persistir após a infecção primária na forma latente em vários órgãos, especialmente nos rins. Em pacientes com deficiência imunológica, principalmente pela AIDS, esses vírus podem ser reativados e causar algumas doenças. A reativação do BKV acarreta doenças do trato urinário, como a cistite hemorrágica e outras nefrites, enquanto a reativação do JCV leva a leucoencefalopatia multifocal progressiva.

Aproximadamente 80% dos adultos do mundo inteiro mostram evidência sorológica para a infecção por JCV, mas, na sua maioria, sem nenhuma manifestação clínica ou histórica de doença. A maioria das pessoas soropositivas apresentam histórico de infecção na infância. A via de transmissão não tem sido muito bem definida, mas é sugerida a transmissão pela água e alimentos contaminados.

Da mesma forma, estima-se que 80% dos adultos de todos os continentes apresentem sorologia positiva para BKV, mas não há evidências de que o BKV cause doença na população imunocompetente. Neste tipo de infecção, as vias de transmissão também ainda não estão bem definidas, embora também haja a possibilidade de transmissão pela água e alimento contaminados. É importante ressaltar que o BKV é estável na água durante várias semanas, aumentando, assim, as chances de transmissão por esse meio. Estudos mostram que o BKV está associado a doenças que afetam os rins, pulmões, olhos, fígado e cérebro. No entanto, há fortes evidências da associação do BKV com cistites hemorrágicas e nefrites. Além disso, o vírus tem mostrado uma relação com doenças renais em pacientes transplantados e com a rejeição a enxertos de 2% a 5%.

10.4. *Adenoviridae*

Os Adenovírus foram descobertos em 1953 por Wallace Rowe e cols, que isolaram o vírus da adenoide, por isso o nome Adenovírus. Em 1962, John Trentin e sua equipe mostraram que o Adenovírus humano do tipo 12 causava câncer em *hamsters* jovens. Esta foi a primeira demonstração de uma atividade oncogênica desencadeada por um vírus que infecta humanos. Desde então, os Adenovírus têm sido ligados à indução de alguns cânceres. Além disso, estudos experimentais com os vírus dessa família vêm contribuindo com descobertas no campo da biologia molecular das células eucarióticas, pela facilidade da sua replicação em culturas *in vitro*.

A família *adenoviridae* infecta apenas os vertebrados, principalmente o homem, e classifica-se em quatro gêneros: *AviAdenovírus*, *MastAdenovírus*, *AtAdenovírus* e *SiAdenovírus*, os quais infectam os seguintes grupos de hospedeiros:

- *AviAdenovírus* - aves.
- *MastAdenovírus* - mamíferos.

- *AtAdenovirus* - répteis, aves e mamífero.
- *SiAdenovirus* - anfíbios e aves.

O ICTV está estudando um novo gênero que infecta uma espécie de peixe, mas que ainda não foi definida.

As seis espécies virais existentes nessa família são classificadas de acordo com as características: molecular, físico-química e imunológica, o que permite a separação em seis espécies distribuídas de “A” a “F” (Quadro 7). No gênero *MastAdenovirus* foram descritos até o momento 51 sorotipos que causam infecções em humanos.

Quadro 7. Espécie e sorotipos com seus respectivos locais de infecção. Adaptado de Santos, 2008

Espécie	Sorotipos	Local de infecção	Potencial oncogênico	
			Tumorigenicidade <i>in vivo</i>	Transformação de células
A	12, 18, 31	Trato gastrointestinal	Elevada	+
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Trato urinário, pulmões	Fraca	+
C	1, 2, 5, 6	Trato respiratório	Nenhuma	+
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-23, 33, 36-39, 42-49, 51	Conjuntiva, trato gastrointestinal	Nenhuma	+
E	4	Trato respiratório, conjutiva	Nenhuma	+
F	40, 41	Trato gastrointestinal	Nenhuma	+

O genoma de DNA de dupla fita não segmentado contém aproximadamente 30 genes. O capsídeo icosaédrico tem de 80 a 110 nm de diâmetro, com 252 capsômeros, dos quais 12 são pentágonos (*pentons*) e 240 hexágonos (*hexons*). As espécies são caracterizadas pela presença de antígenos específicos encontrados no capsômero hexagonal. O vírion possui uma longa projeção que se estende do vértice até cada um dos 12 capsômeros pentagonais. A projeção de hemaglutinina é antigenicamente distinta em cada sorotipo. Dessa forma, é possível se determinar o tipo específico de vírus utilizando-se um teste de inibição da hemaglutinação.

A transmissão pode ocorrer por contágio direto ou indireto, seja pela via oral-fecal, através da água e alimentos contaminados, seja pelos aerossóis, além das secreções oculares e respiratórias. A replicação viral ocorre no epitélio das vias respiratórias superiores, na conjuntiva e também no epitélio intestinal. Após a sua adesão à célula hospedeira, o vírus sofre desnudamento e seu DNA migra para o núcleo. Os genes precoces são transcritos pela RNA polimerase DNA-dependente da célula. O RNA mensageiro (RNAm) precoce transcreve as futuras proteínas não estruturais no citoplasma. O RNAm tardio transcreve as futuras proteínas estruturais. Finalmente, a partícula viral é “montada” no núcleo e o vírus é liberado por lise da célula hospedeira.

Os *Adenovírus* apresentam distribuição mundial, com características endêmicas na maior parte das regiões. Alguns surtos em locais de contato estrito, como no caso de alojamentos, foram relatados. As infecções podem ocorrer em todas as estações do ano, apresentando ocorrência maior no final do inverno, na primavera e no início do verão. No inverno, os *Adenovírus* têm sido responsáveis por 25% de hospitalização por febre e doenças do trato respiratório inferior em recrutas militares. A maioria das infecções é branda, sendo os casos fatais e de sequelas associados aos pacientes imunocomprometidos. Estima-se que essa infecção seja responsável por 2% a 5% de todas as infecções respiratórias, ocorrendo em todas as faixas etárias, com predominância na infância.

10.5. *Herpesviridae*

O nome da família vem de um verbo grego *herpein*, que significa “rastejamento”. O nome se refere ao fato de os membros da família causarem infecções latentes recorrentes com progressão lenta. A família *Herpesviridae* é representada por vírus que infectam os vertebrados, incluindo aves, peixes e vários mamíferos, principalmente humanos. Apresentam uma grande importância médica por estarem envolvidos em muitas doenças. Essa família possui uma grande variação de vírus, devido à ampla ocorrência e diversidade, e é classificada em 3 subfamílias: *Alphaherpesvirus*, *Bethaherpesvirus* e *Gammaherpesvirus*.

A subfamília *Alphaherpesvirus* inclui os gêneros vírus *Herpes Simplex 1* e *2* (HSV-1 e HSV-2), responsáveis, respectivamente, pela infecção da mucosa labial e genital e são vulgarmente conhecidos como Herpes. Essa subfamília inclui também o *Vírus da Varicela-zoster* (HHV-3, *Human Herpesvirus-3*), cuja doença é conhecida como catapora. A segunda subfamília compreende o *Citomegalovírus* (ou HCMV, *Human Cytomegalovirus*, ou HHV-5, *Human Herpesvirus-5*), que causa um tipo de mononucleose infecciosa, os *Herpesvirus 6 e 7* (HHV-6 e HHV-7, *Human Herpesvirus-6 e 7*), responsáveis pela doença infantil infecciosa roséola. A última subfamília tem como representantes o vírus *Epstein-Barr* (EBV)-4, agente etiológico da infecção popularmente conhecida como “doença do beijo” ou mononucleose infecciosa, além de estar envolvido na patogênese de alguns tumores, como o linfoma de Burkitt e o carcinoma nasofaríngeo e o *Herpesvirus-8* (HHV-8, *Human Herpesvirus-8*, ou KSHV), associado ao sarcoma de Kaposi.

Esta família agrupa vírus que apresentam tamanho médio de 120 a 200 nm de diâmetro, com fita dupla de DNA. Geneticamente é a segunda família mais complexa de vírus, pois existem 160 genes em cada espécie. O vírion é icosaédrico com 162 capsômeros, envelopado, apresentando morfologia que vai de esférica até pleomórfica. O genoma não é segmentado e contém fita dupla de DNA com 120 mil a 220 mil nucleotídeos, dos quais 35-75% são

guanina e citosina. O genoma viral codifica proteínas estruturais e não estruturais localizadas no envelope e no capsídeo. Os lipídios virais são derivados das membranas nuclear e celular da célula hospedeira.

Como descritos anteriormente, os gêneros são acompanhados por números e estão associados a diferentes patologias, entretanto, eles possuem como característica principal, o fato de desenvolverem no hospedeiro, infecção crônica, mantendo-se latentes por longos períodos dentro da célula, sem destruí-la. São vírus extremamente infecciosos, porém com prognóstico geralmente benigno. Estima-se que 97% da população mundial já tenha tido contato com esse vírus e uma grande parte não apresentou nenhum sintoma. Alguns vírus desta família podem apresentar neurotropismo, levando ao desenvolvimento de encefalites; outros são linfotrópicos, isto é, possuem afinidade pelos linfócitos, o que poderá desencadear distúrbios do sistema imunitário, inclusive, tornando-se um problema de saúde pública, por causar infecções graves em pacientes imunodeficientes, por exemplo, com AIDS.

Quadro 8. Patologia, transmissão e diagnóstico

Vírus	Patologia	Transmissão	Diagnóstico
<i>Herpes simplex 1 e 2</i>	Gengivostomatite e Herpes labial (<i>HSV1</i>); Herpes genital (<i>HSV2</i>); Conjuntivite, queratite e encefalite herpética, principalmente em doentes imunodeprimidos, e Herpes neonatal	Contato direto com a mucosa lesionada	Pesquisa de antígeno (métodos moleculares e sorológicos)
<i>Varicella-zoster - VZV3</i>	Vesículas cutâneas nas áreas central e laterais do corpo	Contato direto com as lesões e aerossóis	Isolamento em cultura celular, imunofluorescência indireta e PCR

<i>Epstein-Barr EBV4</i>	Mononucleose infecciosa, Doença linforreticular progressiva, Leucoplasia de células em cabeleira, Linfoma de Burkitt, Carcinoma nasofaríngeo	Contato direto com a saliva	Métodos sorológico e molecular
<i>Citomegalovírus - CMV5</i>	Infecção congênita, causando nascimento prematuros e malformações no feto.	Contato com secreções e sangue infectados	Isolamento em cultura celular, sorologia e diagnóstico molecular
<i>Vírus HH6, HH7 e HH8</i>	HH6, HH7 - Exantema súbito HH8- Sarcoma de Kaposi, Linfoma de células B e Doença de Castleman	Contato ou por aerossóis	Métodos sorológicos e molecular

10.6. *Iridoviridae*

O prefixo é derivado de *Íris*, deusa grega do arco-íris, uma vez que alguns componentes desta família apresentam iridescência, um fenômeno óptico que faz certos tipos de superfícies refletirem as cores do arco-íris.

Esta família está dividida em cinco gêneros: *Chloriridovirus*, *Iridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Ranavirus*. Os dois primeiros são parasitas estritos de invertebrados, apesar do *Iridovirus* já ter sido relatado em lagartos. Os gêneros *Lymphocystivirus* e *Megalocytivirus* já foram encontrados em peixes e o *Ranavirus* em anfíbios, répteis e, recentemente, foi relatada a infecção em leopardos, provenientes da Etiópia.

Os vírus dessa família apresentam de 140 a 303 kb, o genoma é DNA de fita dupla, apresentando de 150 mil a 280 mil nt, e simetria icosaédrica. Em relação ao envelope, ele pode estar ausente ou presente, dependendo da maneira de como o vírus sai da célula (lise ou brotamento). O gênero Iridovírus entra na célula hospedeira através de viropexia (endocitose).

A importância desta família está muito ligada ao fato de causar doenças em uma variedade de peixes comercialmente importantes e de ser uma das famílias virais mais prevalentes em insetos.

10.7. Poxviridae

O prefixo *Pox* de *Poxviridae* é de origem inglesa e significa “vesículas”, as quais caracterizam a infecção por esses vírus. Esta família divide-se em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*. A primeira compreende os gêneros: *Orthopoxvirus* (espécie: *Vaccinia vírus*), causador da varíola bovina (*cowpox*) e da varíola humana (*smallpox*); *Parapoxvirus* (espécie: *Orf vírus*); *Avipoxvirus* (espécie: *Fowlpox vírus*); *Capripoxvirus* (espécie: *Sheeppox vírus*); *Leporipoxvirus* (espécie: *Myxoma vírus*); *Suipoxvirus* (espécie: *Swinepox vírus*); *Molluscipoxvirus* (espécie: *Molluscum contagiosum vírus*); *Yatapoxvirus* (espécie: *Yaba monkey tumor vírus*). E a segunda subfamília engloba os Gêneros: *Entomopoxvirus A* (espécie: *Melolontha melolontha entomopoxvirus*); *Entomopoxvirus B* (espécie: *Amsacta moorei entomopoxvirus*); *Entomopoxvirus C* (espécie: *Chironomus luridus entomopoxvirus*).

Os membros dessa família são considerados um dos maiores e mais complexos vírus que infectam animais. Apesar disso, esses vírus apresentam

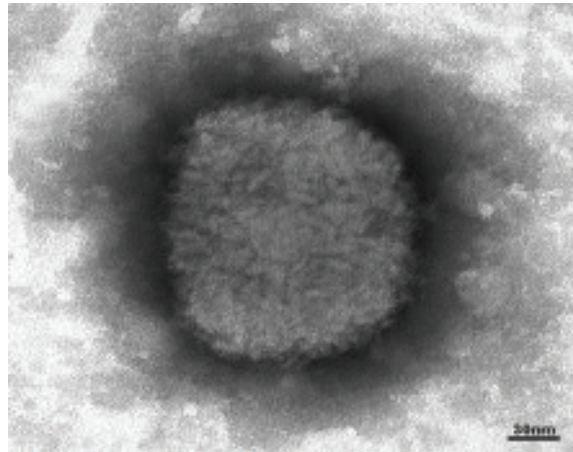
aparência e constituição bioquímica primitivas. Somente a transcrição e replicação do DNA, que ocorrem no citoplasma da célula, é que usam as enzimas codificadas pelo vírus.

Esses vírus infectam tanto vertebrados quanto invertebrados artrópodes. O vírion apresenta envelope tubular ou globular com proteínas estruturais, são geralmente ovóides, pleomórficos, e medem de 160 a 190 nm de diâmetro ou altura. O genoma de DNA não é segmentado e apresenta fita dupla contendo aproximadamente de 130 mil a 375 mil nucleotídeos, dos quais 20% (nos Entomopoxvírus) e 35% a 64% (nos demais) são constituídos por guanina e citosina.

O protótipo dessa família é o *Vírus Vaccinia*, o qual foi usado com sucesso como vacina e, graças as Campanhas de Vacinação na década de 1970 (século XX), foi possível erradicar o vírus da varíola. O vírus *vaccinia* penetra nas células, principalmente por fusão celular, mas ainda não se conhece o receptor responsável pela ligação do vírus à célula.

Outra espécie de Poxvirus, *Molluscum contagiosum virus* (MCV), é conhecida por infectar especificamente humanos. Esta causa uma infecção na pele e na mucosa (pequenas vesículas), normalmente benigna. A transmissão ocorre por meio do contato com o local infectado e é característica da primeira infância. No adulto, já foi encontrada na região genital, por isso, tem sido considerada causadora de Doença Sexualmente Transmissível (DST). O diagnóstico é feito através da clínica, mas quando há dúvidas, o material das vesículas é submetido aos ensaios histológicos.

Figura 9. Microscopia eletrônica do Poxivírus - Foto cedida pela Dr^a Monika Barth/IOC do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral - IOC/Fiocruz.



10.8. *Hepadnaviridae*

O nome *Hepadnaviridae* é derivado da palavra latina *hepa*, que significa "fígado". Esses vírus recebem esse nome devido às infecções que causam neste órgão.

Esta família é pequena, possuindo dois gêneros: *Orthohepadnavirus*, que infectam mamíferos, e *Avihepadnavirus*, que infectam aves. O primeiro gênero inclui as espécies: *Woodchuck hepatitis virus* (WHV), *Ground squirrel hepatitis virus* (GSHV), *Woolly monkey hepatitis virus* (WMHV) e *Hepatitis B virus* (HBV). Estes infectam, respectivamente, marmotas, esquilos, macacos e o homem. Dentre os membros dessa família, o vírus da hepatite B tem grande importância para humanos, sendo responsável por milhões de casos crônicos no mundo inteiro.

O vírion do HBV (partícula Dane) possui envelope, morfologia esférica, simetria icosaédrica e mede entre 40 a 48 nm de diâmetro. O genoma contém uma molécula de DNA circular, segmentado, de fita dupla, com 3.020 a 3.320 nucleotídeos. O ácido nucleico codifica os

antígenos: HBsAg, HBeAg, HBcAg e HBxAg. Outra característica da espécie HBV é apresentar partículas filamentosas, as quais são incompletas e, portanto, não infecciosas.

Durante o curso da infecção pelo HBV, os antígenos e anticorpos virais (marcadores sorológicos) são passíveis de ser detectados no sangue do indivíduo. Cada um desses marcadores apresenta um significado clínico. No início da infecção pelo HBV, o primeiro marcador sorológico a ser detectado é o HBsAg, pois na fase aguda da doença seus títulos são elevados. Este mesmo antígeno tende a desaparecer na evolução normal para a cura e, quando persiste após esse período, a evolução geralmente é crônica. O segundo é o HBeAg, que normalmente indica alto grau de replicação viral. No caso de evolução normal, o anti-HBe é produzido. O terceiro é o anti-HBc IgM, na fase aguda, e, em seguida, o anti-HBc IgG, em níveis gradativos, o qual persiste para a vida toda, podendo indicar que o indivíduo teve pelo menos um episódio de infecção pelo HBV. O anti-HBs indica recuperação da infecção e imunidade contra o HBV. Para a detecção desses marcadores, o método mais utilizado é o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Entretanto, podem ser realizadas técnicas moleculares de detecção do DNA viral, como a Hibridização, o branched-DNA, ou b-DNA – Chiron, e a PCR. Além disso, existem outros marcadores sorológicos da infecção pelo HBV, como o AgHBx e o anti-HBx, mas estes são pouco utilizados nos exames de rotina, ficando seu uso voltado para pesquisa.

A transmissão do HBV pode ocorrer pelo sangue contaminado (através das vias sexual, transplacentária e perinatal), por compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas, por transfusão de sangue ou hemoderivados, ou ainda por acidentes com material biológico. As consequências da infecção pelo HBV são muito variáveis, podendo o indivíduo infectado ser um portador assintomático. Pode ainda apresentar quadros clínicos que resultem na hepatite fulminante ou apresentar a forma crônica, que pode desencadear

a cirrose ou o carcinoma de fígado. A forma aguda da doença é caracterizada por um longo período de incubação de 45 a 120 dias, com sintomas mais comuns de anorexia, náuseas e vômitos. A icterícia geralmente acontece após uma semana de infecção, assim como a urina escura, a pele pálida e os altos níveis de bilirrubina e transaminases, embora aproximadamente 50% dos casos sejam anictéricos.

A infecção pelo HBV pode, no entanto, ser prevenida por vacinas. As primeiras vacinas eram derivadas de plasma de pacientes com infecção crônica, com o HBsAg inativado por métodos físico-químicos. Atualmente se utilizam vacinas desenvolvidas pela tecnologia do DNA recombinante.

10.9. *Coronaviridae*

Esta família pertence à ordem *Nidovirales*, e apresenta dois gêneros: *Coronavírus* e *Torovírus*. Os primeiros isolados dos *Coronavírus* foram o vírus da bronquite infecciosa, em 1930, o vírus da hepatite de camundongo e o da gastroenterite de porcos, em 1940. Estes dois gêneros apresentam similar organização genômica e uma estratégia de replicação. Entretanto, existem diferenças na morfologia do vírion entre os dois gêneros.

Os *Coronavírus* são divididos em três grupos sorológicos. O I e o II têm sido isolados em mamíferos, enquanto o III, em aves. O sorogrupo II é representado pelos protótipos *HCoV-229E* e *HCoV-NL63*, dentre outros, e o Grupo III é representado pelos protótipos *MHV*, *OC43* e *HKU1*, *SARS-CoV*. O *SARS-CoV* (*Coronavírus* associado a Síndrome Respiratória Aguda Severa) é relacionado, apesar de distante, com todos os outros coronavírus sequenciados.

A partícula completa, ou vírion, apresenta-se com morfologia esférica, envelopada e com cerca de 100 a 160 nm de diâmetro. O genoma alberga um RNA de fita simples, polaridade positiva e com tamanho de aproximadamente 32 Kb.

Dentre as proteínas estruturais do vírion existem as espículas de glicoproteínas, que são receptores de ligação e especificidade. Estes realizam a fusão com a membrana da célula hospedeira, a proteína de membrana, a hemaglutinina e a proteína do nucleocapsídeo, que é uma pequena proteína de envelope.

A maioria dos *Coronavírus* replica-se inicialmente nos tratos respiratório e entérico. Em contraste com a grande maioria dos vírus deste gênero, a infecção do trato respiratório inferior pelo SARs-CoV resulta em sérias complicações, requerendo muitas vezes que o paciente seja internado. Uma extensa epidemia, evidenciada inicialmente na China e depois na Europa, América do Norte e em outras partes da Ásia, foi devido a este vírus, e ocorreu entre os anos de 2002 e 2003, levando à morte milhares de pessoas. Esta infecção é caracterizada por febre acima de 38 graus Celsius, acompanhada de dor de cabeça e outros sintomas. Os sintomas respiratórios são usualmente amenos no início, mas após poucos dias, o paciente desenvolve tosse seca e produtiva, apresentando dispneia.

A transmissão do *Coronavírus* ocorre principalmente através de aerossóis de secreções nasais. Para o diagnóstico laboratorial utiliza-se, principalmente, a imunomicroscopia eletrônica e a sorologia. Até o momento, não existem vacinas no mercado capazes de prevenir esta infecção, mas várias vacinas se encontram em estudos clínicos, e podem ser promissoras.

10.10. *Flaviviridae*

O prefixo *flavi* vem do grego e significa “amarelo”, uma vez que os sinais clínicos associados a esse vírus podem levar à coloração amarelada, que aparece na pele e nos olhos do paciente. A família *Flaviviridae* é composta por três gêneros: *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Flavivirus*. O primeiro gênero tem como única espécie, até hoje identificada, o *Vírus da Hepatite C*. O segundo, agrupa os vírus que infectam mamíferos não humanos, com destaque para os

vírus da diarreia bovina e o vírus da peste suína. O último, de acordo com o VIII Relatório do Comitê Internacional em Taxonomia Viral (ICTV), agrupa aproximadamente 50 espécies de vírus de difícil identificação morfológica e taxonômica, dividindo o gênero em 10 grupos, antígenicamente relacionados. Entre eles, o *virus da Febre Amarela*, o grupo do *Dengue virus* (DENV), o grupo do *Mammalian Tick-borne virus* (TBEV), o grupo do *Aroa virus* (AROAV) e o grupo do *Japanese encephalitis virus* (JEV).

Os vírus desta família possuem como ácido nucleico o RNA de cadeia linear simples, polaridade positiva e comprimento médio entre 9,5 a 12,3 kd. Apresentam capsídeo icosaédrico, o que lhes confere um aspecto esférico, recoberto pelo envelope. E as partículas virais possuem um diâmetro com cerca de 40 a 60 nm.

Os representantes dessa família são considerados Arbovírus, pois possuem artrópodes como vetor. A palavra *arbovírus* é de origem inglesa, *arthropod-borne virus*, que significa “vírus carregado por um artrópode”. Os vírus ficam, então, armazenados no vetor e por vezes proliferam, sem causar danos.

Dois espécies dessa família representam um grande problema de Saúde Pública no Brasil, o *Vírus da Dengue* e o *Vírus da Febre Amarela*. Em relação a dengue foram notificados no Brasil, no período de 1981 a 2006, 4.243.049 casos, incluindo 5.817 casos de dengue hemorrágico/síndrome de choque dengue (FHD/SCD), perfazendo um total de 338 mortes. Segundo dados do Laboratório de *Flavivírus* do IOC/Fiocruz (2007), embora a doença tenha afetado todas as regiões brasileiras, o maior número de casos foi relatado no Nordeste e no Sudeste. Os *Vírus da Dengue* (DENV) 1 e 4 foram isolados pela primeira vez na região amazônica do Brasil, em 1981 e 1982. A doença se tornou um problema de saúde pública nacional no estado do Rio de Janeiro, em 1986 e 1990, com circulação de *DENV-2* e *1*, respectivamente. A introdução do *DENV-3* em 2000, também no estado do Rio de Janeiro, levou a uma epidemia com 288.245 casos notificados de

dengue e 91 óbitos. Cepas de vírus identificados em 2002, durante a epidemia, mostrou que o *DENV-3* se expandiu para novas áreas, algo que merece uma avaliação mais aprofundada.

A febre amarela é uma doença infecciosa, que se mantém endêmica nas florestas tropicais das Américas e África. A transmissão para humanos (ciclo urbano) só é possível pela picada de insetos hematófagos da família Culicidae, em especial do gênero *Aedes*. O ciclo silvestre deste vírus se mantém em macacos, que atuam como hospedeiros amplificadores, e insetos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, que atuam como vetores. Em torno de 90% dos casos, a doença se apresenta de forma benigna, evoluindo para a cura, enquanto em 10% apresentam complicações, podendo ocorrer o óbito em torno de 50% desses casos. Os métodos de diagnóstico incluem o ELISA (IgM), a Cultura de Células (isolamento viral), a Imuno-histoquímica e a PCR. A zoonose (ciclo silvestre) dificilmente será erradicada, mas a doença em humanos (ciclo urbano) é prevenível mediante a vacinação com a cepa 17D do vírus amarílico (ver ítem 7 deste capítulo).

10.11. *Arenaviridae*

Os membros da família *Arenaviridae* (do grego, *arena*, que significa “areia”) estão associados a diferentes espécies de roedores (reservatórios naturais). Esses vírus são esféricos, envelopados e apresentam um diâmetro médio de 110 a 130 nm. O ácido nucleico é composto por duas fitas de RNA circular, segmentado e envolto por proteína NP do nucleocapsídeo.

Esses vírus apresentam caráter zoonótico e possuem elevado poder infectante, pois devido às suas características serem semelhantes as da célula hospedeira, atravessam facilmente a membrana plasmática. Causam febres hemorrágicas severas, com extravasamento capilar e alterações hemorrágicas, levando à elevada taxa de mortalidade.

Essa família é dividida em dois gêneros: *Arenovírus* do novo mundo e *Arenovírus* do velho mundo. Dentre os causadores de doenças em humanos estão:

- *Lassa virus* – Febre de Lassa (África) - Velho mundo;
- *Junin virus* – Febre hemorrágica Argentina, reservatório: *Callomys musculinus* – Novo mundo;
- *Machupo virus* – Febre hemorrágica da Bolívia, reservatório: *Callomys callosus* - Novo mundo;
- *Guanarito virus* – Febre hemorrágica da Venezuela - Novo mundo;
- *Sabia* – Febre hemorrágica do Brasil - Novo mundo.

A transmissão ocorre pelo contato direto com a pele ou quando o indivíduo entra em contato com as excreções, ou material contaminado por elas, de roedores infectados. Pode ocorrer, ainda, por picada de artrópode infectado.

Os sinais clínicos dessa infecção estão associados, principalmente, a febres com extravasamento capilar e alterações hemorrágicas, as quais podem culminar com o agravamento do processo, levando a uma síndrome vascular, a hepatite, ou ainda a uma doença neurológica. A febre de Lassa é iniciada como uma gripe que se torna severa posteriormente.

Como medida de prevenção, deve-se procurar reduzir a população de roedores nos reservatórios, evitar contato com as fezes desses animais e tomar medidas de higiene. O paciente infectado deve ser submetido ao isolamento respiratório e a droga frequentemente empregada é a Ribavirina, via intravenosa.

O diagnóstico é realizado por isolamento viral em camundongo ou em cultura de células, além disso, podem ser empregados métodos moleculares e sorológicos (detecção de IgM específicas).

10.12. *Caliciviridae*

Os integrantes desta família são de grande importância como causadores das gastroenterites humanas. São quatro os gêneros desta família: *Lagovírus* e *Vesivírus*, que acometem apenas hospedeiros animais e são representados, respectivamente, pelos vírus da doença hemorrágica do coelho e vírus do exantema vesicular de suínos. E *Norovírus* e *Sapovírus*, que acometem humanos e animais e são representados, respectivamente, pelos *Vírus Norwalk* e *Vírus do tipo Sapporo*.

O vírion que representa esta família é desprovido de envelope, apresenta estrutura icosaédrica e o seu capsídeo, com dimensão entre 27 a 40 nm, tem uma depressão em forma de taça. Por isso que o prefixo da família recebeu a designação de *calici*. O genoma de aproximadamente 8,3Kb, constitui-se de RNA, fita simples, linear, não segmentado e com polaridade negativa.

A História dos *Norovírus* iniciou-se em 1929, quando Zahorsky propôs o nome de “doença do vômito do inverno”, a fim de descrever as epidemias de gastroenterites virais. Em 1968, O *Center Disease Control* (CDC) investigou uma epidemia causada pela doença do vômito ocorrida em uma escola de *Norwalk*, nos Estados Unidos, onde aproximadamente 50% dos alunos e professores desenvolveram gastroenterite. As partículas virais das fezes dos voluntários infectados foram identificadas pela imunomicroscopia eletrônica.

Os *Norovírus* apresentam cinco grupos genômicos. Dentre eles, o I, II e IV estão envolvidos nas infecções em humanos. O estudo destes agentes é um grande desafio, haja visto que não existe nenhum modelo animal pequeno que reproduza a doença clínica, e nem culturas de células suscetíveis.

A prevalência deste vírus é bastante elevada em vários países e, nos EUA, ocorrem cerca de vinte e três milhões de infecções por ano, durante todo o ano, principalmente nos meses mais frios. Mais de 70% das epidemias de gastroenterites estão associadas a este agente. A transmissão deste vírus se dá por via oral-fecal e sua infecciosidade está associada a baixas

doses, seja nas fezes ou no vômito. A diarreia pelo *Norovírus* é considerada comum em viajantes.

O período de incubação do vírus dura de 24 a 48 horas, podendo variar de 18 a 72 horas. Os sintomas gastrointestinais mais comuns são: náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia (4 a 8 evacuações diárias). Já os sintomas sistêmicos são, principalmente, mialgia, dor de cabeça, febre acima de 38 graus Celcius, etc. A imunidade ao vírus não é duradoura, de um modo geral é específica, ou seja, acarreta pouca reação cruzada.

O método laboratorial mais eficaz para o diagnóstico deste vírus é a PCR, capaz de detectar o vírus em amostras clínicas de fezes e vômitos ou em amostras ambientais (alimentos e água). A microscopia eletrônica é mais usada para identificar partículas virais nas fezes. Além disso, os métodos sorológicos também são usados para detectar os anticorpos específicos. O tratamento e o controle desta infecção devem visar a higiene adequada das mãos, dos alimentos e dos locais onde existam indivíduos infectados, já que doses baixas são suficientes para uma transmissão eficiente. Até o momento, não existem vacinas no mercado para prevenir esta infecção, mas algumas vacinas encontram-se em estudos clínicos.

10.13. *Togaviridae*

O prefixo desta família vem do latim *toga*, que significa “capote”, uma vez que estes vírus, ao serem visualizados no microscópio eletrônico, apresentam morfologia em forma de capote. Esta família está dividida em dois gêneros: o *Alphavirus* e o *Rubivirus*, os quais são responsáveis por várias doenças, tais como encefalite equina, rubéola, dentre outras.

O vírion consiste de envelope, capsídeo icosaédrico, e mede cerca de 40 nm de diâmetro. O seu genoma possui uma fita simples de RNA linear, não segmentado, com polaridade positiva, e apresenta de 9.700 a 11.800 nucleotídeos. A estabilidade do vírus sob condições *in vitro* ocorre em pH

alcalino, entretanto, são sensíveis aos solventes orgânicos e detergentes que solubilizam as lipoproteínas do envelope.

A espécie *Rubella vírus*, do gênero *Rubivirus*, é responsável por uma das doenças exantemáticas da infância, a rubéola. Esta doença apresenta característica sazonal, ocorrendo principalmente na primavera, e é transmitida por contato direto com aerossóis de indivíduos infectados. A transmissão do vírus da rubéola durante os três primeiros meses da gestação é de extrema gravidade, já que esse vírus tem a capacidade de atravessar a placenta e infectar o embrião, causando a Síndrome da Rubéola Congênita, que é caracterizada por aborto, parto prematuro, anomalias congênitas e morte fetal.

O período de incubação é de duas a três semanas e a transmissão se dá uma semana antes do aparecimento do exantema. A doença geralmente tem evolução benigna e mais da metade dos infectados são assintomáticos. As manifestações clínicas mais comuns são: febre de até 38 graus Celsius, aumento dos linfonodos do pescoço, e exantemas cutâneos, inicialmente na face, passando para outras partes do corpo. Esta doença é de difícil diagnóstico clínico por se assemelhar as outras doenças exantemáticas. O método de diagnóstico mais usado é o ELISA, o qual permite a detecção de anticorpos específicos. Na Campanha de Vacinação Brasileira, de 2008, foram disponibilizadas vacinas para indivíduos de 20 a 39 anos, de ambos os sexos.

10.14. *Picornaviridae*

Os vírus pertencentes à família *Picornaviridae* foram uns dos primeiros a ser reconhecidos, pois estudos mostraram que muitas das doenças causadas por eles já tinham histórico no passado. Uma importante característica desta família é a sua diversidade, uma vez que existem mais de 200 sorotipos definidos neste grupo. O prefixo *pico* é derivado do grego, “pequeno”, e essa nomenclatura foi atribuída a esta família por apresentarem os menores vírus RNA, quando comparados à grande maioria de vírus que contêm esse ácido nucleico.

A classificação dessa família é baseada nas propriedades antigênicas. A família compreende atualmente oito gêneros: *Enterovírus*, *Cardiovírus*, *Aphovírus*, *Hepatovírus*, *Parechovírus*, *Erbovírus*, *Kobuvírus* e *Teschovírus*. Essa família contém vírus que infectam vários tipos de vertebrados, incluindo o homem, e causam doenças de grande importância médica, como febre aftosa, poliomelite, hepatite A e rinovirose.

Essa família apresenta os vírus RNA de fita simples, linear não segmentado e de polaridade positiva. Os vírions consistem de um capsídeo não envelopado, com simetria icosaédrica, diâmetro de 27 a 30 nm e 12 capsômeros. O genoma completo apresenta de 7.000 a 8.500 nucleotídeos e o vírus apresenta replicação citoplasmática.

Dentre as doenças causadas por vírus desta família, a Hepatite A tem sido mostrada como uma das doenças mais antigas da humanidade. É de extrema gravidade em países em desenvolvimento, já que a disseminação do vírus, pela água ou pelos alimentos, envolve as condições sanitárias e de higiene pessoal (ciclo oral-fecal). Uma vez na corrente sanguínea, esse vírus pode atingir os hepatócitos, desencadeando um processo infeccioso (hepatite), que poderá levar ao aparecimento de sintomas clínicos importantes para o aparelho digestivo.

A hepatite A segue um curso de manifestações clínicas geralmente nos primeiros trinta dias da infecção, apresentando perfis variados, sendo as formas crônicas muito raras. A infecção compreende desde o estado de portador (assintomático) até o sintomático, que apresenta icterícia. No período prodrômico, uma minoria de indivíduos infectados relata sintomas clássicos, como febre, dores musculares, cansaço, mal-estar, inapetência, náuseas e vômitos. À medida que a icterícia vai surgindo, os sintomas e sinais prodrômicos podem desaparecer. Neste período, também pode ocorrer de as fezes ficarem amarelo-esbranquiçadas e a urina, escura.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela pesquisa de anticorpos no soro dos indivíduos suspeitos. Níveis de IgM anti-HAV podem ser detectados até uns quatro meses, principalmente pelo método ELISA. Como em toda doença viral, os pacientes infectados devem ter uma boa alimentação e repouso.

A prevenção da hepatite A envolve principalmente as medidas de responsabilidade das esferas governamentais, tais como o saneamento básico, campanhas de vacinação e informativas sobre a doença e sua prevenção. Alguns cuidados pessoais podem ser tomados a fim de evitar a transmissão. São eles: higiene pessoal e alimentar (lavagem e cloração), cloração ou fervura da água para a inativação do vírus.

Existem no mercado, vacinas licenciadas disponíveis para indivíduos acima de dois anos de idade. Esta vacina ainda não está inserida em Campanhas Nacionais de Imunização, entretanto, o Ministério da Saúde disponibiliza esta vacina para alguns Centros de Saúde.

10.15. *Birnaviridae*

O nome da família *Birnaviridae* tem o prefixo dividido em duas partes. A primeira tem como origem a palavra grega *bi* que significa “dois” e a segunda se refere à sigla RNA (Ácido Ribonucleico), que constitui o genoma do vírion. Dessa forma, esses vírus apresentam dois segmentos de fita dupla de RNA linear. Esta família subdivide-se nos gêneros *Aquabirnavirus*, *Avibirnavirus* e *Entombirnavirus*. Nesses gêneros estão incluídos o *Vírus da necrose pancreática infecciosa* (IPNV), que infecta peixes, o *Vírus da doença infecciosa da bursa* (IBDV) e outros vírus, que infectam galinhas, patos e perus.

Os vírus são esféricos de 70 nm de diâmetro, com capsídeo não envelopado, apresentando simetria icosaédrica, composto por 132 capsômeros. O genoma completo tem de 5.880 a 6.400 nucleotídeos e representa 9,7% do peso do vírion.

Dentre as doenças causadas por vírus dessa família, o IBDV tem uma grande importância, devido ao prejuízo que causa nas indústrias avícolas do mundo inteiro. O IBDV produz uma doença contagiosa, denominada Doença de Gumboro que acomete galinhas, desencadeando uma imunodeficiência secundária pela destruição da Bursa de Fabricius. Essa doença apresenta as formas clínicas e subclínicas com um período de incubação bem pequeno, já que as aves começam a apresentar sinais clínicos de 2 a 3 dias após a exposição. Os efeitos dos vírus nas aves envolvem a destruição de células de órgãos do sistema imunológico, como a Bursa de Fabricius, tonsilas cecais, baço e outros órgãos linfoides. Estudos demonstram que uma região do gene viral pode ser detectada em vírus isolados da Bursa de Fabricius pela técnica de PCR/RFLP. Ainda não se tem uma determinação específica para o controle do IBDV em aves, pois a vacina de vírus vivo de baixa passagem não é recomendada, já que o vírus vacinal mantém as características do vírus selvagem e assim pode desencadear a doença.

Outro vírus importante dessa família é o IPNV, que infecta várias espécies de peixes, como o salmão e a truta, além de infectar também moluscos e crustáceos. A mortalidade das espécies suscetíveis está relacionada com o padrão de virulência da cepa viral, assim como a idade ou condições físicas delas. O vírus tem sido encontrado em leucócitos e macrófagos presentes nos rins e baço dessas espécies. Estudos relacionados à sua replicação nesses locais têm sido associados à disseminação da doença nas espécies propensas à infecção em países da Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul.

A transmissão do IPNV tem sido mais registrada por contato direto dentro de uma mesma espécie, embora já tenha sido encontrado em ovas de algumas espécies de peixes, representando mais de 90% de mortalidade nos alevinos. Nos salmonídeos, a doença causa uma gastroenterite aguda e destruição do pâncreas (necrose focal), principalmente nos indivíduos jovens, já que nos sobreviventes, até seis meses após a infecção, o perfil é inaparente ou

subclínico. Mesmo assim, os principais aspectos de patogenicidade desta doença ainda não estão bem esclarecidos, dificultando, dessa forma, o controle e a prevenção por vacinas. O diagnóstico laboratorial desta infecção tem sido feito através do isolamento do vírus em cultura de células de linhagens susceptíveis, como a *Chinook salmon embryo* (CHSE-214), a *Rainbow trout gonad* (RTG-2) e a *Bluegill fry* (BF-2). Uma vez isolado, a identificação do vírus é normalmente realizada por técnicas como o teste de neutralização por anticorpos monoclonais e policlonais, a imunoperoxidase e o ELISA.

10.16. *Retroviridae*

Esta família está dividida em duas Subfamílias: *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*, as quais apresentam os seguintes gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Lentivirus*, *Spumaretrovirus*, sendo este último da Subfamília *Spumaretrovirinae*. Os vírus da família *Retroviridae* apresentam uma gama de hospedeiros, como símios, bovinos, aves, mamíferos e, inclusive, humanos. O nome desta família se deve à presença da enzima Transcriptase Reversa, responsável pela transcrição reversa do vírus, possibilitando a formação de um DNA complementar, o qual pode ser incorporado ao DNA da célula hospedeira.

Dentre as doenças causadas pelos membros da família *Retroviridae*, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é a mais importante, haja vista que a mesma leva a grandes índices de morbidade e mortalidade em humanos de todo o mundo. A AIDS foi reconhecida em 1981, a partir da investigação clínica e laboratorial em pacientes homossexuais do sexo masculino, residentes na cidade de Nova York, nos Estados Unidos. Estes indivíduos apresentavam grande incidência de Sarcoma de Kaposi e pneumonia (causada pelo *Pneumocystis carini*), que são quadros clínicos característicos de imunodeficiência. Os casos de AIDS também foram relatados em outros grupos de indivíduos, como os hemofílicos e os usuários de

drogas intravenosas, os quais apresentavam infecções graves causadas por microrganismos oportunistas.

Um aumento considerável do número de casos da doença em vários grupos de indivíduos, que não homossexuais, foi observado nos Estados Unidos após 1982. Desta forma, a doença avançou de forma alarmante para outras cidades de todo o mundo. Atualmente, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, existem aproximadamente mais de 40 milhões de infectados no mundo.

A classificação do *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV) é bastante complexa, constituindo Tipos, Subtipos, Grupos, além de formas recombinantes. Os tipos são: *HIV-1* e *HIV-2*. O Tipo 1 é encontrado em todo o mundo, enquanto que o Tipo 2 é limitado à África Ocidental e a algumas regiões da Europa. Os Subtipos identificados são: M, N e O, os quais são baseados, principalmente, nas diferenças genéticas das proteínas do envelope, do capsídeo. O Subtipo M reúne onze Subtipos: A1, A2, B, C, F1, F2, G, H, J e K, os quais apresentam formas recombinantes, como do *CFR01* ao *CFR12*.

A partícula completa do *HIV-1* é envelopada e apresenta forma esférica, com cerca de 110 nm de diâmetro. O genoma constitui-se de RNA de fita simples, de polaridade positiva, não segmentado. Dentre as proteínas estruturais mais importantes do vírion existem:

- Glicoproteína (gp) 120 - inserida no envelope e com a função de se ligar ao receptor CD4 presentes no linfócitos e macrófagos, que são as células-alvo do HIV;
- gp41 - inserida no envelope e com a função de se ligar aos correceptores CCR5 e CXR4 D4, presentes nos linfócitos e macrófagos. A ausência desta ligação impede a entrada do HIV na célula hospedeira;
- Proteína (p) 17 - presente na matriz, associada a membrana e adjacente ao nucleocapsídeo;

- p6, a p7 e a p24 - localizadas no nucleocapsídeo, sendo que as p6 e p7 são associadas ao RNA genômico.

Já dentre as proteínas não estruturais existem:

- p66/51 (transcriptase reversa) - responsável pela transcrição reversa, formando o DNA complementar; a p32 (integrase) permite a integração do DNA complementar viral ao DNA da célula hospedeira e a p11 (protease) inibe as proteases da célula hospedeira.

A infecção pelo HIV é crônica, ou seja, uma vez tendo infectado o indivíduo, o vírus vai persistir por toda a vida. A infecção evolui lentamente através de vários estágios específicos. No início da infecção, durante aproximadamente dois meses, o indivíduo apresenta elevados títulos de vírus no sangue e queda de células CD4, caracterizando a fase aguda da doença. Nesta fase, surgem os sintomas inespecíficos, que são, principalmente, febre, dor de garganta e dor de cabeça. Logo após, surgem os anticorpos no sangue, observando-se a queda dos títulos virais e a progressão da doença para a fase conhecida como assintomática, a qual pode durar, aproximadamente, de oito a dez anos. A doença progride então para a fase conhecida como sintomática, caracterizada pela presença de sintomas específicos da doença, associados aos microrganismos oportunistas. Nesta fase, observamos um aumento da carga viral no sangue e a queda das células CD4 e consideramos o indivíduo com AIDS. Caso não haja um controle rápido e eficaz, o indivíduo pode chegar ao óbito.

O diagnóstico laboratorial da doença deve ser feito após o terceiro mês da possibilidade de contágio e é baseado na detecção de anticorpos no sangue, pela técnica ELISA. O resultado positivo é confirmado por outros métodos como a Imunofluorescência e o *Western Blot*. O monitoramento da doença deve ser feito pela dosagem da carga viral e das células CD4, presen-

tes no sangue do indivíduo, através dos métodos moleculares, como a PCR e a Citometria de Fluxo.

Atualmente, no mundo, o tratamento da doença é baseado em uma combinação de agentes antirretrovirais, denominada *Highly Active Anti-Retroviral Therapy* (HART). Estas drogas possuem a capacidade de inibir várias etapas do ciclo de replicação do vírus, como fusão, transcrição reversa, integração e protease. Os pacientes, quando submetidos a este tratamento, e de um modo geral, têm uma redução considerável da carga viral no sangue; conseqüentemente, as infecções oportunistas ocorrem de forma menos frequente. A forma de prevenção da doença se dá evitando principalmente o contato com sangue, secreções genitais, como sêmen, dentre outras secreções biológicas. O uso de preservativos durante as relações sexuais é a forma mais eficaz de prevenir a transmissão sexual desta doença. Até o momento, nenhuma vacina encontra-se disponível no mercado, mas vários estudos relacionados a esta área encontram-se em andamento.

10.17. *Astroviridae*

O prefixo *astro* vem do grego e significa “estrela”, fazendo uma alusão ao aspecto morfológico desses vírus, que se assemelham a estrelas com cinco a seis pontas. Esta família está dividida em dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. O primeiro inclui as seguintes espécies: *Bovine astrovirus*, *Feline astrovirus*, *Human astrovirus*, *Ovine astrovirus*, *Porcine astrovirus* e *Mink astrovirus*. O segundo tem como representante as espécies: *Chicken astrovirus*, *Duck astrovirus* e *Turkey astrovirus*. Os membros dessa família infectam aves e mamíferos, inclusive o homem.

Essa família possui genoma RNA de fita simples linear, não segmentado, de polaridade positiva, capsídeo icosaédrico e ausência de envelope. O tamanho do genoma varia entre menos de cinco até mais de 20 kb. A entrada do vírus na célula hospedeira é feita por endocitose, mediada por receptores de membrana.

Esses vírus acometem crianças e adultos e são descritos como importantes enteropatógenos. As principais manifestações clínicas da infecção por esses vírus incluem o comprometimento gastrointestinal, tais como, diarreia, náusea, vômito, febre e dor abdominal. Alguns estudos mostram que a duração dos sintomas pode levar de três a quatro dias. Quadros mais severos podem levar a desidratação e ao óbito, principalmente em pacientes imunodeprimidos.

Os métodos de diagnóstico mais empregados para a detecção desses vírus são: Microscopia eletrônica, ELISA, Imunofluorescência e a PCR.

Não existe ainda tratamento antiviral ou vacinas, entretanto, como o ciclo se faz por transmissão oral-fecal é importante o saneamento básico e medidas profiláticas, quanto a higiene pessoal e cuidados com a água e alimentos ingeridos.

10.18. *Reoviridae*

O prefixo desta família se refere a sigla formada por três letras (REO): R - respiratório, E - entérico e O - orfão. Esta designação foi devido ao primeiro *Reovirus* ter sido isolado dos tratos respiratório e entérico de animais e humanos, os quais não apresentavam sintomas específicos de nenhuma doença, por isso órfão.

Esta família é uma das mais complexas, consistindo de nove gêneros, como *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Rotavirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Phytoreovirus*, *Fijivirus* e *Oryzavirus*; os quais infectam várias espécies, como os mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes, invertebrados e plantas.

Dentre os gêneros da família *Reoviridae*, o *Rotavirus* é de extrema importância em humanos, pois é responsável por quase um milhão de mortes por gastroenterite em crianças de todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento. A mortalidade de crianças abaixo de dois anos de idade apresenta como maior causa viral a infecção pelo *Rotavirus*, ficando atrás ape-

nas dos vírus causadores de infecções respiratórias. Esta infecção raramente acomete indivíduos adultos e, quando ocorre, geralmente são mais amenas.

O vírion apresenta morfologia esférica, medindo cerca de 80 nm de diâmetro, desprovido de envelope e com três capsídeos, apresentando simetria icosaédrica. O genoma de 15 a 27 kb, possui ácido nucleico de RNA linear, fita dupla, com cerca de 11 a 12 segmentos e com polaridade positiva. As enzimas requeridas para a transcrição da fita dupla de RNA estão presentes no próprio vírus.

Dentre as proteínas estruturais, a VP7 (glicoproteína ou proteína G) e a VP4 (protease clivada ou proteína P) compõem o capsídeo externo e definem o sorotipo viral, além de estarem relacionadas com a indução da reposta imunológica protetora.

O capsídeo interno é composto pela VP6, a qual, de acordo com sua especificidade antigênica, permite a classificação dos Rotavírus em sete distintos grupos, designados de A-G. Somente os grupos A, B e C foram identificados em humanos.

Os *Reovírus* replicam-se totalmente no citoplasma celular das microvilosidades do intestino delgado, gerando corpos de inclusão no citoplasma das mesmas. Este vírus apresenta uma proteína não estrutural, a NSP4, que é uma enterotoxina responsável pela descamação das células intestinais na luz do intestino, acarretando uma grande liberação de vírus nas fezes. Esta excreção viral pode durar cerca de dois a doze dias.

A diarreia causada pelo Rotavírus é devido à alteração na absorção de sódio e glicose, já que as células destruídas são substituídas por células imaturas da cripta, as quais são incapazes de fazer absorção. Os sintomas típicos da infecção pelo Rotavírus são: diarreia, febre, dor abdominal e vômito, resultando em desidratação. Os pacientes que apresentam a doença mais branda permanecem com os sintomas durante aproximadamente três a oito dias, recuperando-se totalmente após este período.

Em adultos, a doença é bastante rara, todavia já ocorreram epidemias nestes indivíduos devido ao grupo B. O tratamento da gastroenterite pelo Rotavírus deve ser a reposição hídrica e eletrolítica oral ou parenteral nos casos mais graves. A prevenção da doença pode ser feita através de vacina e também por medidas de saneamento básico. Atualmente, existe uma vacina oral, a qual é administrada em duas doses.

O diagnóstico laboratorial baseia-se na evidenciação dos vírus presentes nas fezes de indivíduos infectados recentemente. Para o referido diagnóstico, utilizam-se os seguintes métodos: Imunomicroscopia eletrônica, imunodifusão ou ELISA. Outras técnicas usadas são: a Eletroforese do ácido nucléico viral e também a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

10.19. *Orthomyxoviridae*

Esta família está inserida na ordem *Mononegavirales* e inclui agentes virais associados às infecções do trato respiratório, sendo os mais frequentes agentes causadores de quadros sintomáticos em humanos.

A família *Orthomyxoviridae* é constituída de cinco gêneros, os *Influenzavirus* A, B e C, os *Isavirus* e os *Thogotovirus*. Os três primeiros gêneros apresentam os agentes causadores da influenza em vertebrados, como aves, humanos e outros mamíferos. Os *Isavirus* infectam o Salmão e os *Thogotovirus* infectam vertebrados e invertebrados, como os insetos. (Quadro 1)

Os gêneros *Influenzavirus* A, B e C são identificados por diferenças antigênicas na nucleoproteína e na proteína de matriz, infectando os seguintes vertebrados:

- *Influenza* A – Humanos, outros mamíferos e aves. Responsáveis por todas as pandemias de influenza.
- *Influenza* B – Principalmente humanos.
- *Influenza* C – Humanos e porcos.

Quadro 8 – gêneros *Influenzavírus A*, *B* e *C* e suas respectivas espécies e sorotipos ou subtipos.

Gêneros	Espécies	Sorotipos ou subtipos
<i>Influenzavírus A</i>	<i>Vírus influenza A</i>	H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2, H10N7
<i>Influenzavírus B</i>	<i>Vírus influenza B</i>	
<i>Influenzavírus C</i>	<i>Vírus influenza C</i>	
<i>Isavírus</i>	<i>Vírus da anemia infecciosa do salmão</i>	
<i>Thogavírus</i>	<i>Vírus Thogoto</i>	
	<i>Vírus Dhori</i>	<i>Vírus Batken, Vírus Dhori</i>

Os vírions associados à família *Orthomyxoviridae* são esféricos, pleomórficos, com nucleocapsídeo medindo cerca de 80 a 120 nm de diâmetro, envelopados, e apresentam no seu genoma um RNA de fita simples, com polaridade negativa e com 13,6 Kb. A estrutura viral é constituída de nove proteínas, incluindo a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA).

No que se referem aos influenzavírus tipos A e B, os seus RNA apresentam oito segmentos, enquanto o influenza C apresenta apenas sete segmentos.

Na constituição proteica do Influenzavírus estão presentes as seguintes proteínas estruturais e não estruturais:

- Polimerases (PB1, PB2 e PA).
- Neuraminidase, a qual catalisa a reação de remoção de resíduos de ácido siálico da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus através da mucosa.

- Hemaglutinina (HA), que permite a ligação do vírus (adsorção) aos resíduos de ácido siálico na membrana da célula hospedeira, mediando a fusão viral com o endosoma.
- Proteína do nucleocapsídeo (NP).
- Proteínas de matriz (M1 e M2). A M1 provê a rigidez e a M2 está relacionada ao canal iônico, presente somente no influenza A.
- Proteínas não-estruturais (NS).

Dentre as proteínas mencionadas, a hemaglutinina e a neuraminidase apresentam propriedades importantes, como a que está relacionada a sua habilidade de alteração devido a mutações e recombinações gênicas, sem alteração da sua função. As recombinações gênicas ocorrem devido ao genoma ser segmentado. Esses processos acarretam o *drift* e o *shift* antigênicos. Os *drifts* são mutações menores no genoma viral, levando a epidemias anuais. Já o *shift* são as mutações mais extensas, levando à possibilidade de pandemias. Estas grandes mutações acarretaram grandes epidemias e pandemias na história da humanidade, onde milhões de indivíduos morreram. Como exemplo, a Gripe Espanhola de 1918, causada pelo vírus H1N1, com mais de vinte milhões de mortes no mundo; a Gripe de “Hong Kong”, de 1968-69, causada pelo vírus H3N2, com mais de 30 mil mortes nos Estados Unidos; a Gripe Asiática, de 1957-58, causada pelo vírus H2N2, dentre outras ocorrências, inclusive recentemente, em 2009, a Gripe A, inicialmente chamada Gripe Suína, que ocorreu primeiramente no México e posteriormente em outros países, inclusive no Brasil.

A nomenclatura do *Influenzavírus* é baseada nos seguintes aspectos: tipo de vírus (A ou B), local de isolamento do vírus, designação da linhagem, ano de isolamento, subtipo de hemaglutinina e neuraminidase, por exemplo: A/Texas/1/77/H3N2.

As manifestações clínicas clássicas da infecção causada pelo *Influenzavírus* geralmente surgem de forma abrupta e são, principalmente, febre alta, dor de cabeça, calafrios, dores musculares, tosse seca, dentre outros sintomas. Geralmente, a febre e os sintomas sistêmicos persistem por três dias. Já os sintomas respiratórios duram de três a quatro dias. Desta forma, a fase aguda da doença dura aproximadamente de quatro a oito dias, seguida do período de convalescença de uma a duas semanas. A infecção pelo *Influenzavírus* pode ter como consequência a pneumonia, a miosite e complicações neurológicas, as quais são evidenciadas principalmente em idosos, imunodeficientes e outros indivíduos com alterações cardíacas e pulmonares.

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente no isolamento viral (em cultura de células), na identificação dos antígenos virais e do ácido nucleico. A maioria dos métodos de diagnóstico requerem como material clínico a secreção de nasofaringe, obtida por aspiração ou por *swab*.

Para a prevenção e tratamento desta infecção podem ser usados, respectivamente, vacinas de vírus inativados e drogas, como o cloridrato de amantadina e seu análogo, a rimantadina (Quadro 4).

10.20. *Paramyxoviridae*

O termo *myxo* vem do grego, que significa “mucosas”, e identifica a especificidade dos *Paramyxovírus* aos mucopolissacarídeos e glicoproteínas presentes nos receptores de superfície das células. Os vírus deste grupo podem acometer humanos e muitos animais, como artrópodes e vertebrados.

A família *Paramyxoviridae* possui os gêneros: *Morbilivírus*, *Paramyxovírus* e *Pneumovírus*; sendo o primeiro destes o mais conhecido dos que infectam humanos, o qual é causador do sarampo. Os *Paramyxovírus* têm como representante o vírus da *Parainfluenza* e os *Pneumovírus* são representados pelo vírus da caxumba. Como características importantes, os vírus deste grupo apresen-

tam a aglutinação de hemácias em mamíferos e aves, além da atividade da enzima neuraminidase.

A forma do vírus é completamente irregular, variando de esféricos a filamentosos com diâmetro de 150 a 300 nm, sendo considerados pleomórficos. O envelope apresenta projeções na superfície, com espículas distintas de hemaglutinina e neuraminidase. O capsídeo é alongado e exibe simetria helicoidal, sendo o nucleocapsídeo filamentosos e com extensão que varia de 600 a 800 nm, dependendo do gênero.

Os vírions são compostos de 30% de lipídios em relação ao seu peso e os mesmos estão localizados no envelope. Os vírions são sensíveis ao tratamento com solventes lipídicos, detergentes não iônicos, formaldeído, agentes oxidantes e calor. As proteínas constituem aproximadamente de 75 a 80% do peso da partícula, sendo estas estruturais e não estruturais, codificadas pelo genoma viral. Os carboidratos representados pelas glicoproteínas são encontrados no vírion e constituem 6% do seu peso seco.

Os membros desta família contêm no genoma uma molécula de RNA, de fita simples, linear, com polaridade negativa. Os vírions medem de 150 a 200 nm de diâmetro e de 1.000 a 10.000 nm em extensão.

Esses vírus se ligam a receptores específicos localizados na superfície da membrana celular e entram na célula hospedeira via fusão do envelope viral, com a superfície da célula em um ambiente de pH neutro. Durante o seu ciclo biológico, os vírions têm uma fase extracelular e o capsídeo viral é envelopado, maturando-se naturalmente através da adesão com a célula hospedeira. A replicação do genoma ocorre de maneira similar aos outros vírus RNA, que possuem polaridade negativa. A transcrição, a síntese de proteínas e a replicação do genoma ocorrem no citoplasma da célula hospedeira. As glicoproteínas virais são sintetizadas e processadas como as glicoproteínas da célula. Os vírions maduros ligam-se à membrana plasmática hospedeira e saem da célula.

Das doenças causadas por vírus desta família, o sarampo constitui uma das mais estudadas e importantes. Esta doença pode causar três formas de encefalite: 1) infecção direta dos neurônios; 2) encefalite pós-infecção, que se acredita ser mediada imunologicamente; e 3) panencefalite esclerosante subaguda (SSPE), causada por uma variante defectiva do vírus durante a fase aguda da doença. O *Vírus SSPE* age lentamente e causa sintomas e efeitos citopáticos em neurônios, muitos anos após a fase aguda da doença. O desenvolvimento de um programa efetivo de vacinação tornou o sarampo uma doença rara nos Estados Unidos. Em áreas sem um bom programa de vacinação, a epidemia se mostra cíclica, repetindo ciclos epidêmicos de 1 a 3 anos, quando já se tem um número acumulado de pessoas suscetíveis.

Atualmente, existem algumas vacinas no mercado que são capazes de proteger apenas contra alguns sorotipos virais, sendo isso, uma grande limitação desta forma de prevenção. Outra desvantagem é o elevado custo.

10.21. *Rhabdoviridae*

O prefixo desta família vem do grego *rhábdos*, que significa “formato de bastão”. A família *Rhabdoviridae* infecta uma variedade de hospedeiros, incluindo artrópodes, o grupo dos vertebrados e vegetais. Existem aproximadamente 200 espécies de *Rabdovirus* reconhecidas pelo ICTV. Entretanto, poucas são bem caracterizadas e associadas a gêneros. A complexidade genômica e de transcrição, mostradas por esses vírus, indicam a grande diversidade da família. Os gêneros de importância em animais são:

- *Vesiculovirus* (*Vesicular stomatitis virus*, VSV)
- *Lyssavirus* (*Rabies virus*, vírus da raiva)
- *Ephemerovirus* (*Bovine ephemeral fever virus*)
- *Novirhabdovirus* (*Infectious hemathopoietic necrosis virus*)

O genoma contém apenas uma fita de RNA, não segmentado e de polaridade negativa, exceto em 5% dos membros dessa família. O genoma completo tem de 11 mil a 15 mil nucleotídeos. O peso da partícula viral é constituído por aproximadamente 65% a 75% de proteínas e o restante de lipídeos totais, sendo 50% a 60% de fosfolipídeos e 30% a 40% de esteróis e fosfolipídeos. Outro componente importante das partículas virais são os carboidratos, que constituem 3% da sua composição. A semelhança entre a composição dos lipídeos virais e da membrana plasmática eles sugere que tenham sido originados da célula hospedeira.

O vírion desta família apresenta o envelope e o nucleocapsídeo medindo de 45 a 100 nm de diâmetro. As projeções da superfície são densamente dispersas com espículas. O capsídeo é de simetria helicoidal.

A infecção por *Vesiculovirus* acarreta a formação de pápulas, as quais progredem para vesículas, e quando estas se rompem pode ocorrer infecção secundária, agravando o processo. Com o vírus da raiva (*Lyssavirus*), o desenvolvimento dos sinais clínicos em humanos podem ser divididos em três fases gerais: período prodrômico, fase neurológica aguda (agitação, hipersalivação e paralisia) e a fase de coma, precedendo a morte. Em casos em que a hiperatividade é predominante, a doença é classificada como “raiva furiosa”. Naqueles em que a paralisia é predominante, é chamada “raiva paralítica”. Na infecção por *Ephemerovirus*, o primeiro sinal clínico é a febre, em torno de 40 a 42°C, progredindo para quadros de anorexia, depressão e fraqueza muscular.

O diagnóstico laboratorial *post mortem* do vírus da raiva deverá ser realizado com espécimens clínico do sistema nervoso central (SNC), pelas técnicas de Imunofluorescência ou Imuno-histoquímica para a detecção do antígeno viral. Para o diagnóstico de *Vesiculovirus*, utilizam-se amostras de fluido vesicular ou do epitélio da lesão para o isolamento viral em culturas de células, em animais de laboratório ou em ovos embrionados. Outros métodos, como Imunofluorescência e a neutralização viral, também poderão ser utilizados

para o diagnóstico. E ainda, para a detecção de *Ephemerovirus*, empregam-se as técnicas sorológicas ELISA ou neutralização viral.

Como prevenção da infecção por *Lyssavirus humano* (raiva) é indicada a profilaxia pós-exposição (soroterapia).

10.22. *Filoviridae*

Os vírus desta família são taxonomicamente classificados na ordem *Mononegavirales*. O gênero *Marburgvírus* foi descrito em 1967, na Alemanha, após seu isolamento, a partir de 31 pessoas infectadas; e o gênero *Ebolavírus* foi descrito em 1976, na África subsaariana.

Nesta família, os vírus possuem capsídeo viral envelopado, com simetria helicoidal. O genoma de RNA de fita simples é linear, não segmentado e possui polaridade negativa, constituindo 1,1% do peso da partícula. Os vírions desta família são filamentosos e pleomórficos, medindo 80 nm de diâmetro, podendo chegar a 1.400 nm em extensão.

O gênero *Marburgvirus* apresenta a única espécie *Lake Victoria Marburgvirus*, responsável pela febre hemorrágica de Marburg e o gênero *Ebolavirus* apresenta quatro espécies: *Zaire ebolavirus* (EBOV-Z), *Sudan ebolavirus* (EBO-S), *Reston ebolavirus* (EBOV-R) e *Ivore Coast ebolavirus* (EBOV-IC). Causa a febre súbita, dor muscular, dor de cabeça e lesões orais. As enfermidades causadas por esses vírus induzem grandes processos hemorrágicos em humanos e em primatas não humanos, causando, dentre outros sintomas graves, diarreia, erupções cutâneas, hemorragias, interna e externa, e vômito com sangue, além de petéquias, sintomas que podem levar ao choque hipovolêmico e óbito em poucos dias.

A transmissão viral pode ocorrer através de vários fluídos orgânicos, como sangue, fezes, suor, saliva, vômito, sêmen e outras secreções, principalmente sanguinolentas. O período de incubação ocorre de 2 a 21 dias. O

diagnóstico laboratorial consiste em analisar amostras, como saliva, urina e outros fluídos, pelas técnicas ELISA e Imunofluorescência, além de métodos moleculares.

Para controle e prevenção dessas infecções, devem ser tomadas medidas, como o adequado isolamento do paciente, esterilização de materiais que entraram em contato com as amostras, ou mesmo com o paciente infectado, utilização de equipamentos de proteção individual especial pelos profissionais de saúde e dos contactantes (ver capítulo 1 do volume 1).

Ainda não existe vacina e terapia antiviral específica, por isso, o tratamento para essas infecções é paliativo, ou seja, a busca da redução do quadro hemorrágico, a hidratação hídrica e eletrolítica parenteral e oral.

10.23. *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* consiste em mais de 300 sorotipos que infectam vertebrados, invertebrados e vegetais. Os gêneros definidos nessa família são: *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Orthobunyavirus* e *Tospovirus*. Esses vírus são transmitidos por mosquitos, flebotomíneos e carrapatos, com exceção do gênero *Hantavirus*, que infecta roedores e são transmitidos por inalação de aerossóis dos dejetos destes animais. Os membros desta família são conhecidos por causarem infecções graves no homem, dentre as quais destacamos: a febre do Vale Rift, a febre hemorrágica do Congo e da Criméia e a encefalite da Califórnia.

Os vírus pertencentes a esta família são vírus de RNA circular de fita simples, trissegmentado, sendo dois segmentos de polaridade negativa e um de polaridade positiva. O virion carrega, também, uma enzima, polimerase (cap-dependente), denominada "L". As extremidades dos segmentos de RNA servem como sítio de reconhecimento para a polimerase. O virion apresenta simetria helicoidal, possui envelope e exibe um tamanho de 90 a 100 nm de diâmetro. É provável que o mecanismo de viropexia ocorra

durante a entrada do vírus na célula, subsequentemente é observado o desnudamento parcial do capsídeo e a partir daí a transcrição e tradução das proteínas virais no citoplasma. Os vírus migram para a região interna da membrana celular e finalmente saem da célula por pinocitose (brotamento), carreando parte da bicamada lipídica da célula hospedeira, para formar, assim, seu envelope.

O vírus mais conhecido desta família é o *Vírus Hantaan*, o qual pertence ao gênero *Hantavírus*. Este vírus infecta roedores e causa diferentes doenças, como a febre hemorrágica, com síndrome renal, na Ásia e na Europa, e a síndrome pulmonar e cardiovascular, que ocorre nas Américas. A Síndrome pulmonar é caracterizada por extravasamento de líquidos do compartimento intravascular para o interstício pulmonar, podendo levar a grave insuficiência respiratória. Esses vírus são transmitidos ao homem por inalação de aerossóis disseminados pelos excrementos e saliva de roedores infectados, mas foi descrita também a possibilidade de contágio direto ou indireto entre humanos. O primeiro caso registrado no Brasil ocorreu na década de 1980, no estado do Pará. Em 1993, três casos graves, inclusive um deles com óbito, aconteceram no estado de São Paulo, em Juquitiba. O número de casos associados a este vírus tem aumentado, disseminando-se para o sul do país, tendo, como quadros clínicos, características da síndrome pulmonar cardiovascular. Alguns desses casos mostraram evolução de uma grave pneumonia intersticial nos dois pulmões, com febre intensa e insuficiência respiratória.

A confirmação dos casos pelo diagnóstico laboratorial pode ser evidenciada pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida de uma Transcrição Reversa (RT-PCR), assim como a detecção de anticorpos IgM específicos no soro, através do ELISA. O início da doença é caracterizado pelos seguintes sintomas clínicos: dispneia, insuficiência respiratória grave, calafrios, náuseas, vômitos e, em alguns casos, diarreia e dores abdominais. Como esses sintomas

podem ocorrer em diversas síndromes, é importante que se realize o método ELISA na pesquisa de anticorpos IgM, a fim de caracterizar a fase aguda da doença.

Para evitar a propagação dessa doença, deve-se orientar as pessoas que moram na zona rural ou em qualquer outro lugar de risco sobre a possibilidade de os roedores silvestres (subfamília *Sigmodontinae*) serem reservatórios dos vírus. Outro cuidado importante deve ser dispensado aos profissionais de saúde, uma vez que já foram relatados alguns casos de médicos e funcionários contaminados por pacientes ou fômites.

O tratamento da síndrome pulmonar e cardiovascular baseia-se na oxigenação, ventilação dos pulmões e controle da pressão arterial. Por esse motivo, pacientes com esse quadro necessitam de uma internação em unidade de terapia intensiva (UTI). Estudos sugerem que drogas antivirais, como a Ribavarina, possam reduzir a gravidade do quadro clínico do paciente gravemente acometido.

11. Viroides e Prions

11.1. Viroides

O conceito de viroide foi proposto por Diener em 1971, quando estudava a doença do tubérculo da batata, onde detectou RNA nos núcleos das células vegetais doentes. O viroide é uma partícula infecciosa de RNA menor que os vírus, apresentando, ainda, outras diferentes características: Consiste em apenas uma molécula de RNA circular com baixo peso, não apresenta capsídeo e envelope, não produz proteínas, pode ser copiado apenas no núcleo da célula hospedeira e, para a sua detecção, é necessária a identificação de sequências de nucleotídeos do RNA, diferindo dos vírus, por não ser possível a sua visualização em tecidos infectados sem a utilização dessas técnicas.

Os viroides são classificados na taxonomia moderna em famílias, gêneros e espécies, segundo suas características biológicas e moleculares. E constituem os menores e menos complexos fitopatógenos conhecidos. Ainda não está claro como os viroides causam doença, mas devem utilizar proteínas celulares para efetivar seu ciclo infeccioso. A morte celular pode ocorrer devido à alteração do metabolismo, pois este interfere na capacidade de as células processarem o RNA mensageiro, impedindo, assim, a produção de proteínas celulares.

11.2. Príons

Os príons são partículas proteicas infecciosas, extremamente pequenas, resultantes de proteínas normais modificadas por mutação, nomeada por Stanley Prusiner, em 1982. Diferente de outras proteínas que aparecem em membranas plasmáticas de muitas células, os príons se ligam a estas membranas internamente formando fibrilas que, como não podem ser organizadas corretamente, formam agregados que, por sua vez, ao longo do tempo, acabam por matar as células.

Desde 1920, várias doenças têm sido atribuídas a esse agente infeccioso, algumas delas acometem o ser humano e causam degeneração mental, outras estão relacionadas a infecções de caprinos e bovinos, como a encefalopatia e a doença da vaca louca, respectivamente. Vários aspectos da infecção por príons ainda não estão elucidados, entre eles a forma como uma doença causada por príon se propaga.

O Prêmio Nobel de Medicina, de 1987, foi dado a Prusiner por seu estudo, onde ele identifica as cinco características desse agente infeccioso:

- não são inativados pelo calor a 90 °C;
- o tratamento com radiação não tem efeito nas infecções por príons, nem formol;
- resistem às enzimas que digerem DNA ou RNA;

- são destruídos por agentes químicos, como o fenol, a ureia e hidróxido de sódio 1M, responsáveis pela desnaturação de proteínas;
- possuem pareamento direto de aminoácidos.

Atualmente, sabe-se que a inativação dos príons só é possível em autoclave, à temperatura de 130°C.

12. Vírus Oncogênicos

São vírus com capacidade de modificar o ácido nucleico, formando associação estável com o genoma da célula hospedeira, mudando a sua estrutura e a função no organismo. Os oncogenes são fragmentos de DNA de vírus tumorais que causam a divisão descontrolada da célula hospedeira, já o proto-oncogene é similar ao oncogene, mas é formado a partir da captura de genes “extras” da célula hospedeira por alguns vírus RNA tumorais.

A maioria dos vírus oncogênicos codifica a informação para divisões ilimitadas, pois são mutantes que contém deleções ou substituições. Essas mutações alteram o material codificado por estes genes.

A maioria dos vírus tumorais conhecidos até o momento são vírus DNA, tais como o vírus de *Epstein-Barr* (EBV), o *Papilomavírus humanos* (HPV) e o *Vírus da hepatite B* (HBV); entretanto, alguns vírus RNA estão associados a cânceres, como, por exemplo, o *HTLV-1* e o *HIV*.

Referências Bibliográficas

AMERICAN Academy of Pediatrics. Adenovirus Infections. In: PETER G.(Ed.), 1997 Red Book. *Report of the Committee on Infectious Diseases*. 24.ed. Elk Grove Village, I.L: American Academy of Pediatrics, 1997.

ANTONSSON, A. *et al.* The ubiquity and impressive genomic diversity of human nature of these viruses. *J. Virol*, v. 74 , n. 24, p.11.636-11.641, 2000.

BENETKA, V. *et al.* First report of an iridovirus (Genus Ranavirus) infection in a Leopard tortoise (*Geochelone pardalis pardalis*). *Vet. Med. Austria / Wien. Tierärztl. Mschr*, v. 94, p.243-248, 2007.

- BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; DELIUS, H. Evolution of papillomaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 186, p.34-53, 1994.
- BERNS, K. I.; FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Parvoviridae: the viruses and their replication. Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
- BEST, S. M. *et al.* Caspase cleavage of the nonstructural protein NS1 mediates replication of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* v. 77, p.5.305-5.312, 2003.
- BLACK, J. G. *Microbiologia: Fundamentos e perspectivas.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001.
- BOFILL-MAS, S. *et al.* Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J. Virol.*, v. 75, n. 21, p. 10.290-10.299, 2001.
- CÂMARA, G. N. N. L. *et al.* Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 01, n. 01, p.149-158, 2003.
- CANN, A. J. *Principles of molecular virology.* 4. ed. San Diego: Academic Press, 2001.
- CARVALHO, W. B. Acute bronchiolitis, an updated review. *Rev Assoc Med Bras*, v. 54, n. 1, p.10, 2008.
- CAVANAGH, D. *et al.* Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian. Pathology*, v. 31, p. 81-93, 2002.
- CHANTLER, J. ; WOLINSKY, J. S. ; TINGLE, A. (). Rubella virus. *In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.). Fields' Virolog.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001.
- CHEN, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.*, v. 12, p. 1.306-1.312, 2001.
- CLAUS, M. P. *et al.* Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* v. 27, n. 7, p. 314-318, 2007.
- COLE, C. N. ; CONZEN, S. D. Polyomaviridae: The viruses and their replication. *In: KNIPE, D. M. ; HOWLEY, P. M. (Eds.). Fields Virology.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
- CONWAY, M. J. ; MEYERS, C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J. Dent. Res.*, v. 88, n. 4, p.307-317, 2009.

DAVISON, A. J. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, v. 86, n. 69-88, 2002.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.*, v. 30, p.115-133, 2004.

_____. Antiviral drug Discovery and development: Where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res*, v. 67, p.56-75, 2005.

DESROSIERS, R. C. Nonhuman lentiviruses. In: KNIPE, D. M. ; HOWLEY, ; P. M. (Eds.). *Fields Virolog.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

DIMMACK, N. J. ; EASTON, A. J.; LEPPARD, K. *Introduction to modern virology.* 6. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2007.

DOPAZO, C. P. ; BARJA, J. L. Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. In: CAREY, O. C.(Ed.). *Molecular diagnosis of salmonid disease.* v. 2, p. 23-47, 2002.

EIRAS, M. et al. Víróides e vírusóides: relíquias do mundo de RNA. *Fitopatol. Bras.*v. 31, n. 3, 2006.

FERREIRA, A. W. ; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FERREIRA, W. F. C. ; SOUSA, J. C. F. *Microbiologia.* Lisboa: Lidel, 2002.

FIGUEIREDO L.T.M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 2, p. 203-210, 2006.

_____. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 32, p. 154-158, 1999.

FIELDS, B. N. ; KNIPE, D. M. ; HOWLEY, P. M. *Fields Virology.* 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Pub, 2002.

_____. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven Pub, 2006.

FLINT, S. J. et al. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* Washington: ASM, 2000.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária.* Editora da UFSM, 2007.

_____. et al. *Viroidae.* In: FAUQUET, CM. et al. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier Academic Press, 2005.

FORSLUND, O. et al. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.*, v. 80, p. 2437-2443, 1999.

FOY, H. M. *Adenoviruses*. In: EVANS, A. ; KASLOW, R. (Ed.). *Viral Infections in Humans: epidemiology and control*. 4. ed. New York: Plenum, 1997.

GAO, G. P. *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 99, p. 11854-11859, 2002.

GUBALA, A.J. *et al.* Genomic characterisation of Wongabel virus reveals novel genes within the Rhabdoviridae. *irology*, 376; v. 1, n. 20, p. 13-23, 2008.

HORWITZ, M. S. *Adenoviruses*. In: FIELDS B. N. ; KNIPE D. M. ; HOWLEY P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995.

ICTVdB Management 00.001. Adenoviridae. In: ICTVdB. *The Universal Virus Database*, version 3. BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). New York, USA: Columbia University, 2006.

_____. Management 00.017. Arenaviridae. In: ICTVdB. *The Universal Virus Database*, version 3. BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). New York, USA: Columbia University, 2006.

_____. Management 00.005. Astroviridae. In: ICTVdB. *The Universal Virus Database*, version 3. BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). New York, USA: Columbia University, 2006.

_____. Management 00.009. Birnaviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). New York, USA: Columbia University, 2006.

_____. Management 00.011. Bunyaviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). New York, USA: Columbia University, 2006.

_____. Management 00.012. Caliciviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.). New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 03.019. Coronaviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.). New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 01.025. Filoviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.). New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.026. Flaviviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.030. Hepadnaviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.031. Herpesviridae. In: ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.036. Iridoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2003.

_____. Management 00.046. Orthomyxoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management. 00.099. Papillomaviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 01.048. Paramyxoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management. 00.050. Parvoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.052. Picornaviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management. 00.047. Polyomaviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.058. Poxviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 01.062. Rhabdoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.060. Reoviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.061. Retroviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

_____. Management 00.073. Togaviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed.); New York, USA; Columbia University, 2006.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E.A. *Microbiologia Medica*. 22. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

- KUHN, R. J. *et al.* Structure of Dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, v. 108, p. 717-725, 2002.
- LA SCOLA, B. *et al.* A giant virus in amoebae. *Science*, . 28; v. 299, n. 5615, p. 2033, 2003.
- LITTER, E. ; OBERG, B. Achievements and challenges in antiviral drugs. *Antiviral Chem. Chemother*, v.16, p.155-168, 2005.
- _____. The past, present and future of antiviral drug discovery. *Drugs*, v.7, n.12, p. 1104-1112, 2004.
- LOPEZ, S. ; ARIAS, C. F. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*, v. 12, p. 271-278.
- MADIGAN, M. T. *Microbiologia de Brock*. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MORALES, J. C. *Técnicas de diagnóstico em virologia*. Madri: Ediciones Diaz de Santos, 1993.
- MURPHY, F. A. *et al.* The Classification and Nomenclature of Viruses. "Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". *Archives of Virology*, Nova lorque: Springer Verlag, 1995.
- MURRAY, P. R. ; ROSETHAL, K.S. ; PFALLER, M.A. *Medical Microbiology*. 9. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.
- OLIVEIRA, L. H. S. *Virologia Humana*. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994.
- PARASHAR, U. D. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 12, p.304-306.
- RAMOS, E.*et al.* The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation*,. 15; v. 87, n. 5, p. 621-630, 2009.
- ROBINSON, J. L.. Prevention of congenital rubella syndrome - what makes sense in 2006? *Epidemiol. Rev.* , v. 28, p. 81-7, 2006.
- RODRIGUES, C. A. *Detecção e caracterização molecular do poliomavírus em transplantados*,Dissertação (Mestrado)– Aveiro: Universidade de Aveiro, 2006.
- ROSENBERG, H. F. ; DYER, K. D. ; DOMACHOWSKE, J. B. Respiratory viruses and eosinophils: exploring the connections. *Antiviral Res*, v. 83, n. 1, p.1-9, Epub, 2009,16.
- ROTTINGHAUS, S. T. ; WHITLEY, R. J. Current non-AID antiviral chemotherapy. *Ther*, v. 5, n. 2, p. 217-230, 2007.
- RYAN KJ RAY, C. G. *Sherris Medical Microbiology: an Introduction to Infectious Diseases*. New York: McGraw-Hill, 2004.

SANTOS, N. S. O. ; ROMANOS, M. T. V. ; WIGG, M. D. *Introdução à Virologia Humana*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2008.

SPECTER, S. ; HODINKA, R. L. ; YOUNG, S. A. *Clinical Virology Manual*. 3. ed. ASM Press: Washington, 2000.

STRAUSS, E. G. ; STRAUSS, J. H. *Viruses and human disease*. San Diego: Academic Press, 2002.

TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. *et al. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego. Academic Press, 2000.

WAGNER, E. K. ; HEWLETT, M. J. *Basic Virology*, 2004.

WENGLER, G. The regulation of disassembly of alphavirus cores. *Arch. Virol.*, v. 154, n. 3, p. 381-90.



Capítulo 3

Bacteriologia

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Lucieny de Faria Souza Miguel

1. Introdução

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

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

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

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

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

2. Histórico da Bacteriologia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Morfologia e citologia bacteriana

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

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

3.1. Morfologia

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

3.1.1. Bastonetes ou bacilos

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

3.1.2. Espirilos

Forma de hélice, sacarroilha, ou espiralar.

3.1.3. Cocos

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

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


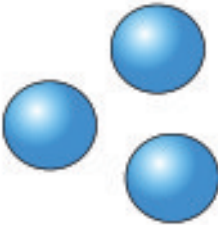


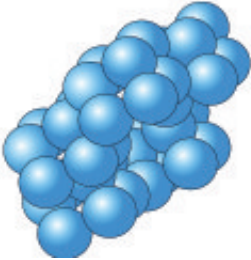

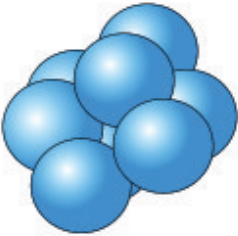
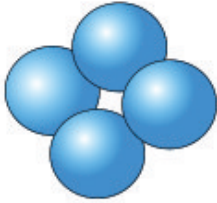
- Diplococos – Cocos agrupados 2 a 2 (divisão em um único plano).
- Estreptococos – Vários cocos dispostos em cadeia, similar a um cordão de pérolas. (divisão em um único plano).
- Tétrades – Grupos de 4 cocos unidos (divisão em 2 planos).
- Sarcinas – Grupos de 8 cocos unidos, de forma semelhante a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

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

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

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



	
Bacilos ou Bastonetes	Cocos
	
Espirilo	Diplococos
	
Estafilococos	Estreptococos
	
Sarcina	Tétrade

3.2. Citologia

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

3.2.1. Parede celular

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

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

Figura 1. Estrutura básica da parede celular Gram-negativa

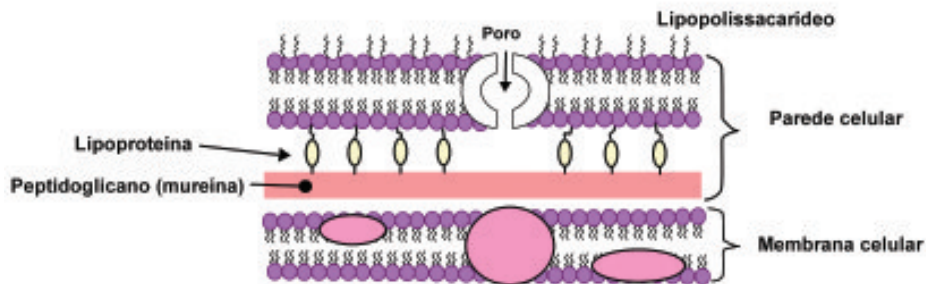
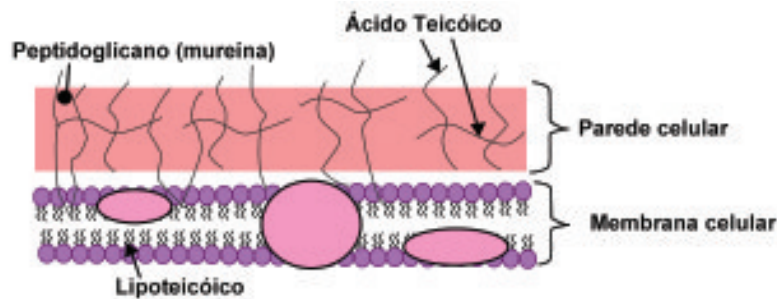


Figura 2. Estrutura básica da parede celular Gram-positiva



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

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

3.2.2. Membrana celular ou membrana citoplasmática bacteriana

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

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

3.2.3. Citoplasma

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

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

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

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

3.2.4. Outras estruturas

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

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

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

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

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

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

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

4. Taxonomia bacteriana

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

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

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

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

4.1. Nomenclatura taxonômica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2. Convenção taxonômica

Sufixos usados para determinação de ordens, famílias e tribos:

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

4.3. Regras de modificação na nomenclatura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.1. Coloração de Gram

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

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

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

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

Através de nossa experiência, podemos formular duas regras simples:

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

5.1.1. Método de Gram (Clássico)

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

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

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

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

5.1.2. Preparação de corantes

A. Cristal Violeta Fenicada

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

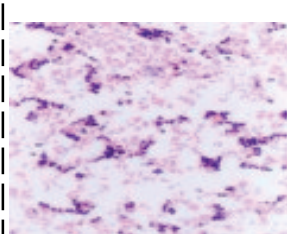
Dissolver o corante no álcool, adicionar o fenol fundido pouco a pouco e acrescentar a H₂O destilada. Filtrar após 24 horas de repouso.

B. Lugol

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

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

Figura 3. Bactérias coradas pelo método de Gram



C. Fucsina de Ziehl

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

Safranina.....2,5 g

Água destilada.....500 mL

Misturar bem o pó na água até a completa dissolução.

5.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

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

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

5.2.1. Método de Ziehl-Neelsen

Esfregaço homogêneo, delgado e fixado.

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

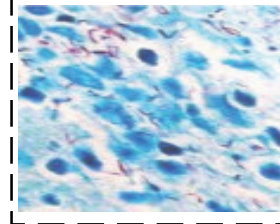
- Lavar em água corrente e descorar com solução de álcool-ácido clorídrico a 1%.
- Cobrir o esfregaço com azul de metileno, por aproximadamente 30 segundos.
- Lavar e deixar secar.
- Observar em objetiva de imersão (100 X).

5.2.2. Preparo dos corantes

A. Fucsina de Ziehl

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

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



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

B. Azul de Metileno

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

Agitar e completar com:

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

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

5.3. Coloração de Albert-Laybourn

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

5.3.1. Método de Albert-Laybourn

Esfregaço homogêneo, delgado e fixado.

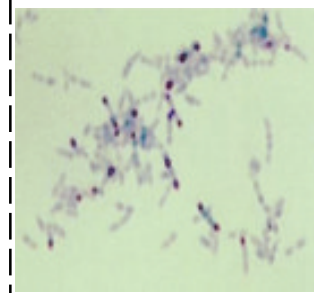
- Cobrir o esfregaço por 3 a 5 minutos, com a solução de Albert-Laybourn.
- Escorrer (sem lavar).
- Cobrir com solução Lugol forte, por aproximadamente 2 minutos.
- Lavar e secar.
- Observar em objetiva de imersão (100 X).

5.3.2. Preparo de corantes

A. Solução de Albert-Laybourn

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

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



B. Solução de Lugol Forte

Iodo metálico..... 2,0 g
Iodeto de potássio..... 3,0 g
H₂O destilada 300 mL
Guardar em frasco âmbar ao abrigo da luz.

5.4. Método de Fontana-Tribondeau

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

5.4.1. Técnica de Fontana-Tribondeau

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

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

5.4.2. Preparo de corantes

A. Líquido de Ruge (fixador):

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

B. Mordente

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

Dissolver o ácido fênico na água.

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

C. Nitrato de Prata Amoniacal (solução impregnadora)

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

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



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

5.5. Coloração para flagelos

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

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

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

5.5.1. Técnica de visualização de flagelos

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

5.5.2. Preparo dos corantes

Solução A:

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

Solução B:

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

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

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

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

5.6.1. Técnica para coloração de esporos

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

Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

5.6.2. Preparo dos corantes

Solução A: Verde malaquita a 5%

Verde malaquita..... 2,5 g

Água destilada..... 50 mL

Misturar e deixar em repouso durante uma noite para dissolver.

Solução B: Safranina

B.1 Solução estoque

Safranina50 g

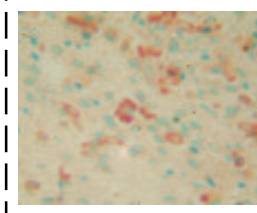
Etanol a 95%.....2.000 mL

B.2 Solução de trabalho

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

Água destilada.....2.700 mL

Figura 7. Esporos colorados pelo método de Wirtz-Conklin



5.7. Coloração de cápsula

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

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

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

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

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

5.7.1. Técnicas de coloração de cápsula

5.7.1.1. Método da tinta da China (coloração negativa)

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

5.7.1.2. Método da tinta da China com fucsina diluída

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

5.7.1.3. Método de Hiss

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

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

Execução prática:

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

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

5.7.2. Preparo dos corantes

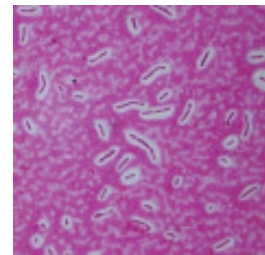
Cristal violeta e fucsina diluída (veja colorações anteriores)

Solução de sulfato de cobre a 20%:

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

Água destilada.....100 mL

Figura 8. Visualização da cápsula bacteriana



5.8. Considerações

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

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

6. Meios de cultura: preparo e utilização

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

6.1. Meio de cultura

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

6.2. Classificação dos meios de cultura

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

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

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

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

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

Ex: Ágar nutritivo.

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

Ex: Meio SIM e Cary & Blair.

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

Ex: Caldo nutritivo, caldo simples e caldo Casoy.

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

6.2.2. De acordo com a composição química

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

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

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

6.2.3. De acordo com o objetivo da utilização

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

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

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

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

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

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

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

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

6.3. Substâncias usadas no preparo de meios de cultura

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

6.3.1. Fonte de carbono

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

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

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

6.3.2. Fonte de nitrogênio

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

6.3.3. Outros compostos

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

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

6.4. Fatores ambientais que afetam o crescimento de microrganismos

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

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

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

6.5. Seleção dos meios de cultura primários

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

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

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

6.6. Isolamento e cultivo de culturas puras

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

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

6.6.1. Técnicas de isolamento de microrganismos

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

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

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

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

6.7. Conservação das culturas puras

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

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

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

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

7. Reprodução bacteriana e fases de crescimento

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

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

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

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

7.1. Fase estacionária (1ª) ou fase Lag

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

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

7.2. Fase logarítmica (fase Log ou exponencial)

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

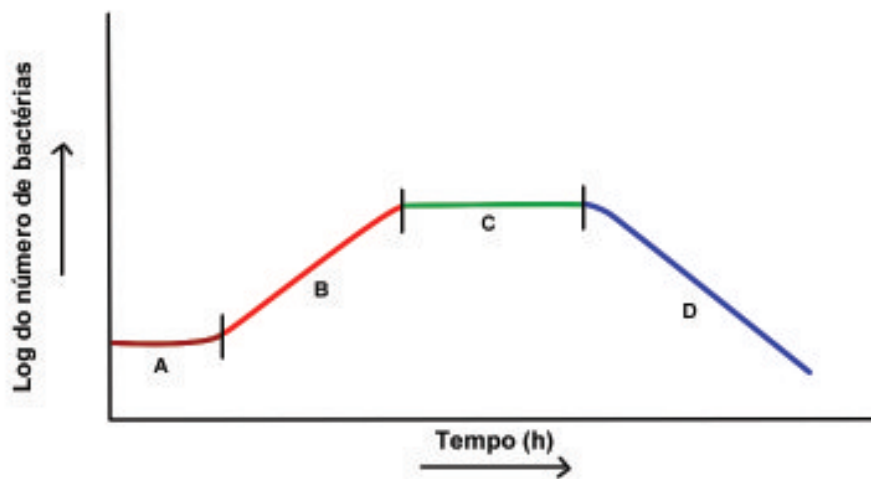
7.3. Fase estacionária (2ª) ou fase Platô

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

7.4. Fase de declínio ou morte

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

Figura 9. Faces do crescimento bacteriano *in vitro*



8. Fatores ambientais que afetam o crescimento bacteriano

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

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

8.1. Temperatura

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

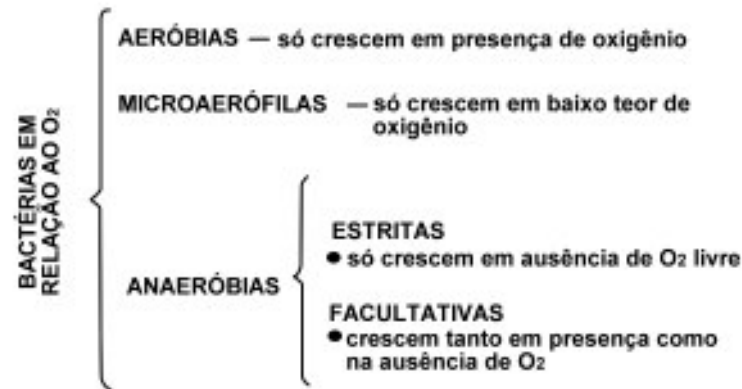
A temperatura ótima de crescimento pode não ser a temperatura ótima de outras atividades celulares. Estes valores podem ser diferentes, dependendo dos autores consultados, porém, em média, obedecem ao critério abaixo:

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

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

8.2. Oxigênio

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



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

Ex.: *Acinetobacter*.

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

Ex.: *E.coli*.

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

Ex.: *Clostridium botulinum*.

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

Ex.: *Campylobacter*

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

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

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

Figura 10. Jarra hermética



hidrogênio, que a partir de um catalisador de paládio contido na jarra forma água. Além disso, o dióxido de carbono também estimula o crescimento de várias bactérias.

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

8.3. pH

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

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

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

8.4. Outros fatores

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

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

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

9. Controle dos microrganismos

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

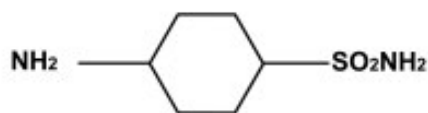
10. Quimioterapia e antibioticoterapia (Mecanismos de ação dos antimicrobianos)

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

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

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

Figura 11. Configuração do Prontosil.



Sulfanilamida

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

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

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

Atualmente, a denominação dos antimicrobianos é feita assim:

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

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

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

Ex.: Fluoquinolonas, Aspirina, etc.

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

10.1. Seleção de agentes antimicrobianos

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

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

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

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

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

10.2. Antimicrobianos usados na terapia das infecções

10.2.1. Sulfas e sulfonas

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

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

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

A toxicidade seletiva destes antimicrobianos se dá através de:

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

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

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

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

Figura 12. Sulfametoxazol (sulfa)

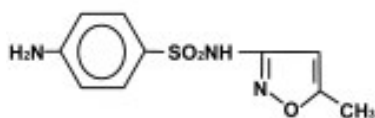


Figura 13. Trimetoprim

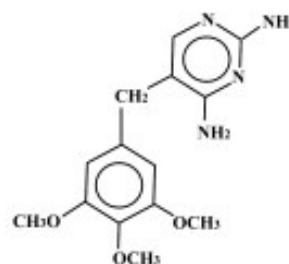
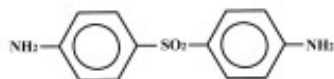


Figura 14. Dapsona (Sulfona)



10.2.2. Quinolonas

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

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

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

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

Figura 15. Ácido nalidixico (Quinolona)

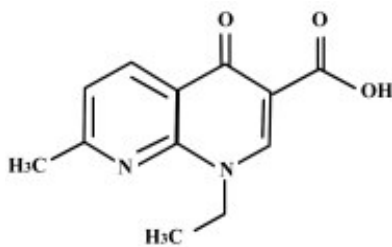
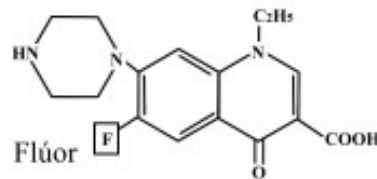


Figura 16. Norfloxacina (Fluoroquinolona)



10.2.3. Antissépticos

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

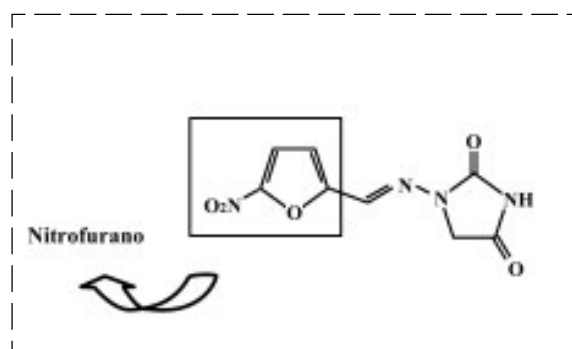
A nitrofurantoína (Figura 17), representante desta classe, é um nitrofurano sintético utilizado na prevenção e no tratamento de infecções urinárias. Inibe tanto bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas, devendo ser utilizado em microrganismos comprovadamente sensíveis a este fármaco.

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

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

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

Figura 17. Nitrofurantoína



10.2.4. Betalactâmicos

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

- Penicilinas

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

- Cefalosporinas

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

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

Os mecanismos de ação das penicilinas e cefalosporinas são:

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

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

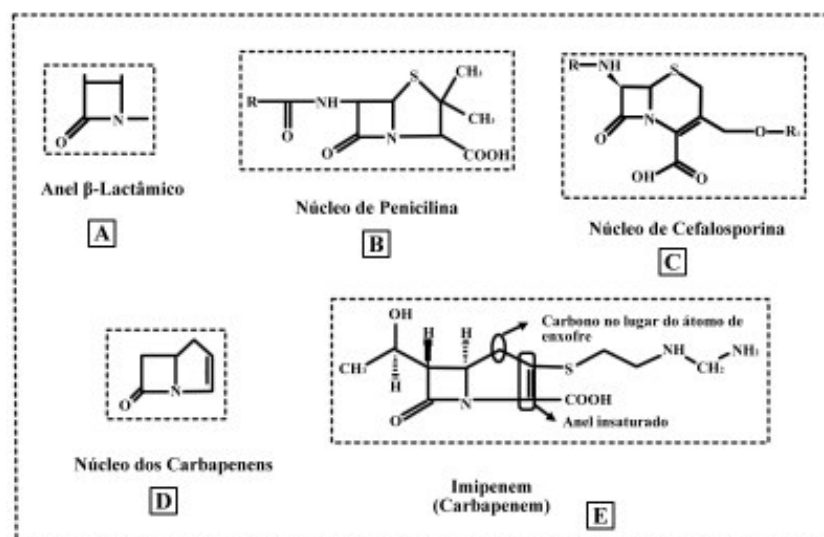
- Carbapenems

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

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

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

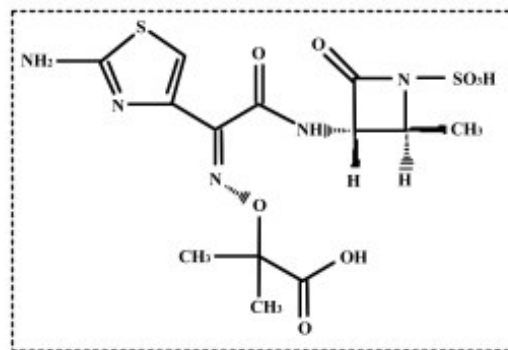
Figura 18. Betalactâmicos



- Monobactâmicos

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

Figura 19. Aztreonam (Monobactâmico).



10.2.5. Aminoglicosídeos e tetraciclina

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

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

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

Figura 20. Estreptomina.

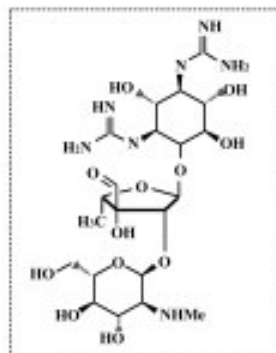


Figura 21. Canamicina.

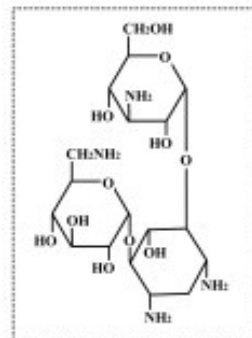
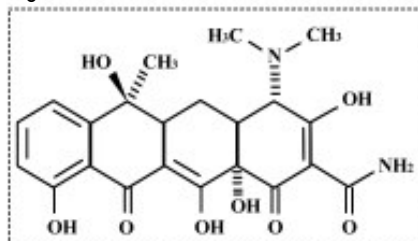


Figura 22. Tetraciclina.



10.2.6. Macrolídeos, lincosamidas e anfenicóis

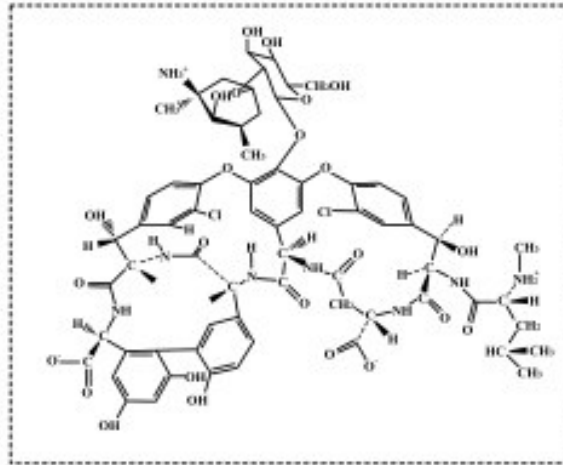
Os macrolídeos são fármacos com estrutura lactônica macrolítica. Sendo a eritromicina o primeiro antimicrobiano a ter aplicação clínica, em indivíduos alérgicos aos β -lactâmicos. A claritromicina, forma metilada da eritromicina (Figura 23), e a azitromicina possuem determinadas características comuns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

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

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

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

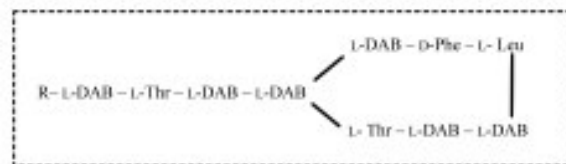
Figura 26. Vancomicina



10.2.8. Polimixinas

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

Figura 27. Polimixina.

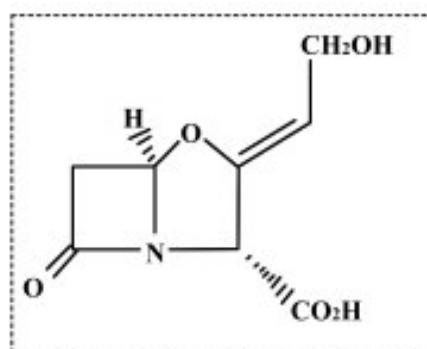


10.2.9. Inibidores da β -lactamase

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

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

Figura 28 – Ácido clavulânico



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



11. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

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

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

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

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

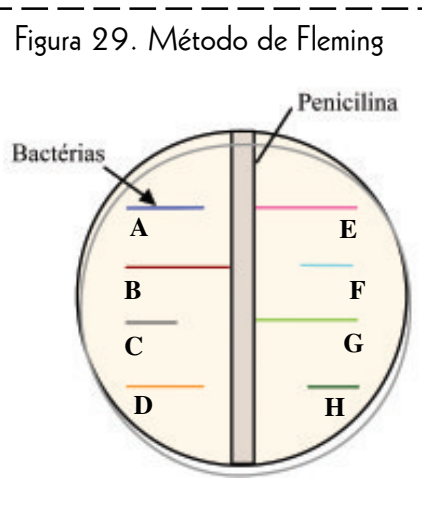
a) Método de Fleming da escavação em valeta (Figura 29)

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

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

b) Foster & Woodruff (1943)

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



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

c) Vicent & Vicent (1944)

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

d) Morely (1945)

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

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

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

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

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

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

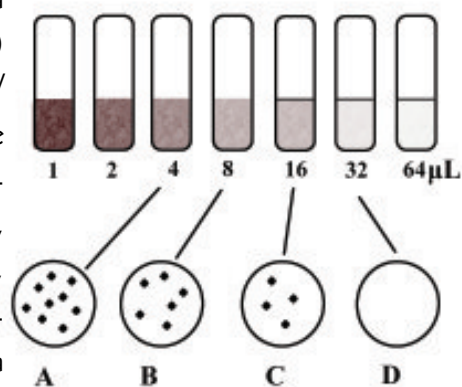
11.1. Provas de sensibilidade por diluição em caldo

11.1.1. Teste da macrodiluição em tubos

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

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

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



Vantagens:

- Determinação de resultado quantitativo, a CIM.

Desvantagens:

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

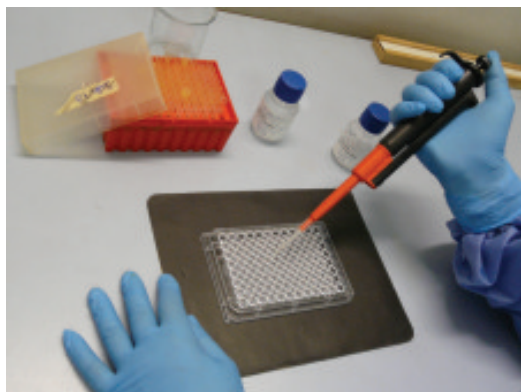
11.1.2. Teste da Microdiluição em caldo

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

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

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

Figura 31. Microdiluição em caldo



Vantagens:

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

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

Desvantagens:

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

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

11.2.1. Método de Anderson

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

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

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

11.2.2. Prova de Bauer-Kirby

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

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

Figura 32. TSA em placa



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

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

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

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

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

Vantagens do método de disco-difusão em ágar:

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

Limitações:

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

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

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

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

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

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

11.2.4. Outros fatores importantes que devem ser considerados

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

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

Método de suspensão direta da colônia:

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

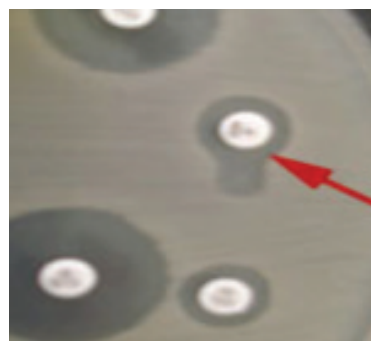
Observação: Para obter o inóculo desejado, incubar o *Trypticase Soy Broth* (TSB) ou o caldo Müller-Hinton $35 \pm 2^\circ\text{C}$ até a turbidez da cultura no caldo atingir 0,5 da escala de McFarland, o que geralmente ocorre entre 2 a 6 horas.

Inoculação da placa

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

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

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



Aplicação dos discos

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

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

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

Incubação das Placas

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

Leitura das placas

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

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

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

Interpretação dos Resultados

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

11.2.6 - E-Test

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

Figura 34. Gradiente de sensibilidade do E-Test.



Vantagens

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

Desvantagens

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

Resultados atípicos

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

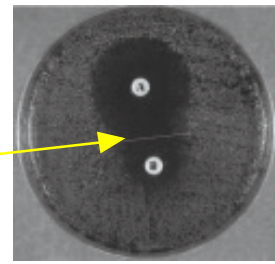
11.3. Combinações de agentes antibacterianos

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

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

Reparem o aumento da espessura do halo

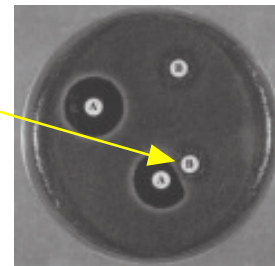
Figura 35. Sinergismo



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

Observem a inibição da sensibilidade próximo ao antimicrobiano B

Figura 36. Antagonismo



11.4. Controle de qualidade dos testes

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

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

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

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

12. Genética bacteriana

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

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

12.1. Genótipo e fenótipo

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

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

12.2. Genes e reprodução

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

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

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

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

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

12.3. Mutações

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

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

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

12.4. Recombinação genética

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13. Mecanismos de patogenicidade e defesa bacteriana

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

13.1. Como se inicia a patogenicidade?

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

Ex.: Micobactérias.

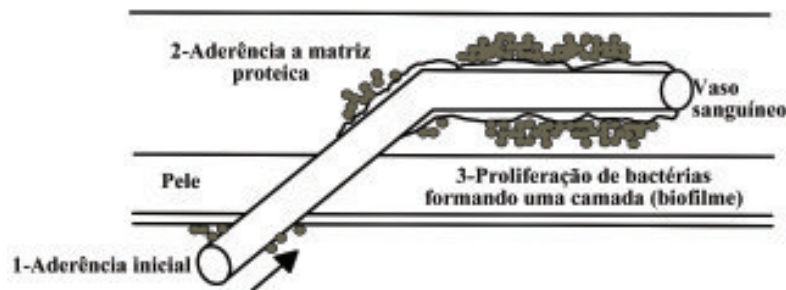
Há algumas bactérias que são específicas, pois infectam um determinado tipo de tecido. O *Streptococcus pneumoniae*, por exemplo, pode habitar a garganta e a nasofaringe, mas quando causa doença, infecta preferencialmente o trato respiratório inferior. A afinidade tecidual pode estar relacionada com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

13.2. Fatores de virulência

13.2.1. Adesão

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

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



13.2.2. Invasão

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

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

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

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

Bactérias intra e extracelulares

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

Sideróforos

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

13.2.3. Toxinas

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

13.2.3.1. Endotoxinas

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

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

13.2.3. Exotoxinas

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

- Grupo I

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

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

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

- Grupo II

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

- Grupo III

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

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

13.2.3.3. Enzimas hidrolíticas

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

14. Microbiota autóctone

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

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

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

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

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

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

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

14.1. Cavidade oral

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

14.2. Nasofaringe

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

14.3. Esôfago

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

14.4. Trato gastrointestinal

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

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

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

14.5. Vagina

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

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

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

14.6. Pele

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

14.7. Conjuntiva

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

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

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

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

15.1. Parâmetros básicos para uma coleta correta

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

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

- Coletar no **momento ideal**

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

- Obter **quantidades suficientes**

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

- Utilizar **dispositivos adequados**

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

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

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

- Rotular (especificar **suspeita**)

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

15.2. Sítios anatômicos

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

15.2.1. Trato respiratório superior

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

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

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

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

15.2.2. Trato respiratório inferior

Escarro e coleta direta das vias respiratórias inferiores:

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

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

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

15.2.3. Trato urinário

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

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

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

15.2.4. Trato genital

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

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

15.2.5. Sangue

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

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

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

15.2.6. Líquido cefalorraquidiano (líquor)

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

15.2.7. Lesões cutâneas

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

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

15.2.8. Olhos e ouvidos

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

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

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

15.2.9. Trato gastrointestinal

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

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

15.3. Transporte da amostra

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

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

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

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

15.4. Processamento da amostra

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

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

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

16. Noções sobre as principais bactérias de importância clínica

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

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

16.1. Cocos Gram-positivos

- *Staphylococcus*

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

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

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

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

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

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

- **Streptococcus**

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

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

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

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

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

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

• **Enterococcus**

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

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

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

16.2. Cocos Gram-negativos

- ***Neisseria***

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

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

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

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

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

16.3. Bastonetes Gram-positivos

- ***Clostridium***

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

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

- *Clostridium botulinum*

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

- *Clostridium tetani*

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

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

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

- *Clostridium perfringens*

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

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

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

- *Clostridium difficile*

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

- *Bacillus*

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

- *Bacillus anthracis*

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

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

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

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

- *Bacillus cereus*

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

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

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

- *Corynebacterium*

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

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

- *Corynebacterium diphtheriae*

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

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

- *Mycobacterium*

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

- *Mycobacterium tuberculosis*

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

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

- *Mycobacterium leprae*

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

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

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

- *Listeria*

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

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

- *Listeria monocytogenes*

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

16.4. Bastonetes Gram-negativos

16.4.1. Entéricos

- *Enterobacteriaceae*

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

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

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

- *Escherichia coli*

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

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

- *Shigella*

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

- *Salmonella*

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

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

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

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

- *Yersinia*

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

• *Yersinia pestis* – Agente etiológico da peste (zoonose). Tem como seu reservatório, roedores silvestres e domésticos. Sua principal via de transmissão ocorre pela picada de pulgas infectadas (peste bubônica), mas também pode ser transmitida pessoa-a-pessoa, via inalação direta de aerossóis de pessoa infectada nos pulmões (peste pneumônica), podendo ou não ter proliferação sistêmica (septicêmica). É um microrganismo considerado de alta letalidade.

• *Yersinia enterocolitica* – Pode causar diferentes doenças no homem, como conjuntivite e osteomielites, mas tem na infecção intestinal sua síndrome mais comum e importante, caracterizada por febre e dor abdominal. Apresenta, algumas vezes, quadro semelhante a apendicite aguda, decorrente de intensa inflamação do íleo terminal e gânglios mesentéricos (enterocolite). Em casos de debilitados, a bactéria pode ter disseminação sistêmica, levando o paciente após a cura da infecção intestinal a artrite e outras complicações.

• *Yersinia pseudotuberculosis* – Embora primariamente considerada um patógeno animal, também pode estar envolvida em infecção intestinal, causando diarreia e linfadenopatia com necrose, podendo levar ao desenvolvimento de nódulos esbranquiçados no fígado, baço e pulmões. A forma septicêmica, embora não muito comum pode levar à morte em até dois dias.

• Outras *Enterobacteriaceae*

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

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

- ***Vibrio***

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

- *Vibrio cholerae*

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

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

- *Vibrio parahaemolyticus*

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

- *Aeromonas*

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

- *Pseudomonas*

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

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

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

- *Burkholderia*

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

- *Campylobacter*

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

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

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

16.4.2. Não entéricos

- *Brucella*

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

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

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

- *Bordetella*

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

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

- *Legionella*

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

- *Helicobacter*

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

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

- *Haemophilus*

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

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

16.5. Espiroquetídios

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

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

- *Leptospira*

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

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

- *Treponema*

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

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

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

- *Borrelia*

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

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

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

16.6. Outras bactérias

- *Mycoplasma e Ureaplasma*

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

Espécies mais importantes para o homem:

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

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

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

- *Rickettsiae*

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

- *Chlamydia*

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

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

17. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas no trato respiratório

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

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

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

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

17.1. Trato Respiratório Superior (TRS)

17.1.1. Faringite e tonsilite

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

Figura 37. Tonsilite bacteriana



As bactérias associadas a essas doenças são:

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

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

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

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

17.1.2. Otite e Sinusite

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

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

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

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

17.2. Trato Respiratório Inferior (TRI)

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

17.2.1. Agudas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

17.2.2. Crônicas

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

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

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

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

18. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas do trato urinário

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

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

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

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

18.1. Patogênese das Infecções do TU

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

• Infecções urinárias não bacterianas

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

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

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

• Infecções urinárias bacterianas

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

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

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

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

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

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

• Características Clínicas e Complicações

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

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

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

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

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

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

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

18.2. Coleta do material

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

Amostra de urina por coleta de jato intermediário

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

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

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

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

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

Amostra de urina por punção suprapúbica

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

Amostra de urina de catéter

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

Amostragens diferentes para determinação de casos especiais:

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

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

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

18.3. Transporte do material

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

18.4. Procedimentos

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

• Testes rápidos

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

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

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

• Urinocultura

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

a) Urinocultura quantitativa

1. Técnica da alça calibrada (Método de Hoeprich)

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

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

2. Técnica das diluições seriadas

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

Semeando-se sempre 0,1 mL de cada diluição em placa de cultura. Pode-se semear em superfície (Drigalski) ou *pour-plate*.

• Meios utilizados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Deteção de bacteriúria significativa**

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

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

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

b) Urinocultura qualitativa

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

19. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas sistêmicas (hemocultura)

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

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

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

19.1. Diluição

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

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

19.2. Meios de cultura

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

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

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

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

19.3. Formação de coágulos

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

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

19.4. Uso de antimicrobianos

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

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

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

19.5. Exames de hemoculturas e subculturas

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

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

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

19.5.1. Interpretação dos resultados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20.1. Podemos dividir a síndrome intestinal em dois grupos:

20.1.1. Síndrome disenteriforme

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

20.1.2. Síndrome coleriforme

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

20.2. Patogenia da diarreia bacteriana

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

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

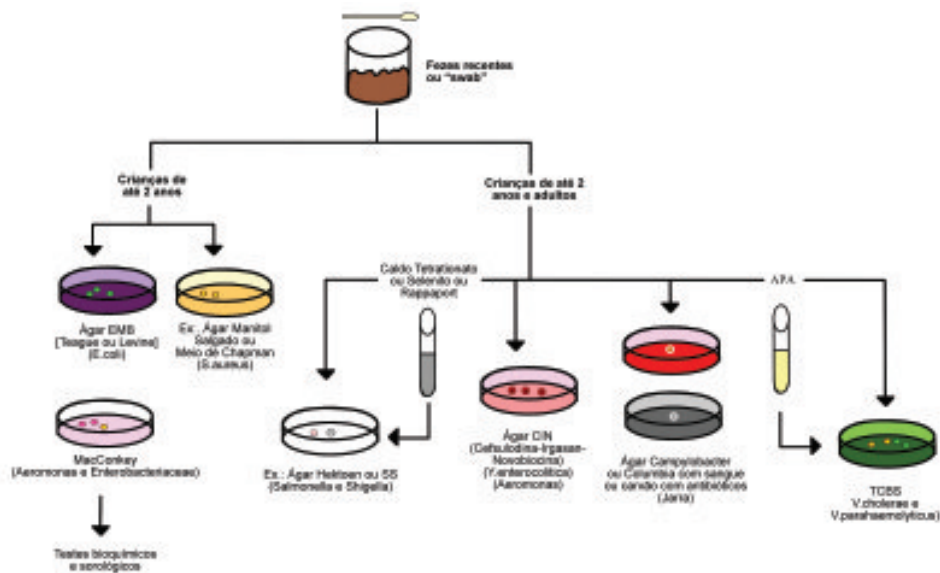
Nas fezes:

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

20.3. Coprocultura

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

Figura 38. Esquema da coprocultura



20.3.1. Diagnóstico bioquímico

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

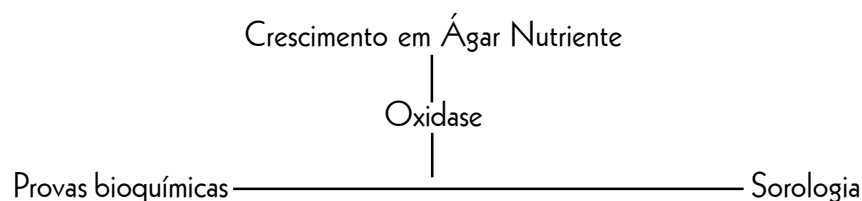
Como uma possibilidade de confirmação do comportamento bioquímico do microrganismo, efetua-se a investigação sobre a classificação sorológica do mesmo.

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

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

Principais provas bioquímicas

- Prova de oxidase



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Reativo de Braun & Silberstein (1940):

p-dimetilaminobenzaldeído 5,0 g

Metanol 50,0 mL

Ácido ortofosfórico 10,0 mL

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

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

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

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

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

Indicador de VM:

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

Álcool etílico 95° 300 mL

H₂O destilada 200 mL

Gotejar no cultivo bacteriano: Resultado positivo - cor vermelha.

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

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

• Degradação do Citrato (ágar citrato seg. Simmons)

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

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

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

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

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

- Degradação do malonato (caldo malonato-fenilalanina)

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

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

- Desaminação da fenilalanina (caldo malonato-fenilalanina)

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

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

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

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

21. Diagnóstico laboratorial nas infecções bacterianas do sistema nervoso central

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

21.1. Membranas que revestem o SNC

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

21.2. Invasão do SNC

- **Via corrente sanguínea**

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

- **Via nervos periféricos**

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

21.3. Meningite asséptica e bacteriana

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

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

21.3.1. Principais agentes etiológicos bacterianos associados às meningites

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

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

21.4. Diagnóstico laboratorial

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

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

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

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

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

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

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

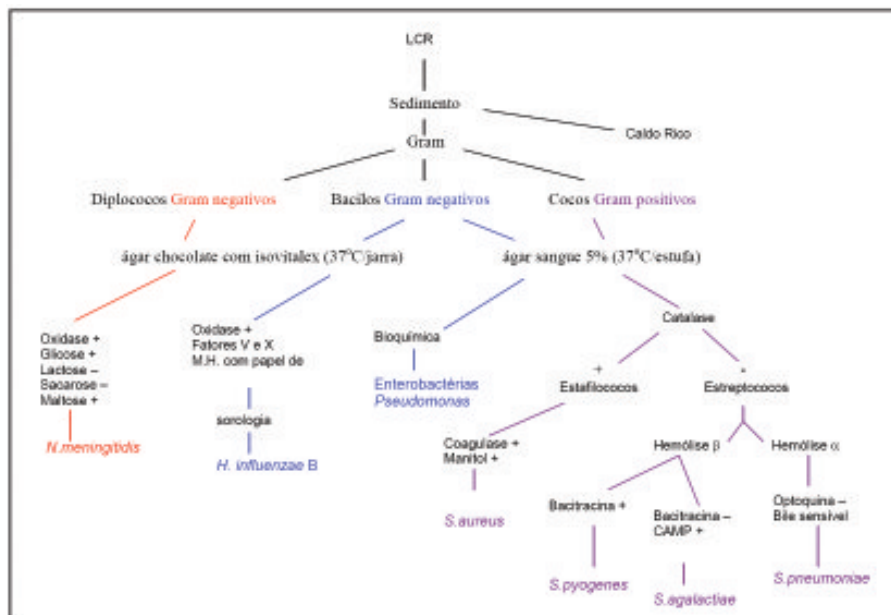
Pode-se também detectar antígenos no líquido com látex (aglutinação macroscópica).

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

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

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

Figura 39. Esquema de identificação das bactérias no líquido



22. Cultura bacteriana de secreções orgânicas

22.1. DST's

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

22.1.1. Coleta de amostras para diagnóstico de DST

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

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

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

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

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

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

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

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

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

22.1.2. Teste de escolha para o diagnóstico da uretrite gonocócica

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

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

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

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

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

22.1.4. Semeadura e armazenamento das amostras

22.1.4.1. Suspeitas de *N.gonorrhoeae* para cultura

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

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

22.1.4.2. Suspeitas de outros agentes para cultura

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

22.2. Outras secreções e líquidos biológicos

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

22.2.1. *Staphylococcus*

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

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

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

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

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

Exame bacteriológico

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

- Prova da catalase

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

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

GÊNEROS	CATALASE
Streptococos	-
Estafilococos	+

- Prova do manitol

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

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

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

- Prova de coagulase

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

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

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

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

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

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

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

- Prova DNase

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

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

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

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

Sensibilidade a discos impregnados com Novobiocina e Polimixina B:

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

Resumo:

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

22.2.2. Streptococcus

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

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

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

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

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

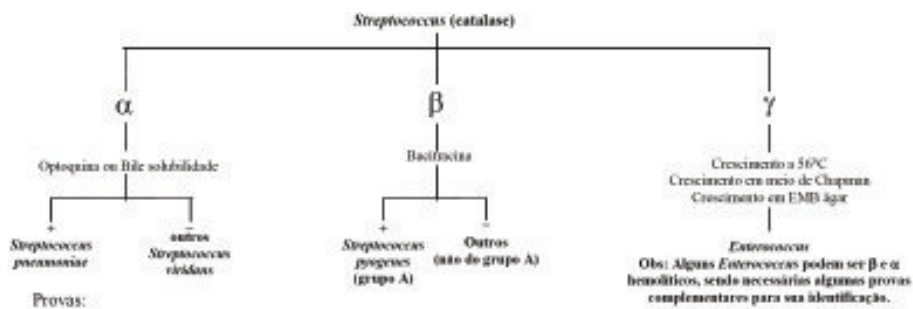
Os estreptococos gama não produzem hemólise e a espécie associada à patogenia humana foi para o gênero *Enterococcus* (*Streptococcus faecalis*).

- **Cultura (*Pour Plate*)**

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

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

Leitura: observação do tipo de hemólise em ágar sangue:



Provas:

A. Optoquina

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

B. Solubilidade da bile em caldo

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

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

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

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

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

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

C. Bacitracina

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

Interpretação - Grupo A - sensível a bacitracina.

Demais grupos – Resistentes.

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

D. Crescimento a 56°C

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

E. Crescimento em meio de Chapman

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

F. Crescimento em ágar EMB

Os enterococos crescem na presença do corante azul de metileno.

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

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

23. Apêndice

A. Método de Giemsa

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

- Diluição do corante:

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

B. Meio de Loewenstein-Jensen

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

Componentes:

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

Solução de verde de malaquita à 2% - Fórmula:

Verde de malaquita2 g
Água destilada100 mL

Preparo da solução de verde de malaquita:

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

Preparo do meio:

- a) Dissolver os sais e a asparagina na água (dissolver aquecendo lentamente);
- b) Juntar os outros componentes, menos os ovos e o verde de malaquita, e autoclavar a 120°C por 30 minutos.
- c) Resfriar a base à 45 - 50°C.
- d) Tomar 2 dúzias de ovos frescos, lavar bem com água e sabão, escovando cada ovo individualmente com uma escova macia, e imergir durante 30 minutos em álcool etílico a 70°. Secá-los com pano estéril.
- e) Quebrar os ovos semiassepticamente em frasco estéril, transferindo-os para uma proveta estéril de 1000 mL até completar o volume.
- f) Agitar para homogeneizar (poderá utilizar liquidificador estéril ou balão estéril com pérolas de vidro).
- g) Filtrar em quatro camadas de gaze passando para o balão que contém a base fria.
- h) Adicionar o verde de malaquita.
- i) Homogeneizar bem.
- j) Deixar repousar durante 30 minutos para as bolhas da superfície estourarem.

- k) Distribuir 10 a 12 ml por tubo de rosca estéril.
- l) Colocar os tubos no coagulador, inclinados (ângulo de 45°), durante 50 minutos a 85°C - se não tiver coagulador, pode-se coagular os ovos em banho de areia à 85°C colocado em estufa de esterilização, também por 50 minutos, tendo o cuidado de verificar a temperatura constantemente. Pode-se também usar o forno a 85 °C ou mesmo em autoclave fechada, sem expulsão do ar (verificar temperatura).
- m) Incubar por 48h a 36°C (teste de esterilidade), proteger contra a evaporação e conservar em geladeira. Usar, no máximo, até um mês após o preparo.

C - Hidrólise do hipurato

Verifica a capacidade do microrganismo de hidrolisar o hipurato de sódio em glicina e ácido benzoico. Pode ser utilizado para diferenciar distintos microrganismos como estreptococos do grupo B (*S.agalactiae*) ou mesmo espécies termofílicas de *Campylobacter* (*C.jejuni* + e *C.coli* -).

O microrganismo é semeado em caldo com o hipurato de sódio e incubado por 18 a 24h a 35°C. Após este período o caldo é centrifugado e no sobrenadante (0,8 mL) é adicionado 0,2 mL de cloreto férrico (FeCl) formando um precipitado abundante que, se perdurar por mais de 10 minutos, evidencia a presença do ácido benzoico (prova do hipurato positiva). Outra alternativa é usar o reagente de ninhidrina que detecta a glicina livre. Neste caso há a formação de coloração azul-escura.

No caso de *Campylobacter*, suas exigências de crescimento dificultam a incubação descrita, então uma massa de células proveniente de crescimento anterior é acrescentada ao caldo hipurato para realização da prova.

D- Métodos de teste de sensibilidade aos antimicrobianos para anaeróbios sugerido pelo CLSI

Método de diluição em ágar:

- Escolher o antimicrobiano a ser testado.
- Diferentes concentrações dos antimicrobianos são misturadas ao ágar Wilkins-Chalgren, o qual é fundido e vertido em placas de Petri.
- Até 36 isolados são testados para cada placa por inoculação pontual (repicador de Steers ou similar).
- Após 48h em jarra hermética tipo GasPak ou câmara de anaerobiose, faz-se a leitura (determina a CIM).
- Este método, apesar de muito funcional, é complicado para *Clostridium* sp. que apresentam crescimento disseminado.

Método de diluição em caldo em microtubos (DM)

- A CIM dos diferentes antimicrobianos é determinada em placas de microtitulação.
- Os meios de escolha de acordo com o CLSI são o caldo BHI, o caldo de Schaedler modificado e o de Wilkins-Chalgren (WC) – Já outros órgãos padronizadores, como o IUMC, sugerem Difco Anaerobe Broth.
- O meio com as diferentes concentrações dos antimicrobianos (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL) é distribuído em placa de microtitulação - 0,1 mL para cada uma das 96 cubetas da placa com pipeta semiautomática. Estas placas poderão se armazenadas em plásticos e congeladas em freezer a -70°C, de 4 a 6 meses.
- No momento da utilização, descongela-se a placa em temperatura ambiente e adiciona-se o cultivo ativo (18 a 24hs) em caldo Schaedler, diluído 1:100 – incuba-se por 48hs em anaerobiose.

Podemos, então, ler a CIM (menor concentração que inibe completamente o crescimento), que corresponde à cubeta límpida.



Tabela de percentuais de positividade, para diferenciação bioquímica, simplificada das principais *Enterobacteriaceae* estudadas na clínica

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Shigella</i> , grupos A, B, C		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Escherichia coli</i> tardia		<i>Salmonella</i> Typhi		<i>Salmonella</i> Choleraesuis		<i>Salmonella</i> Larthagens subg. IIIa		<i>Salmonella</i> Larthagens subg. IIIb		<i>Citrobacter</i>		<i>Clebsiella</i>		<i>Enterobacter</i>					<i>Pantoea agglomerans</i>		<i>Hafnia alvei</i>		<i>Serratia</i>		<i>Proteus</i>		<i>Morganella morganii</i>		<i>Providencia</i>		<i>Yersinia</i>	
	Indol	Vermelho de metila	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	H ₂ S (TSI)	Urease	KCN	Motilidade (36°C)	Gelatina (22°C)	Lisina-Desaminase	Arginina-Dihidrolase	Omitina-Desaminase	Fenilalanina-Desaminase	Malonato	Gás de Glicose	Lactose	Sacarose	D-Manitol	Dulcitol	Salicina	Adonitol	Mio-Inositol	D-Sorbitol	L-Arabinose	Rafinose	L-Raminose	Esculina	DNase (25°C)	Indol	marcescens	liposolvens	rubridaca	mirabilis	vulgaris	retigeri	stuartii	alcalifaciens	enterocolitica	pestis
Indol	98	50	0	99	0	0	2	0	33	99	100	0	99	0	0	0	11	20	0	1	1	0	2	98	98	99	98	99	99	99	50	0	0						
Vermelho de metila	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10	20	5	5	5	5	50	40	20	93	20	97	95	97	93	100	99	97	80	100								
Voges-Proskauer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	95	98	100	100	70	85	98	93	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0									
Citrato de Simmons	1	0	0	1	25	25	99	98	78	99	95	98	95	95	100	99	99	50	10	98	90	95	65	15	0	95	93	98	0	0									
H ₂ S (TSI)	1	0	0	100	50	50	99	100	78	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
Urease	1	0	0	0	0	0	0	2	44	75	85	95	90	2	65	93	1	20	4	15	3	2	98	95	98	98	30	0	75	5	95								
KCN	3	0	0	0	0	0	1	95	89	0	99	98	97	98	98	0	99	65	95	95	90	25	98	99	98	97	100	100	2	0	0								
Motilidade (36°C)	95	0	0	98	95	95	99	99	89	95	95	0	0	97	95	90	96	85	85	97	95	85	95	95	95	94	85	96	2	0	0								
Gelatina (22°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	89	0	99	0	0	0	0	0	0	2	0	90	90	90	91	0	0	0	0	0	0	0	0								
Lisina-Desaminase	90	0	0	100	95	95	99	100	0	0	0	98	99	98	0	90	0	100	99	95	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
Arginina-Dihidrolase	17	5	2	0	55	55	70	70	65	80	85	0	0	0	97	0	99	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
Omitina-Desaminase	65	1	98	100	100	100	99	100	0	99	95	0	0	98	96	100	91	0	98	99	95	0	99	0	98	0	0	1	95	0	0								
Fenilalanina-Desaminase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	50	20	0	0	0	0	98	99	95	98	95	98	0	0	0								
Malonato	0	0	0	0	0	0	95	0	11	95	1	95	98	95	55	96	18	65	50	3	2	94	2	0	1	0	0	0	0	0									
Gás de Glicose	95	2	0	100	95	95	85	0	89	98	97	97	97	100	100	98	98	20	98	55	75	30	96	85	90	10	0	85	5	0	0								
Lactose	95	0	2	0	0	0	85	0	78	50	35	98	100	95	93	55	99	40	5	2	10	100	2	2	1	5	2	0	5	0	0								
Sacarose	50	0	1	0	0	0	5	0	89	40	9	99	100	100	97	98	100	75	10	99	98	99	15	97	0	15	50	15	95	0	0								
D-Manitol	98	93	99	0	98	98	100	98	100	99	100	99	99	100	100	99	100	99	99	100	100	0	0	0	0	100	10	2	98	97	100								
Dulcitol	60	2	0	0	5	5	1	0	11	40	1	30	55	5	15	0	5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Salicina	40	0	0	0	0	0	0	60	0	15	30	99	100	100	75	99	99	65	13	95	97	99	0	50	0	50	2	1	20	70	25								
Adonitol	5	0	0	0	0	0	0	0	0	98	0	90	99	98	25	0	0	7	0	40	5	99	0	0	0	100	5	98	0	0	0								
Mio-Inositol	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	95	98	95	15	0	75	15	0	75	60	20	0	0	0	90	95	1	30	0	0								
D-Sorbitol	94	30	2	0	90	90	99	99	100	99	99	99	99	100	95	0	0	30	0	99	95	1	0	0	0	1	1	1	99	50	0								
L-Arabinose	99	60	95	9	0	0	99	99	100	100	99	99	98	100	100	99	100	95	95	0	98	100	0	0	0	0	1	1	98	100	50								
Rafinose	50	50	3	0	1	1	1	1	44	0	5	99	100	96	97	97	99	30	2	2	85	99	1	1	0	5	7	1	5	0	15								
L-Raminose	80	5	75	0	100	100	99	99	99	100	99	99	100	99	92	99	100	85	97	0	15	1	1	5	0	70	0	0	1	1	70								
Esculina	35	0	0	0	0	0	1	1	0	1	5	99	100	98	30	97	100	60	7	95	97	94	0	50	0	35	0	0	25	50	95								
DNase (25°C)	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	85	99	50	80	0	0	10	0	5	0	0								

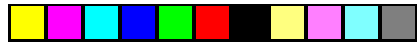
Obs.: *Shigella* grupo A, B, C diferenciação: Grupo A: manitol (-), Grupo B e C: manitol (+). A diferenciação final é sorológica.
 Obs.: Para identificação completa de *Salmonella* e *Escheria coli*, deverá ser realizada sorologia complementar.
 (Tabela de Farmer *et al.*, 1985, atualizada com informações contidas em Koneman, 2001 e Jawetz *et al.*, 2009.)



Referências bibliográficas

- ANDERSON, K. F. *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* Atlanta, v. 45, p. 2723-2725, 2007.
- BATISTA, R. S. ; GOMES, A. P. *Antimicrobianos - Guia Prático*. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2005. 330 p.
- BELL, J. M. *et al.* Prevalence and significance of a negative extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmation test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Results from the Sentry Asia-Pacific surveillance program, *J. Clin. Microbiol.* v. 45, p. 1478-1482, 2007.
- BIER, O. *Microbiologia e Imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1234 p.
- CARDOSO, W. M. ; SILVA, G. G. *Microbiologia em Análises Clínicas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Merck, 1989. 79 p.
- CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. 7. ed. Pennsylvania: CLSI approved standard M7-A7, 2006.
- _____. *Performance standards for antimicrobial disk tests*. 9. ed. Pennsylvania: CLSI approved standard M2-A9, 2006.
- _____. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement*. Pennsylvania: CLSI document M100-S18, 2006.
- DAVIS, B. D. ; DULBECCO, R. *Microbiologia de Davis – Fisiologia e Genética Bacterianas*. Vol I. 2ª ed., São Paulo: Harbra do Brasil, 1979. 421 p.
- DAVIS, B. D. ; DULBECCO, R. *Microbiologia de Davis – Infecções Bacterianas e Micóticas*. Vol III. 2. ed. São Paulo: Harbra do Brasil. p. 759, 1979. 1219 p.
- FARMER, J. J. I. I. I. ; DAVIS, B. R. ; HICKMAN-BRENNER, F. W. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated clinical specimens. *American: Journal of Clinical Microbiology*, v. 21: p. 46-76, 1985.
- FERREIRA, A. W. ; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e autoimunes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.
- GILMAN A. G. ; GOODMAN, L. S. ; RALL, T. W; MURAD, F. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10. edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002. 1647 p.
- HARVEY, R. A; CHAMPE, P. C. *Farmacologia Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 478 p.
- JAWETZ, E. ; MELNICK, J. L. ; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 24. ed., McGraw-Hill Medical. 2009. 820p.

- KONEMAN, E. W. *et al.* *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.
- LIVERMORE, D. M. ; WINSTANLEY, T. G. ; SHANNON, K. P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *London J Antimicrob Chemother.* v. 48(supl.1). p. 87-102, 2001.
- MIMS, C. *et al.* *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Medicina Brasil, 2005. 728 p.
- MURRAY, PR. *et al.* *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 992 p.
- NORDMANN, P. ; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Paris. *Clin Microbiol Infect Dis.* v. 8. p. 321-331, 2002.
- OPAS, ANVISA, REDE RM, CGLAB/SVS/MS. *Medidas de prevenção e controle da resistência microbiana e programa de uso racional de antimicrobianos em serviços de saúde*. São Paulo: Disciplina de Infectologia da UNIFESP, 2007.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* *Procedimentos básicos em Microbiologia clínica*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340p.
- PELCZAR, M. ; CHAN, E. C. S. ; KRIEG N. R. *Microbiologia*. Vol I. Rio de Janeiro: Makron Books (Grupo Pearson). 2. ed, 2005. 524 p.
- _____. *Microbiologia*. Vol II. Rio de Janeiro: Makron Books (Grupo Pearson). 2. ed, 2005. 517 p.
- PICÃO, RC. *et al.* Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-or VIM-producing isolates. São Paulo. *J Clin Microbiol*; v.46, 2028-2037, 2008.
- ROSSI, F. ; ANDREAZZI, D. B. *Interpretando o antibiograma*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 118p.
- SCHAECHTER, M. *et al.* *Microbiologia - Mecanismos das Doenças Infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 642 p.
- TINDALL, B. J. *et al.* Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. Germany. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 55, p. 521-524, 2005.
- TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.
- TRABULSI, L. R. ; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51:221-271, 1987.
- WOESE, C. ; KANDLER, O. ; WHEELIS, M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci ,USA*, v. 87, n. 12, p. 4576-9,1990.





Capítulo 4

Micologia

Aurea Maria Lage de Moraes

Rodrigo de Almeida Paes

Verônica Leite de Holanda

1. Introdução à micologia

Os fungos são organismos que convivem conosco todos os dias. Estes organismos são encontrados praticamente em qualquer local do ambiente que nos cerca, inclusive no ar, onde estruturas reprodutivas, na forma de esporos ou conídios, estão prontas para, ao cair em um substrato adequado, desenvolver novas estruturas vegetativas e reprodutivas.

Estes organismos, muitas vezes, nos são úteis, decompondo resíduos orgânicos, causando a decomposição ou a degradação de alimentos, ou mesmo atacando seres vivos, parasitando-os e, eventualmente, causando a sua morte.

Os fungos são importantes, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Ecologicamente, são considerados os lixeiros do mundo, pois degradam todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas. Já, economicamente, têm implicações em várias áreas: Medicina humana e veterinária, Farmácia, Nutrição, Fitopatologia, Agricultura, Biotecnologia, entre outras.

Os fungos tiveram seu grupo reconhecido como um reino a partir da descrição de cinco reinos por Whittaker em 1969. Esses organismos foram alocados em reinos com base na morfologia e no modo de nutrição dos seres vivos, sendo criado, então, o reino Fungi. Em 1990, Carl Woese propôs o agrupamento dos cinco reinos estabelecidos por Whittaker em três domínios: *Archaea*, *Eubacteria* e *Eukaria*, onde o reino Fungi faz parte do domínio Eukaria, que reúne todos os eucariontes.

A Micologia é, portanto, a área da Biologia destinada ao estudo dos fungos.

1.1. Elementos fundamentais dos fungos e Citologia

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e α -glucano. Não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos.

Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos **esporos** (reprodução sexuada) ou **conídios** (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfologicamente semelhantes a estas.

Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos. Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada **micélio**, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos. Os filamentos simples ou ramificados que formam o micélio são denominados **hifas**. Na maioria dos casos, o sistema vegetativo encontra-se no interior dos tecidos parasitados, no solo ou na matéria orgânica em decomposição.

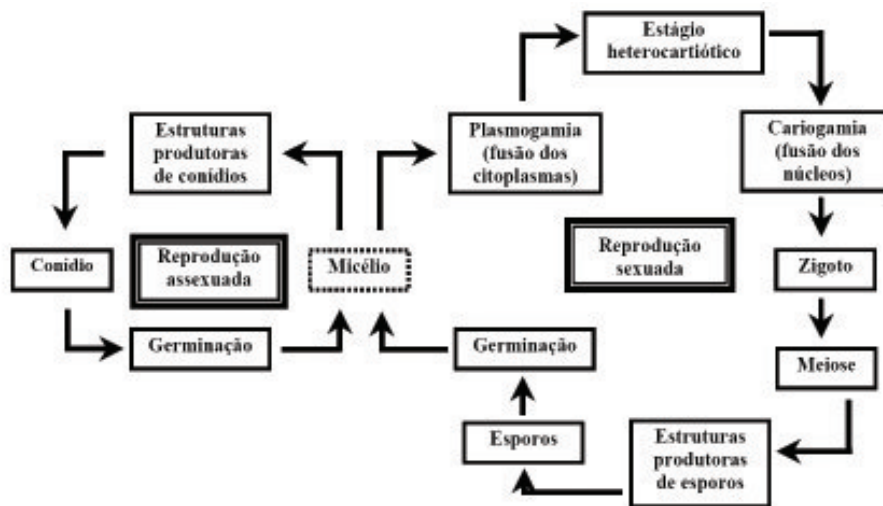
Com a formação dos esporos ou conídios é necessário que estes tenham acesso livre ao ar, para assegurar sua disseminação. Realiza-se, então, uma diferenciação das hifas vegetativas, geralmente levantadas verticalmente sobre o plano do micélio, conhecido como **esporóforo** ou **conidióforo**, e sobre estes se originam os esporos ou conídios. As hifas, por sua vez, podem ser apocíticas (com septo) ou cenocíticas (sem septo).

O ciclo de vida dos fungos compreende duas fases. Uma somática, caracterizada por atividades alimentares, e outra reprodutiva, onde os fungos podem realizar reprodução sexuada ou assexuada. Em ambos os casos, um grande número de estruturas é formado, dependendo da espécie. As estruturas assexuadas, como também as sexuadas, podem ser formadas isoladamente ou em grupos, neste caso, formando corpos de frutificação. Assim, conídios podem ser formados em conidióforos isolados ou agrupados, constituindo então os **conidiomas**. Os esporos podem ser formados em ascas (onde são formados os ascos) ou basidiomas (onde são formados os basídios).

De acordo com tipo de reprodução realizada, os fungos podem ser divididos em três grupos:

- **Holomorfo**: aquele que no ciclo de vida realiza ambas as reproduções, sexuada e assexuada.
- **Anamorfo**: aquele que no ciclo de vida realiza apenas a reprodução assexuada.
- **Teleomorfo**: aquele que no ciclo de vida realiza apenas a reprodução sexuada.

Esquema do ciclo de vida geral do fungo.



1.2. Nutrição, metabolismo e *habitat*

Os fungos são considerados seres heterotróficos, necessitando de materiais orgânicos já formados, que servem como fonte de energia e como constituintes celulares. Por causa da rigidez da parede celular, sua nutrição é por absorção de nutrientes solúveis simples. Realizam respiração celular ou fermentação para obtenção de energia, e sua reserva energética é sob a forma de glicogênio.

Devido à ausência de clorofila nos fungos, torna-se necessário que o substrato forneça as substâncias já elaboradas indispensáveis à alimentação, obrigando os fungos a viverem em estado de saprofitismo, parasitismo, simbiose (líquens, por exemplo) ou mutualismo. Eles podem ser subdivididos em:

- Saprófitas obrigatórios – Fungos que vivem exclusivamente em matéria orgânica morta, não podendo parasitar organismos vivos.
- Parasitas facultativos ou saprófitas facultativos – Fungos capazes de causar doenças ou de viver em restos orgânicos, de acordo com as circunstâncias.

- Parasitas obrigatórios – Fungos que vivem exclusivamente atacando organismos vivos.

Os fungos são considerados seres cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta. Sendo amplamente distribuídos pela natureza, são encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e industriais.

A maioria dos fungos têm como necessidades nutricionais, os elementos C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe e Zn. Muitas espécies não necessitam de luz para seu desenvolvimento, já outras necessitam para formar suas estruturas de reprodução, podendo ser consideradas fototróficas (que buscam a luz). A temperatura ideal para o crescimento dos fungos fica entre 0 a 35°C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 a 30°C e a umidade ideal fica em torno da saturação.

1.3. Posição sistemática dos fungos

O reino Fungi é dividido em sete filos, (Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporídia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota), e um grupo, os fungos anamórficos. Este grupo não possui valor taxonômico, sendo seus membros relacionados aos filos Ascomycota e Basidiomycota.

A taxonomia dos fungos é tradicionalmente baseada em caracteres citológicos e morfológicos. Mas, atualmente, com o desenvolvimento de técnicas bioquímicas e moleculares, novos caracteres foram adicionados como auxílio na identificação das espécies fúngicas. Tais como as técnicas baseadas em PCR (RAPD, RFLP, AFLP), sequenciamento de DNA, isoenzimas e cromatografia (TLC, HPLC, CG, espectrometria de massa).

1.3.1. Filo Chytridiomycota

Os representantes do filo Chytridiomycota são considerados cosmopolitas e saprófitos aquáticos. A maioria é de água doce poucos são marinhos. A principal característica do grupo é a formação de zoósporo flagelado, estruturas de propagação no ambiente aquático, onde o flagelo ajuda na sua movimentação.

Ex: *Chytriumyces* sp.

1.3.2. Filo Neocallimastigomycota

São encontrados no sistema digestivo dos grandes mamíferos herbívoros e possivelmente em outros ambientes anaeróbios terrestres e aquáticos. Tratam-se de zoósporos não flagelados.

Ex: *Neocallimastix* sp.

1.3.3. Filo Blastocladiomycota

Seus representantes apresentam reprodução assexuada com zoósporo de um único flagelo, e reprodução sexuada através da fusão de planogametas. São habitantes restritos de água e solo e parasitos de insetos.

Ex: *Allomyces* sp. e *Coelomomyces* sp.

1.3.4. Filo Microsporídia

Organismos eucariontes sem mitocôndria e flagelo desconhecido. São parasitas obrigatórios de animais, e comumente atacam peixes e insetos. Estes organismos foram incluídos no reino Fungi após estudos filogenéticos.

1.3.5. Filo Glomeromycota

O filo Glomeromycota é representado por fungos de micorrizas arbusculares (FMA). Participam de uma associação mutualística com as raízes

de algumas plantas, na qual a planta, através da fotossíntese, fornece energia e carbono para a sobrevivência e multiplicação do fungo, enquanto este absorve nutrientes, minerais e água do solo transferindo-os para as raízes da planta. Também são considerados cosmopolitas. Foi incluído neste grupo os representantes do antigo filo Zygomycota, que tem como principais características, hifas cenocíticas e a formação de zigosporângio, por reprodução sexuada; e esporângio, por reprodução assexuada. Os esporângios são estruturas formadoras de propágulos para dispersão.

Ex: *Mucor* sp. e *Glomus* sp.

1.3.6. Filo Ascomycota

O filo Ascomycota compreende o maior grupo do reino Fungi, constituído de aproximadamente 75% de todos os fungos descritos. Seus representantes são considerados cosmopolitas e são encontrados na natureza como saprófitos, parasitas (especialmente de plantas), ou em associação mutualística (com algas unicelulares) formando os líquens.

A principal característica do grupo é a presença de asco contendo ascosporos, geralmente oito, que representam a estrutura de propagação do grupo. São produzidos por reprodução sexuada.

A reprodução assexuada também pode ser encontrada. O asco é formado em uma estrutura denominada ascocarpo (corpo de frutificação), que pode ser encontrado nas seguintes formas: apotécio (ascocarpo em forma de taça), cleistotécio (ascocarpo totalmente fechado, que se rompe com a maturidade), e peritécio (ascocarpo em forma de balão, com um poro na sua ponta). A ausência da formação de ascocarpo também é observada, sendo este considerado como ascos nus.

Ex: *Eurotium* sp. e *Emericella* sp.

1.3.7. Filo Basidiomycota

Os representantes do filo Basidiomycota são considerados cosmopolitas e saprófitos. São comumente denominados “cogumelos”. Têm como principal característica a presença de basídio contendo basidiosporos, geralmente quatro, produzidos por reprodução sexuada.

A reprodução assexuada também pode ser encontrada. O basídio é formado a partir de um basidiocarpo, sendo este constituído, basicamente, por píleo (o chapéu do cogumelo), lamela (estrutura pregueada abaixo do píleo, onde se encontram os basídios) e estirpe (estrutura que sustenta o píleo).

Ex: *Agaricus* sp. e *Rhodotorula* sp.

1.3.8. Fungos Anamórficos

Os Fungos Anamórficos formam um grupo de fungos onde a reprodução assexuada é predominante, com a formação de conídios como estrutura de propagação.

A reprodução sexuada é ausente, desconhecida ou teve a capacidade perdida. Esse grupo está relacionado a gêneros do filo Ascomycota e Basidiomycota por comparação de sequências gênicas. São considerados como cosmopolitas, saprófitos, e parasitas de animais e plantas.

Os conídios são formados por células conidiogênicas, presentes nos conidióforos, que são prolongamentos de hifas modificadas, com função reprodutiva. Os conídios podem ter diferentes formas, tamanhos e cores, podem possuir ou não a superfície texturizada, ornamento ou septo.

Ex: *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp.

2. Por que estudamos os fungos

Os fungos são conhecidos da humanidade há vários séculos, tanto por seus benefícios quanto pelos problemas que causam. Muitas doenças huma-

nas, de animais e plantas (micoses) são causadas por fungos. Em humanos e animais os fungos podem causar alergias respiratórias e cutâneas leves ou intensas, dependendo da suscetibilidade e pré-disposição do indivíduo. Podem causar infecções em mucosas e outros tecidos subcutâneos, assim como infecções crônicas e letais envolvendo órgãos inteiros. Cada tecido ou órgão do corpo humano pode ser afetado, com exceção dos dentes.

Nós dependemos da agricultura para nos fornecer alimentos, principalmente os grãos de cereais (milho, trigo, aveia, amendoim, etc.) que alimentam tanto os humanos quanto os animais. Doenças fúngicas em cereais causam perdas significantes na agricultura, tanto para o consumo interno quanto para a exportação de grãos – atividade tão importante em nossa economia. Além disso, o ataque dos fungos não se restringe ao campo de produção, eles atacam também os grãos estocados causando sua destruição ou produzindo toxinas carcinogênicas potentes (micotoxinas) dentro destes grãos.

Os fungos têm sido utilizados para os mais diferentes propósitos, desde a antiguidade. O uso mais antigo deles tem sido como alimento, propriamente dito, tendo sido utilizado mais tarde também na indústria alimentícia para a produção de pães, queijos, cervejas e vinhos. O sabor e a textura de muitos alimentos, como os queijos e o molho de soja, são dados pelos fungos usados em sua fabricação. Posteriormente, foi descoberto o poder dos fungos na produção de metabólitos que poderiam ser úteis, como a Penicilina.

Estudos em Biotecnologia e Engenharia genética propiciaram a produção destes metabólitos em larga escala. Hoje produtos fúngicos usados comercialmente incluem ácidos orgânicos, etanol, alguns antibióticos (além da Penicilina), pigmentos, vitaminas, enzimas e pesticidas biológicos. Além de se tornarem valiosos objetos de pesquisa, em particular, como modelos eucariontes, uma vez que são facilmente manipulados em laboratório, fornecendo informações importantes sobre a bioquímica, a genética e a biologia molecular dos eucariontes.

3. Micologia Médica

A Micologia médica tem como principal objetivo estabelecer o diagnóstico micológico das infecções por fungos, que por sua vez se baseia em correta coleta e processamento de espécimes clínicos. A observação das normas de preservação, e transporte adequados dos materiais clínicos até os locais de processamento, como laboratório de Microbiologia/Micologia também tem enorme importância para a obtenção de resultados acurados.

3.1. Classificação das micoses

Didaticamente, podemos dividir as micoses em grupos, como demonstrado a seguir:

3.1.1. Micoses superficiais e cutâneas

As MICOSES SUPERFICIAIS são infecções causadas por fungos que invadem as camadas mais superficiais da capa córnea da pele ou a haste livre dos pelos. As lesões se manifestam como mancha pigmentar na pele, nódulo ou pelos. A forma invasiva do fungo é uma hifa, característica de cada micose.

A **pedra negra** é uma micose causada pela *Piedraia hortae*. Esta micose consiste em nódulos duros, de cor escura, localizados na haste dos pelos e bastante aderentes a eles. Em parasitismo, o fungo se apresenta como um emaranhado de hifas intimamente unidas. Essas hifas são de cor castanha e têm parede e septos espessos. Os nódulos constituem, na verdade, um ascostroma, pois em meio ao enovelado de hifas formam-se lóculos ovalados contendo oito ascósporos. Já a **pedra branca** é causada por leveduras do gênero *Trichosporon*. Nesta infecção o fungo cresce sobre a haste dos pelos, formando nódulos de hifas hialinas septadas e ramificadas, facilmente destacáveis dos

pelos, que podem se desarticular, resultando em artroconídios retangulares que se tornam esferóides ou poliédricos.

Leveduras do gênero *Malassezia* são os agentes da **pitíriase versicolor**. Esses fungos vivem normalmente sobre a pele do homem, na forma de levedura. Usualmente podem filamentar e invadir as células queratinizadas das camadas superficiais da pele, determinando a micose. A doença se manifesta como manchas descamativas distribuídas pelo tórax, abdome e membros superiores. Ao contrário do que muitos pensam, a micose não é adquirida na praia; o que ocorre é que quando o doente se bronzeia, os locais da pele onde o fungo está em parasitismo não se queimam, permitindo que as lesões possam ser visualizadas com maior facilidade. O diagnóstico definitivo se dá somente pelo exame direto através da observação de hifas curtas e curvas e elementos redondos. A *Malassezia* não cresce nos meios de cultura habituais usados na rotina porque necessita de suplemento lipídico para seu crescimento.

As **MICOSES CUTÂNEAS** se caracterizam por serem causadas por fungos que invadem toda a espessura da capa córnea da pele ou a parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal. Na pele, as lesões se manifestam como mancha inflamatória, nos pelos como lesão de tonsura e na unha por destruição da lâmina ungueal. O contágio é feito através de animais, homens ou de solo infectado.

As **dermatofitoses** constituem manifestações clínicas muito variadas causadas por um grupo de fungos, denominados dermatófitos, que produzem lesões na pele, pelos ou unhas. Os fungos dermatófitos degradam queratina e pertencem aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Há reconhecidamente 27 espécies patogênicas para o homem, dentre as quais 15 ocorrem no Brasil. Destas, as principais são: *Trichophyton rubrum*,

Epidermophyton floccosum, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *T. tonsurans*.

As dermatofitoses podem ser classificadas nas seguintes modalidades clínicas: dermatofitose ou tinha do couro cabeludo, da pele glabra, da barba e da face, dos pés, das unhas e inguinal, dependendo da localização da lesão no paciente. Já nos cabelos, pela relação com os fungos, podem ser diferenciados dois tipos de parasitismo: endotrix, onde os arthroconídios se localizam somente no interior do pelo, esse causado, por exemplo, por *T. tonsurans*; e ectotrix, onde os arthroconídios se dispõem no interior e ao redor do fio de cabelo. Podemos citar *M. canis* e *T. mentagrophytes* como agentes deste tipo de parasitismo pilar.

Em cultivo, os dermatófitos, em sua maioria, produzem dois tipos de conídios: macroconídios e microconídios que, juntamente com a característica macroscópica da colônia, vão permitir a identificação das diferentes espécies dos dermatófitos. Os macroconídios são característicos dos seguintes gêneros:

- *Microsporum* – São fusiformes, grandes, multisseptados de paredes rugosas.
- *Epidermophyton* – São clavados, robustos bi ou trisseptados com paredes lisas e espessas.
- *Trichophyton* – Quando existentes são delicados, clavados, multisseptados de paredes finas e lisas.

O quadro a seguir mostra as características macro e micromorfológicas que são observadas nas colônias dos principais fungos responsáveis por dermatofitoses.

Fungo dermatófito	Macromorfologia	Micromorfologia
<i>Trichophyton rubrum</i>	Colônia branca, granular ou cotonosa, com pigmento vermelho no verso	Microconídios em gota de lágrima dispostos ao longo da hifa e macroconídios, que quando existem, são comuns do gênero
<i>T. mentagrophytes</i>	Colônia branca, granular ou cotonosa, com pigmento que vai do amarelo ao marron no verso	Macroconídios do gênero, microconídios redondos numerosos
<i>T. tonsurans</i>	Colônia acastanhada com pigmento vermelho-ferruginoso no verso	Microconídios numerosos e polimórficos, usualmente clavados ou alongados
<i>Microsporum canis</i>	Colônia branca, penugenta com pigmento amarelo alaranjado no verso	Macroconídios fusiformes, multisseptados de paredes rugosas e mais espessas que a dos septos, poucos microconídios
<i>M. gypseum</i>	Colônia pulverulenta de cor camurça, com pigmento pardo no verso	Numerosos macroconídios fusiformes, multisseptados, de paredes rugosas e finais poucos microconídios
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Colônia membranosa de cor verde-limão	Macroconídios em grupos de três ou mais na extremidade de conidióforos, microconídios inexistentes

A **candidíase** é micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em especial pela espécie *C. albicans*. Elas são hóspedes normais do trato gastrointestinal do homem e fazem parte da microbiota de determinadas regiões do tegumento cutâneo. Porém a *Candida* pode invadir a camada córnea da pele ou a lâmina ungueal de hospedeiros normais. As lesões têm localização

peculiar: nas unhas das mãos e nas áreas intertriginosas da pele (região inguinal, espaços interdigitais das mãos, região submamária e axilar). Também é possível ocorrerem lesões nas unhas dos pés.

Há ainda outras micoses de pele e de unha que não são causadas nem por fungos dermatófitos nem por fungos do gênero *Candida*. Dentre esses fungos destacam-se: *Fusarium* sp., *Scytalidium dimidiatum*, e *S. hyalinum* que podem causar lesões principalmente em unhas e em espaços interdigitais dos pés. Em cultivo, *S. dimidiatum* se apresenta como colônia cotonosa, branca no início tornando-se cinza a negra em dez dias. Microscopicamente, se compõe de hifas demáceas e hialinas, com artroconídios septados e não septados. *S. hyalinum* é considerado um mutante de *S. dimidiatum* incapaz de sintetizar melanina e, com isso, as hifas e os conídios são sempre hialinos. As culturas de *Fusarium* sp. podem ser as mais variadas possíveis, quanto à macroscopia. Esta dependerá da espécie que causa a lesão. Porém, microscopicamente, o que caracteriza *Fusarium* sp. é a presença de macroconídios em forma de lua, bi ou trisseptados.

3.1.2 . Micoses subcutâneas

As MICOSES SUBCUTÂNEAS se caracterizam por resultar da inoculação de um fungo patogênico por ocasião de um traumatismo, manifestando-se como tumefação ou lesão supurada da pele ou do tecido subcutâneo, produto da disseminação do fungo por contiguidade ou por via linfática, porém limitada ao território aquém do linfonodo regional.

A **esporotricose** tem como agente *Sporothrix schenckii*. Esse é um fungo dimórfico, logo, muda entre as formas miceliana e leveduriforme, de acordo com a temperatura e as condições do ambiente onde se encontra. Assim sendo, *S. schenckii*, em parasitismo nos tecidos apresenta-se como

elementos leveduriformes bem pequenos, com brotamento geralmente em forma de charuto. Na natureza, em associação a vegetais e madeira, vive na forma filamentosa. A transmissão clássica da esporotricose se dá por traumatismo causado por vegetais onde o fungo se encontra ou pela forma zoofílica, ou seja, através de lesões provocadas por animais infectados por *S. schenckii*, em especial gatos, como vêm ocorrendo no estado do Rio de Janeiro, que é uma área endêmica de esporotricose. A lesão inicial da esporotricose é uma pápula ou nódulo que surge no ponto da inoculação, usualmente localizado nos membros. Desse local o fungo pode propagar-se por contiguidade, determinando uma lesão circunscrita ou por via linfática, ocasionando o aparecimento de nódulos em número variável sobre o trajeto de um linfático superficial. O diagnóstico definitivo se dá com o isolamento em cultivo do fungo em amostras de pus ou biópsia das lesões. Testes de detecção de IgG e IgM em amostras de soro podem auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento terapêutico desta infecção.

A **cromoblastomicose** é uma infecção que se caracteriza pelo aspecto parasitário de seus agentes: o corpo muriforme. Esses são elementos globosos, com parede acastanhada espessa e septados em planos distintos. Podem ser visualizados também elementos não septados e outros com apenas um septo, porém o que caracteriza o corpo muriforme é a presença de septos em planos diferentes. As principais espécies que podem causar cromoblastomicose no ser humano são *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*, e *Rhinocladiella aquaspersa*. No Brasil, normalmente, os casos dessa micose são causados por *F. pedrosoi*, após traumatismo com matéria orgânica vegetal.

Micetoma é o nome coletivo de micoses produzidas por algumas espécies de fungos ou de actinomicetos aeróbios, os quais, nos tecidos, se organizam em um agregado de hifas ou filamentos bacterianos, denominados grãos. Os agentes de micetoma possuem *habitat* na natureza associado a vegetais,

nutrindo-se de outros vegetais em decomposição ou como fitopatógenos. O micetoma eumicótico se distingue do actinomicótico por ser: causado por um fungo, enquanto o actinomicótico é causado por bactérias filamentosas. Os grãos, de tamanho e forma variados, podem ter coloração branco-amarelado, vermelha ou negra. O que caracteriza a cor de um grão é somente o fungo ou actinomiceto agente da doença. Por isso, a cor do grão obtido das lesões do paciente já fornece um indicativo de qual seja o agente do micetoma. O quadro a seguir o relata alguns desses agentes, com o respectivo tipo e coloração dos grãos:

Fungos causadores de micetoma	
Grão eumicótico negro <i>Madurella mycetomatis</i> <i>M. grisea</i> <i>Pyrenochaeta romeroi</i> <i>Exophiala jeanselmei</i>	Grão eumicótico branco <i>Acremonium sp.</i> <i>Pseudallescheria boydii</i> (<i>Scedosporium apiospermum</i>) <i>Neotestudina rosatii</i> <i>Aspergillus nidulans</i> (<i>Emerciella nidulans</i>)
Actinomicetos causadores de micetoma	
Grão actinomicótico vermelho <i>Actinoadura pelletieri</i>	Grão actinomicótico branco <i>Actinoadura madurae</i> <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>N. asteroides</i> , <i>N. caviae</i> <i>Streptomyces somaliensis</i>

Há outras micoses subcutâneas de interesse, como a lobomicose e a entomoftoramicose. No entanto, a esporotricose, cromoblastomicose e micetomas são as mais comuns no Brasil.

3.1.3. Micoses sistêmicas e oportunistas

As MICOSES SISTÊMICAS se caracterizam por serem adquiridas por inalação de propágulos fúngicos, sendo, conseqüentemente a lesão primária pulmonar, com tendência à regressão espontânea. O fungo pode se disseminar pelo corpo através do sangue, originando lesões extrapulmonares nos indivíduos. Os agentes de micoses sistêmicas raramente são implantados traumáticamente; quando isso ocorre, determinam uma lesão granulomatosa circunscrita, com ou sem linfangite regional, que regride espontaneamente.

Ao invadir os tecidos, os fungos desencadeiam resposta imunológica no hospedeiro, que pode ser evidenciada por reação intradérmica, na qual se verifica a resposta celular dada pelo hospedeiro, por reações de hipersensibilidade tardia e por provas de detecção de anticorpos em amostras de soro (imunodifusão dupla e fixação do complemento), onde é avaliada a resposta humoral. Uma reação intradérmica positiva evidencia que o indivíduo já foi previamente sensibilizado pelo fungo e as provas sorológicas indicam que há anticorpos contra o fungo. Porém, as provas sorológicas podem fornecer resultados falso-positivo e falso-negativo, visto que podem ocorrer reações cruzadas com outros anticorpos na prova aplicada. As provas sorológicas auxiliam no diagnóstico de micoses sistêmicas, mas o que realmente diagnostica a doença é o isolamento do fungo em cultivo ou sua observação no exame micológico direto dos materiais adequados para o exame, tendo as provas imunológicas valor diagnóstico presuntivo. As provas imunológicas são úteis para avaliações epidemiológicas, para avaliação prognóstica e para a triagem de pacientes. As reações intradérmicas apresentam valor diagnóstico baixo, uma vez que não discriminam entre infecções passadas ou recentes. Porém são de grande valor nos estudos epidemiológicos.

As micoses sistêmicas são a coccidioidomicose, a blastomicose, a histoplasmose, e a paracoccidioidomicose. As duas primeiras não são comuns no Brasil, embora sejam relatados casos de coccidioidomicose no semi-árido do Nordeste, em especial no Piauí em caçadores de tatus, que revolve-ram o solo para desentocar a caça. Há também a esporotricose sistêmica, que é resultado da inalação de conídios de *S. schenckii* os quais vão causar infecção pulmonar que pode sistematizar-se. Este tipo de apresentação clínica da esporotricose é bastante raro. O aspecto macro e micromorfológico do fungo é o mesmo do agente da esporotricose subcutânea.

A **histoplasmose** é uma infecção sistêmica, causada por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* ou *H. capsulatum* var. *duboisii*. Enquanto o primeiro agente tem distribuição cosmopolita, o outro tem sua distribuição geográfica restrita ao continente africano. O cultivo de *H. capsulatum* à temperatura ambiente é constituído de colônia branca que, quando muito velha, assume coloração camurça. O crescimento do fungo é bem lento. Microscopicamente se observam hifas finas e delicadas e conídios de dois tipos. Os macroconídios esféricos e tuberculados são estruturas marcantes para a identificação do fungo. Porém, a presença de microconídios esféricos é necessária para a correta identificação do agente, pois há alguns fungos saprófitas, pertencentes ao gênero *Chrysosporium*, que também produzem estruturas de propagação semelhantes. Deve-se, para a correta identificação do agente da histoplasmose, realizar a conversão desse fungo para a fase leveduriforme em meios enriquecidos com incubação a 37°C. Todavia, a conversão de *H. capsulatum* não é facilmente obtida e depende também das características fisiológicas de cada isolado. Quando convertidos à fase leveduriforme observam-se colônias glabras, lisas, branco-amarelada, e na microscopia notam-se leveduras ovais e unibrotantes.

A **paracoccidioidomicose** é uma micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis*, caracterizada pela forma parasitária do seu agente: célula leveduriforme mutibrotante com parede celular birrefringente. É a micose

sistêmica mais frequente na América Latina. Afeta usualmente agricultores, que mantêm contato direto com a natureza, em principal com o solo. A micose é endêmica no Brasil. As manifestações clínicas da paracoccidiodomicose resultam da inalação de elementos infectantes do fungo ou de uma reativação de lesão primária quiescente, ou seja, de uma lesão adquirida há algum tempo, muitas vezes mais de trinta anos, e que não tinha ainda se desenvolvido. O fungo, além de acometer o pulmão, dissemina-se para outras partes do corpo, atingindo principalmente as mucosas do indivíduo, sua pele e linfonodos. O aspecto macroscópico da cultura de leveduras desse fungo tem coloração creme-clara, consistência cremosa e é conseguido em meios especiais, como o meio de Fava-Neto, com incubação a 37°C. O cultivo a 25°C dá origem a colônias de crescimento muito lento, filamentosas, algodoadas ou aveludadas, compostos de uma trama de hifas sem conídios.

As MICOSES OPORTUNÍSTICAS são causadas por fungos termotolerantes (que crescem a uma temperatura de 37°C), de baixa virulência e que determinam doenças em hospedeiros com graves deficiências do sistema imunodefensivo. Esses fungos têm porta de entrada variável, usualmente provocam reação supurativa necrótica. Podem acometer os mais variados órgãos, produzindo quadros polimórficos que se apresentam como manifestação cutânea, subcutânea ou sistêmica. Os fungos invadem os tecidos como uma hifa.

A **criptococose** é causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, das quais destacam-se duas espécies: *C. neoformans*, que acomete principalmente indivíduos imunodeprimidos e *C. gattii*, que pode acometer indivíduos imunocompetentes. A micose é de frequência elevada nas grandes cidades, onde são diagnosticadas suas formas clínicas mais graves. As formas subclínicas ou as que se manifestam como infecção respiratória inespecífica devem ser

bastante frequentes. A doença é endêmica no Norte e no Nordeste do país, acometendo crianças, jovens e adultos, de ambos os sexos e todas as faixas etárias, com ou sem depressão do sistema imunológico. O fungo apresenta tropismo pelo sistema nervoso central e o líquido do paciente pode simular meningite viral, bacteriana e também tuberculose. As leveduras do gênero *Cryptococcus* possuem uma característica especial, que é a presença de uma cápsula polissacarídica que envolve todo o fungo. Essa cápsula pode ser evidenciada em exames laboratoriais por contraste com tinta nanquim ou com a coloração pelo Mucicarmin de Mayer. *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de produzir a enzima extracelular fenol oxidase, que é extremamente útil para a identificação do agente da criptococose, pois esta enzima faz com que a levedura se torne melanizada quando colocada em cultivo com compostos fenólicos. Esta enzima e a cápsula polissacarídica estão relacionadas com a virulência desse fungo ao organismo.

A **aspergilose** é causada por membros do gênero *Aspergillus* que se apresentam nos tecidos como hifas hialinas septadas e ramificadas dicotomicamente, ou seja, num ângulo de 45°. A micose se manifesta em três formas clínicas: a alérgica, de colonização e a forma invasiva. Poucos grupos de *Aspergillus* causam infecção no homem. Espécies de *Aspergillus* dos grupos *fumigatus*, *niger* e *flavus* são os patógenos mais comuns, porém também podem causar infecção fungos dos grupos *nidulans*, *terreus*, *ustus* e *restrictus*. O aspecto microscópico do conidióforo permite a distinção entre as diferentes espécies.

A **candidíase oportunista** tem incidência mundial e resulta da invasão por espécies de *Candida* dos tecidos de hospedeiros com endocrinopatias, nos que recebem terapêuticas imunodepressivas, nutrição parenteral e administração prolongada de antibióticos ou esteroides, e ainda em pacientes com complicações após grandes cirurgias. Nos tecidos, as espécies de *Candida* se apresentam como hifas de aspecto peculiar, com exceção de *C. glabrata* (nun-

ca filamta, sempre se apresenta na forma de levedura). O agente mais comum é *C. albicans*, espécie que faz parte da microbiota do tubo digestivo do homem. Vive também em menor número na árvore brônquica e na cavidade vaginal. Os microrganismos responsáveis pela candidíase são classificados em sua forma anamórfica, usando provas fisiológicas de assimilação e fermentação de açúcares. À medida que vêm sendo descobertas as formas teleomórficas das espécies de *Candida*, as características dos esporos demonstram que elas pertencem a vários gêneros distintos.

3.2. Agentes antifúngicos

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. Nos últimos anos, a anfotericina B e os azóis – principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol – têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos. Os polienos ligam-se a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas moléculas pequenas, levando à morte celular. A anfotericina B é um antibiótico fungicida de largo espectro e potente, mas seu uso é associado a efeitos adversos significantes, como nefrotoxicidade e febre com calafrios, como reação aguda à infusão intravenosa, já que a farmacocinética deste fármaco não permite a administração oral.

Os azóis são compostos totalmente sintéticos. O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da esterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, que prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metil-esteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvi-

mento do fungo. Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, mas são menos potentes que ela. Podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo dos azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis.

Um outro agente antifúngico sistêmico utilizado é o pró-fármaco flucitosina. Todos os fungos sensíveis são capazes de desaminar a flucitosina em 5-fluorouracila, um potente antimetabólito; como resultado final, a síntese de ácido desoxirribonucleico dos fungos fica prejudicada. Embora as células dos mamíferos não convertam a flucitosina em fluorouracila, o que é crucial para ação seletiva do composto, alguns microrganismos da flora intestinal o fazem, causando certa toxicidade aos humanos.

A atividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da concentração mínima capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado **CIM** (Concentração Inibitória Mínima), ou **MIC** ("Minimum Inhibitory Concentration") em inglês. Este valor pode ser determinado através do **método das diluições sucessivas** ou do **método da difusão em ágar**, ou ainda através do uso de tiras contendo um gradiente de concentração de antibiótico, conhecido como E-teste.

Do ponto de vista microbiológico e clínico, o conceito de sensibilidade e resistência é aplicado para classificar o isolado como sensível ou resistente. No aspecto microbiológico, uma cepa é considerada resistente a um antifúngico quando a **concentração inibitória mínima** é mais elevada que a habitual do antifúngico frente a essa espécie.

Podemos observar três diferentes tipos de resistência aos agentes antifúngicos:

- **Intrínseca:** é dita quando nenhum membro de uma espécie é sensível ao antifúngico, ou seja, todos são insensíveis.

- **Primária:** ocorre quando dentro de uma espécie, normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se uma cepa com resistência natural a ele, sem necessidade de contato prévio com a droga.
- **Secundária:** ocorre quando uma cepa, previamente sensível, desenvolve resistência à droga após ter sido exposta a ela.

3.3. Diagnóstico imunológico das micoses pulmonares

As provas imunológicas prestam valiosos auxílios no diagnóstico de uma infecção fúngica. Os dados obtidos através de tais provas, devem ser criteriosamente interpretados e correlacionados com os achados micológicos, evidências clínicas e circunstâncias epidemiológicas.

Para segurança e facilidade na interpretação dos resultados, soros controles positivos devem ser incluídos nas provas sorológicas para detecção de anticorpos em soro. Essas provas devem ser realizadas com uma bateria de antígenos. No caso específico das micoses pulmonares, essa bateria deve incluir, no mínimo, antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* e *Coccidioides immitis*.

Para melhor avaliação prognóstica, as provas devem ser executadas com amostras seriadas do soro colhido em diferentes períodos, possibilitando assim a elaboração da curva sorológica.

É importante salientar que as provas imunológicas têm valor **presuntivo** no diagnóstico das infecções fúngicas, sendo o exame de cultivo o padrão-ouro para diagnóstico definitivo das micoses.

3.4. Interpretação das provas imunológicas

3.4.1. Paracoccidiodomicose

Pacientes portadores de paracoccidiodomicose ativa sem tratamento apresentam positividade nas provas sorológicas acima de 90%. Os títulos da reação de fixação de complemento são mais elevados nas formas graves e agudas da doença, sofrendo quedas à medida que ocorre melhora clínica. A reação não tem muito valor diagnóstico quando tomada como dado isolado. A correlação com os dados clínicos, epidemiológicos e resultados fornecidos por outras técnicas faz com que a importância diagnóstica aumente.

Na imunodifusão dupla de Ouchterlony pode ocorrer a formação de várias bandas de precipitação, sendo mais frequente a demonstração de apenas uma delas. A reação é dotada de alta especificidade. Reações cruzadas são mínimas e podem ocorrer principalmente com soros de pacientes portadores de histoplasmose.

A contraimunoeletroforese é mais sensível que a imunodifusão dupla e permite que os resultados sejam conhecidos em tempo reduzido. Ao lado do alto valor diagnóstico, a reação permite também acompanhar a evolução sorológica do paciente, através da titulação seriada de amostras do soro. O sorodiagnóstico específico da paracoccidiodomicose pode ser obtido por intermédio da imunoeletroforese, através da demonstração do arco de precipitação correspondente ao antígeno E₂ ou **gp43**. O arco de precipitação correspondente forma-se na região catódica da lâmina.

3.4.2. Histoplasmose

Anticorpos fixadores do complemento podem ser demonstrados na maioria dos pacientes, já a partir da quarta semana após a infecção. Preconiza-se a utilização dos antígenos obtidos da fase leveduriforme do *Histoplasma*

capsulatum bem como do antígeno obtido da sua fase filamentosa para aplicação no teste, uma vez que o antígeno leveduriforme apresenta uma maior especificidade e o antígeno filamentoso maior sensibilidade. Os resultados inespecíficos estão geralmente relacionados aos títulos de 1:8 e 1:32. Consequentemente títulos inferiores a 1:8 são considerados normais, e entre 1:8 e 1:32 são considerados de valor presuntivo. Títulos de 1:32 ou mais elevados são altamente sugestivos de histoplasmose em atividade. Após a cura clínica, os títulos caem rapidamente e normalmente desaparecem após nove meses. Reações cruzadas podem ocorrer com soros de portadores de paracoccidioomicose.

Na imunodifusão dupla podem ser verificadas duas faixas de precipitação de importância diagnóstica, denominadas **bandas H e M**. A faixa M forma-se próxima do orifício que recebe o antígeno e pode ser demonstrada com soros de pacientes com formas agudas ou crônicas de histoplasmose, ou em indivíduos sensíveis a histoplasmina e que se submeteram a recente teste intradérmico com o antígeno. A precipitina H é demonstrada no soro de pacientes com a doença ativa ou até dois anos após recuperação clínica, raramente ocorre na ausência de M.

A contraímunoeletroforese tem praticamente o mesmo valor da imunodifusão dupla, permitindo ainda a titulação dos anticorpos anti- *H. capsulatum*.

A detecção de antígeno de *H. capsulatum* em espécimes de urina, sangue e fluido cefalorraquiano oferece um método rápido para o diagnóstico, para o monitoramento de terapia, assim como para a identificação de recaídas na histoplasmose disseminada. Resultados falso-positivos têm sido observados somente em pacientes com blastomicose, paracoccidioomicose e infecção por *Penicillium marneffe*, e menos frequentemente em pacientes com coccidioomicose.

3.4.3. *Aspergilose*

Nos aspergilomas, os títulos de anticorpos específicos demonstrados pela reação de fixação de complemento estão geralmente elevados. As bandas de precipitação reveladas pela imunodifusão dupla e contraímunoeletroforese são geralmente múltiplas, podendo ser acima de dez. Após a remoção cirúrgica do aspergiloma ou tratamento adequado, estes anticorpos deixam de ser detectados em pouco tempo.

Na aspergilose brônquica alérgica os títulos de anticorpos específicos são baixos, e na asma aspergilar raramente são demonstrados. Através de provas cutâneas com aspergilina, pode-se demonstrar reações de hipersensibilidade do tipo I e III na aspergilose brônquica alérgica, e do tipo I na asma aspergilar.

Nas formas invasivas da doença raramente se demonstram anticorpos através das provas usuais, necessitando-se o emprego de provas mais sensíveis tais como radioimunoensaios e imunoenzimáticas.

Na imunodifusão dupla e contraímunoeletroforese, podem ocorrer reações inespecíficas devido à proteína C-reativa do soro do paciente. A eliminação de tal reação inespecífica se faz através da lavagem da lâmina, em solução de citrato de sódio a 5% durante trinta minutos.

3.4.4. *Criptococose*

O imunodiagnóstico da criptococose se baseia principalmente na demonstração de antígeno solúvel de *C. neoformans*, (GLUCORONOXILOMANANA) através da reação de soro ou líquido com partículas de látex sensibilizadas com gamaglobulina de coelho antipolissacáride capsular. Interferências, tais como fator reumatoide e efeito prozona podem ser encontradas neste teste, e são facilmente eliminadas com tratamento das amostras com pronase.

Os reagentes para demonstração de antígeno solúvel são encontrados no comércio, de procedência norte-americana, na forma de *KIT*.

Anticorpos podem ser demonstrados na fase inicial e final da criptococose. As provas mais utilizadas para tal propósito, são as reações de imunofluorescência indireta e aglutinação de suspensão de células de *C. neoformans*, porém apresentam baixo rendimento.

4. Meios de cultura e corantes

4.1. Meios de cultura

Os meios de cultura são preparações que contêm as fontes nutricionais necessárias para o crescimento e multiplicação dos organismos.

O cultivo de microrganismos pode ter diferentes propósitos, mas em todos eles o meio de cultura deve suprir as necessidades mínimas para que *in vitro* se consiga um ambiente semelhante ao que se encontrava o organismo na natureza.

Levando em consideração que os nutrientes são unidades estruturais e fontes de energia para a construção e manutenção da estrutura e organização dos microrganismos, o meio de cultura deve contê-los para que viabilize o seu crescimento.

São esses os principais constituintes do meio de cultura:

- **Água:** sempre deve ser usada água destilada para o preparo de meios de cultura. A água da torneira é de constituição desconhecida, variando especialmente em íons e em pH.
- **Fonte de carbono:** é necessária para a síntese de numerosos compostos orgânicos que fazem parte do protoplasma. A glicose é a principal fonte de carbono utilizada pelos microrganismos.

- **Fonte de nitrogênio:** muitos componentes da célula, principalmente as proteínas, contêm nitrogênio.
- **Minerais:** enxofre e fósforo.
- **Elementos de traço:** são os minerais que são exigidos em quantidades mínimas. Exemplos: potássio, magnésio, etc.
- **Fatores de crescimento:** um fator de crescimento é um componente orgânico que a célula deve conter para crescer, mas é incapaz de sintetizar. Exemplos: aminoácidos, purinas, etc.

Observação: Para o preparo do meio de cultura, as drogas usadas devem ser de maior pureza. O pH, a temperatura e a aeração devem ser cuidadosamente controlados. Sempre se deve observar o prazo de validade do produto.

Os meios de cultura podem ser classificados da seguinte forma:

Quanto ao estado físico

- *Sólido:* contém ágar (agente solidificante) na concentração de 1,5g a 3,0g por litro.
- *Semissólido:* 0,1g a 1,1g de ágar.
- *Líquidos (caldos):* ausência de ágar.

Agentes solidificantes:

- *Gelatina:* pode ser hidrolizada. É mais utilizada hoje em provas bioquímicas.
- *Ágar:* é uma substância hidrocarbonada extraída de várias espécies de algas vermelhas, e é imune ao desdobramento pela maioria dos microrganismos.
- *Sílica gel:* usada quando se deseja cultivar microrganismos autotróficos.

Quanto à composição química

- *Naturais ou Complexos*: formados por substâncias de composição química não definida.
- *Sintéticos*: quando a composição química é conhecida e seus componentes servem para suprir as fontes necessárias de carbono, nitrogênio, vitaminas, etc.

Quanto ao emprego

- *Meios de enriquecimento*: são meios enriquecidos com determinados nutrientes que favorecerão o desenvolvimento de determinado microrganismo, entre vários outros.
- *Meio de manutenção*: garante a viabilidade do microrganismo, por longos períodos, de modo a torná-los disponíveis em qualquer experimentação.
- *Meio diferencial*: permite ao microrganismo produzir estruturas ou reações que podem ser usadas na sua diferenciação entre gêneros ou espécies.
- *Meio seletivo*: permite o crescimento de um determinado grupo ou gênero de microrganismo, em detrimento de outros.

Os meios de cultura devem ser preparados e esterilizados cuidadosamente, de acordo com o protocolo a seguir:

a) Pesagem dos ingredientes

- Se o meio é preparado a partir de seus ingredientes básicos, suas massas corretas para o volume desejado devem ser pesadas isoladamente.

- Para meios desidratados, pesar a massa correspondente ao volume desejado.

b) Dissolução dos ingredientes

- Nunca usar recipientes de cobre ou zinco para dissolução dos ingredientes do meio de cultura, usar preferencialmente o balão de vidro, quimicamente limpo.
- Adicionar ao recipiente contendo os ingredientes uma quantidade de água destilada, aproximadamente a metade do volume desejado, agitando constantemente com bastão de vidro, e evitando a formação de bolhas; aquecer brandamente.
- Usar água destilada à temperatura ambiente, no preparo de meios líquidos.
- Completar o volume do meio com a água após a formação de suspensão homogênea. Isso é essencial, principalmente em meios contendo agentes solidificantes.
- O aquecimento para uma efetiva dissolução dos ingredientes e esterilização do meio deve ser feito no menor tempo possível. Os meios que contêm ágar devem ser aquecidos até o seu ponto de ebulição para uma completa dissolução.
- Resfriar os meios contendo ágar à temperatura aproximada de 50 °C, reajustar o volume de água destilada aquecida de 45 a 50 °C, se houver perda significativa de água durante o aquecimento.

c) Determinação e ajuste de pH

- Determinar o pH de meios formulados antes de adicionar o ágar.
- Quando se tratar de meios formulados, se deve aferir 0,2 unidades de pH acima do desejado, haja visto que o pH abaixa aproxima-

damente este valor após a autoclavação. Nos meios desidratados, não é necessário o ajuste do pH, pois os meios já vêm tamponados.

- Determinar o pH através de um potenciômetro ou por papel indicador de pH.
- Ajustar o pH com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N.

d) Distribuição dos meios

- Distribuir os meios em recipientes, quimicamente limpos e no caso de meios que não suportem nova autoclavação, usar recipientes estéreis.
- Ao distribuir em frascos de Erlenmeyers ou balões de fundo chato, evitar ultrapassar 50% do volume total do frasco.
- A distribuição em placas deve ser de aproximadamente 15mL; 6ml em tubos para meio inclinado, 5ml para camada alta e 6ml para caldos em geral.
- A distribuição nos tubos deve ser feita com pipetas;
- Codificar os meios conforme padrão ou convenção do laboratório;

e) Esterilização dos meios

- Com algumas exceções, esterilizar os meios em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

f) Preparo de ágar inclinado em tubos

- Ao retirar os tubos contendo meio sólido da autoclave, incliná-los apoiando-os num suporte de madeira, permanecendo os mesmos com aproximadamente 1cm de meio na base. Deixar solidificar à temperatura ambiente.

g) Plaqueamento de meio de cultivo

- Fundir o meio sólido em banho-maria, resfriá-lo em banho d'água, de modo a evitar ou diminuir a umidade que se condensa na tampa da placa de Petri, quando o ágar se solidifica.
- Flambar a boca do recipiente que contém o meio, antes de distribuí-lo na placa.
- Próximo à chama do bico de Bunsen, verter o meio, levantando parte da tampa da placa de Petri estéril, o suficiente para permitir a introdução da boca do tubo ou outro recipiente que contém o meio, sem tocar as bordas da placa. Pode-se usar uma pipeta para a distribuição.
- Fechar a placa, movimentá-la levemente sobre a bancada para permitir uma distribuição uniforme, e deixar solidificar à temperatura ambiente.

h) Armazenamento e conservação dos meios de cultura:

- Para períodos de tempo prolongados, recomenda-se guardar os tubos e frascos de Erlenmeyers contendo meio em temperatura de 12 a 15 °C. Os meios contendo ágar não devem ser guardados abaixo de 0 °C para não alterar seu gel.
- Geralmente é possível sua conservação durante um ou dois meses à temperatura ambiente em locais secos, limpos e abrigados da luz;
- Identificar todos os tubos, placas ou frascos que contenham meios de cultura.
- Para que não haja perda de água do meio para o ambiente, os recipientes devem ser bem vedados. No caso de placas de Petri, seus bordos poderão ser lacrados com parafilme.

Lista de meios de cultura mais utilizados em laboratório de Micologia**Ágar extrato de arroz (*Rice extract agar*)**

- Meio desidratado 15g
- Ágar 30g
- Água destilada 1000mL

Suspender o pó na água e deixar embeber o ágar durante trinta minutos, fundir, distribuir e esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C.

Ágar Sabouraud glicosado (*Sabouraud glyucose agar*)

- Dextrose 30g
- Peptona 10g
- Ágar 30g
- Água destilada 1000mL

Misturar todos os elementos em balão, deixar embeber o ágar por trinta minutos, levar à autoclave e aquecer lentamente à 120 °C. Agitar e ajustar o pH para 6,5. Esterilizar por quinze minutos a 121 °C.

Batata dextrose ágar (*Potato dextrose agar – BDA*)

- Meio desidratado 39g
- Ágar 5g
- Água destilada 1000mL

Suspender em água e deixar embeber o ágar por quinze minutos. Aquecer até a dissolução completa. Esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C.

Mycosel (Mycobiotic) agar

• Farinha de soja digerida	10 g
• Dextrose	10 g
• Cicloheximida	0,4 g
• Cloranfenicol	0,05 g
• Agar	15 g
• Água destilada	1000 mL

Misturar os reagentes. Esquentar agitando frequentemente até dissolver todos os ingredientes. Autoclavar a 118°C por quinze minutos. Não aquecer de forma excessiva. Para o meio desidratado seguir o mesmo procedimento sem adição do ágar.

Czapeck dox ágar (CZ)

• Sacarose	30 g
• Nitrato de sódio	3 g
• Fosfato di-potássico	1 g
• Sulfato de magnésio	0,5 g
• Cloreto de potássio	0,5 g
• Sulfato ferroso	0,01g
• Ágar	30 g
• Água destilada	1000mL

Misturar e dissolver os reagentes. Juntar o ágar e deixar embeber durante trinta minutos. Ajustar o pH para 7,3 antes de esterilizar. Fundir o ágar e esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C. Para o meio desidratado, seguir o mesmo procedimento sem adição do ágar.

Ágar infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion agar – BHI)

• Infusão de 200g de cérebro de bezerro	7,7 g
• Infusão de 250g de coração de vaca	9,8 g
• Proteose Peptona	10 g

• Dextrose	2 g
• Cloreto de sódio	5 g
• Fosfato dissódico	2,5 g
• Ágar	20 g

Misturar e dissolver os reagentes. Juntar o ágar e deixar embeber durante trinta minutos. Ajustar o pH para 7,4 antes de esterilizar. Fundir o ágar e esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C. Para o meio desidratado seguir o mesmo procedimento sem adição do ágar.

Ágar dextrose farinha de milho (*Corn meal agar – CMA*)

• Farinha de milho	40 g
• Dextrose	20 g
• Ágar	20 g
• Água destilada	1000 mL

Colocar a farinha em Becker com água e aquecer em banho-maria a 60 °C por uma hora. Em seguida, filtrar em gaze dobrada duas vezes. Restabelecer o volume inicial com água destilada. Transferir para balão que já contenha o ágar e a dextrose pesados. Esterilizar em autoclave a 121 °C por vinte minutos. Para o meio desidratado usar o mesmo procedimento usado no BDA, porém esterilizar a 121 °C por vinte minutos.

OBS: Quando este meio é utilizado para *Mucoracea*, trocar a dextrose por glicose.

Extrato de malte ágar (*Malt extract agar – MEA*)

• Extrato de malte	30 g
• Ágar	30 g
• Água destilada	1000 mL

Usar o mesmo procedimento do meio BDA, e ajustar o pH para 7,0.

Sabouraud

• Glicose	30 g
• Peptona	10 g
• Ágar	20 g
• Água destilada	1000 mL

Usar o mesmo procedimento do meio Sabouraud glicosado.

Meio seletivo para fungos entomopatogênicos

• Farinha de aveia	10 g
• Ágar	10 g
• Sulfato de estreptomicina	0,50 g
• Dodine	0,45 g
• Penicilina G	0,20 g
• Cristal violeta	2,5 mg
• Água destilada	500 mL

* *Solução estoque de cristal violeta*: 0,1 g de cristal violeta em 200 ml de água destilada.

* *Solução estoque de antibióticos*: 4g de penicilina G e 10 g de sulfato de estreptomicina em 40 mL de água destilada.

Mistura-se aveia e ágar em 490 mL de água destilada; agita-se vigorosamente aquecendo até a fervura, adiciona-se Dodine e 5 mL da solução estoque de cristal violeta enquanto estiver quente, e autoclava-se por vinte minutos. Quando estiver na temperatura de 50 a 55 °C, adicionam-se 2 mL de solução estoque de antibióticos; agita-se bem e distribui-se imediatamente o meio em placas de Petri.

Farinha de aveia ágar (*Oatmeal ágar – OM*)

- | | |
|--------------------|---------|
| • Farinha de aveia | 60 g |
| • Ágar | 12,5 g |
| • Água destilada | 1000 mL |

Bater a farinha no liquidificador com um pouco da água por um minuto. Depois adicionar o ágar e a água e homogeneizar. Esterilizar em autoclave a 121°C por vinte minutos.

OBS: Não utilizar o frasco de Erlenmeyer na medida exata do meio, pois durante a autoclavação, o meio ferve e pode molhar a rolha ou transbordar.

Extrato de levedura-peptona-glicose-ágar (*Yeast extract-peptone-glucose-agar – PYGA*)

- | | |
|-----------------------|---------|
| • Peptona | 5 g |
| • Extrato de levedura | 5 g |
| • Glicose | 20 g |
| • Ágar | 13 g |
| • Água destilada | 1000 mL |

Seguir os mesmos procedimentos usados para Sabouraud glicosado.

MP-5 (meio seletivo para fungos aquáticos)

- | | |
|------------------|---------|
| • Peptona | 1 g |
| • Maltose | 4 g |
| • Ágar | 20 g |
| • Água destilada | 1000 mL |

Seguir os mesmos procedimentos usados para o Sabouraud glicosado

Observação: Todos os meios utilizados no laboratório de Micologia podem ser acrescidos com antibióticos (cloranfenicol, estreptomina, etc.) para evitar o crescimento de outros microrganismos.

Meio de cultura – Fava Netto (para antígeno de *P. brasiliensis*)

• Proteose peptona nº 3 (Difco)	3 g
• Peptona	10 g
• Extrato de carne	5 g
• Cloreto de sódio	5 g
• Extrato de levedura	5 g
• Dextrose	40 g
• Ágar	18 g
• Água destilada qsp	1000 mL

Fundir o meio em banho maria fervente. Ajustar o pH entre 7,2 e 7,4. Autoclavar a 120°C durante vinte minutos.

Meio de cultura - Smith-Asparagina (para histoplasmina)

• L-Asparagina	7 g
• Cloreto de amônio	7 g
• Fosfato monoácido de potássio	1,31 g
• Citrato de sódio	0,9 g
• Sulfato de magnésio heptahidratado	1,5 g
• Citrato férrico	0,3 g
• Glicose	10 g
• Glicerina	25 g
• Água destilada qsp	1000 mL

Dissolver a asparagina em cerca de 300 mL de água destilada aquecida a 50°C. Dissolver os sais separadamente em 25 mL de água destilada, sendo que o citrato férrico deverá ser dissolvido em água quente. Misturar as soluções dos sais com a solução de asparagina. Homogeneizar. Acrescentar a glicose e a glicerina. Completar o volume com água destilada. Homogeneizar. Distribuir o meio, porções de 200 mL, em balões de 500 mL. Autoclavar a 120°C durante vinte minutos

Meio de Cultura – Negróni (Filtrado de cultura de *P. brasiliensis*)

- Dissolver 60 g de neopeptona em 120 mL de água destilada aquecida a 45°C.
- Colocar a solução de neopeptona em tubos para diálise (membranas de celofane) e dialisar contra água destilada (cerca de 2 litros) durante cinco horas a 70°C, e por uma noite em geladeira a 4°C.
- Retirar o conteúdo do tubo de diálise e completar o volume com água destilada para 1.800 mL. Adicionar 36g de glicose, 0,18 g de tiamina e 0,36 g de asparagina.
- Homogeneizar e acertar o pH, que deve ser entre 6.8 e 7.0;
- Distribuir o meio, porções de 150 mL em frascos Erlenmeyer ou balões de 300 mL de capacidade.
- Autoclavar a 120°C durante 15 minutos.

Observação: Todos os meios utilizados no laboratório de Micologia podem ser acrescidos com antibióticos (cloranfenicol, estreptomina, etc), para evitar o crescimento de outros microrganismos.

4.2. Corantes

A coloração é um meio utilizado em laboratórios de Micologia com o objetivo de visualizar estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos, as formas de leveduras, e realizar testes de viabilidade. As soluções utilizadas são:

a) Solução de hidróxido de potássio – KOH (solução clarificante)**• Concentrações:**

- 40% - unhas (fâneros).
- 30% - pelos e pele.
- 10% - pele tenra de criança.
- 6% - para exame de escarro.
- 5% - para estudo de Basidiomycotina e outros fungos.

• **Fórmula (para solução 30%):**

KOH em lentilhas	30 g
Água destilada	70 mL

• **Preparo:**

Dissolver os dois ingredientes em movimentos giratórios, até a total dissolução dos componentes.

A solução deve ficar transparente.

Armazenar em vidro escuro.

b) Lactofenol de Amann com azul de algodão

Usado para tornar mais distintas as estruturas hialinas dos fungos (corante citoplasmático)

• **Fórmula:**

Ácido fênico	20 g
Ácido láctico	20 g
Glicerina	40 g
Água destilada	20 mL
Azul de Poirrierblau	0,05 g

• **Preparo:**

Misturar todos os componentes e dissolver pelo calor.

Depois adicionar 0,05g de azul de Poirrierblau.

Esperar 24 horas e filtrar.

Observação: Para estudar as estruturas de fungos demáceos (negros) pode-se utilizar Lactofenol de Amann sem adição de azul de algodão.

c) Acridine Orange

Corante vital usado para teste de viabilidade que distingue células vivas e mortas, onde as células vivas adquirem coloração laranja, e as células mortas, coloração verde.

• Fórmula:

Acridine orange	0,02 g
PBS pH 7,7	100 mL

• Preparo:

Dissolver os dois ingredientes e agitar.

d) Verde janus B

Usado na diferenciação de células vivas e mortas. As células vivas permanecem incolor, enquanto as células mortas adquirem coloração azul.

• Fórmula:

Verde-janus B	0,05 g
Água destilada	100 mL

• Preparo:

Dissolver os dois ingredientes e agitar.

e) Reagente de Melzer

Usado para detecção de reação amiloide ou dextrinoide de esporos, ascas e tecidos himeniais de Ascomycotina e Basidiomycotina, na qual uma coloração azulada determina uma reação amiloide e uma marrom determina uma reação dextrinoide.

• **Fórmula:**

Iodo	0,5 g
Potássio iodado	1,5 g
Hidrato de cloro	20 g
Água destilada	20 mL

• **Preparo:**

Dissolver os ingredientes e agitar.

f) Floxina B

Usada para o estudo do citoplasma de Basiodiomycotina.

• **Fórmula:**

Floxina B	10 g
Glicerina	75 mL
Água destilada	175 mL

• **Preparo:**

Misturar todos os componentes e dissolver pelo calor.

g) Glicerina 10%

Preserva a coloração original do fungo estudado.

• **Fórmula:**

Glicerina	10 mL
Água	90 mL

• **Preparo:**

Misturar os ingredientes com leve agitação.

5. Técnicas micológicas

5.1. Diluição seriada

A diluição seriada é uma técnica simples que pode ser usada para vários propósitos, como: separação de duas cepas fúngicas que estejam misturadas em um tubo ou placa (contaminação no tubo ou na placa), contagem de colônias em amostras, isolamento de fungos de substratos líquidos (análise de água, leite, etc) e de solo, além da determinação da quantidade e qualidade de um inóculo para processos fermentativos ou inóculos líquidos.

a) Preparo da amostra

Separação de duas cepas de fungos

- Fazer uma raspagem com a alça em L na placa ou no tubo onde se encontram as duas cepas a serem separadas – no caso de separação de duas cepas de fungos.
- Este raspado deve ser colocado em um tubo com 10mL de solução salina a 0,85% e homogeneizar.

Isolamento de fungos de substratos líquidos

- Colocar 2 mL da amostra líquida (água, leite, etc) em um tubo com 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneizar.

Isolamento de fungos de solo

- Colocar 1g do solo a ser analisado em um tubo com 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneizar.

b) Diluição da amostra

- Utilizando uma série de dez tubos com 9 mL de salina, colocar no primeiro tubo 1 ml da suspensão homogeneizada do primeiro tubo (deve-se usar uma pipeta para cada transferência); homogeneizar e transferir

1 mL para o segundo tubo; homogeneizar novamente e transferir 1 mL para o terceiro tubo. Repetir este procedimento até o último tubo

c) Semeadura nos meios de cultura

- Preparar uma placa de Petri com o meio de cultura escolhido para cada tubo de diluição.
- Todas as placas devem ser marcadas com as respectivas diluições.
- Retirar 0,1 mL ou 1 mL (à escolha) de cada uma das diluições e transferir para a placa de Petri com a pipeta (**deve-se usar uma pipeta para cada diluição**) e espalhar na placa com o auxílio da alça de Drigalski.
- Incubar as placas por, no mínimo, sete dias na estufa a 25°C.
- Após o período de incubação, observar as placas e fazer a contagem das colônias ou no caso de separação das cepas fúngicas, observar as placas e retirar a colônia desejada com a alça em L.

d) Observação dos resultados – Contagem

A contagem de colônias é feita a partir da observação das placas e contagem manual das colônias crescidas e quantificação da diluição original, ou seja, quantos conídios ou esporos haviam na sua suspensão original. O número de conídios presentes na suspensão original será igual ao número de colônias multiplicado pelo fator de diluição.

Ex: Se na diluição 10^{-4} obtivemos cinquenta colônias com inóculo de 1 mL, a concentração original será de $50 \times 10^4 = 5 \times 10^5$ conídios/mL.

Se na diluição 10^{-6} obtivemos 135 colônias com um inóculo de 0,1 ml, a concentração original será de $135 \times 10^6 \times 10 = 135 \times 10^7 = 1,35 \times 10^9$ conídios/mL.

Observação: Para a contagem de conídios ou esporos em uma solução também podemos usar a Câmara de Neubauer

5.2. Técnicas de sementeira e microscopia

5.2.1. Sementeira de fungos

Inoculação em placas

As técnicas usadas para inocular fungos em placas são fundamentalmente efetuadas para obter culturas axênicas (culturas puras) e são bem desenvolvidas, já que a identificação de fungos filamentosos baseia-se principalmente nas características morfológicas.

Procedimento:

- Flambar a alça ao rubro e esfriar.
- No caso de a amostra estar em tubo:
 - remover a tampa de rosca ou tampão de algodão do tubo que contém a cepa, com o dedo mínimo da mão direita, segurando o tubo com a mão esquerda;
 - flambar a boca do tubo, imediatamente antes e depois da inoculação;
- No caso de a amostra também estar em placa:
 - tomar a placa com a mão esquerda, de modo que a base da placa fique segura e a tampa possa ser manipulada num movimento de abrir e fechar, com os dedos polegar e indicador;
 - proceder a uma rápida flambagem na placa toda vez que esta tenha que ser aberta;
 - manipular a placa na altura da chama do bico de Bunsen;

- introduzir a alça ou agulha no tubo ou placa de Petri com amostra, e retirar uma quantidade suficiente do inóculo;
- tomar uma placa, abrir conforme exposto anteriormente e inocular no centro da placa ou conforme especificações em três pontos eqüidistantes.
- Incubação das placas:
 - incubar as placas, invertidas em estufa ou à temperatura ambiente, para evitar que, durante a incubação, a água de condensação da superfície do ágar, provoque crescimento confluyente do organismo, impedindo a formação de colônias isoladas.
 - obedecer aos requisitos fisiológicos de crescimento do microrganismo, tais como temperatura ideal de incubação, iluminação, tempo de incubação, etc.

Inoculação em tubos ou frascos de Erlenmeyers

A inoculação em tubos ou frascos de Erlenmeyers pode ser feita em meios sólidos e líquidos. Apresentam inúmeras finalidades de uso. Em todos os casos, tomam-se medidas assépticas durante a inoculação.

a) Meio líquido para meio líquido

Quando a cultura estiver em meio líquido e se pretende repicá-la para um tubo contendo meio líquido, deve-se usar uma alça de platina ou níquel-cromo em forma de gota, observando-se as condições de assepsia.

b) Meio líquido para meio sólido

- Tomar com uma alça em forma de gota um inóculo da amostra em meio líquido.
- Introduzir a alça sobre a superfície do ágar inclinado, até a base do mesmo.
- Fazer estrias ou um esfregaço em direção à boca do tubo, sobre a superfície inclinada até $\frac{3}{4}$ da sua extensão. A superfície inclinada do ágar deve ficar voltada para cima, com a mão do operador por baixo do tubo, de modo que a superfície inclinada possa ser vista sem obstáculo.

c) Meio sólido para meio líquido

- Introduzir a agulha ou alça em forma de L estéril no tubo que contém a cultura em ágar inclinado e tomar uma pequena quantidade do inóculo. Evite carrear pedaços ou fragmentos do meio com o inóculo.
- Imergir o inóculo no meio líquido, agitar a agulha suavemente contra a parede do tubo para ressuspender o inóculo.
- Homogeneizar o meio sob leve agitação.

d) Meio sólido para meio sólido

- Tomar com uma agulha ou alça em forma de L o inóculo no meio sólido.
- Introduzir a agulha sobre a superfície do ágar inclinado, até a sua base.
- Fazer estrias ou um esfregaço em direção à boca do tubo, sobre a superfície inclinada, até aproximadamente $\frac{3}{4}$ da sua extensão. O procedimento é o mesmo da inoculação de meio líquido para o meio sólido.

- Incubação dos tubos:
 - preferencialmente todos os tubos com meio sólido devem ficar em posição vertical em estantes ou outros tipos de suporte.

6.2.2. Microscopia

Exame direto de um pedaço da colônia

Com a alça de platina em forma de L ou agulha esterilizada, cortar um pedaço da colônia e colocá-lo sobre uma lâmina. Não se deve raspar a superfície da colônia, porque apenas os conídios serão retirados. Desta forma, em muitos casos é possível identificar o fungo.

Colocar uma gota do corante lactofenol de Amann com azul de algodão ou outro corante desejado sobre o pedaço da colônia. Se o fungo for muito escuro, substituir o corante por uma solução clarificante ou uma gota de água.

Cobrir a preparação com uma lamínula, comprimindo-a com o cabo do bisturi ou do estilete. Examinar ao microscópio, com objetivas de 10X, 40X e 100X.

Técnica de cultivo em lâmina

Na maioria das vezes, é necessário obter preparações onde as estruturas do fungo são observadas por inteiro. Isto porque há muitos gêneros cujos esporos ou conídios por si só não são característicos. Neste caso, as estruturas responsáveis pela formação e sustentação dos conídios ou esporos necessitam ser observadas por completo. Isto nem sempre é possível com a técnica de exame direto, havendo necessidade de se fazer o cultivo na própria lâmina. Com isto, obtêm-se os fungos com suas estruturas intactas.

Procedimento:

- Vazar em placa de Petri uma camada fina do meio de cultura adequado para cada gênero ou espécie de fungos a ser examinado.
- Após a solidificação do meio, com o auxílio de um bisturi, cortar fragmentos de 0,5 cm².
- Montar uma placa de 15 cm de diâmetro e cobrir o fundo com papel de filtro e colocar sobre este um bastão em forma de “U”, duas lâminas e duas lamínulas.
- Após a esterilização, colocar o quadrado de meio sobre cada lâmina;
- Inocular nos quatro lados do quadrado do meio de cultura, fragmentos miceliais e/ou esporos.
- Colocar sobre o meio de cultura a lamínula.
- Molhar o papel de filtro com água destilada estéril formando uma câmara úmida.
- Deixar em temperatura ambiente, por aproximadamente uma semana ou mais dependendo do fungo estudado.
- Observar crescimento e esporulação.
- Fixar pelo formol por 24 horas.
- Montar lâminas e lamínulas com corante e observar em microscópio ótico com objetivas de 10x, 40x e 100x.

Técnica da fita adesiva

Esta técnica dá excelentes resultados quando o fungo está sendo cultivado em placa de Petri. Na maioria das vezes, suas estruturas aparecerão inteiras, como no cultivo em lâmina.

Procedimento:

- Cortar um pedaço de fita adesiva um pouco menor do que a lâmina e colocá-lo sobre a colônia, com a cola para baixo.
- Comprimir com a alça de platina em forma de L para que o fungo cole na fita.
- Colar a fita sobre o corante na lâmina.
- Observar ao microscópio óptico com objetivas de 10X, 40X e 100X.

Cultivo sob lamínula

O objetivo desta técnica é a observação das microestruturas vegetativas e reprodutivas do fungo mais intactas.

Procedimento:

- Inocular em uma placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura específico para o gênero a ser identificado, fragmentos do fungo em três pontos equidistantes entre si, e sobre cada um destes colocar uma lamínula de 24x32mm, previamente flambadas em bico de Bunsen.
- Após sete dias de crescimento, as lamínulas sobre os pontos de inóculo devem ser retiradas do interior da placa, com auxílio de uma pinça, previamente flambada. As lamínulas devem ser colocadas invertidas sobre lâminas contendo uma gota de Lactofenol de Amann com azul de algodão.
- Observar ao microscópio óptico com objetivas de 10X, 40X e 100X.

Técnicas para estudo de Ascomycotina

Procedimento:

- O uso de um microscópio estereoscópico (lupa) é indispensável para o exame do material.
- Secções verticais no corpo frutífero do fungo estudado poderão ser feitas com auxílio de uma gilete ou bisturi.
- A maioria das lâminas para posterior observação ao microscópio óptico é montada normalmente em água para medição dos ascosporos e observação de sua coloração, o reagente de Melzer's também devendo ser usado para o estudo dos anéis apicais das ascas.
- O estudo destes fungos em meio de cultura também deve ser feito para que se conheça o seu anamorfo. Isto poderá ser feito através da técnica de isolamento de ascosporos (*single ascospore isolation*).

Técnica para estudo de Basidiomycotina

- O material é montado em KOH a 5%.
- O reagente de Melzers também é usado para os esporos de fungos Agaricáceos.

Impressão de esporos:

Uma das mais importantes características que permite o agrupamento dos gêneros em seções é a coloração dos basidiósporos em massa, ou seja, a impressão de esporos.

Procedimento:

- Selecionar um corpo frutífero fresco e maduro e cortar sua haste junto ao píleo.

- Colocar o píleo sobre uma folha de papel de duas cores (preta e branca) com as lâminas ou poros para baixo.
- Cobrir o píleo e o papel com papel encerado, cristalizador ou com uma campânula. Se o corpo frutífero do fungo estiver em boas condições, a impressão de seus esporos poderá ser obtida em uma hora.

5.3. Coleta e isolamento de fungos ambientais

Observações quanto ao complexo fungo-substrato são de grande valia por ocasião de qualquer coleta. Deve-se notar que as estruturas mais visíveis de um fungo não representam, necessariamente, o seu todo. Além disso, grande parte de seus ciclos ou remanescentes estruturais poderão estar perdidos no interior do substrato. Desta forma, conclui-se que a amostra que se coleta de um fungo, na verdade não passa de um momento do seu ciclo biológico.

As partes mais evidentes, nos fungos, representam em geral, aquelas que mais resistem ao manuseio e ao tratamento para secagem. As condições ideais para o estudo dos fungos residem no isolamento dos organismos a partir de diferentes substratos, e nos diversos ambientes em que os fungos ocorrem: solo, ar, água ou mesmo na vegetação.

Independente do espécime a ser coletado, alguns materiais gerais devem ser providenciados para as coletas:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| * altímetro | * fósforo ou isqueiro |
| * jornal | * caderneta de campo |
| * lupa de mão | * lápis |
| * mochila ou cesta | * máquina fotográfica |
| * canivete ou espátula | * papel indicador de pH |
| * faca afiada | * saco plástico |
| * fita crepe | * saco de papel |
| * fita métrica ou trena | |

A. Solo

Considera-se o solo um mosaico de micro-habitats devido a sua grande complexidade, longe de ser um simples amontoado de matéria inorgânica sem vida. Ao contrário, o solo costuma ser rico em microbiota e mesofauna, o que força o pesquisador a usar técnica ou substâncias especiais quando pretende isolar um grupo definido.

O método de diluição é o mais usado para se estudar a incidência de fungos em solos. O material, ao ser coletado, deve ser colocado em latas esterilizadas ou em sacos plásticos. As amostras destinadas à análise devem ser manipuladas com o auxílio de uma espátula ou colher, parcialmente esterilizadas com algodão embebidos em álcool ou com auxílio de uma lamparina. De preferência, o período entre a coleta de material e as diluições, não deve ultrapassar quatro horas.

Procedimento:

- Tomam-se 10g de cada amostra de solo e coloca-se em frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina esterilizada. Agitar vigorosamente (solução 1:10 - mesmo princípio da diluição seriada porém em maiores proporções).
- Desta suspensão, pipeta-se 1 mL e adiciona-se a tubo contendo 9 mL de solução salina esterilizada, após agitação (solução 1:100).
- Retira-se então outro 1 mL desta última solução e coloca-se em um novo tubo contendo também 9 mL de solução salina esterilizada, sempre após agitação (solução 1:1000).
- Por fim, se necessário, a mesma operação anterior pode ser repetida, e uma alíquota de 1 ou 0,1 mL plaqueada em um meio de cultura apropriado. Em geral, usa-se ágar Sabouraud acrescido de antibiótico (cloranfenicol, estreptomina ou penicilina).

- Após sete dias, faz-se o isolamento dos fungos, repicando-se as colônias para tubos de ensaio contendo meio sólido.
- Após o desenvolvimento das colônias, procede-se à identificação genérica-específica dos fungos.

A coleta de substratos orgânicos, como folhas, frutos, raízes e troncos em diferentes estádios de decomposição também é interessante. Estercos de herbívoros devem ser coletados frescos, com uma espátula grande e acondicionados em sacos plásticos.

Importante lembrar que as regras de assepsia parcial e etiquetagem (local de coleta, data, condições ambientais e substrato) são idênticas para qualquer coleta, e devem receber atenção especial.

O método da placa de solo consiste em se colocar, com uma espátula, quantidades pequenas de solo em uma placa esterilizada, evitando os torrões de terra. Verter então o meio de cultura com antibiótico (sugere-se a utilização do meio de MARTIN, com rosa-bengala e sulfato de streptomina) e deixar solidificar.

Para o isolamento de fungos de substratos orgânicos pode-se utilizar o método de pressão de folhas. Este consiste em se pressionar com uma pinça uma folha sobre a superfície do meio de cultura com antibiótico, retirando-a em seguida. A placa, então, é deixada à temperatura ambiente, observando-se diariamente o crescimento das colônias.

Outra opção seria plaquear amostras de substratos (folhas, galhos, insetos, etc), cortadas com bisturi em pequenos pedaços. Deposita-se de uma a três amostras equidistantes sobre o ágar, umedecendo-as levemente com água esterilizada. Se a amostra for de insetos muito pequenos, colocá-los intactos.

B. Fungos macroscópicos

Existe uma variação muito grande de fungos macroscópicos, de consistência diferente. Alguns se decompõem logo após serem coletados, outros são mais resistentes. De qualquer modo, cuidado e bom senso tornam-se necessários para o sucesso de uma coleta. Os materiais comumente usados são:

- Cristalizador.
- Folha de papel dupla face (branca/preta), para coleta de esporos.
- Frascos de vidro escuros com fixador álcool a 5%.
- Papel de filtro ou algodão.

No caso de o substrato ser esterco de herbívoros, preparar um cristalizador contendo papel de filtro embebido em água e glicerina (para não ressecar rapidamente), antes de introduzi-lo no recipiente. Tampar, então, deixando o conjunto à temperatura ambiente e ao abrigo do sol, porém com iluminação. Impedir o ataque de inseto ou outros artrópodes e observar o crescimento macroscópico dos fungos.

Nas coletas, deve-se retirar o material por inteiro com o auxílio de uma faca ou espátula, cuidadosamente, para evitar quebra ou esfarelamento. Se possível, trazer parte do substrato junto. Aconselha-se não misturar materiais diferentes em um mesmo saco a fim de evitar a mistura de esporos. Ao transportá-los para outro lugar, acomodá-los na mochila ou cesta, protegendo-as com folhas de jornal. Amostras delicadas podem ser coladas no fundo de uma caixa de fósforos. Durante as coletas, anotações sobre cor, textura e tamanho do material coletado devem ser feitas, pois na maioria dos casos os fungos têm suas características alteradas depois de secos.

C. Ar atmosférico

O ar representa um repositório natural, sob a forma de esporos, dos mais diversos tipos e grupos de fungos. O isolamento depende do local, do tempo de exposição e do substrato empregado. A coleta de ar pode ser realizada de duas formas:

1. Com um amostrador de ar por impactação - Nestes amostradores há um compartimento onde é colocada uma placa de Petri com o meio de cultura escolhido e quando o amostrador é ligado, a placa recebe todo o ar puxado em um volume determinado por dez minutos. Ao término, essas placas são incubadas a 25°C por sete dias. As colônias são contadas e repicadas para tubo de ensaio e deve-se então proceder à identificação dos fungos isolados.
2. Expondo as placas de Petri com meio de cultura escolhido, por cinco, dez ou quinze minutos ao ar atmosférico no ambiente selecionado, incubando em seguida a 25°C por sete dias. Repicar as colônias para tubo de ensaio e proceder à identificação dos fungos isolados.

D. Água

Fungos aquáticos

Em ambientes aquáticos, encontramos tanto fungos zoospóricos como tetraradiados (não zoospóricos). Os primeiros são realmente adaptados ao ambiente aquático, pois possuem esporos flagelados móveis. O segundo grupo, sem flagelos, apresenta esporos de forma radiada, com três ou quatro braços partindo de um mesmo ponto, ou ainda sigmóides ou ovalados. Esta morfologia concede maior facilidade de flutuação, dispersão e aderência ao substrato.

Os fungos aquáticos podem também ser encontrados no solo, graças à formação de estruturas de resistência que lhe permitem sobreviver até que condições de umidade favoráveis se estabeleçam. Para observação destes fungos, torna-se necessária a coleta de amostras de água e solo, às quais adicionam-se iscas especiais. Assim, o material para a iscagem é:

- Ácido clorídrico a 1%.
- Frasco de 100ml, de boca larga e tampa.
- Hidróxido de potássio a 2%.
- Hipoclorito de sódio a 10%.
- Iscas como: asa de insetos, celofane, ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, folha de gramínea descorada ou fervida, frutos (maçã, jabuticaba, etc), grão de pólen do *Pinus*, gravetos e sementes (cânhamo, *Crotalaria* sp.).
- Papel alumínio.
- Papel encerado.
- Saco de tela de náilon ou lata.

A iscagem pode ser realizada no campo ou no laboratório. É importante salientar que a transparência do material irá determinar sua eficiência como isca. De preferência, os frascos devem ser esterilizados. Para fins taxionômicos, este requisito passa a ser obrigatório.

No momento da coleta da água, juntar ao pote gravetos ou folhas que estiverem nas proximidades. Uma vez no laboratório, transferir uma parte do coletado para placas de Petri esterilizadas, adicionar as iscas e deixar à temperatura ambiente. Com o desenvolvimento das colônias, entre 48 e 72 horas, procede-se ao isolamento da cultura pura, utilizando o meio MP-5.

Após o crescimento em meio sólido, retirar um pequeno quadrado de 1x1 cm da parte mais periférica da colônia, colocando-o em uma placa esterili-

zada com água destilada estéril e duas a três metades de sementes de cânhamo. Decorridas 48 horas, o material deve estar pronto para ser observado diretamente ou montado em lâmina.

Todos os substratos que portarem crescimento micelial devem ser separados, lavados em água destilada e recolocados em placas contendo novas amostras do mesmo substrato com água destilada esterilizada renovada. Em lâmina, pode-se observar os flagelos colocando-se uma a duas gotas de Karo na montagem, a fim de diminuir a mobilidade dos zoósporos.

Para as espécies que dificilmente ocorrem neste tipo de iscagem, recomenda-se a submersão de frutos, gravetos ou folhas dentro de latas perfuradas ou bolsas de náilon. Estas devem ser amarradas com fio plástico e, de preferência, protegidas da observação pública. Após duas ou três semanas, este material deve ser retirado e lavado em água corrente por cerca de trinta minutos, para a remoção de detritos, bactérias, protozoários e pequenos invertebrados. Se os fungos estiverem presentes, pústulas esbranquiçadas aparecerão na epiderme do fruto, as quais deverão ser observadas.

5.4. Preservação de fungos

Culturas microbianas são extremamente vulneráveis e podem se contaminar, mutar ou morrer. Muitas vezes, culturas são insubstituíveis, e sua perda pode ser muito grave. Outras vezes ela pode ser reisolada ou adquirida de uma coleção de culturas. Em qualquer um dos casos, tempo, informação e dinheiro são desperdiçados, mas isto pode ser evitado ou minimizado com um sistema eficiente de preservação de linhagens. Esta é uma das funções mais importantes de uma coleção de culturas. A preocupação central é a preservação de linhagens com suas características originais durante um longo período de tempo. Novas espécies, mutantes, organismos portadores de plasmídeos e linhagens produzidas por engenharia genética devem ser preservadas, de forma

a manter as suas propriedades. Assim, é essencial que coleções de culturas executem pesquisas no intuito de definir técnicas de preservação apropriadas. É importante frisar que não existe nenhum método universal para uma preservação adequada a todos os microrganismos. Grupos taxonômicos de microrganismos, e até linhagens dentro da mesma espécie, variam quanto a sua resposta aos diferentes métodos de preservação.

Métodos de preservação

Estes métodos têm como objetivo manter as culturas num estado viável sem mudança morfológica, fisiológica ou genética. Para se obter um bom resultado na aplicação de um método de preservação, a cultura deve estar em ótimas condições, deve-se respeitar as condições ótimas de crescimento, temperatura, umidade, aeração, iluminação e meio de cultivo.

A. Repique

• Ágar

O método mais tradicional de preservação de culturas é através da transferência periódica da cultura (repique) para um novo meio de cultivo sólido ou líquido. O intervalo entre cada transferência varia com o microrganismo, o meio de cultivo empregado e as condições ambientais.

A maioria dos fungos pode crescer em BDA ou EM, contudo, alguns têm requerimentos especiais de crescimento. O período de tempo entre as transferências varia de fungo para fungo. Para alguns, a cada duas ou quatro semanas, a maioria a cada dois a quatro meses, enquanto outros podem sobreviver 12 meses sem transferência. Três condições devem ser determinadas quando se usa este método para preservação de microrganismos:

- Meio adequado para manter as culturas.
- Temperatura ideal de estocagem.
- Frequência entre as transferências.

• **Preservação sob óleo mineral**

Muitas espécies de fungos podem ser preservadas por meses ou anos através de um método relativamente fácil e simples, que é o de imersão em óleo mineral. O óleo deve ser esterilizado por aquecimento em um forno Pasteur a 170°C por uma ou duas horas ou autoclavagem dupla por quinze minutos a 121°C.

Deixar crescer a cultura em meio apropriado. O repique pode ser feito em ágar inclinado ou não.

Após um crescimento adequado, colocar assepticamente o óleo mineral estéril sobre a superfície da cultura a uma altura aproximada de 1 a 2cm (quando a cultura estiver em ágar inclinado, cobre-se completamente a superfície). Isto impede a desidratação e reduz a atividade metabólica, assim como a velocidade de crescimento do microrganismo, devido à redução da tensão do oxigênio.

Guardar as culturas com óleo mineral na posição vertical. Fazer testes de viabilidade periodicamente para determinar se a cultura está deteriorando.

• **Blocos de ágar em água**

O método consiste em cultivar o microrganismo em uma placa de Petri contendo um meio de ágar apropriado. Após o crescimento vigoroso o ágar é cortado com uma lâmina estéril em blocos de aproximadamente 4 a 6 mm. No caso de fungos, a partir do final do crescimento das colônias, um número apropriado de cubos é transferido assepticamente para tubos ou frascos con-

tendo 10 a 15 mL de água destilada estéril. Para reativação, basta retirar assepticamente um dos cubos e depositá-los sobre um meio adequado, a sua aplicação fica restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar, como no caso de fungos filamentosos e algumas leveduras.

B. Secagem

• Secagem em areia, solo e sílica-gel

Também é considerada como um bom método de conservação de microrganismos. Pode ser uma simples secagem de esporos ou secagem sob várias condições, como, por exemplo, em secador com ou sem vácuo.

Para tanto, emprega-se a seguinte linha de trabalho: Preparar o tubo para estocagem (pode ser de tampa rosquiável ou frascos de penicilina), enchendo-o até $\frac{3}{4}$ com gel (sílica-gel purificada, sem indicador, 6-22 mesh), depois esterilizar no mínimo durante três horas a 180°C (calor seco), e colocar em atmosfera seca para seguir em banho de gelo *overnight*. Fazer uma suspensão de esporos em leite frio desnatado (5%). Derramar a suspensão fria sobre a sílica gelada e depois levar para um banho de gelo, pelo menos durante quinze minutos.

Deixar os géis à temperatura ambiente (25 a 30°C) dentro de dessecadores até que, com a agitação, os cristais sejam separados (cerca de uma a duas semanas ou dois a três dias para fungos de crescimento rápido). Armazenar os tubos em dessecadores em sala fria ou recipientes com sílica em geladeira (4°C), embora bons resultados possam ser obtidos à temperatura ambiente.

- **Armazenamento em solo estéril**

A preservação de fungos em solo estéril, pode ser feita de duas maneiras:

- pela inoculação de uma suspensão de esporos;
- pela inoculação de esporos secos em solo seco ou em substrato similar, com subsequente estocagem do material seco.

O método de estocagem em solo empregado consiste em inocular 5g de solo (20% de umidade e esterilizado pelo menos duas vezes a 121°C por quinze minutos) com 1mL de suspensão de esporos em água, com subsequente crescimento durante cerca de dez dias à temperatura ambiente. O armazenamento deverá ser feito de preferência em refrigerador a 5°C.

C. Liofilização (*freeze-drying*)

A liofilização, ou *freeze-drying* é um dos métodos mais econômicos e eficientes de preservação a longo prazo. O método permite a produção de grande número de liofilizado porque o uso de ampolas pequenas facilitam a estocagem. Enquanto o procedimento da liofilização é relativamente simples, o aspecto teórico é bastante complexo, pois a liofilização envolve a remoção de água de uma suspensão de microrganismos congelados por sublimação sob pressão reduzida, isto é, a água é evaporada sem passar pela fase líquida (passagem do estado sólido para o estado gasoso).

As células secas podem ser estocadas por longo período, se mantidas longe de oxigênio, umidade e luz. Elas podem a qualquer hora ser facilmente re-hidratadas e ativadas.

A liofilização pode ser realizada de várias maneiras, pois vários tipos de aparelhos foram desenvolvidos para este fim.

No caso dos fungos, é importante lembrar que o sucesso da liofilização varia entre linhagens de mesma espécie; em geral, aqueles que crescem e

esporulam bem em cultura sobrevivem ao processo, enquanto que isolados em estado deteriorado ou debilitado não resistem à liofilização.

Requisitos básicos para liofilização

- Meio de suspensão externo para congelamento (álcool metílico ou etílico + gelo seco).
- Gerador e mantenedor de vácuo (bomba).
- Absorvente do vapor de água (dissecante - condensador - líquido refrigerante).

Parâmetros de liofilização

Tipo de célula; crescimento e idade da cultura; concentração celular; meio de suspensão (crioprotetores); velocidade de resfriamento; método de secagem; condição de estocagem; método de constituição e métodos de análise (medidas de viabilidade, injúria, morte e outros parâmetros).

Crioprotetores

Materiais proteicos, carboidratos; aminoácidos; leite desnatado e outros.

Meios de suspensão:

- Leite desnatado 10%; leite desnatado 10% + inositol 5%.
- Sacarose 7% + peptona 7%; inositol 5% em soro de sangue de cavalo e outros.

Método de liofilização:

- Pré-congelamento + vácuo (umidade residual 1% a 2%);
- Centrifugação + vácuo
 - Secagem primária: umidade residual 5% a 10%.
 - Secagem secundária: umidade residual 1% a 2%.

Congelamento:

A preservação das características de microrganismos armazenados em um freezer com faixa de temperatura de 0 a -20°C produz resultados diversos, sendo que seu sucesso depende da espécie de fungo.

Parâmetro de congelamento:

Escolha do tipo de refrigerador, escolha de ampolas e frascos, agentes crioprotetores, culturas e preparação de suspensão, velocidade de resfriamento, estocagem e velocidade de descongelamento.

Pré-resfriamento para congelamento:

- Freezer (velocidade de resfriamento, $v_r = 1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$).
- Gelo seco ($v_r = 7^{\circ}\text{C}/\text{min.}$).
- Fase vapor de nitrogênio ($v_r = 18^{\circ}\text{C}/\text{min.}$).

Congelamento direto:

Fase líquida de nitrogênio ($v_r = 200^{\circ}\text{C}$).

D. Armazenamento em nitrogênio líquido

Utiliza-se o nitrogênio líquido para se conseguir temperaturas “ultrabaixas”. Isso tem sido satisfatório para grande número de células vivas.

O método apresenta certas desvantagens: a aparelhagem requerida é mais cara que a usada para secagem ou congelamento; há necessidade de condições bem controladas de congelamento e degelo, e ainda há o risco de explosão de ampolas. Também é um método menos interessante que a secagem, quando se usa o armazenamento para distribuição de culturas.

A estocagem a temperaturas “ultrabaixas” reduz as trocas físicas e químicas e é um bom método para ser usado quando as culturas são de difícil liofilização.

Nos fungos, faz-se uma suspensão de esporos em glicerol 10% e alíquotas de 0,5mL são distribuídas em ampolas de vidro-borosilicato ou criotubos de 1mL e marcadas com o número da cultura usando tinta permanente. As ampolas são seladas com maçarico (quando criotubos, as tampas são bem fechadas) e colocadas num banho com corante em refrigerador de 4 a 8°C por trinta minutos para pré-resfriamento. Este procedimento permite que o glicerol penetre e envolva o organismo. O corante indica qualquer falha no selamento das ampolas ou criotubos, caso o conteúdo fique colorido.

Tal procedimento é seguido pelo congelamento das ampolas a -35°C por quarenta a sessenta minutos, e as ampolas são então colocadas no nitrogênio líquido e congeladas rapidamente a -196°C. A reativação é feita colocando-se as ampolas rapidamente em banho de água a 37°C até os cristais de gelo derreterem. As ampolas então são abertas e o conteúdo é dispensado em meio de cultura adequado ao crescimento.

Para se fazer o controle da viabilidade e pureza das culturas congeladas, a reativação deve ser feita após três a quatro dias de estocagem no nitrogênio líquido.

E. Método do papel de filtro (preservação de fungos entomopatogênicos)

Procedimento:

- Tiras de papel de filtro previamente esterilizadas (estufa 105°C por 24h), são distribuídas sobre o meio BDA (batata dextrose ágar), em placas de Petri, pouco antes de endurecer.
- Culturas fúngicas são transferidas para estas placas e incubadas por oito dias (dependendo do isolado) a 28°C.
- As tiras de papel apresentando estruturas fúngicas são retiradas das placas e transferidas para placas de Petri, para então serem mantidas em dessecador contendo sílica gel, onde deverão permanecer por 48 horas à temperatura ambiente.

- Após este período de incubação, as tiras são acondicionadas em saquinhos de papel-manteiga, previamente esterilizados, e armazenadas em dessecador à temperatura ambiente.

F. Método da sílica gel

Procedimento:

- Preparar recipientes (vidrinhos com tampa ou tubos *Eppendorfs*) parcialmente cheios com sílica gel (6 a 22 meshes) sem indicador, seca e esterilizada com calor seco (180°C/90 min).
- Cultivar os isolados em meio de cultura até a fase de esporulação.
- Preparar suspensão de esporos em leite em pó desnatado (10%), esterilizado e esfriado a 4°C.
- Adicionar a suspensão de esporos à sílica, resfriada a 4°C, sendo 0,5 mL da suspensão para 4 g de sílica.
- Incubar a 4°C por trinta minutos.
- Armazenar à temperatura ambiente por duas semanas e depois vedar as tampas.
- Transferir para geladeira (4 °C) para longo período de armazenamento.

6. Técnicas utilizadas em Micologia médica

O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas requer a **coleta** de amostras apropriadas e **procedimentos laboratoriais** adequados, segundo indicação clínica do paciente. A qualidade da amostra disponível para análise laboratorial é de fundamental importância. Coleta, estocagem e processamento de espécimes inadequados **podem levar a um diagnóstico errôneo**.

Dependendo da micose do paciente, uma série de materiais podem ser enviados ao laboratório para exame, como relacionado no quadro a seguir.

Tipos de micose	Tipos de material usualmente enviado ao laboratório para exame
Superficiais e cutâneas	Pele, pelos, unhas, exsudatos
Subcutâneas	Pus, tecidos (biópsias), exsudatos
Sistêmicas e oportunistas	Escarro, pus, tecidos (biópsias), exsudatos líquor, materiais brônquicos, medula óssea, sangue, urina

6.1. Coleta e processamento de espécimes clínicos

6.1.1. Pele

A. Coleta

- Limpar com álcool etílico ou éter (Em alguns casos nenhuma antissepsia pode ser feita). Se a lesão for úmida, limpar com água destilada ou solução salina estéril. Lâmpada de Wood pode ser usada para orientar a coleta e o diagnóstico.
- Raspar com lâmina de bisturi estéril ou cureta dermatológica a borda das lesões, evitar colher o material do centro da lesão.
- Colocar o material em placa de Petri entre duas lâminas ou em envelope (estéreis).

B. Processamento

- Exame microscópico direto - KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo.

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol Mycosel Ágar (contém cicloheximida e cloranfenicol)*
Semeadura	Semear três a cinco escamas de pele em cada tubo
Incubação	Incubar à temperatura ambiente
Observação	Observar o crescimento de fungos por até três semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados em geral pela morfologia

6.1.2. Pelos

A. Coleta

- Com pinça estéril coletar o máximo de pelos afetados. A lâmpada de Wood pode ajudar na seleção.
- Colocar em placa de Petri, entre duas lâminas ou em envelope (estéreis).
- Procurar sempre colher, por raspagem, amostra de pele onde se implantam os pelos afetados, mesmo se tiverem aparência sadia.

B. Processamento

É realizado da mesma maneira que para amostras de pele.

6.1.3. Unhas

A. Coleta

- Limpar com álcool etílico ou éter.
- Raspar com lâmina de bisturi estéril ou com tesoura cirúrgica de ponta reta grande quantidade da parte lesada da unha. Desprezar as primeiras raspagens. Excelente para exame e cultivo é a parte da unha aparentemente são na borda da lesão ungueal.
- Raspar o material sob a unha, em caso de lesão na parte proximal e periungueal.

- Colocar o material em placa de Petri, entre duas lâminas ou envelope (estéreis).

B. Processamento

É realizado da mesma maneira que para amostras de pele.

6.1.4. Escarro

A. Coleta

- Quantidade: 5 a 10 mL são suficientes.
- Coletar, de preferência em jejum, o primeiro da manhã, após escovar os dentes e bochechar com solução antisséptica.
- Colher em recipiente estéril.
- Processar até duas horas após a coleta.

B. Processamento

- Fluidificação e concentração de escarro:
 - Adicionar ao escarro 10 mL de solução de citrato de sódio 0,10 mol/L e 0,10g de N-acetil L-cisteína.
 - Agitar bastante, centrifugar e desprezar o sobrenadante.
- Exame microscópico direto: KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Semeadura	Espalhar o material em pelo menos dois tubos de cada meio
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro a seis semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados*

* Em geral é realizada através de observação ao microscópio das colônias isoladas, em preparações com lactofenol-azul de algodão, cultivo em lâminas, demonstração de termotolerância e demonstração do dimorfismo entre outras técnicas.

7.1.5. Pus

A. Coleta

- Colher assepticamente, de preferência através de punção (nesse caso o procedimento é realizado por um médico).
- Colocar em recipiente estéril ou processar imediatamente.
- Processar o mais rápido possível, caso o processamento não tenha sido realizado no momento da coleta.

B. Processamento

- Exame microscópico direto: KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Semeadura	Pelo menos dois tubos de cada, se houver material suficiente. Caso contrário, semear em quantos tubos forem possíveis
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados

Observação: Caso se observe grãos no pus, deve-se limpar a lesão com salina estéril, cobri-la com gaze estéril e, comprimir a região ao redor da lesão, a fim de que os grãos fiquem retidos na gaze. Se houver dificuldade de se obter material, deixar a gaze sobre a lesão do paciente até o dia seguinte. Observamos este material ao microscópio estereoscópico “pescando” os grãos, com auxílio de uma agulha “alça de platina” e, colocando-os em uma placa com salina estéril para lavá-los.

Após a lavagem, processar:

1. Exame direto: NaOH 4% ou KOH 10%.
2. Cultivo:

Grãos actinomicóticos – Semear em Caldo Tioglicolato e Sabouraud sem antibiótico.

Grãos eumicóticos – Semear em Sabouraud com cloranfenicol, observar de três a quatro semanas e identificar os isolados.

6.1.6. Aspirado de medula óssea

A. Coleta

- O médico deve coletar por punção.
- Colocar em frasco estéril com heparina. Evitar heparina de reuso, pois esta deve ser rigorosamente estéril. Nunca colher em frascos com EDTA, pois esta substância se combina com elementos da parede do fungo, diminuindo a sensibilidade do exame.
- Processar até duas horas após a coleta.

B. Processamento

- Exame direto geralmente não é realizado. Mas se necessário, corar lâminas com Giemsa ou Gram.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol Mycosel Ágar BHI Ágar (se possível com sangue de carneiro 5%)
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até seis semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados

6.1.7. Tecidos (biópsia)

A. Coleta

- O procedimento de coleta é realizado pelo médico
- Colocar, preferencialmente em tubo estéril, contendo 2 a 3 mL de soro fisiológico também estéril. Na ausência de frascos estéreis com salina, colocar entre duas gazes estéreis umedecidas com soro fisiológico, acondicionando em recipiente estéril para transporte.
- Processar rapidamente, no máximo em duas a quatro horas.

B. Processamento

- Pinçando firmemente o tecido, cortar pequenos fragmentos e em seguida macerar (em gral, homogeneizador ou com tesoura cirúrgica estéril).
- Exame microscópico direto: KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados

* Para isolar Zigomicetos (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia* etc) usar o meio:

Pão umedecido esterilizado em tubo ou placa. Acrescentar cloranfenicol na concentração de 300mg/l no processamento. Fragmento de tecido deve ser cortado com bisturi em pequenos pedaços com cuidado, evitando a maceração.

6.1.8. Líquor

A. Coleta (sempre realizada por um médico).

- Quantidade ideal: 1,0 mL em tubo estéril (às vezes vêm menos material).

- Processar rapidamente;
- Se for preciso conservar: guardar sob refrigeração (4°C).

Observação: *Cryptococcus* tolera bem a refrigeração.

B. Processamento

- Centrifugar o líquido;
- Exame microscópico direto do sedimento com tinta nanquim (OBRIGATÓRIO) e esfregaços corados com Gram e Giemsa (caso necessário).
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-água com cloranfenicol e BHI - NUNCA Mycosel
Semeadura	Semear o sedimento em pelo menos dois tubos de cada meio
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro a seis semanas
Identificação	Identificar todos os fungos isolados

6.1.9. Exsudatos (Pleura, pericárdio, peritônio, articulações, etc)

A. Coleta

- Colher em tubo estéril com heparina estéril. O ideal é já ter heparina na seringa.
- Processar rapidamente.

B. Processamento

- Centrifugar e desprezar o sobrenadante.
- Exame microscópico direto do sedimento com KOH 10% ou NaOH 4% e tinta nanquim.
- Cultivo: é realizado da mesma forma que escarro (item 6.1.4 deste capítulo)

6.1.10. Material brônquico (aspirado, escovado, lavado e outros)

A – Colheita (sempre realizada pelo médico do paciente)

- Colher em frasco estéril.

B. Processamento

É Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Realizar exame microscópico do sedimento com KOH 10% e tinta nanquim. Cultivo do sedimento da mesma forma que para amostra de escarro.

6.1.11. Urina

A. Coleta

- Quantidade – 25 a 50 mL em frasco estéril;
- Recomendar:
 - Primeira urina da manhã.
 - Cuidados de higiene local.
 - Desprezar o primeiro jato.
- Processar no máximo em duas a quatro horas.
- Conservar sob refrigeração (4°C), excepcionalmente.

B. Processamento

- Exame microscópico direto do sedimento com KOH 10% ou NaOH 4% e tinta nanquim.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Semeadura	Semear o sedimento em pelo menos dois tubos de cada meio de cultura
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até seis semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados*

Nota: Para investigação da etiologia fúngica, recomenda-se coleta de uma amostra matinal diária, por três dias consecutivos. * A ANVISA também recomenda que seja realizada cultura quantitativa da urina para contagem de unidades formadoras de colônia, através da semeadura da urina não centrifugada em uma placa de Sabouraud ágar com alça calibrada.

6.1.12 Sangue (para hemocultura)

A. Coleta

- Fazer assepsia local com álcool iodado.
- Quantidade: 4 a 5 mL de sangue (utilizando escalpe e seringa descartável).
- Colocar diretamente em frasco de hemocultura contendo meio de BHI líquido ou líquido.
- Manter o frasco (já inoculado) em temperatura ambiente, invertido em estantes apropriadas.
- Processar em 48 horas após a colheita; dez dias após a primeira semeadura e dez dias após a segunda semeadura.
- Se forem utilizados frascos de sistemas automatizados, seguir instruções do fabricante.

B. Processamento

- Exame direto em geral não é realizado, se necessário, corar lâminas pelo Gram ou Giemsa.
- Cultivo:

Meios	BHI ágar com cloranfenicol
Semeadura	Retirar o hemocultivo (com seringa descartável) e inocular cerca de 1 mL em cada tubo de cultura, espalhando o sangue por toda superfície do meio
Observação	Observar as subculturas (tubos) por até seis semanas
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e observar de quatro a seis semanas
Identificação	Identificar todos os fungos isolados

6.2. Coleta de sangue: separação, conservação e estocagem do soro

Cerca de 10 mL de sangue deverão ser colhidos através de punção venosa, em tubo de ensaio estéril sem adição de anticoagulantes. O soro é separado após retração do coágulo, segundo os preceitos técnicos, a fim de evitar hemólise. Adicionar ao soro, mertiolato na concentração final de 1:10.000, a partir de solução estoque 1:100.

Distribuir em alíquotas de 1 mL em pequenos tubos e ensaio ou frascos, identificá-los corretamente e armazenar em congelador até o momento do uso ou envio ao laboratório de referência.

6.3. Preparo e padronização dos antígenos utilizados nas provas sorológicas e reações intradérmicas

6.3.1. Polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis*

O antígeno obtido a partir de células de *Paracoccidioides brasiliensis* em sua fase leveduriforme, segundo técnica de FAVA NETTO, é de natureza química quase que exclusivamente polissacarídica. O antígeno é utilizado nas reações de fixação de complemento, precipitação em meio líquido e nas provas intradérmicas de leitura tardia.

- a) Preparar o meio de cultura - Fava Netto;
- b) No preparo do antígeno, utilizar no mínimo três amostras diferentes de *P. brasiliensis*, que são mantidas em sua forma leveduriforme em estufa a 35°C, no meio acima descrito e, com repiques a cada vinte dias.
- c) Preparar suspensão em solução fisiológica estéril das células leveduriformes do fungo.

- d) Com auxílio de pipeta estéril, espalhar a suspensão sobre a superfície do meio de cultura contido em garrafas de Roux.
- e) Incubar a 35°C durante vinte dias.
- f) Decorrido o prazo estipulado, colher as células do fungo, com auxílio de espátula e fazer suspensão em solução tampão Veronal, contida em frascos apropriados para centrifugação.
- g) Homogeneizar a suspensão com auxílio de bastão de vidro e centrifugar a 2.000 rpm durante dez minutos.
- h) Desprezar o sobrenadante (É conveniente, antes, autoclavar o sobrenadante, pois ele pode conter células viáveis, ou adicionar formalina).
- i) Fazer suspensão do sedimento em aproximadamente cinco volumes de acetona. Homogeneizar a suspensão com auxílio de bastão de vidro (estéril).
- j) Centrifugar a 2.000 rpm durante dez minutos. Desprezar o sobrenadante.
- k) Repetir as operações “i” e “j” por mais duas vezes.
- l) Repetir as operações “i”, “j” e “k”, com éter sulfúrico.
- m) Anotar o volume do sedimento e deixá-lo em frasco aberto em geladeira até o dia seguinte, quando as células estarão secas.
- n) Fazer suspensão a 15% em solução tampão veronal, levando em consideração o volume das células anotado no item “m”.
- o) Autoclavar a suspensão a 115°C durante quinze minutos.

- p) Centrifugar a 2.000 rpm, durante trinta minutos, tendo o cuidado em manter condições de esterilidade.
- q) Deixar o frasco em geladeira até o dia seguinte.
- r) Repetir a operação "p".
- s) Separar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar mertiolato na concentração final de 1:10.000.
- t) Distribuir o antígeno em alíquotas de 1 a 5ml, em frascos ou tubos estéreis. Identificar e datar.
- u) Realizar controle de esterilidade.
- v) A estabilidade do antígeno é superior a dois anos, quando estocado a 4°C.

A padronização do antígeno polissacarídico para emprego na reação de fixação de complemento se faz através da titulação desse antígeno ante o soro de paciente portador de paracoccidiodomicose e, que reconhecidamente seja positivo em tal reação diante do antígeno padrão.

Nas reações intradérmicas, o antígeno deve ser padronizado em pacientes portadores de paracoccidiodomicose, ou em animais experimentalmente infectados. Através da utilização de antígeno padrão, chega-se à diluição ótima que deverá ser utilizada para o novo antígeno. Fava Netto, através de sua experiência pessoal, verificou que a diluição do antígeno a ser utilizado nas provas intradérmicas corresponde a 1/10 daquela que representa a dose ótima de antígeno para fixar unidades de complemento 50% de hemólise, na prova de fixação de complemento. Geralmente a diluição ótima do antígeno para utilização nas reações intradérmicas está em torno de 1:10.

6.3.2. Filtrado de cultura de *Paracoccidioides brasiliensis*

O antígeno obtido por essa técnica, constitui-se em excelente reagente para ser utilizado nas reações de fixação do complemento e precipitação em gel. Sua natureza química é glicoproteica.

- Preparar o meio de cultura - Negróni (item 4.1 deste capítulo)
- Inocular os frascos com pelo menos três amostras diferentes de *P. brasiliensis*, a partir de cultivos mantidos a 35°C.
- Incubar a 35°C durante quatro semanas sob agitação constante.

Observação: Se não houver disponibilidade de manter os cultivos sob agitação constante, os mesmos poderão ser mantidos estáticos a 35°C durante 12 semanas.

- Decorrido o tempo de cultivo, adicionar mertiolato na concentração final de 1:10.000, agitar e incubar a 35°C durante uma semana.
- Realizar controle de esterilidade.
- Filtrar as culturas em papel de filtro.
- Colocar o filtrado em placas de Petri limpas e deixar em estufa a 37°C, até que o volume seja reduzido a 1/20 do volume original, ou utilizar polietilenoglicol (concentrando vinte vezes).
- Centrifugar a 2.500 rpm por trinta minutos.
- Distribuir o filtrado, que constitui o antígeno em alíquotas de 1 a 5 mL em frascos tipo penicilina, identificar, datar e estocar a 4°C.

6.3.3. Filtrado de cultura de *Histoplasma capsulatum* (HISTOPLASMINA)

- Preparar o meio de cultura - Smith-Asparagina (item 4.1 deste capítulo).
- Semear de três a cinco amostras diferentes de *Histoplasma capsulatum* nos balões contendo o meio de cultura.

- Deixar as culturas à temperatura ambiente e no escuro, durante quatro a seis semanas, sob agitação.
- Decorrido o prazo estabelecido, adicionar mertiolato na concentração final de 1:10.000. Agitar para submergir os filamentos e deixar à temperatura ambiente durante uma semana.
- Realizar controle de esterilidade.
- Filtrar em papel de filtro.
- Dependendo do emprego da histoplasmina, temos dois caminhos a seguir:

- **Utilização em reações sorológicas** (Reações de fixação de complemento e precipitação em gel de ágar)

- Colocar o antígeno em placas de Petri limpas, deixar a 37°C até que o volume seja reduzido para 1/20 do volume original.
- Centrifugar a 2.500 rpm durante trinta minutos.
- Distribuir o antígeno em frascos tipo penicilina.
- Identificar, datar e conservar a 4°C.
- Para padronização nas provas sorológicas, consultar o item 6.5 deste capítulo.

- **Utilização em provas intradérmicas**

- Após filtrar em papel de filtro a histoplasmina é filtrada em membrana esterilizante (poro de 0,22 µm).
- Distribuir em frascos tipo penicilina e estocar a 4°C.
- Realizar controle de esterilidade.

- A histoplasmina a ser utilizada nas reações intradérmicas é geralmente diluída a 1:1000, em solução fisiológica estéril. Deverão ser realizadas provas em indivíduos sensíveis ao antígeno, ou animais previamente sensibilizados, diante de *H. capsulatum*, utilizando-se histoplasmina padrão para fins de comparação.

6.3.4. Filtrado de cultura de *Aspergillus fumigatus*

- Cultivar *A. fumigatus* (mínimo de três amostras diferentes) em caldo Sabouraud por quatro semanas à temperatura ambiente.
- Decorrido o prazo estipulado, adicionar mertiolato na concentração final de 1:5.000. Agitar para submergir os filamentos.
- Deixar as culturas à temperatura ambiente durante uma semana.
- Realizar controle de esterilidade.
- Filtrar em papel de filtro.
- Colocar o filtrado em placas de Petri limpas e deixar em estufa a 37°C, até que o volume seja reduzido para 1/20 do volume original, ou utilizar polietilenoglicol para concentrar.
- Centrifugar a 2.500 rpm durante trinta minutos.
- Distribuir o antígeno em alíquotas de 1-5 mL, em frascos tipo penicilina., Identificar, datar e conservar a 4°C.

O filtrado de cultura de *A. fumigatus* é utilizado nas reações de fixação de complemento e precipitação em gel de ágar. É conveniente preparar pela mesma técnica, filtrados de culturas de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger*. Para a padronização do antígeno, consultar o item 6.5 deste capítulo.

6.5. Técnicas de padronização dos antígenos utilizados nas provas sorológicas

a) Reação de fixação de complemento

Os antígenos utilizados nas reações de fixação de complemento são padronizados através da titulação cruzada perante soro positivo para o antígeno em estudo. Utiliza-se, para tal propósito, antígeno padronizado com finalidades de controle da reação. A diluição ótima do antígeno não deverá demonstrar atividade anticomplementar.

b) Imunodifusão dupla de Ouchterlony

São feitas diluições do antígeno (1:2, 1:4, 1:8 etc), as quais são colocadas para difundir no gel, contra soro reconhecidamente positivo para o antígeno em questão.

Decorrido o tempo necessário para formação dos precipitados, procede-se à leitura da reação.

O título do antígeno será aquele correspondente à sua mais alta diluição que se dê positividade nítida com o soro e o mesmo número de bandas de precipitação, quando comparado ao antígeno padrão.

6.6. Técnica de imunodifusão radial dupla em gel de ágar (Ouchterlony)

REAGENTES

Reagente 1

Ágar noble0,5 g

Água destilada.....100 mL (Estocar em erlemayer a 4° C)

Reagente 2

Ágar noble1,0 g

Azida sódica0,1 g

PBS 7.2100 mL

* Aquecer em banho-maria até o ágar dissolver

* Colocar 3,5 mL em tubo de ensaio e estocar a 4° C

Reagente 3

PBS (Tampão fosfato 0,01 mol/L , NaCl 0,15 mol/L) pH 7.2-7.4

Solução **A**: NaH_2PO_4 —0,2 M (Fosfato de sódio monobásico)

Solução **B**: Na_2HPO_4 —0,2 M (Fosfato de sódio dibásico)

* **Tampão fosfato 0,01 mol/L**

Adicionar 280 mL da solução **A** a 720 mL da solução **B**

PBS: 50 mL do tampão fosfato + 50 mL de NaCl 3 mol/L.
Completar para 1000 mL com água destilada.

Reagente 4

Citrato de sódio 5 g100 mL de água destilada

Reagente 5

SOLUÇÃO CORANTE

Coomassie brilliant blue0,5 g

Ácido acético10 mL

Etanol45 mL

Água destilada45 mL

Reagente 6

SOLUÇÃO DESCORANTE

Metanol400 mL

Ácido acético100 mL

Água destilada500 mL

1ª Etapa (filmagem das lâminas):

- Mergulhar as lâminas de microscopia, devidamente limpas, no **reagente 1**; com auxílio de uma pinça, retirá-las em seguida, deixando o tempo suficiente para umedecê-las.
- Secá-las em estufa de aproximadamente 60°C.
- Após a secagem, estocá-las em caixas para posterior utilização.

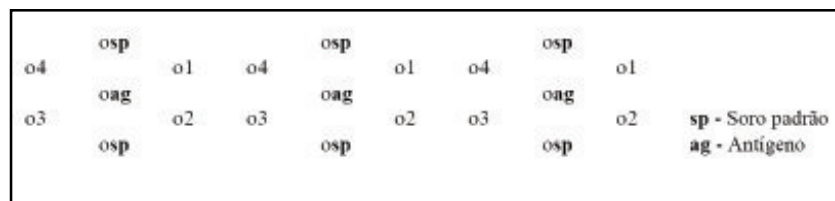
2ª Etapa:

- Utilizando uma mesa nivelada, colocar a lâmina previamente “filmada” com o **reagente 1**.

- Colocar em banho-maria os tubos com 3,5 mL de ágar (**reagente 2**) estocados, esperar liquifazer.
- Verter sobre a lâmina o **reagente 2** liquefeito, deixando solidificar por cinco minutos.
- Colocá-las em câmara úmida na geladeira.

Observação: Pode permanecer em geladeira na câmara úmida até sete dias (margem de segurança).

- Após dez minutos em geladeira, a lâmina já pode ser perfurada segundo esquema a seguir.



3ª Etapa

- Colocar o soro - 10 µL em cada orifício - respeitando o esquema acima. Nas extremidades superiores e inferiores adicionar soro padrão. Nos poços 1, 2, 3 e 4, adicionar os soros a serem testados.
- Após a colocação dos soros, aguardar uma hora para adicionar os antígenos nos orifícios centrais.

4ª Etapa

- Difusão em estufa a 37°C ou à temperatura ambiente, por 48 horas.

5ª Etapa

- Iniciar os banhos – Colocar as lâminas (após 48 horas) em uma cuba e verter sobre elas citrato de sódio 5 % (**reagente 4**) por duas horas, com objetivo de retirar precipitados inespecíficos.
- Após o banho de citrato – Adicionar solução salina 0,9 % por 48 horas, trocando várias vezes.

6ª Etapa

- Usando o papel de filtro (umedecê-lo previamente em água destilada), embrulhar as lâminas e colocá-las em estufa de secagem a 60° C, até atingir completa secagem.
- Mergulhar as lâminas em água destilada, e retirar o papel cuidadosamente. Lavar em água corrente para retirar resíduos de papel de filtro e secá-las em estufa.

7ª etapa

- Corar por dez minutos utilizando o **reagente 5**.
- Colocar em cuba de coloração várias lâminas e verter o corante. Após dez minutos, retirar as lâminas e estocar novamente o corante (é possível reaproveitá-lo). Periodicamente deve-se filtrá-lo novamente.

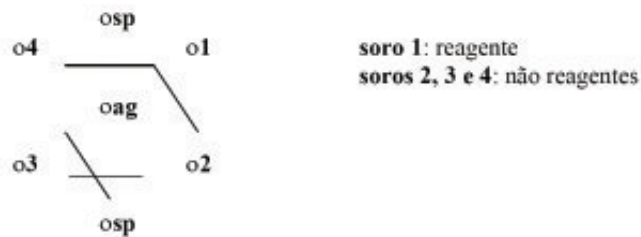
8ª Etapa

- Após o processo de coloração, retirar o excesso de corante com solução descorante (**reagente 6**) até que as linhas de precipitação fiquem bem nítidas.

Observação: Se descorar muito ou totalmente pode corar novamente.

9ª Etapa

- Leitura: considera-se reação positiva (soro reagente) quando houver a presença de linhas de precipitação apresentando identidade total com o soro padrão. Exemplo:



6.7. Identificação de leveduras de importância clínica

As leveduras são um grupo de fungos heterogêneos que superficialmente aparentam ser homogêneas. A identificação desses fungos é baseada nas características morfofisiológicas e bioquímicas. A morfologia é primariamente usada para estabelecer o gênero, entretanto, as provas bioquímicas (Teste de redução do nitrato e hidrólise da ureia), e de assimilação e fermentação de açúcares são usadas para diferenciar várias espécies.

6.7.1. Provas morfológicas

Dentre as provas morfológicas disponíveis para identificar espécies do gênero *Candida* temos a técnica de Dalmau e o tubo germinativo.

A técnica de Dalmau é baseada no fato de que *C. albicans*, quando cultivada em meio de cultura pobre em nutrientes, como o ágar arroz ou ágar fubá, produz uma estrutura de resistência denominada clamidoconídio. Dentre todas as espécies do gênero *Candida*, somente *C. albicans* e *C. dubliniensis* são capazes de formar clamidoconídios, sendo que esta última forma clamidoconídios em cachos, apresentando três ou mais clamidoconídios por hifa. Além disso, esta é uma espécie rara e altamente relacionada a *C. albicans*.

O teste do tubo germinativo baseia-se no fato de que *C. albicans*, quando incubada a 37°C por duas a três horas, em soro bovino ou de coelho, forma, a partir de suas leveduras, uma estrutura denominada tubo germinativo que dará origem às hifas e pseudo-hifas características desta espécie.

Teste do tubo germinativo

- Rotular os tubos testes com o número da amostra.
- Usando uma pipeta, dispensar 0,5 mL de soro bovino ou de coelho em cada tubo.
- Com uma alça flambada, tocar levemente a colônia de levedura e colocá-la no soro dentro do tubo.
- Agitar para homogeneizar as células leveduriformes no soro. Incubar os tubos a 37°C por duas a três horas.
- Após a incubação, colocar uma gota da suspensão numa lâmina de microscopia lisa e cortada e cobrir a preparação com uma lamínula.
- Examinar ao microscópio para detectar a presença ou ausência de tubo germinativo nas células da levedura estudada.

Teste de Dalmau

- Usar uma placa de Petri com *corn meal* ágar adicionado de 1% Tween 80.
- Com um bisturi estéril, fazer um sulco no meio de cultura, aproximadamente 1 cm à esquerda do meio da placa.
- Com auxílio de uma alça de platina esterilizada, retirar uma pequena quantidade da cultura leveduriforme em estudo e semear no sul-

co. Fazer três furos no meio de cultivo com a mesma alça à direita do sulco, formando um pequeno triângulo.

- Colocar uma lamínula (24 mm x 24 mm) estéril sobre o meio de cultura, cobrindo o sulco e sobre os furos.
- Incubar a temperatura ambiente por 72 horas.
- Observar no microscópio óptico, em objetiva de 10X, a presença ou ausência de clamidoconídios, diariamente até completar cinco dias.

6.7.2. Provas de assimilação

Para estudo de assimilação de fontes de carbono por leveduras podem ser utilizados meios cromogênicos, bem como *kits* comerciais de identificação.

Meio CHROMagar Candida

O meio cromogênico CHROMagar Cândida para diferenciação de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* e outras espécies permite a identificação do microrganismo de acordo com a coloração que este apresenta no meio semeado.

A interpretação dos resultados é feita com base na cor e no aspecto típico das colônias, conforme apresenta a tabela a seguir:

Cor e aspecto típico da colônia	Microrganismo pré-identificado
Verde	<i>Candida albicans</i>
Azul-metálico	<i>Candida tropicalis</i>
Rosa, rugosa	<i>Candida krusei</i>
Branco à violeta	Outras espécies

Galeria API 20C Aux

A galeria API 20 C AUX engloba vinte cúpulas que contêm substratos desidratados para efetuar 19 testes de assimilação. As cúpulas são inoculadas com um meio mínimo semigelosado e as leveduras crescem apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura dessas reações faz-se por comparação com os controles de crescimento (presença ou ausência de turvação) e a identificação é possível consultando o catálogo analítico ou um sistema de identificação disponível na internet (Api Web).

Método Vitek YBC (Cartão de Bioquímica para levedura)

O cartão YBC contém 30 poços. Destes 30, 26 contêm caldos bioquímicos e quatro contêm caldos de controle negativo. O cartão necessita de 24 horas, e em alguns casos de 48 horas, de incubação a 30°C em uma estufa e, em seguida, de uma única leitura depois de decorridas 24 horas, e em alguns casos de uma segunda leitura depois de 48 horas, no leitor/incubadora VITEK para uma análise dos dados. O cartão baseia-se nos métodos bioquímicos estabelecidos de Wickerham e Burton. Estes testes incluem a assimilação de hidratos de carbono, hidrólise da ureia, resistência a ciclo-heximida e redução de nitrato, que foram adaptados para serem utilizados no sistema VITEK.

6.8. Testes de sensibilidade aos antifúngicos

Entre os testes preconizados para detectar resistência a antifúngicos, apenas alguns deles foram até agora suficientemente avaliados em estudos amplos e bem conduzidos, a fim de comprovar boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial, além de correlação com a evolução clínica dos pacientes. Os mais conhecidos e difundidos são os do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), denominado, desde 2005, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicado a partir de 1985, sob a forma de

documento. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adquiriu os direitos autorais para a língua portuguesa dos documentos CLSI/NCCLS M27-A3 e M38-A e tornou-os disponíveis através do site: <http://www.anvisa.gov.br>

M27-A3. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras; à Terapia Antifúngica Norma Aprovada - Terceira edição do NCCLS: Descreve a metodologia de um teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos das leveduras que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo as espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. O M27-A3 é o método mais bem estudado e o documento pertinente contém técnicas de diluição em meio líquido, macrodiluição em tubos de ensaios e microdiluição em placas de microtitulação, para determinar a CIM. As leveduras são testadas ante as drogas (anfotericina B, 5-fluorocitosina e azólicos, incluindo cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, além de posaconazol e ravuconazol). O meio usado é o RPMI-1640 líquido, inóculo inicial de 1 a 5×10^6 cel/mL, ajustando em espectrofotômetro a 530 nm, incubação a 35° C. Utilizam-se cepas-controle ATCC em todos os testes realizados.

M38-A. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada do NCCLS.

Descreve um método para testar a sensibilidade dos fungos filamentosos que causam infecções invasivas, incluindo espécies de *Aspergillus*, espécies de *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*, assim como outros fungos patogênicos oportunistas, aos agentes antifúngicos. O

meio de cultura recomendado é mesmo indicado no documento M27-A2 e o inóculo deve ser ajustado, com auxílio de espectrofotômetro, para conter $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL. Entretanto, a densidade óptica (DO) a 530 nm, requerida no ensaio, depende do tamanho do conídio ou esporangiosporos do fungo em estudo. Há necessidade de adição de *Tween 20*, como agente surfactante, para preparar inóculo de *Aspergillus* spp.

M44-A. esse método descreve uma prova sensível e prática, validada para teste de sensibilidade em *Candida* spp.; utilizando discos impregnados com fluconazol ou com voriconazol. Este método ainda não foi validado para provas com outros gêneros de leveduras e recentemente foi proposto um novo método para uso com fungos filamentosos. O documento inclui critério de interpretação para os diâmetros de halos obtidos com discos de fluconazol e valores esperados para cepas padrão.

EUCAST. ensaio recomendado para avaliação da atividade antifúngica de substâncias puras pela técnica da microdiluição em caldo, pela organização europeia *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST), é baseado nos procedimentos da referência CLSI M27-A2, mas com algumas modificações, a fim de se obter maior exatidão na determinação dos valores de CIM. Estudos têm confirmado que a modificação do documento CLSI M27-A2, com a suplementação do meio RPMI 1640 e com 2% de glicose no meio de cultura, tornou a metodologia mais vantajosa. Isso se deu devido a redução do tempo de incubação necessário (24 horas) para se obter um crescimento suficiente para a determinação dos valores de CIM.



Sistemas comerciais: Existem vários sistemas comerciais para realizar testes de sensibilidade aos antifúngicos, incluindo, entre outros, Asty, Atb Fungus 3, Candifast, E-Test, Fungitest, Integral Systems Yest, Mycototal E Sensitríte Yeast One. Apenas o E-Test, o Atb Fungus 3 e o Candifast têm distribuidores no Brasil.



Resumo do capítulo

Os fungos são organismos que convivem conosco todos os dias. São importantes, tanto do ponto de vista ecológico, quanto econômico. A Micologia é a área da Biologia destinada ao estudo dos fungos, que teve o seu grupo reconhecido como um reino a partir da descrição de cinco reinos por Whittaker, em 1969. Os organismos foram alocados em reinos com base na morfologia e no modo de nutrição dos seres vivos, sendo criado, então, o reino Fungi. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem dos **esporos** (reprodução sexuada) ou **conídios** (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfológicamente semelhantes a estas. Na maioria dos casos, o sistema vegetativo encontra-se no interior dos tecidos parasitados, no solo ou na matéria orgânica em decomposição. Com a formação dos esporos ou conídios, é necessário que estes tenham acesso livre ao ar, para assegurar sua disseminação. O ciclo de vida dos fungos compreende duas fases. Uma somática, caracterizada por atividades alimentares, e outra reprodutiva, onde os fungos podem realizar reprodução sexuada ou assexuada. Por causa da rigidez da parede celular, sua nutrição é por absorção de nutrientes solúveis simples. Os fungos são considerados seres cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta. A temperatura ideal para o crescimento dos fungos fica entre 0 a 35°C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 a 30°C, e a umidade ideal fica em torno da saturação.

Os fungos são usados como alimento propriamente dito; na indústria alimentícia, na produção de pães, queijos, cervejas e vinhos; na indústria farmacêutica e biotecnológica, para a fabricação de antibióticos, ácidos, pigmentos, enzimas, pesticidas biológicos, entre outros usos.

- Os fungos podem parasitar o homem e outros animais, causando um grupo de doenças conhecidas como micoses.

- As micoses podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com suas manifestações clínicas.
- As micoses superficiais são infecções causadas por fungos que invadem as camadas mais superficiais da capa córnea da pele ou a haste livre dos pelos.
- As micoses cutâneas se caracterizam por serem causadas por fungos que invadem toda a espessura da capa córnea da pele, a parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal.
- As micoses subcutâneas se caracterizam por resultar da inoculação de um fungo patogênico por ocasião de um traumatismo, em geral cortes por plantas ou pela manipulação do solo, manifestando-se como tumefação ou lesão supurada da pele ou do tecido subcutâneo, produto da disseminação do fungo por contiguidade ou por via linfática.
- As micoses sistêmicas são caracterizadas por serem adquiridas através de inalação de propágulos fúngicos, causando, conseqüentemente a lesão primária pulmonar. Desta forma, o fungo pode se disseminar pelo corpo através da corrente sanguínea, originando lesões extrapulmonares nos pacientes.
- As micoses oportunistas são causadas por fungos termotolerantes de baixa virulência que determinam doenças em hospedeiros com graves deficiências do sistema imunológico.
- O diagnóstico das micoses é realizado através da visualização do fungo nos espécimes clínicos (exame microscópico direto) e do seu cultivo em meios adequados. Provas imunológicas podem auxiliar no diagnóstico, fornecendo resultado presuntivo das infecções.

Questões

- 1) Cite as técnicas mais importantes para o isolamento de fungos de solo e de ar.
- 2) Em que situações podemos usar a técnica de diluição seriada?
- 3) Paciente portador do HIV fazendo uso de corticosteroides e que teve tuberculose pulmonar há três anos apresenta imagens radiológicas de tórax sugestivas de bola fúngica. Foi colhida uma amostra de escarro, a qual foi processada adequadamente. O exame microscópico direto apresentou hifas septadas e hialinas, ramificadas dicotomicamente. No cultivo, houve crescimento de uma colônia esverdeada, a qual, quando corada pelo lactofenol azul de algodão, apresentou conidióforo com vesícula alongada e fiálides distribuídas a partir da metade da vesícula, dando origem a longas cadeias de conídios globosos e equinulados. Com base nisso, responda:
 - a) Explique como deve ser realizado o processamento do espécime clínico em questão, antes que sejam realizados o exame direto e o cultivo do material.
 - b) Qual o agente etiológico desta micose?
 - c) Que testes imunológicos poderiam ser aplicados à doença que o paciente possui?
 - d) Uma pessoa saudável, sem uso de medicamentos, poderia adquirir esta infecção? Comente.

Referências Bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C. J. ; MIMS, C. W. ; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clinical and Vaccine Immunology*. v. 14, n. 9, p. 1149-1157, 2007.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. *Controle Microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ATTLI, S. D. *Importância e sistemática de fungos filamentosos*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa Tecnologia "André Tosello", 1990.
- CRESPO-ERCHIGA, V. ; GÓMEZ-MOYANO, E. ; CRESPO, M. *La pitiriasis versicolor y las levaduras del género Malassezia*. *Actas Dermo-Sifilográficas*. v. 99, n. 10, p. 764-771, 2008.
- CRUZ, L. C. H. *Micologia Veterinária*. Itaguaí: Imprensa Universitária, 1985.
- HAMILTON, A. J. *Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii: current status and future trends*. *Medical Mycology*. v. 36, n. 6, p. 351-364, 1998.
- HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. Londres, v.111, 2007.
- KIRK, P. M. *et al.* (eds). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2001.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.
- LAZÉRA, M. S. *et al.* *Criptococose*. In: Coura, J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- LOPES-BEZERRA, L. M. ; SCHUBACH, A. O. ; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.
- MOORE-LANDECKER, E. *Fundamentals of the Fungi*. 4. ed., New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1996.
- PUTZKE, J. ; PUTZKE, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos*. Vol. I. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.
- RIPPON, J. *Medical Mycology: The pathogenic fungus and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia: WB Saunders, 1988.

SILVEIRA, V. D. *Micologia*. 5. ed., Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1995.

VALLE, A. C. F. *et al.* *Micoses superficiais e cutâneas*. In: COURA, J. R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

WANKE, B. *et al.* Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's Northeastern State of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia*. v. 148, n. 2, p. 57-67, 1999.

WEITZMAN, I; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. ; MUNIZ, M. M. ; WANKE, B. *Histoplasmose*. In: Coura, J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.