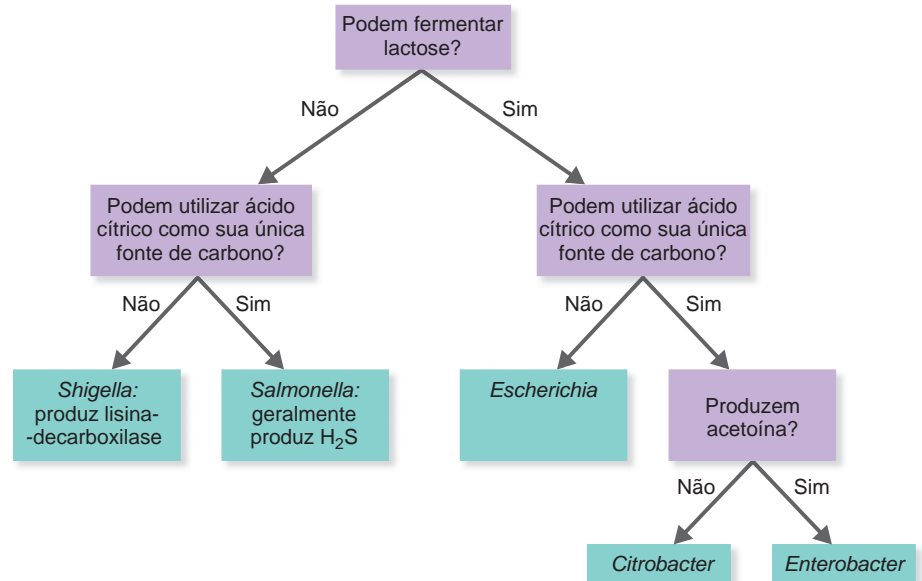


Figura 10.8 Utilização de características metabólicas para identificar gêneros selecionados de bactérias entéricas.

P Considere que você tem uma bactéria gram-negativa que produz ácido a partir de lactose e não pode utilizar o ácido cítrico como única fonte de carbono. Qual é essa bactéria?



dem diferir quanto às suas propriedades metabólicas ou fisiológicas podem parecer iguais. Literalmente centenas de espécies bacterianas são pequenos bastonetes ou pequenos cocos.

P&R Contudo, um tamanho maior ou a presença de estruturas intracelulares nem sempre significa uma classificação fácil. A pneumonia por *Pneumocystis* é a infecção oportunista mais comum em pacientes com Aids. Até a epidemia de Aids, o agente responsável por essa infecção, *P. jirovecii* (anteriormente conhecido como *P. carinii*), raramente era visto em seres humanos. *Pneumocystis* não possui estruturas que podem ser facilmente utilizadas para identificação (veja a Figura 24.20, página 698), e sua posição taxonômica tem sido incerta desde a sua descoberta em 1909 por Carlos Chagas em camundongos. Embora tenha sido classificado como um protozoário, estudos recentes comparando a sequência de seu rRNA com a de outros protozoários, *Euglena*, fungos celulares gelatinosos, plantas, mamíferos e fungos mostraram que *Pneumocystis* é na realidade um membro do Reino *Fungi*. Pesquisadores cultivaram *Pneumocystis* e desenvolveram alguns tratamentos úteis para a pneumonia causada por ele. Se os pesquisadores considerarem o parentesco desse organismo com os fungos, tratamentos apropriados serão obtidos.

A morfologia celular nos diz pouco sobre as relações filogenéticas. Contudo, as características ainda auxiliam na identificação de bactérias. Por exemplo, diferenças em estruturas como os endosporos ou os flagelos podem ser úteis.

Coloração diferencial

Relembre do Capítulo 3 que um dos primeiros passos para identificar bactérias é a coloração diferencial. A maioria das bactérias é gram-positiva ou gram-negativa. Outras colorações diferenciais, como a coloração ácido-álcool resistente, podem ser úteis para um grupo mais limitado de micro-organismos. Lembre-se de que essas colorações têm como base a composição química das paredes celulares e, portanto, não são úteis para as bactérias sem paredes ou para as arqueobactérias com paredes incomuns. O exame microscópico de

uma coloração de Gram ou de uma coloração ácido-álcool resistente é utilizado para obter informações rápidas no ambiente clínico.

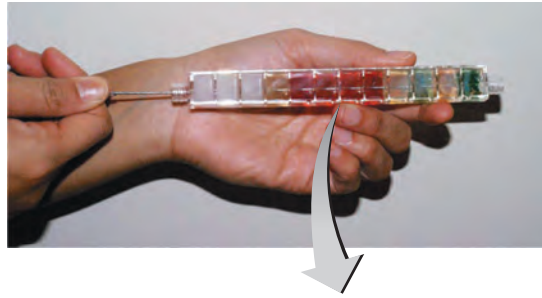
Testes bioquímicos

As atividades enzimáticas são amplamente utilizadas para diferenciar as bactérias. Mesmo bactérias intimamente relacionadas em geral podem ser separadas em espécies distintas após serem submetidas a testes bioquímicos, como a determinação da capacidade de fermentar um conjunto de carboidratos selecionados. Como um exemplo da utilização de testes bioquímicos para identificar bactérias (nesse caso, em mamíferos marinhos), veja o quadro na página 283. Além disso, os testes bioquímicos podem fornecer informações sobre o nicho da espécie no ecossistema. Por exemplo, uma bactéria que possa fixar o gás nitrogênio ou oxidar o enxofre elementar fornecerá nutrientes importantes para plantas e animais. Isso será discutido no Capítulo 27.

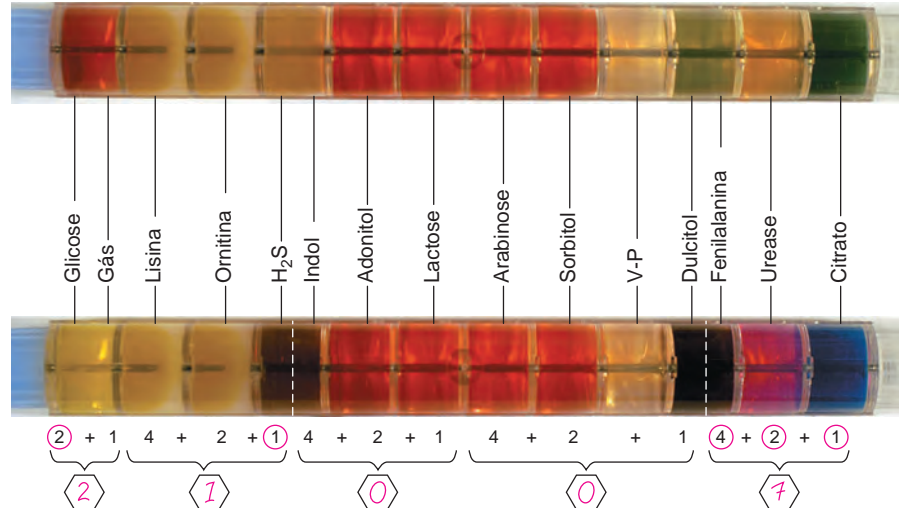
As bactérias gram-negativas entéricas são um grupo amplo e heterogêneo de micro-organismos cujo habitat natural é o trato intestinal de humanos e de outros animais. Essa família contém muitos patógenos que causam doenças diarreicas. Vários testes foram desenvolvidos para que os técnicos identifiquem rapidamente os patógenos, os médicos forneçam um tratamento apropriado e os epidemiologistas localizem a fonte da doença. Todos os membros da família *Enterobacteriaceae* são oxidase-negativos. Entre as bactérias entéricas estão membros dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Citrobacter* e *Salmonella*. *Escherichia*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, que podem fermentar a lactose para produzir ácido e gás, podem ser diferenciados de *Salmonella* e *Shigella*, que não podem. Outros testes bioquímicos, como mostrado na Figura 10.8, podem diferenciar os gêneros.

O tempo necessário para identificar bactérias pode ser reduzido consideravelmente com a utilização de meios seletivos e diferenciais ou métodos rápidos de identificação. Lembre-se do Capítulo 6 (página 168) que os meios seletivos contêm ingredientes que inibem o crescimento de organismos competidores e favorecem o

1 Um tubo contendo meio para 15 testes bioquímicos é inoculado com uma bactéria entérica desconhecida.



2 Após incubação, é feita a leitura dos resultados.



3 O valor para cada teste positivo é circulado, e os números de cada grupo de testes são somados para fornecerem o código numérico ID.

4 A comparação do código ID com uma lista de nomes computadorizada mostra que o organismo é *Proteus mirabilis*.

Código ID	Organismo	Resultados atípicos	Teste confirmatório
21006	<i>Proteus mirabilis</i>	Ornitina ⁻	Sacarose
21007	<i>Proteus mirabilis</i>	Ornitina ⁻	
21020	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Lisina ⁻	

Figura 10.9 Tipo de método de identificação rápida para bactérias: Enterotubo II da Becton Dickinson. Este exemplo mostra os resultados para uma linhagem típica de *P. mirabilis*; contudo, outras linhagens podem produzir resultados diferentes para os testes que estão listados na coluna de Resultados Atípicos. O teste V-P é utilizado para confirmar uma identificação.

P Como uma espécie pode ter dois códigos ID diferentes?

crescimento dos organismos de interesse, e os meios diferenciais permitem que o micro-organismo desejado forme uma colônia que pode ser distinguida.

O *Bergey's Manual* não avalia a importância relativa de cada teste bioquímico e não descreve sempre as linhagens. Ao diagnosticar uma infecção, o médico deve identificar uma espécie em particular e até uma linhagem específica para prosseguir com o tratamento apropriado. Para isso, séries específicas de testes bioquímicos foram desenvolvidas para a identificação rápida em laboratórios hospitalares. Sistemas de testes rápidos foram desenvolvidos para leveduras e outros fungos, assim como para bactérias.

Métodos rápidos de identificação são produzidos para grupos de bactérias de importância médica, como as entéricas. Tais

ferramentas são projetadas para realizar vários testes bioquímicos simultaneamente e podem identificar bactérias em 4 a 24 horas. Isso algumas vezes é chamado de **identificação numérica** porque os resultados de cada teste correspondem a um número. Na forma mais simples, a um teste positivo pode ser dado o valor 1 e a um teste negativo, o valor 0. Na maioria dos kits comerciais de testes, os resultados correspondem a números na faixa de 1 a 4, com base na confiabilidade e importância relativa de cada teste, e o resultado total é comparado com um banco de dados de organismos conhecidos.

No exemplo mostrado na **Figura 10.9**, uma bactéria entérica desconhecida é inoculada em um tubo projetado para realizar 15 testes bioquímicos. Após incubação, os resultados em cada compartimento são registrados. Observe que para cada resultado é de-

Figura 10.10 Um teste de aglutinação em lâmina. (a) Em um teste positivo, a aparência granulada se deve ao agrupamento (aglutinação) de bactérias. (b) Em um teste negativo, as bactérias ainda estão distribuídas de maneira homogênea em salina e antissoro.

P A aglutinação ocorre quando as bactérias são misturadas com _____.

signado um valor; o número resultante da soma de todos os testes é chamado de código ID. A fermentação da glicose é importante, e para uma reação positiva é dado o valor 2, em comparação com a produção de acetoina (teste V-P, ou teste de Voges-Proskauer), que não tem valor.

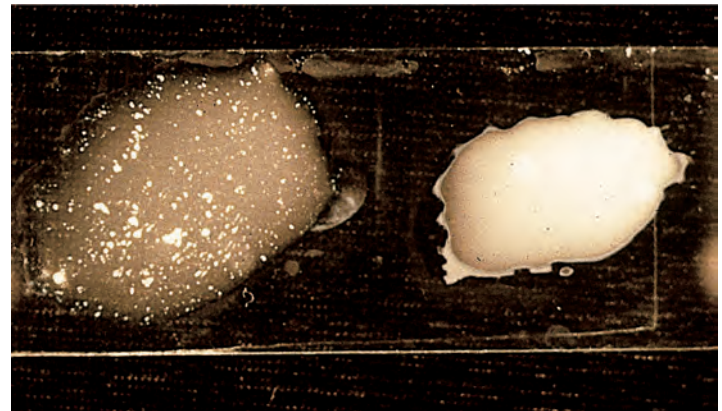
Uma interpretação computadorizada dos resultados simultâneos dos testes é essencial e é fornecida pelo fabricante. Uma limitação dos testes bioquímicos é que as mutações e a aquisição de plasmídeos podem resultar em linhagens com características diferentes. A menos que um grande número de testes seja utilizado, um organismo pode ser identificado de maneira incorreta.

Sorologia

A **sorologia** é a ciência que estuda o soro e as respostas imunológicas que são evidenciadas no soro (veja o Capítulo 18). Os micro-organismos são antigênicos; ou seja, aqueles que entram no corpo animal estimulam a formação de anticorpos. Os anticorpos são proteínas que circulam no sangue e se combinam de maneira altamente específica com as bactérias que causaram a sua produção. Por exemplo, o sistema imune de um coelho inoculado com as bactérias mortas da febre tifoide (antígeno) responde com a produção de anticorpos contra as bactérias da tifoide. Soluções de tais anticorpos utilizadas para identificar muitos micro-organismos de importância médica estão disponíveis comercialmente; essa solução é chamada de **antissoro**. Se uma bactéria desconhecida é isolada de um paciente, ela pode ser testada com um antissoro conhecido e com frequência é identificada rapidamente.

Em um procedimento chamado de **teste de aglutinação em lâmina**, amostras de uma bactéria desconhecida são colocadas em uma gota de solução salina em várias lâminas. A seguir, diferentes antissoros conhecidos são adicionados a cada amostra. As bactérias aglutinam (agregam) quando misturadas com anticorpos que são produzidos em resposta a essa espécie ou linhagem de bactéria; um teste positivo é indicado pela presença de aglutinação. Testes de aglutinação em lâmina positivos e negativos são mostrados na **Figura 10.10**.

Os **testes sorológicos** podem diferenciar não somente espécies microbianas, mas também linhagens dentro de uma espécie. As linhagens com antígenos diferentes são chamadas de **sorotipos**, **sorovares** ou **biovares**. Veja a discussão sobre sorovares de *Escherichia* e *Salmonella* na página 310. Como mencionado no Capítulo 1, Rebecca Lancefield foi capaz de classificar os sorotipos dos estreptococos pelo estudo de suas reações sorológicas. Ela descobriu que os diferentes antígenos nas paredes celulares de vários sorotipos de estreptococos estimulam a formação de diferentes anticorpos. Por outro lado, como bactérias intimamente relacionadas produzem alguns dos mesmos antígenos, os testes sorológicos podem ser uti-



(a) Teste positivo

(b) Teste negativo

lizados para triagem de isolados bacterianos pelas possíveis similaridades. Se um antissoro reage com as proteínas de diferentes espécies ou linhagens bacterianas, essas bactérias podem ser testadas posteriormente para outras similaridades.

O teste sorológico foi utilizado para determinar se o aumento no número de casos de fasciite necrosante nos Estados Unidos e na Inglaterra desde 1987 era devido a uma fonte comum de infecção. Nenhuma fonte comum foi encontrada, mas houve um aumento nos dois sorotipos de *Streptococcus pyogenes*, que foram denominadas bactérias “comedoras de carne”.

Um teste chamado de **imunoensaio enzimático (ELISA, de enzyme-linked immunosorbent assay)** é amplamente utilizado porque é rápido e pode ser lido por um computador (**Figura 10.11**; veja também a Figura 18.14, página 518). Em um ELISA direto, anticorpos conhecidos são colocados em canaletas de uma microplaca, e um tipo desconhecido de bactéria é adicionado a cada canaleta. A reação entre os anticorpos conhecidos e as bactérias fornece uma identificação das bactérias. Um ELISA é utilizado no diagnóstico de Aids para detectar a presença de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus que causa a Aids (veja a Figura 19.13, página 540).

Outro teste sorológico, o **Western blotting**, é utilizado para identificar anticorpos no soro de um paciente (**Figura 10.12**). A infecção por HIV é confirmada pelo *Western blotting*, e a doença de Lyme, causada por *Borrelia burgdorferi*, frequentemente é diagnosticada por *Western blot*.

- 1 Proteínas de uma bactéria ou vírus conhecido são separadas por uma corrente elétrica em uma eletroforese.
- 2 As proteínas são a seguir transferidas para um filtro por uma corrente elétrica.
- 3 O soro do paciente é lavado sobre o filtro. Se o paciente tiver anticorpos para uma das proteínas do filtro (nesse caso, proteínas de *Borrelia*), os anticorpos e as proteínas combinarão. Um soro anti-humano ligado a uma enzima é a seguir lavado sobre o filtro.
- 4 Isso será visualizado como uma banda colorida sobre o filtro após adição do substrato de enzima.