

# MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 6: Detecção e Identificação de Bactérias de  
Importância Médica





**MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA  
O CONTROLE DE INFECÇÃO  
RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

Módulo 6: Detecção e Identificação e  
Bactérias de Importância Médica

Copyright © 2013 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

A Anvisa, igualmente, não se responsabiliza pelas idéias contidas nessa publicação.

1ª edição – 2010

*Elaboração, distribuição e informações:*

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

*Diretoria*

Dirceu Brás Aparecido Barbano – Diretor-Presidente

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

*Adjuntos de Diretor*

Luiz Roberto Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araujo de Oliveira

Doriane Patricia Ferraz de Souza

*Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTES*

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

*Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde – GVIMS*

Magda Machado de Miranda Costa

*Coordenação Técnica:*

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos – Anvisa

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas-SP

*Redação:*

Ana Carolina Ramos Moreno – Universidade de São Paulo(USP)-SP

Ana Luíza de Mattos Guaraldi – Universidade do Estado do Rio de Janeiro(UERJ)-RJ

Ângela Von Nowakowski – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Carla Taddei de Castro Neves – Universidade de São Paulo(USP)-SP

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Doroti de Oliveira Garcia – Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP

Elsa Masae Mamizuka – Universidade de São Paulo(USP)-SP

John Anthony McCulloch – Universidade de São Paulo(USP)-SP

Lycia M. Jenne Mimica – Santa Casa de São Paulo-SP

Marina Baquerizo Martinez – Universidade de São Paulo(USP)-SP

Tânia Mara Ibelli Vaz – Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP

*Revisão técnica – Anvisa:*

André Anderson Carvalho

Fabiana Cristina de Sousa

Heiko Thereza Santana

Magda Machado de Miranda

Suzie Marie Gomes

*Cooperação técnica:*

Termo de Cooperação nº 64

Organização Pan-Americana da Saúde

Organização Mundial da Saúde

Representação Brasil

Joaquin Molina – Representante

Enrique Vazquez – Coordenador da Unidade Técnica de Doenças

Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação de Saúde

Rogério da Silva Lima – Consultor Nacional da Unidade Técnica de

Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis e Análise de Situação

de Saúde

*Projeto Gráfico e Diagramação:*

All Type Assessoria Editorial Ltda

*Capa:*

Camila Contarato Burns – Anvisa

### Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

150p.: il.9 volumes

ISBN

1. Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Título.

# SUMÁRIO

<b>Capítulo 1: Estafilococos, Streptococos, Enterococos e outros.....</b>	<b>7</b>
1.1 Introdução.....	7
1.2 Identificação de estafilococos.....	13
1.3 Identificação dos <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
<b>Capítulo 2: Neisserias .....</b>	<b>23</b>
2.1 Introdução.....	23
2.2 Isolamento.....	26
2.3 Transporte e semeadura do material.....	28
2.4 Bacterioscopia e identificação .....	29
<b>Capítulo 3: Enterobactérias .....</b>	<b>35</b>
3.1 Introdução: .....	35
3.2 Tipos de testes utilizados .....	37
3.3 Etapas da identificação de enterobactérias.....	41
3.4 Identificação das enterobactérias de importância clínica .....	43
3.5 Identificação sorológica .....	53
<b>Capítulo 4: Bastonetes Gram-Negativos Não Fermentadores .....</b>	<b>59</b>
4.1 Introdução.....	59
4.2 Semeadura, leitura e interpretação das provas de identificação utilizadas na triagem inicial.....	61
4.3 Testes necessários para a identificação bioquímica dos BNFs após a triagem inicial.....	62
4.4 Procedimentos para a identificação bioquímica dos BNFs.....	64
<b>Capítulo 5: Bacilos Curvos ou Espiralados e outros Relacionados de Importância Clínica .....</b>	<b>75</b>
5.1 Introdução.....	75
5.2 <i>Campylobacter</i> .....	77
5.3 <i>Vibrios</i> , <i>aeromonas</i> e <i>plesiomonas</i> .....	78
<b>Capítulo 6: Bacilos Gram Positivos .....</b>	<b>83</b>
6.1 Introdução.....	83
6.2 Orientação geral para a identificação de BGPs.....	83
6.3 Corineformes .....	86
6.4 Bacilos gram-positivos regulares.....	95
6.6 Bacilos gram-positivos anaeróbios que devem ser diferenciados.....	97
6.7 Bacilos esporulados aeróbios e anaeróbios facultativos .....	97

**Capítulo 7: Fastidiosos ..... 109**

7.1	Introdução .....	109
7.2	<i>Bartonella</i> .....	113
7.3	<i>Bordetella</i> sp.....	115
7.4	<i>Brucella</i> sp.....	116
7.5	<i>Francisella tularensis</i> .....	118
7.6	<i>Haemophilus</i> sp.....	120
7.7	<i>Legionella</i> sp.....	123
7.8	<i>Pasteurella</i> sp. ....	125
7.9	<i>Actinobacillus</i> sp. ....	127
7.10	<i>Capnocytophaga</i> sp.....	128
7.11	<i>Eikenella</i> sp. ....	129
7.12	<i>Kingella</i> sp.....	129
7.13	<i>Cardiobacterium hominis</i> .....	130
7.14	<i>Chromobacterium violaceum</i> .....	131
7.15	<i>Streptobacillus moniliformis</i> .....	131

**Capítulo 8: Bactérias Anaeróbias Estritas ..... 135**

8.1	Introdução .....	135
8.2	Coleta de material.....	138
8.4	Processamento do material.....	140
8.5	Identificação bacteriana .....	143
8.6	Provas de sensibilidade a antimicrobianos .....	147

## APRESENTAÇÃO

A resistência microbiana é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência microbiana.

Nesse contexto, insere-se o Laboratório de Microbiologia, que tem como objetivo não apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas também indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos micro-organismos que estão interagindo com o organismo humano, possibilitando a indicação de tratamentos mais adequados. Para o desempenho satisfatório dessa função, é fundamental que os laboratórios de microbiologia possuam estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota e os contaminantes, identificar micro-organismos associados à infecção ou com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, realizar o transporte rápido das amostras e manter uma educação contínua em relação aos aspectos da infecção relacionada à assistência à saúde.

Tendo em vista esses aspectos e considerando que a microbiologia é um campo muito dinâmico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, em cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, propõe a terceira revisão do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, buscando atualizar informações nos temas considerados essenciais e contando com um seleto e conceituado corpo editorial. O manual é composto por nove módulos, a saber: Módulo 1 – Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica; Módulo 2 – Controle externo da qualidade; Módulo 3 – Principais Síndromes Infecciosas; Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final; Módulo 5 – Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos; Módulo 6 – Detecção e identificação de bactérias de importância médica; Módulo 7 – Detecção e identificação de micobactérias de importância médica; Módulo 8 – Detecção e identificação de fungos de importância médica e Módulo 9 – Infecções virais.

A Anvisa e a OPAS esperam com essa publicação contribuir para que os laboratórios de microbiologia possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada unidade hospitalar, além de subsidiar a adoção de procedimentos básicos padronizados nesses serviços.



## Capítulo 1:

### *Estafilococos, Estreptococos, Enterococos e outros*

*Ângela Von Nowakonski  
Elsa Masae Mamizuka*

## 1.1 Introdução

### 1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Os Estafilococos são cocos Gram-positivos não esporulados que mais resistem no meio ambiente. Podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, são relativamente resistentes ao calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal. No entanto, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção relacionada à assistência à saúde, esse micro-organismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos sadios são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, e podem albergar o micro-organismo na nasofaringe, ocasionalmente na pele e raramente na vagina. A partir desses sítios, o *S. aureus* pode contaminar a pele e membranas mucosas do paciente, objetos inanimados ou outros pacientes por contato direto ou por aerossol, ocasionando infecções letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados. Já foram descritos no Brasil casos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida aos antibióticos mais potentes como a Vancomicina, e relatos da capacidade que os *Staphylococcus* coagulase negativa têm de desenvolver resistência. Recentemente tem sido relatada a emergência de *Staphylococcus aureus* associado a infecções na comunidade com resistência a oxacilina, (ORSA-AC), porém sensível à maioria das classes de antibióticos, exceto a beta-lactâmicos, representados por penicilinas e cefalosporinas, contrapondo ao ORSA hospitalar que é multirresistente. Tal emergência vem preocupando, pois essas linhagens são conhecidas por apresentarem fatores de virulência como a citotoxina, denominada leucocidina de Pantón Valentine, associados principalmente a lesões de pele e mucosas e às pneumo-

nias necrotizantes graves. Esse tipo de pneumonia caracteriza-se por quadros clínicos graves com infiltrado alveolar multilobar, diferente de pneumonias hospitalares que evoluem para empiema. A mortalidade é muito mais elevada nos casos de pneumonia necrotizante e o achado de acometimento bilateral do parênquima, associado à hemorragia necrotizante é comum nesses casos. Alguns autores têm notado uma substituição das linhagens hospitalares tradicionais por essa linhagem ORSA-AC. A emergência de ORSA-AC foi observada em vários países por métodos moleculares que possibilitou a identificação do ORSA-AC, por meio da caracterização do gene *mecA*, como cassete cromossômico tipo IV ou SCCmec tipo IV, devido ao seu baixo peso molecular com taxa de replicação mais rápida, conferindo vantagens de disseminação dessas linhagens. Recente estudo realizado em nosso meio mostrou que os fatores de risco relacionados com a aquisição de ORSA-AC foram crianças menores de um ano, menor número de doenças de base e menor frequência de uso de antibióticos e realização de procedimentos cirúrgicos (Marques 2007).

### 1.1.2 Estafilococos coagulase negativos

Os estafilococos coagulase-negativa (ECN) são habitantes normais da pele e membranas mucosas de humanos e geralmente possuem um relacionamento benigno ou simbiótico com seu hospedeiro. No entanto, adquirem potencial patogênico se tiverem acesso ao tecido do hospedeiro através de trauma da barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implante de materiais médicos (próteses, cateteres, válvulas cardíacas, marcapassos, etc.) (HEIKENS, 2005). Um dos maiores problemas enfrentados pelo laboratório de microbiologia clínica e pelos médicos envolvendo os ECN está na dificuldade em distinguir isolados significantes (patogênicos) de isolados contaminantes, já que o principal contaminante dos frascos de hemocultura é também o principal patógeno em infecções envolvendo cateter e outros materiais médicos implantados (EIFF, 1998).

Vários critérios têm sido utilizados na tentativa de diferenciar bacteremia clinicamente significativa causada por ECN e contaminação de hemoculturas. Esses critérios incluem, entre outros, combinações de achados clínicos, fonte da amostra de sangue (amostras de sangue periférico x amostras obtidas de cateter), e, principalmente, o número de culturas positivas. No entanto, investigações recentes utilizando técnicas de tipagem molecular revelaram que 33% de aparentes infecções da corrente circulatória causadas por ECN diagnosticadas tendo como base o número de hemoculturas positivas revelaram isolados não relacionados (OUD, 1999). Outra alternativa utilizada para avaliar a importância clínica dos ECN é a identificação das espécies desses isolados, a qual deve ser rápida e confiável a fim de prever o mais precocemente possível o potencial patogênico e a sensibilidade aos antimicrobianos.

crobianos de cada isolado e esclarecer o significado clínico de cada espécie (COUTO, 2001). No entanto, essa identificação continua problemática para os laboratórios de microbiologia clínica pela necessidade de uma grande variedade de provas bioquímicas, as quais muitas vezes fornecem resultados não confiáveis para os ECN (CARRETO, 2005).

### 1.1.3 Estreptococos e Enterococos

Os estreptococos foram os maiores causadores de infecção relacionada à assistência à saúde na era pré-antibiótica, causando surtos de infecção e morte de puérperas. Apesar de não serem atualmente uma importante causa de infecção relacionada à assistência à saúde, provocam, no entanto, doenças muito graves e muitas vezes letais, mesmo em pacientes imunocompetentes, sendo importante o rápido diagnóstico desse agente. Já os enterococos apresentam importância crescente como causadores de infecção relacionada à assistência à saúde, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento dessas infecções. Os Enterococos mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium*, com grande capacidade de colonização de pacientes e de contaminarem superfícies ou equipamentos utilizados em hospitais. Possuem sensibilidade ou resistência variável aos antibióticos chamados glicopeptídios como a vancomicina e teicoplanina. O emprego de muitos antibióticos ou classes de antibióticos tem sido associado à infecção ou colonização por enterococos resistentes a vancomicina – ERV em estudos clínicos, incluindo cefalosporinas de espectro ampliado e agentes com potente atividade contra bactérias anaeróbias. Enterococcus resistentes à vancomicina (ERV) são um problema global e têm sido isolados com alta frequência nos hospitais brasileiros. A maioria dos ERV são *E. faecium* fenótipo VanA (EVRFM), porém existe um clone específico de *E. faecalis* fenótipo VanA (EVRFS) que tem se disseminado rapidamente em vários hospitais do país. Fatores de virulência de *E. faecalis* e *E. faecium* que influenciam na relação parasita/hospedeiro têm sido descritos.

Existem, atualmente, cepas comensais naturalmente resistentes a vancomicina e que podem ser isoladas de pacientes internados, porém excepcionalmente capazes de causar surtos, mas que devem ser corretamente identificadas.

### 1.1.4 Identificação preliminar

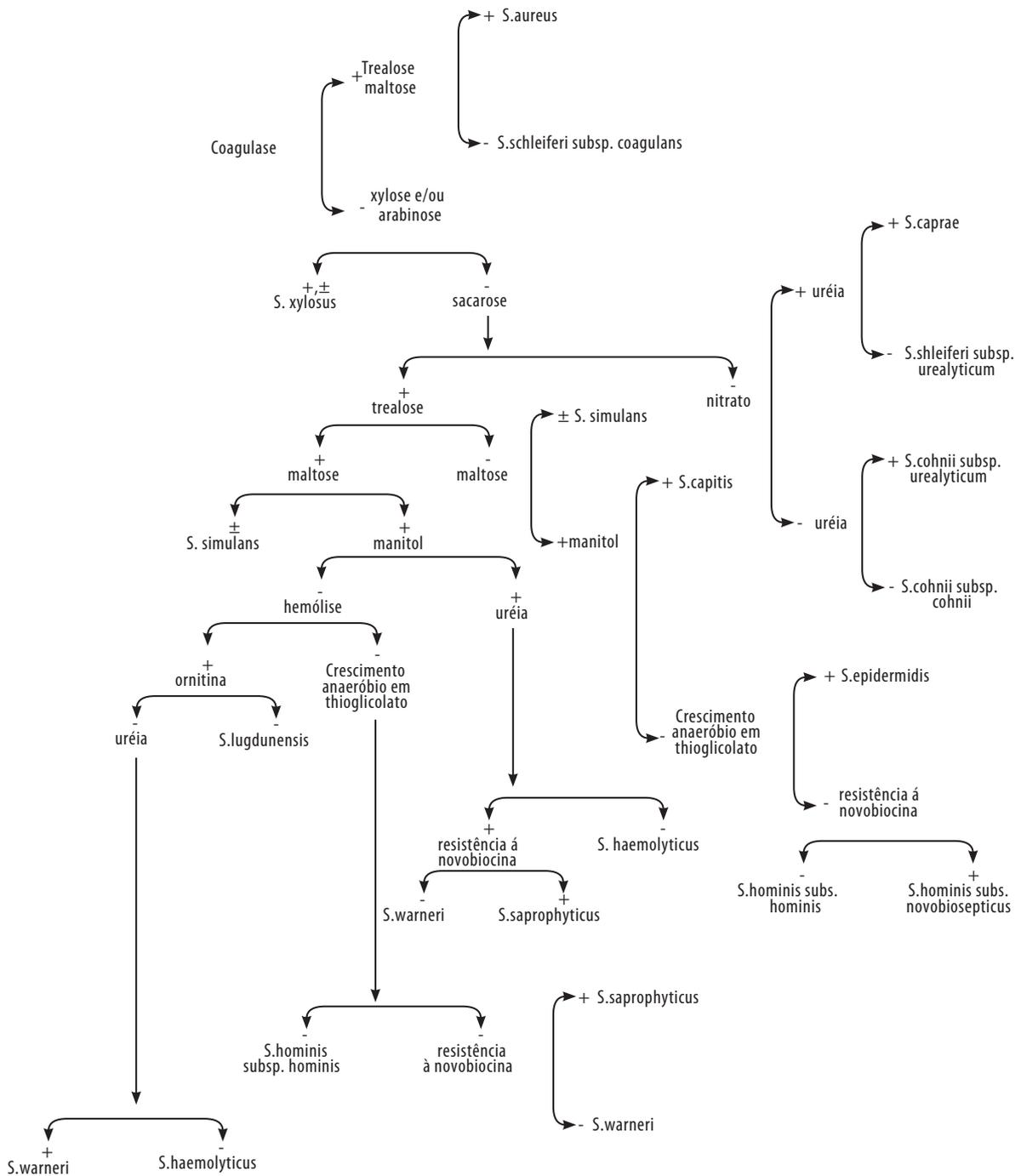
A identificação dos estreptococos e estafilococos é baseada na morfologia que apresentam em meios líquidos, sendo o estreptococo uma cadeia normalmente longa e os estafilococos mostrando-se em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados.

A identificação presuntiva começa com a inoculação primária na placa de ágar sangue de carneiro que deve ser incubada em 5% de tensão de CO<sub>2</sub> (método da vela ou estufa de CO<sub>2</sub>). As colônias de estafilococos são geralmente maiores, convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo podendo apresentar hemólise ou não. Note-se que o desenvolvimento da cor amarelada no *S.aureus* ocorre somente após incubação prolongada (72 horas), à temperatura ambiente. As colônias de estreptococos tendem a ser menores (puntiformes), e com halos de hemólise total ou parcial (beta e alfa hemólise). A diferenciação entre os estreptococos e os estafilococos se dá, seguramente, pela prova da catalase.

#### A) Prova da catalase

- Com a alça bacteriológica ou com um palito coleta-se o centro de uma colônia suspeita e esfrega-se em uma lamina de vidro. Colocar sobre esse esfregaço uma gota de água oxigenada a 3% e observar a formação de bolhas. Para a família Staphylococcaceae (estafilococos) a prova é geralmente positiva, enquanto que para a família Streptococcaceae (estreptococos) é negativa.

Esquema simplificado para identificação das espécies do gênero *Staphylococcus* spp. (Adaptado de Terasawa 2006)



### 1.1.5 Divisão dos cocos Gram-positivos pela prova da catalase

Catalase positivos	Catalase negativos
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Planococcus</i> spp.	<i>Aerococcus</i> spp.
<i>Stomatococcus</i> spp.	<i>Gemella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Stomatococcus</i> spp.

Ao coletar a colônia, não carregar meio de cultura (ágar sangue), que pode acarretar resultados falso-positivos porque o sangue do meio contém catalase. Algumas cepas de enterococos podem dar falsa reação positiva (fazer Gram e ver disposição em cadeias curtas ou aos pares).

Identificação simplificada dos cocos Gram-positivos de importância clínica						
Gênero	Catalase	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	Tétrade
<i>Staphylococcus</i>	+	neg	+	neg	não	variável
<i>Planococcus</i>	+	+	+	neg	+	variável
<i>Micrococcus</i>	+	neg	+	+	variável	variável
<i>Enterococcus</i>	neg	variável	+	neg	não	não
<i>Streptococcus</i>	neg	neg	variável	neg	não	não
<i>Aerococcus</i>	neg	neg	+	neg	não	+
<i>Stomatococcus</i>	variável	neg	neg	neg	não	variável
<i>Kocuria</i>	+	neg	+	+	variável	+

\* aderente ao meio

Cocos Gram-positivos, Catalase negativa, Motilidade Negativa <sup>1</sup>					
Gênero	NaCl 5%	Vancomicina	PYR	Bile Esculina	Tétrade
<i>Enterococcus</i>	+	variável	+	+	não
<i>Streptococcus</i>	neg	sensível	neg <sup>2</sup>	neg <sup>3</sup>	não
<i>Aerococcus</i>	+	sensível	variável	variável	variável
<i>Leuconostoc</i>	variável	resistente	neg	variável	não
<i>Pediococcus</i>	variável	resistente	neg	+	variável
<i>Gemella</i>	neg	sensível	+	neg	não
<i>Rothia mucilaginosa</i> <sup>4</sup>	neg	sensível	+	+	variável

<sup>1</sup> *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* são positivos

<sup>2</sup> *S. pyogenes* é positivo

<sup>3</sup> alguns *S. viridans* podem ser positivos

<sup>4</sup> catalase fracamente positiva

## 1.2 Identificação de estafilococos

Os *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*. O gênero *Staphylococcus* apresenta 32 espécies, 14 subespécies, sendo que somente 15 espécies são encontradas em amostras humanas, e, de uma maneira prática, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos de acordo com a resposta ao teste da plasmogelase.

O teste mais importante na identificação da família *Staphylococcaceae* é a prova da catalase, mas também compartilhada por gêneros de cocos Gram-positivos relacionados: *Micrococcus*, *Planococcus*, *Alloiococcus* (catalase variável), *Rothia mucilaginosa* (catalase variável) e *Kocuria kristinae*, pouco isolados e de pouca importância clínica, mas que podem ser diferenciados dos *Staphylococcus* pelo teste da bacitracina com disco de 0,04 UI: *Micrococcus*=sensível e *Staphylococcus*=resistente.

### 1.2.1 Provas diferenciais dos Gêneros Catalase positivos ou variáveis

Gênero	Motilidade	NaCl 6,5%	Oxidase	Catalase
<i>Staphylococcus</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Macrococcus</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Planococcus</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Alloiococcus</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Variável
<i>Rothia mucilaginosa</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Variável
<i>Micrococcus</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Kocuria kristinae</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

\* OBs. Apenas *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus* são catalase negativos, os demais são positivos

Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> de maior importância clínica						
Espécie	DNase	PYR	Novobiocina	Ureia	Polimixina	Outras
<i>S. aureus</i>	+	neg	sensível	variável	resistente	pig.amarelo
<i>S. epidermidis</i>	neg	neg	sensível	+	resistente	
<i>S. lugdunensis</i>	neg	+	sensível	variável	variável	Ornitina +
<i>S. haemolyticus</i>	neg	+	sensível	neg	sensível	Ornitina neg
<i>S. saprophyticus</i>	neg	neg	resistente	+	sensível	isolado em urina
<i>S. schleiferi</i>	neg	+	sensível	neg	sensível	Sacarose neg
<i>S. intermedius</i>	+	+	sensível	+	sensível	
<i>S. hyicus</i>	+	neg	sensível	variável	resistente	
<i>S. hominis</i>	neg	neg	sensível	+	variável	
<i>S. capitis</i>	neg	neg	sensível	neg	neg	
<i>S. cohnii</i>	neg	neg	sensível	neg	neg	

Obs. Veja esquema completo em Iorio et al 2007

Existem cerca de 31 espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa conhecidas, das quais as mais frequentes são:

- *Staphylococcus epidermidis* – causador de infecções de cateteres e próteses e o mais frequente micro-organismo encontrado em hemoculturas.
- *Staphylococcus saprophyticus* – causador de infecção urinária em mulheres jovens.
- *Staphylococcus haemolyticus* – importante devido à resistência aumentada aos antimicrobianos, e por ser comumente confundido com o *S. aureus*, pois apresenta hemólise na placa de ágar sangue de carneiro.

### 1.2.2 Teste da resistência a novobiocina

A cepa é semeada de maneira semelhante ao antibiograma em placa de Muller Hinton acrescida de um disco teste de novobiocina contendo 5 µg. As amostras resistentes mostram zonas de inibição de 6 a 12 mm, enquanto as susceptíveis apresentam halos de 16 mm ou mais. As cepas de *Staphylococcus saprophyticus* são resistentes.

### 1.2.3 Testes da Trealose, Urease e Novobiocina

Espécies	Trealose	Urease	Novobiocina
<i>S. epidermidis</i>	Negativo	Positivo	Sensível
<i>S. haemolyticus</i>	Positivo	Negativo	Sensível
<i>S. saprophyticus</i>	Positivo	Positivo	Resistente

## 1.3 Identificação dos *Staphylococcus aureus*

A forma mais simples de identificar o *Staphylococcus aureus* é a prova da coagulase que pode ser efetuada em tubo ou em lâmina.

### 1.3.1 Teste da coagulase em lâmina

A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante) “clumping factor” na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma causando a coagulação do mesmo.

- Colocar 2 gotas de salina em uma lâmina.
- Emulsionar uma colônia isolada a ser testada.
- Colocar uma gota de plasma e misturar com um palito de plástico ou de madeira.
- Observar se há aglutinação em 10 segundos.

Não se pode executar esse teste a partir de um ágar com grande concentração de sal como ágar manitol.

### 1.3.2 Teste da coagulase em tubo

Esse teste baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. O teste é melhor efetuado se:

- Adicionar 0,1 mL de caldo BHI, incubado por uma noite, com colônia suspeita a um tubo de ensaio com 0,5 mL de plasma.
- Incubar por 4 horas à 35°C em estufa ou banho maria.
- A formação do coágulo é observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90 graus da vertical.

Um método alternativo é a emulsificação dessa mesma colônia suspeita em um 0,5 plasma e incubado da mesma forma. Qualquer coágulo indica uma prova positiva, porém não confundir com precipitados ou floculação. O melhor plasma a ser usado é o de coelho com EDTA, não devendo ser usado o plasma humano vindo do banco de sangue.

### 1.3.3 Teste da DNase

Esse teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA, (DNAse test Ágar) obtido comercialmente.

- Adicionar ao meio original azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%. o meio adquire uma coloração azul intensa.
- Incubar a 35°C por 24 horas.
- Uma coloração rósea característica ao redor das colônias produtoras de DNase indica a positividade da prova.

O meio adicionado com corante demonstra uma melhor facilidade na leitura, e permite o repique da amostra positiva para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, evitando que se retorne à placa original onde nem sempre as colônias estão bem isoladas.

### 1.3.4 Teste da endonuclease

- Teste da endonuclease termoestável é efetuado no mesmo meio de DNA.
- Ferver o caldo de cultura com a bactéria suspeita por 15 minutos.
- Fazer pequenos orifícios no meio (em placa) utilizando canudos de refrigerante.
- Colocar ao meio de DNA gotas de caldo de cultura turvo com a colônia suspeita.
- A leitura do teste é semelhante ao da DNase.

Note que esse método pode ser efetuado a partir de caldo de hemocultura em que foi observado o crescimento de cocos Gram-positivos agrupados.

### 1.3.5 Outras provas que diferenciam o *Staphylococcus aureus*

Aglutinação em látex ou em hemácias de carneiro (sorologia). Esses testes geralmente detectam a coagulase livre e alguns apresentam também uma imunoglobulina antiproteína A presente da parede do *Staphylococcus aureus*. Como são disponíveis comercialmente, deve-se seguir as instruções do fabricante.

### 1.3.6 Teste do crescimento em ágar manitol

O *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5 % de cloreto de sódio, denominado ágar manitol salgado ou Meio de Chapman. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado.

### 1.3.7 Identificação de outros gêneros

A diferenciação entre *Micrococcus* sp. e os *Staphylococcus* sp. se dá pela coloração de Gram, em que os *Micrococcus* aparecem em tétrades, ou pela pigmentação de suas colônias (amarelas, róseas ou alaranjadas). Alguns não apresentam pigmentos e podem ser diferenciados pela sensibilidade a Bacitracina 0,004 UI, a mesma utilizada na identificação de *Streptococcus pyogenes*, mas utilizando-se a inoculação em ágar Mueller Hinton.

### 1.3.8 Identificação dos estreptococos

Os estreptococos podem ser diferenciados de acordo com sua aparência na placa de ágar sangue após incubação a 35°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>, podendo apresentar: hemólise total (beta), parcial (alfa, de cor esverdeada) ou nenhuma (gama).

A identificação de espécie de estreptococos beta hemolíticos é feita através de aglutinação com soros específicos contra os antígenos de Lancefield (A, B, C, D, F e G), que constitui uma prova rápida, porém não acessível a todos os laboratórios em virtude do elevado custo.

### 1.3.9 Teste da bacitracina

É importante notar que as identificações devem ser feitas em ágar sangue sem tensão de CO<sub>2</sub> ou os resultados podem ser conflitantes.

- Semear meia placa de ágar sangue com o estreptococo a ser identificado, como para um antibiograma.
- Colocar o disco de bacitracina 0,004 UI como indicado.

- Incubar por uma noite a 35°C sem CO<sub>2</sub>.
- Observar qualquer zona de inibição como resultado de sensibilidade. O *Streptococcus pyogenes* (grupo A) é assim rapidamente identificado.

### 1.3.10 Teste do Sulfametoxazol Trimetoprim (SXT)

- Adicionar na mesma placa de ágar sangue o disco de SXT.
- Incubar por uma noite a 35°C sem CO<sub>2</sub>.
- A sensibilidade a essa droga significa, em conjunto com as outras leituras, que o estreptococo não pertence ao grupo A, B ou D de Lancefield.
- Colocar um disco de Bacitracina 0,004 UI à direita e um de Sulfametoxazol-trimetoprim à esquerda.
- Havendo necessidade, pode ser feito o teste de CAMP na mesma placa, conforme desenho abaixo.

#### A) Teste de CAMP (NA MESMA PLACA)

- Inocular uma estria única de uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtor de beta lisina (ATCC 25923) no centro de uma placa de ágar sangue preparada obrigatoriamente com sangue de carneiro. (Essa linhagem de *S. aureus* deve ser mantida continuamente em estoque).
- Inocular as amostras a serem testadas em estrias formando um ângulo reto com a linha de inoculação da amostra teste de estafilococo. As estrias não devem se tocar, ficando a 1 mm de distância, e desse modo várias amostras podem ser testadas em uma mesma placa de ágar sangue. A maneira de inocular é fundamental para a observação do efeito esperado.
- Incubar a placa a 35-37°C durante um período de 18-24 horas.
- A positividade da prova, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), é evidenciada pelo alargamento da zona de lise, que adquire a forma de ponta de flecha característica, na área de intersecção entre as duas estrias.
- Se o teste de CAMP não resultar em uma flecha, mas numa figura semelhante a uma cabeça de fósforo, refazer o teste de catalase e em caso positivo verificar as provas para identificação de *Listeria* sp.

#### B) Teste do PYR

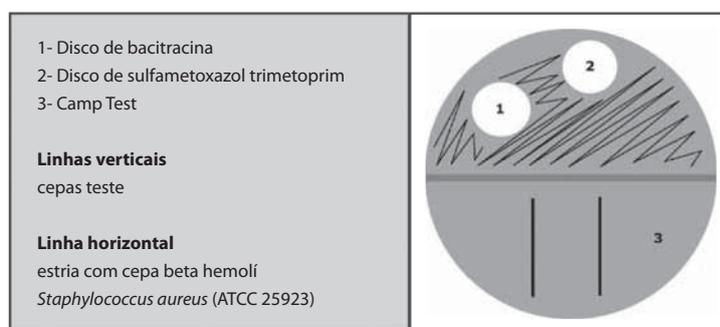
- Esse teste determina a atividade do PYR também chamado pyrrolidonyl-aminopeptidase, uma enzima produzida pelo *Streptococcus pyogenes* e também pelo *Enterococcus* sp. Utilizar somente colônias puras para o teste, pois podem surgir resultados errôneos. Seguir as instruções do fabricante, uma vez que se encontra disponível comercialmente.
- Esse teste é tecnicamente equivalente à prova da hidrólise da bile esculina e crescimento em 6,5% de NaCl, usados na identificação clássica

dos enterococos, e mais específico que o teste da Bacitracina na caracterização presuntiva dos estreptococos beta hemolíticos do grupo “A”, tendo a vantagem de ser mais rápido.

- Em qualquer dos dois casos, o PYR constitui uma alternativa importante para esclarecer testes duvidosos. Na impossibilidade da realização de testes sorológicos de confirmação, reforçar o valor dos testes presuntivos clássicos de identificação do *Streptococcus pyogenes*.

### C) Teste da bile esculina e do NAACL 6,5%

- Semear as provas de Bile Esculina e do caldo de NaCl a 6,5%.
- Incubar da mesma forma.
- Teste da bile esculina positiva apresenta cor marrom escuro e o do caldo de NaCl a 6,5 % deve mostrar turvação para ser considerado positivo.



- Todos os estreptococos do grupo D de Lancefield apresentam a bile esculina positiva, seja *Enterococcus* sp. ou *Streptococcus* do grupo D não enterococo (*Streptococcus bovis*). Quanto ao teste da tolerância ao NaCl a 6,5%, somente os enterococos são positivos.

#### 1.3.11 Teste da hidrólise do hipurato

- Os *Streptococcus agalactiae* (grupo B) são também capazes de hidrolisar o hipurato em seus componentes: glicina e ácido benzóico.

#### Identificação de estreptococos beta hemolíticos dos grupos A, B e D

Espécies	Sensibilidade à Bacitracina	CAMP teste. Hidrólise do Hipurato	SXT	Bile esculina. Tolerância NaCl 6,5%
<i>S. pyogenes</i>	sensível	negativo	negativo (R)	negativo
<i>S. agalactiae</i>	resistente	positivos	negativo (R)	negativo
<i>Enterococcus</i> sp.	resistente	negativo	negativo (R)	positivos
<i>Estreptococo Não</i> A, B ou D.	resistente	negativo	positivos (S)	negativo

### 1.3.12 Identificação dos estreptococos não beta hemolíticos

- Somente os estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*) e os do grupo D *Enterococcus* spp. e *Streptococcus bovis* podem não apresentar nenhuma hemólise, a denominada gama hemólise.

### 1.3.13 Identificação de estreptococos gama hemolíticos ou sem hemólise

#### A) Identificação CAMP/Hidrólise de hipurato Bile Esculina Tolerância a NaCl 6,5%

- *Streptococcus agalactiae* positivo negativo negativo
- Enterococo negativo positivo positivo
- *S. bovis* negativo positivo negativo

### 1.3.14 Identificação dos estreptococos alfa hemolíticos

- A identificação desse grupo não deve ser feita por métodos sorológicos, pois a maioria não possui os antígenos de Lancefield.

Identificação dos estreptococos alfa hemolíticos			
Identificação	Optoquina e Bile solubilidade	Bile esculina	Tolerância 6,5% a NaCl
<i>Pneumococo</i>	positivo	negativo	negativo
<i>Enterococos</i>	negativo	negativo	positivo
<i>Grupo viridans</i>	negativo	negativo	negativo
<i>Streptococcus</i>	negativo	positivo	negativo

### 1.3.15 Teste da optoquina

- Semear um quarto de uma placa de ágar sangue com a cepa alfa hemolítica a ser testada.
- Aplicar um disco de optoquina.
- Incubar a 35°C em tensão aumentada de CO<sub>2</sub> – método da vela.
- Uma zona de inibição de 14 mm ou mais à volta de um disco de 6 mm significa sensibilidade e identifica o *Streptococcus pneumoniae*.

### 1.3.16 Teste da bile solubilidade

O teste da bile solubilidade também identifica o *Streptococcus pneumoniae*. Pode ser executado em placa ou em caldo.

#### B) Caldo:

- Tomar um caldo turvo após 3 horas de incubação a 35°C.
- Inocular uma suspensão de desoxicolato a 10%.
- Clareamento da turbidez reflete a lise bacteriana e confere um resultado positivo à prova.

**C) Placa:**

- Inocular gotas de desoxicolato de sódio a 2% sobre as colônias suspeitas.
- Incubar a 35°C por 30 minutos.
- As colônias positivas irão desaparecer por lise bacteriana.

Suspeitar da presença de “variante nutricional de *Streptococcus*” desses micro-organismos quando o Gram de amostras positivas de hemocultura obtidas em meios comerciais mostram cocos em cadeias que não crescem no subcultivo em ágar sangue, então deve-se proceder dessa forma:

- Semear o repique em ágar sangue.
- Fazer estrias perpendiculares ao sentido da semeadura com *Staphylococcus aureus*, como para a identificação presuntiva de *Haemophilus influenzae*.
- Incubar a 35°C em atmosfera com CO<sub>2</sub>.

Identificação dos enterococos mais importantes clinicamente						
Espécie	Arabinose	Sorbitol	Crescimento Telurito 0,04%	Motilidade	Pigmento	Vancomicina
<i>E. faecalis</i>	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	variável
<i>E. faecium</i>	positivo	variável	negativo	negativo	negativo	variável
<i>E. casseliflavus</i>	positivo	variável	negativo	positivo	positivo	resistente
<i>E. gallinarum</i>	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	resistente

## Referências Bibliográficas

- VIDAL, P. M. Fatores associados à infecção de corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* portador de SCC mec tipo IV. Dissertação de mestrado-FMUSP. 2007, 66p. Ref.
- TERASAWA, L.B. Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase negativa isolados no Hospital de Clínicas de Curitiba – Paraná – Tese de mestrado-UFP, 2006, 109p
- EIFF, C. V.; HEILMANN, C.; PETERS, G. *Staphylococcus epidermidis*: why is it so successful? *Clin Microbiol Infect*, v. 4, n. 6, p. 297-300, 1998.
- HEIKENS, E. et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species level identification of Clínicl isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clínicl Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 2286-2290, 2005.
- OULD, L. et al. Role of blood culture systems in the evaluation of epidemiological features of coagulase-negative staphylococcal bloodstream infection in critically 11 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 18, p. 899-901, 1999.
- COUTO, I. et al. Identification of Clínicl staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *Journal of Clínicl Microbiology*, v. 39, n. 9, p.3099-3103, 2001.
- CARRETO, E. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, n. 3, p. 177-184, march 2005.
- RICE, L. B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bactéria – *The American Journal of Medicine* Vol 119 (6A), S11–S19, 2006.
- IORIO, N.L.P.; FERREIRA, R.B.R.; SCHUENCK, R.P. et al. Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. *J Clin Microbiol.*, 2007, 45(8):2564-69.



## Capítulo 2: *Neisserias*

Ana Carolina Ramos Moreno  
Carlos Emílio Levy  
Marina Baquerizo Martinez

### 2.1 Introdução

O gênero *Neisseria* é formado por bactérias aeróbias, imóveis e não esporuladas. As *neisserias* são diplococos Gram-negativos, cuja característica peculiar é a união de seus lados adjacentes. Na rotina do laboratório clínico, costuma-se comparar essa morfologia a dois grãos de feijão ou rins unidos . Apenas a espécie *N. elongata* difere dessa morfologia, sendo diplobacilos ou diplococo-bacilo. A maioria das espécies de *Neisseria* pode habitar as mucosas de animais e seres humanos de forma comensal. O crescimento ótimo se dá em ambientes úmidos com temperatura entre 35 a 37°C (temperatura do corpo humano).

Todas as *Neisserias* são micro-organismos fastidiosos, oxidase positiva e a maioria são catalase positiva (com exceção de *Neisseria elongata* e *Kingella denitrificans*). Elas utilizam os carboidratos por via oxidativa, com pouca produção de ácido. O meio de cultura mais utilizado para verificar a oxidação dos carboidratos é o *Cistyne Tripticase Ágar* (CTA), com o indicador de pH vermelho de fenol. Para evitar reações duvidosas na hora da identificação de *Neisseria*, recomenda-se utilizar uma grande quantidade de inóculo para que, assim, haja uma maior produção de ácidos. As diferentes espécies de *Neisseria*, incluindo *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, são analisadas junto com as espécies *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella* spp. e *Kingella* spp. por suas características morfológicas, cocos ou cocóides Gram-negativos, e pela possibilidade de haver confusão durante a identificação.

Embora as doenças causadas por *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* sejam as mais conhecidas, as outras espécies de *Neisseria* podem causar doenças em pessoas com a imunidade comprometida.

### 2.1.1 Diagnóstico diferencial entre *Neisserias* e outros cocobacilos Gram-negativos

Bactéria	Morfol	OXI	CAT	OF Gli	CTA Gli	DNAse	AS	MOT
<i>Neisseria meningitidis</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	+	neg
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	diplococo	+	+	não cresce	+	neg	neg	neg
<i>Neisseria</i> spp.	diplococo/ bacilo	+	variável	variável (oxidativo)	variável	neg	+	neg
<i>Moraxella catarrhalis</i>	diplococo	+	+	inerte	neg	+	+	neg
<i>Kingella</i> spp.	cocobacilo	+	neg	fermentador	+	neg	+	variável
<i>Moraxella</i> spp.	cocobacilo	+	+	inerte	neg	neg	+	neg
OXI = oxidase CAT=catalase AS = crescimento em Ágar Sangue				OFGli=OF Glicose CTAGli= utilização da glicose em base ágar cistina tripticase MOT = motilidade				

Características de algumas espécies de importância clínica

#### 2.1.2 *Neisseria gonorrhoeae*

O ser humano é o hospedeiro natural de *Neisseria gonorrhoeae* e a doença causada por esse micro-organismo denomina-se gonorréia. A gonorréia, considerada uma doença sexualmente transmissível, é transmitida entre os seres humanos através do contato íntimo das mucosas. *N. gonorrhoeae* pode infectar a uretra, a vagina e o ânus e pode se propagar para as articulações. As mulheres são as principais portadoras assintomáticas; no homem encontra-se apenas uma taxa de 1 a 5% de portadores. *N. gonorrhoeae* é sempre considerada patogênica, o que indica a necessidade de tratamento. A transmissão para o recém-nascido pode ocorrer durante o parto. No homem, *N. gonorrhoeae* causa uretrite e está relacionada a complicações como epididimite, prostatite e estenose uretral. O período de incubação da bactéria pode ser de um a sete dias. Na mulher, esse micro-organismo causa corrimento vaginal, endocervicite, uretrite, abscesso vestibular, salpingooforite e doença inflamatória pélvica. A mudança do microambiente vaginal inibe o crescimento de bactérias produtoras de ácido, como *Lactobacillus*, que fazem parte da microbiota feminina. O pH vaginal torna-se menos ácido e uma variedade de organismos é, então, capaz de proliferar, o que acarreta infecções secundárias. *N. gonorrhoeae* pode ser isolada também na mucosa oral e anal. Em recém-nascidos pode causar uma conjuntivite denominada oftalmia neonatorum. A doença sistêmica disseminada pode ocorrer em 1 a 3% dos pacientes infectados, principalmente em assintomáticos, e é caracterizada por febre, tremores, lesões cutâneas e artrite de extremidades. As lesões cutâneas são do tipo máculo-pustulares ou hemorrágicas, com centro de necrose. Ocorre artrite séptica, com 50% de positividade de isolamento. Pode ocorrer meningite e endocardite.

### 2.1.3 *Neisseria meningitidis*

*N. meningitidis* é o agente etiológico da enfermidade meningocócica, mais comumente chamada de bacteremia e meningite meningocócica. Essas duas síndromes clínicas podem aparecer simultaneamente, entretanto, a presença apenas da meningite é mais frequente. *N. meningitidis* também pode causar infecção sistêmica grave, com coagulação intravascular disseminada (CIVD) e elevada mortalidade, conjuntivite, artrite séptica, pericardite purulenta, sinusite, otite e pneumonia. Esse micro-organismo pode ser isolado das mucosas de 5 a 15% de indivíduos sãos por períodos de semanas a meses. A transmissão se faz por vias aéreas (aerossóis) ou contato com secreções respiratórias de portadores assintomáticos.

A meningite é um processo infeccioso que acomete as meninges, sendo que nessa entidade clínica estão comprometidas a pia-máter, aracnóide e espaço subaracnóideo. Esse espaço é contínuo e o líquido que nele circula envolve a convexidade cerebral, preenche as cisternas, passa pela emergência dos nervos cranianos e pela medula espinal. Logo, um agente infeccioso que atinge esse compartimento, espalha-se rapidamente por todo o Sistema Nervoso Central (SCN).

*N. meningitidis* é uma bactéria encapsulada, sendo esse um importante fator de virulência. Os meningococos são tradicionalmente classificados pelo sistema de tipagem sorológica baseada na diferença da estrutura da cápsula (sorogrupo), proteínas de membrana externa e lipooligossacarídeo. De acordo, com a classificação baseada nos antígenos capsulares, existem 12 sorogrupos conhecidos: A, B, C, 29-E, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z. São conhecidos 20 sorotipos (antígenos Proteína de Membrana Externa (OMP) classe 2/3) e 10 subtipos (antígenos OMP classe 1).

### 2.1.4 *Moraxella (Branhamella catarrhalis)*

*M. catarrhalis* está frequentemente associada a infecções do trato respiratório e ocorre principalmente em crianças e adultos jovens. Esse micro-organismo pode causar otite média, sinusite, bronquite e pneumonia. Mais raramente pode causar endocardite, meningite ou infecções sistêmicas. Em idosos, após o *Haemophilus influenzae* e pneumococo, *M. catarrhalis* constitui a terceira causa de pneumonia em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. *M. catarrhalis* raramente é isolada em indivíduos assintomáticos. Cerca de 80% das cepas são produtoras de beta-lactamase e são detectadas através do teste do Nitrocefina (cefalosporina cromogênica). Os agentes antimicrobianos geralmente utilizados no tratamento de *M. catarrhalis* são amoxicilina-ácido clavulânico, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporinas orais,

macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas. Outras espécies de *Neisseria* raramente são isoladas em casos de endocardite.

## 2.2 Isolamento

### 2.2.1 *Neisseria gonorrhoeae*

Para o diagnóstico de *N. gonorrhoeae*, o sítio apropriado para a coleta do material clínico depende da idade, sexo e práticas sexuais do indivíduo, além dos sintomas clínicos da infecção. O instrumento que será utilizado para fazer a coleta pode ser lubrificado apenas com água morna. Outros tipos de lubrificantes podem ser tóxicos para a bactéria. O material pode ser coletado com *swab* ou alça bacteriológica, o que depende do material. Sempre que possível coletar o material em *swabs* separados, um para cultura e outro para bacterioscopia.

#### A) Tipos de materiais clínicos:

- Uretral
- Endocervical (sexualmente ativas/vaginal em meninas)
- Retal (colher secreção mucosa e não fezes, utilizando meio seletivo tipo Thayer Martin)
- Orofaringe
- Conjuntiva
- Glândula de Bartholin
- Trompas
- Endométrio
- Líquido sinovial
- Lesões de pele
- Sangue

#### B) Recomenda-se:

- Utilizar *swab* com algodão atóxico ou *swab* de Rayon ou Dacron.
- Semear o material clínico nos meios sólidos o mais rápido possível. Sempre utilizar as placas previamente aquecidas em estufa.
- Urina pode ser utilizada após centrifugação rápida e semeadura do sedimento.
- Utilizar meio seletivo no caso de materiais clínicos não estéreis, para aumentar a probabilidade de isolamento do patógeno.
- Usar frascos de hemocultura sem o anticoagulante SPS, que é inibidor para as *N. gonorrhoeae* (Ex: Caldo BHI com 1% de gelatina) ou fazer repiques cegos em 24 horas de incubação no caso de hemoculturas automatizadas.

- Em lesões de pele, preferir a biópsia ao *swab*.
- Incubar em câmara úmida em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% ou em jarra de vela.
- Sempre realizar bacterioscopia pelo Gram.
- A temperatura de incubação é crítica, não deve ultrapassar os 37°C.

### 2.2.2 *Neisseria meningitidis*

O meningococo é isolado mais prontamente quando o material clínico é obtido antes do início da antibioticoterapia e quando é rapidamente transportado ao laboratório, protegido de ambientes secos e temperaturas extremas, especialmente frias. O sítio apropriado para a coleta do material clínico depende do indivíduo e dos sintomas clínicos da infecção. Sempre que possível coletar material para cultura e bacterioscopia.

#### A) Materiais clínicos para isolamento, de acordo com aspectos clínicos:

- Sangue (usar frascos de hemocultura sem SPS como anticoagulante)
- LCR
- Aspirado de petéquias
- Sufusões hemorrágicas ou biópsias
- Líquido sinovial
- *Swab* de conjuntiva
- Aspirado traqueal ou transtraqueal ou escarro
- Lesões de pele
- *Swab* de nasofaringe (preferível ao *swab* de orofaringe)

### 2.2.3 *Moraxella (branhamella) catarrhalis*

A escolha do material clínico em pacientes com otite aguda média e sinusite maxilar é o fluido de timpanocentese e o aspirado sinusal, respectivamente. Sempre que possível coletar material para cultura e bacterioscopia.

### 2.2.4 Material clínico adequado para isolamento de acordo com o quadro clínico:

- **Otite média:** Timpanocentese (miringotomia) quando indicado. Secção colhida com *swab* em geral revela flora contaminante, exceto se rompimento espontâneo muito recente e sem uso prévio de antimicrobianos.
- **Sinusite:** Aspirado de seios da face comprometidos, quando indicado.
- **Infecções do trato respiratório inferior/pneumonia:** Escarro, aspirado traqueal e transtraqueal podem ser úteis ou BAL, quando indicado, e comparados com bacterioscopia.

## 2.3 Transporte e semeadura do material

O material clínico coletado deve ser representativo do processo infeccioso investigado, evitando contaminação com as áreas adjacentes. A coleta e o transporte inadequados podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o crescimento da flora contaminante.

Após a coleta do material clínico, o ideal é semeá-lo imediatamente em meio sólido e incubá-lo em estufa bacteriológica a 35-37°C em jarra de vela com umidade. O uso de meios de transporte como Stuart ou Amies deve ser considerado uma alternativa de risco. Para *M. catarrhalis*, os meios de transporte habituais são adequados.

**IMPORTANTE:** Todo resultado liberado pelo laboratório de microbiologia é consequência da qualidade da amostra recebida.

### 2.3.1 *Neisseria gonorrhoeae*

O gonococo é muito sensível a temperatura e atmosfera de CO<sub>2</sub> e, frequentemente, um pequeno número de organismos está presente no material clínico. Quando a amostra é enviada ao laboratório, ela precisa ser transportada de maneira a preservar a viabilidade do micro-organismo.

Recomendações:

- *N. gonorrhoeae* é sensível a variações de temperatura acima de 37°C ou abaixo de 35°C, de modo que a amostra não pode ser refrigerada ou mantida acima dos 37°C.
- Para cultura do micro-organismo, recomenda-se ágar chocolate enriquecido com suplemento de l-cisteína, NAD e vitaminas (Isovitalex ou similar).
- Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO<sub>2</sub> a 5% (jarra com vela ou estufa de CO<sub>2</sub>).
- Para secreção retal, *swab* de orofaringe ou outros materiais com microbiota contaminante abundante ou menor expectativa de isolamento, semear, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado (TMM) ou meio New York City (NYC).
- Meios seletivos como TMM inibem crescimento de enterobactérias, a maioria das espécies saprófitas de Neisserias (7,5 µg/mL de colistina), Gram-positivos (Vancomicina 3 µg/mL) e fungos (13,5 µg/mL de nistatina) e contêm suplementos para suportar crescimento das *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae*.

### 2.3.2 *Neisseria meningitidis*

*N. meningitidis* não é tão fastidiosa quanto a *N. gonorrhoeae*. O material clínico, após coletado, deve ser transportado ao laboratório clínico rapidamente, protegido de ambientes secos e variações de temperatura, especialmente frias.

Recomendações:

- Transportar em ambientes úmidos, com CO<sub>2</sub>, evitando variações de temperatura.
- *N. meningitidis* cresce bem em ágar sangue, mas por precaução, deve-se semear também em ágar chocolate.
- Incubar em jarra com umidade (bola de algodão e água estéril) e CO<sub>2</sub> (jarra com vela ou gerador de CO<sub>2</sub>).
- Para materiais com microbiota contaminante ou menor expectativa de isolamento, semear, além do meio rico, em meio seletivo como Thayer Martin modificado (TMM) ou meio New York City (NYC).

### 2.3.3 *Moraxella catarrhalis*

A) **Recomenda-se:**

- *M. catarrhalis* tolera a temperatura ambiente, ou seja, não é tão sensível a variações de temperatura como as *Neisserias*.
- Possui um bom crescimento em ágar sangue de carneiro 5% e ágar chocolate. Uma boa porcentagem de *M. catarrhalis* cresce em ágar seletivo.
- Incubar as placas a 35°C em ambiente aeróbio ou em atmosfera de 5 a 7% CO<sub>2</sub>.
- Material estéril ou com pouca microbiota (LCR, sinovial, sangue, biópsia, conjuntiva, nasofaringe) pode ser semeado em meio não seletivo.

## 2.4 Bacterioscopia e identificação

O exame bacterioscópico é muito importante na microbiologia clínica e consiste na observação direta, através de microscópio, do material obtido de qualquer tipo de lesão (feridas, líquido, urina, entre outros). Isto é, o material é recolhido e então observado por microscopia, após coloração. Em muitos casos, pode ser utilizado para identificação presuntiva dos micro-organismos, como o gênero *Neisseria*.

Recomendações:

- No momento da coleta, recomenda-se colher dois *swabs* da amostra clínica, ou material suficiente para a semeadura e bacterioscopia. O esfregaço na lâmina deve ser feito logo após a coleta.
- Quando o *swab* é único, no caso de *Neisseria*, dá-se preferência à semeadura imediata do material e posteriormente:
  - Ressuspender o *swab* em 1 mL de salina.
  - Agitar no Vortex.
  - Centrifugar.
  - Fazer um esfregaço do sedimento.
- O laudo da bacterioscopia deve relatar de forma quantitativa o material analisado, salientando a presença ou ausência de diplococos Gram-negativos com características de *Neisseria* em:
  - raros (+)
  - poucos (++)
  - moderados (+++)
  - muitos (++++)
- Descrever se os micro-organismos são extracelulares ou intracelulares e quantificar os polimorfonucleares e as células epiteliais.
- É importante correlacionar a bacterioscopia com achados de cultura e dados do paciente, como quadro agudo, portador, etc. Em casos de abuso sexual, é fundamental o isolamento e identificação completa do micro-organismo, considerando que neisserias saprófitas ou mesmo *Acinetobacter* spp. podem ser diagnosticados erroneamente como *N. gonorrhoeae*.

#### 2.4.1 Identificação

A análise macroscópica das colônias bacterianas revela informações que são importantes no processo de identificação do micro-organismo. Cada espécie possui características que, muitas vezes, lhe é peculiar, tais com tamanho, forma, cor, aspecto, entre outros.

*N. gonorrhoeae* produz em ágar chocolate vários tipos de colônias. A colônia típica é pequena, brilhante e convexa. São menores do que as de neisserias saprófitas cuja cor pode variar de cinza a amarelo. A colônia de *M. catarrhalis* é de cor cinza róseo-acinzentado, comumente friável, saindo inteira quando removida com a alça bacteriológica. As colônias de *N. meningitidis* são maiores que as colônias de gonococos, brilhantes e convexas. Os subtipos A e C capsuladas podem apresentar-se mucóides.

Para o diagnóstico da gonorréia, existem no comércio recursos como ELISA, sondas genéticas de ácido nucléico, PCR e suas variantes, que possuem elevado custo e são indicados em caso de levantamentos epidemiológicos ou

quando não se dispõe dos recursos tradicionais de identificação. Os testes imunológicos não substituem a cultura bacteriana e a bacterioscopia.

Para LCR, outros fluídos estéreis e até mesmo a urina, a caracterização de *Neisseria meningitidis* pode ser feita pela técnica de aglutinação com partículas de látex. Esse método é rápido, possui boa sensibilidade, especificidade e permite a tipagem dos sorogrupos de *N. meningitidis* mais prevalentes em meningites. Uma vantagem do método imunológico é sua positividade nos casos de cultura negativa por uso prévio de antimicrobianos, sendo, no entanto, de custo elevado. Para o tipo B, alguns produtos oferecem testes para afastar reação cruzada com *E. coli*. A reação negativa não exclui o diagnóstico, que deve ser sempre avaliado juntamente com a bacterioscopia e a cultura.

#### 2.4.2 Bacteriologia

A identificação de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* pode ser realizada de duas formas: presuntiva e confirmatória.

A identificação presuntiva baseia-se na realização das provas de oxidase, bacterioscopia e coloração de Gram das colônias crescidas. Em serviços de Saúde Pública (relacionados a doenças sexualmente transmitidas – DST), a prevalência da gonorréia é bem significativa. Desta forma, para fins práticos de tratamento, pode-se fazer o diagnóstico através de aspectos clínicos associados à bacterioscopia positiva (Diplococos Gram-negativos intracelulares) em pacientes de risco. Deve-se, no entanto, sempre colher material para cultura, possibilitando a confirmação e o monitoramento da resistência dessas bactérias.

Na ocorrência de surtos de meningite meningocócica, o diagnóstico presuntivo para fins de tratamento também pode ser baseado na clínica e na bacterioscopia positiva do LCR ou de lesões (petéquias e púrpuras). Deve-se realizar a cultura do material clínico para confirmação, identificação de sorotipo e sensibilidade aos antimicrobianos através dos seguintes procedimentos:

- Fazer a coloração de Gram das colônias isoladas para confirmar a presença de diplococos Gram-negativos.
- Fazer o teste de oxidase das colônias sugestivas.
- Deve-se procurar afastar outros gêneros de bactérias como *Acinetobacter* spp., *Kingella* spp. e *Moraxella* spp. que são morfologicamente parecidos. Um recurso prático para evitar erros de identificação de *Acinetobacter* spp. e *Kingella* spp. com *Neisseria* é:
- Semear a colônia suspeita em ágar chocolate.

- Colocar um disco de penicilina de 10 UI.
- Após 24 horas fazer um Gram das colônias que crescerem próximas à zona de inibição.
- Se permanecerem cocóides, com aspecto de neisserias, confirma-se o isolamento; caso tenham adquirido a forma de bacilos longos, o isolado não é de *Neisseria*.
- Outro passo importante é verificar a capacidade de crescimento em meios pobres como o ágar nutriente ou a necessidade de crescimento em meio rico (ágar chocolate suplementado).

A diferenciação entre as espécies de *Neisseria* baseia-se na sua capacidade de oxidação de carboidratos específicos (glicose, maltose, lactose, sacarose e frutose) e nas exigências nutricionais e de meio ambiente para seu crescimento. As neisserias utilizam os carboidratos por via oxidativa e o meio utilizado para verificar a bioquímica bacteriana é a base Ágar Cistina Trypticase (CTA), adicionada de 1% de cada um dos açúcares. Essa base possui como indicador de pH o vermelho de fenol, que a partir do pH 6,8 adquire a cor amarela. No entanto, reações duvidosas podem ocorrer devido a falhas na detecção da acidez produzida pela bactéria, o que pode dificultar a identificação. Recomenda-se enviar a cepa isolada rapidamente ao Laboratório de Referência para confirmação.

### 2.4.3 Provas de rotina para diferenciar *Neisserias* patogênicas

Bactéria	AC 22°C	NA 35°C	DNAse	GLI	MAL	LAC	SAC	FRU
<i>N. gonorrhoeae</i>	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg
<i>N. meningitidis</i>	neg	V	neg	+	+	neg	neg	neg
<i>N. lactamica</i>	V	+	neg	+	+	+	neg	nen
<i>N. siccca</i>	+	+	neg	+	+	neg	+	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	neg	+	+	neg	+	+
<i>N. flavescens</i>	+	+	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<i>M. catarrhalis</i>	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Kingella</i> spp.	V	+	neg	+	neg	neg	neg	neg

AC – crescimento em ágar chocolate à 22°C; NA – crescimento em ágar nutriente à 35°C; GLI – glicose; MAL – maltose; LAC – lactose; SAC – sacarose; FRU – frutose; NEG – negativo; V – variável.

## Referências Bibliográficas

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12<sup>th</sup> ed. St. Louis. Mosby Elsevier, 2007, 1031p.

WINN, J.Jr; ALLEN, S.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRENKENBERGER, P.C.; WOODS, G.K. – Color Atlas and Textbook OF Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1535p.

MC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore. Ed. William & Wilkins Co., 2000.

MURRAY, P.R. et al. Manual of Clínica Microbiology. 9<sup>th</sup> ed. Washington DC. American Society for Microbiology ASM Press 2007, 2256p

<http://www.cdc.gov/> – Center for Disease Control and Prevention.



## Capítulo 3: Enterobactérias

Carlos Emílio Levy  
Tânia Mara Ibelli Vaz

### 3.1 Introdução:

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grande grupo de bacilos Gram-negativos, classificados atualmente em 44 gêneros, 176 espécies e quatro grupos entéricos ainda não nomeados. As enterobactérias estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas no solo, água, frutas, vegetais e produtos de origem animal, como a carne e ovos. Sua ecologia é variável, bem como seu potencial patogênico para o homem, animais e vegetais.

#### A) Caracterização da família *Enterobacteriaceae*:

- São bacilos Gram-negativos, não esporulados, com motilidade variável. Crescem na presença ou ausência de oxigênio. Crescem bem nos meios comuns de cultura e nos meios seletivos para enterobactérias como o ágar Mac Conkey. Fermentam a glicose com ou sem a formação de gás. A maioria é catalase positiva, exceto a *Shigella dysenteriae*. A maioria é oxidase negativa, exceto *Plesiomonas*, gênero recentemente incorporado na classificação da família *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* sp. (muito semelhante a *E. coli*). A maioria reduz o nitrato a nitrito.

#### B) Importância clínica:

- As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. Muitas espécies de enterobactérias são patogênicas para o homem causando vários tipos de doenças. Essas incluem doenças diarreicas, infecções em feridas e queimaduras, infecção no trato urinário e respiratório, septicemia e meningite, sendo responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias.

- Algumas espécies são consideradas enteropatogênicas, por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais, normalmente transmitidas por água ou alimentos contaminados. São considerados enteropatógenos clássicos os diferentes sorotipos de *Salmonella*, *Shigella* spp., categorias diarreioogênicas de *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*. Alguns desses podem, ainda, estar associados a infecções extraintestinais.

### C) Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde e na comunidade:

- Infecções relacionadas à assistência à saúde: Nas infecções relacionadas à assistência à saúde, os gêneros e espécies predominantemente isolados, representando 99% das enterobactérias de importância clínica, são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter* spp., e *Providencia* spp.
- Infecções na comunidade: As infecções na comunidade são frequentemente causadas pelos enteropatógenos clássicos, associados às doenças transmitidas por alimentos. Também são comuns as infecções urinárias causadas por *E. coli*, *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp.

Baseado em dados de prevalência e importância clínica, considera-se necessário que os laboratórios de microbiologia utilizem metodologia que permita discriminar com  $\geq 80\%$  de acerto os gêneros e espécies considerados a seguir:

<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Shigella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter sakazaki</i>
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Providencia</i> spp.	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Serratia</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Morganella morganii</i>

**Tabela 1** Principais provas para a identificação das enterobactérias de importância clínica

fermentação da glicose	produção de gás (CO <sub>2</sub> )
fermentação da lactose	utilização de citrato
motilidade	produção de indol
oxidase	produção de urease
descarboxilação da lisina	produção de fenilalanina desaminase ou opção triptofanase
produção de sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)	produção de gelatinase e/ou DNase

**Tabela 2** Provas complementares de Identificação

Teste da ornitina descarboxilase e arginina desidrolase
Reação de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)
Fermentação de outros carboidratos: glicerol, sacarose, maltose, arabinose, salicina, dulcitol, manitol, etc.
ONPG – teste da Beta galactosidase
Utilização do malonato de sódio
Hidrólise da Esculina, etc.

Os esquemas de identificação baseiam-se na determinação dos gêneros e espécies mais isolados na clínica, e nas provas mais características de cada gênero e espécie, segundo alguns critérios como: facilidade de execução, facilidade de interpretação, custo, rapidez para leitura, etc.

### 3.2 Tipos de testes utilizados

Na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica, a identificação de enterobactérias se baseia em características fenotípicas. Para a identificação das espécies são utilizados testes convencionais, kits comerciais, métodos automatizados ou métodos rápidos utilizando substratos cromogênicos.

Testes convencionais preparados no laboratório devem ser submetidos a um rigoroso controle de qualidade. Aqueles adquiridos no comércio em testes isolados ou em kits devem ser acompanhados dos respectivos esquemas de identificação, previamente validados com cepas padrão e desempenho documentado.

Métodos automatizados, em geral, utilizam essas mesmas provas e ampliam o número de testes podendo caracterizar com maior segurança e melhor poder de discriminação gêneros e espécies não comuns.

Métodos rápidos em geral utilizam substratos cromogênicos para detecção de enzimas produzidas pelas bactérias e que se revelam após 4 a 6 horas de incubação.

Na rotina bacteriológica, existem várias alternativas e, com base em conjuntos ou sistemas simplificados de provas bioquímicas, é possível realizar a triagem e identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico. Desse modo, das enterobactérias isoladas de amostras clínicas, cerca de 90% podem ser perfeitamente identificadas através desses esquemas, podendo o resultado ser entregue dentro de um espaço de tempo relativamente curto, geralmente, entre 48 a 72 horas a partir do isolamento.

### 3.2.1 Principais Meios Bioquímicos Utilizados na Rotina

A identificação presuntiva das enterobactérias pode ser facilitada pela utilização de meios que reúnem em um só tubo várias reações bioquímicas. Assim, é possível realizar a identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico, minimizando o tempo de saída do resultado.

No Brasil, os meios presuntivos de identificação mais utilizados são: Meio de Rugai, modificado por Pessoa e Silva (Meio de IAL), EPM MILI e TSI.

As facilidades, dificuldades ou limitações na utilização de cada um desses meios dependem do treinamento e conhecimento do analista que está executando o exame.

Meio IAL (Instituto Adolfo Lutz) – O meio de IAL é extremamente prático por se tratar de um único tubo reunindo nove reações: Na fase superior do tubo pode ser verificada a fermentação da glicose, produção de gás, fermentação da sacarose, produção de urease,  $H_2S$  e triptofano desaminase. Na fase inferior, separada da superior por uma camada de cera de carnaúba, verifica-se a descarboxilação da lisina e motilidade. No tampão observa-se a produção de indol. O meio deve ser inoculado com uma picada profunda, até o final do tubo, e posteriormente, após a picada, estria-se a superfície, na fase superior.

Baseado nestas provas é possível identificar as seguintes bactérias: *E. coli*, *Shigella* (indol positiva), *Shigella* (indol negativa), *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp. (sacarose negativa), *Enterobacter cloacae*, *Providencia* spp. (ureia positiva) ou *Morganella morganii*, *Providencia* spp. (ureia negativa), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* (necessita provas complementares), *Vibrio cholerae*, *Vibrio* spp. (oxidase positiva) e alguns bacilos não fermentadores.

Por se tratar de um meio presuntivo, provas complementares devem ser realizadas sempre que necessário, especialmente a utilização do citrato em meio Citrato de Simmons, a DNAse, oxidase e a fermentação da lactose.

#### A) Variantes do meio IAL:

- Tubo 1 – meio de Rugai sem sacarose provas: fenilalanina, fermentação da glicose, gás,  $H_2S$ , ureia
- Tubo 2 – MIO (Motilidade Indol Ornitina)
- Tubo 3 – lisina
- Tubo 4 – citrato
- Tubo 5 – rhamnose

Conjunto EPM/MiLi/Citrato – Trata-se praticamente da mesma combinação de reações do meio IAL ou Rugai & Araújo (modificado por Pessoa & Silva), separados em 2 tubos, passando a verificação do indol da tampa do IAL, para o meio MiLi após adição do reativo de Kovacs.

### B) Tubo EPM:

- Fermentação da glicose, produção de gás, H<sub>2</sub>S, ureia, fenilalanina; inocular picando até o fundo e semear na superfície, incubar com a tampa frouxa 24 horas/35°C.

Tabela 3 Interpretação do Meio EPM

<b>Base</b>	Produção de gás	Formação de bolhas ou rachaduras no meio
	Produção de H <sub>2</sub> S	Presença de pigmento negro de qualquer intensidade
	Hidrólise da Ureia	Coloração azul esverdeada (fraca) na base indica prova positiva
<b>Superfície</b>	Desaminação do Triptofano	Reação positiva – verde escuro ou acastanhado Reação negativa – superfície inalterada

### C) Tubo MiLi:

- Fazer picada central apenas – incubar 24hs/35°C.
- Motilidade – bactérias móveis crescem além da picada turvando o meio, enquanto as imóveis crescem apenas na linha de picada.
- descarboxilação da lisina – lisina positivo o meio torna-se roxo, na prova negativa o meio permanece amarelado nos 2/3 inferiores.
- Após a leitura da lisina adicionar 3 gotas de reativo de Kovacs para o teste de indol – a formação de um anel rosa na superfície do meio indica positividade para o indol.

### D) Citrato:

- Inocular a superfície e incubar 24hs/35°C.
- A prova positiva é evidenciada pelo aparecimento de coloração azul na superfície.

■ **Meio Tríplice Açúcar Ferro (TSI)** – Considerado o mais clássico dos sistemas de identificação, necessita de provas adicionais, mas tem a vantagem de ser de mais fácil interpretação. Abaixo será descrito em detalhes e será a base da identificação de enterobactérias.

■ **Acurácia da identificação** – Qualquer sistema de testes existentes no comércio, com leitura manual ou automatizada tem limitações no número de provas e de discriminação dos diferentes gêneros e espécies de enterobactérias, de modo que a maioria dos esquemas trabalha com um máximo de 80% de acerto.

Os esquemas de identificação de enterobactérias podem utilizar uma ampla gama de recursos, variando desde nove reações como meio IAL ou Rugai & Araújo modificado por Pessoa & Silva, até dez testes propostos nesse manual, ou sistemas como API 32E que pode identificar enterobactérias e alguns não fermentadores, utilizando 32 testes. É importante destacar que nenhum sistema oferece 100% de acerto para a caracterização das espécies de enterobactérias, mas analisam o principal comportamento descrito na literatura.

A fonte de informação mais utilizada baseia-se na tabela organizada por Farmer (1999) contando com 47 provas, e os respectivos percentuais de positividade para os diferentes gêneros e espécies de enterobactérias. Alguns dos principais gêneros e espécies de importância clínica podem ser caracterizados com >95% de acerto com poucas provas. Entretanto para as espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* os testes mais utilizados apresentam baixo poder de discriminação, sendo a identificação feita pelo maior percentual de probabilidade.

É necessário destacar que padrões não usuais podem ocorrer e que o microbiologista deve estar atento para analisar cepas que possam ter importância clínica e epidemiológica ou encaminhá-las a Laboratórios de Referência. Antes, no entanto, deve certificar-se da pureza da cultura e que o padrão não usual não se deve a cultura mista de bactérias.

O meio de TSI é inclinado em bico de flauta, de cor vermelho cereja e deve ser inoculado por picada central até o fundo, seguido de espalhamento na superfície e incubação durante 18-24h a 35°C.

**Tabela 4** Provas do Meio de TSI

Púrpura/amarelo (ápice púrpura e base amarela) =fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativos)
Amarelo/amarelo (ápice e base amarelas) = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares)
Presença de gás (CO <sub>2</sub> ) = bolhas ou meio fragmentado
H <sub>2</sub> S positivo= presença de precipitado negro

Tabela 5 Interpretação do resultado das reações encontradas no TSI

Ápice	Base	H <sub>2</sub> S	Gás	Interpretação mais provável
Vermelho	Vermelho	Neg	Neg	Sem crescimento = bactéria exigente ou não semeado
Vermelho	Vermelho	Neg	Neg	Crescimento na superfície = Não Fermentador ou Gram (+)
Amarelo	Vermelho	Neg	Neg	Crescimento na superfície = Gram (+)
Vermelho	Amarelo	Neg	V	Enterobactéria ou <i>Aeromonas</i> lactose e sacarose negativas
Amarelo	Amarelo	Neg	V	Enterobactéria
Amarelo	Amarelo	Pos	V	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus/Morganella/Providencia</i> e <i>Citrobacter</i>

Neg. = negativo v. = variável

**Obs.:** A presença de H<sub>2</sub>S em bactérias lactose e sacarose negativas pode ser menos evidente pois a precipitação de sais de ferro pelo sulfeto de hidrogênio depende de meio ácido (Ex: *Salmonella typhi*)

### 3.3 Etapas da identificação de enterobactérias

#### 3.3.1 Análise do crescimento nos meios ricos e seletivos

A identificação de uma enterobactéria começa com a análise da morfologia da colônia obtida a partir do material semeado. Em geral temos os seguintes meios para interpretar:

- Secreções: Ágar sangue e Mac Conkey
- Líquidos nobres e biópsias: Ágar chocolate e Mac Conkey
- Fezes: Mac Conkey e SS.
- Urina: CLED ou Ágar sangue e Mac Conkey, etc.

Devemos considerar que:

- A enterobactéria sempre cresce nos meios ricos (Ágar sangue, chocolate e CLED), bem como nos meios seletivos: Ágar Mac Conkey e SS.
- Os Gram-positivos como regra não crescem em Ágar Mac Conkey e SS, exceto os enterococos que podem crescer, porém as colônias são menores.
- No Ágar Mac Conkey e SS, além das enterobactérias e dos enterococos, podem crescer bactérias não fermentadoras e *Candida*.
- Portanto caracteriza-se uma enterobactéria quando ela está presente em todos os meios semeados, mas ainda é necessário diferenciar de outros micro-organismos não muito exigentes como não fermentadores, enterococos e *Candida* spp.
- Recomenda-se a seguir realizar:

#### A) Gram da colônia isolada

- Recomenda-se sempre fazer o Gram para evitar enganos de interpretação (diferenciar cocos de bacilos, Gram-positivos de Gram-negativos e leveduras).

#### B) Prova da oxidase

- Indicada para detectar e/ou diferenciar o grupo *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio* que também são fermentadores. A prova de oxidase não deve ser realizada a partir de meios que contêm corantes ou indicadores.

#### C) Prova do metabolismo fermentador

- Triagem utilizando os meios de OF-glicose (quando suspeitar de não fermentador) ou meio presuntivo (IAL, EPM-MILI, TSI)

#### D) Série bioquímica complementar

- Sempre necessária para caracterizar gênero e espécie. O número de provas permitirá maior ou menor discriminação (vide a seguir nível de complexidade de provas).

As Enterobactérias caracterizam-se por se apresentarem como: bacilos Gram-negativos, fermentadores da glicose, com ou sem produção de gás, oxidase negativas, reduzem nitrato a nitrito e que crescem bem no meio de Ágar Mc Conkey ou Ágar EMB (Eosin Metilene Blue Ágar).

Como modelo de triagem na identificação bacteriana tem sido utilizado o meio de TSI (Tríplice açúcar ferro), que permite avaliar a fermentação da glicose, produção de gás, fermentação de lactose e/ou sacarose e produção de H<sub>2</sub>S.

O TSI constitui o meio de identificação preliminar mais utilizado no mundo, sendo necessário, no entanto, adicionar algumas provas para completar a identificação, que podem ser utilizadas em dois níveis de complexidade, dependendo da disponibilidade de testes, interesse ou necessidade de uma melhor qualidade de identificação:

#### ■ **Nível de complexidade 1 – TSI mais:**

- Motilidade, indol, lisina, ureia, citrato, lactose observada no Ágar Mc Conkey, fenilalanina, DNase e oxidase.

#### ■ **Nível de complexidade 2 – realizar as provas do nível 1 mais:**

- Ornitina, arginina, sacarose, arabinose, malonato, esculina e PYR.

### 3.3.2 Descrição das Principais Provas Bioquímicas

#### A) Motilidade/H<sub>2</sub>S/Indol

- Semear por picada até o fundo, e incubar 24hs/35°C.

Motilidade – Para testar motilidade pode-se utilizar os meios de Motilidade/indol (pode-se adicionar resazurina para melhor observação do crescimento); SIM (motilidade, indol e H<sub>2</sub>S) e Mili (Motilidade, Indol e Lisina):

- Crescimento apenas na linha de picada = motilidade negativa
- Crescimento difuso em todo o meio = motilidade positiva

H<sub>2</sub>S – Produção de gás sulfídrico, verificado no TSI ou SIM

H<sub>2</sub>S positivo = meio enegrecido

H<sub>2</sub>S negativo = cor inalterada do meio

Indol – Após 24h de incubação, pingar 3-4 gotas de Kovacs na superfície do meio:

- presença de cor púrpura = indol positivo
- cor do reagente = indol negativo

#### B) Ureia de Christensen

- Inoculado apenas na superfície e incubar 24h/35°C
- Urease positivo = cor vermelha (*Proteus* apresenta reação mais intensa)
- Urease negativo = mantém cor amarelada do meio

#### C) Citrato de Simmons

- Inocular na superfície (inóculo fraco) e incubar 24h/35°C
- Citrato positivo = azul e/ou crescimento no meio
- Citrato negativo = cor verde (inalterado)

#### D) Fenilalanina

- Inocular a superfície do meio (inclinado) e incubar 24h/35°C, após crescimento pingar na superfície 5 gotas do reagente cloreto férrico a 10%
- FA positivo = cor verde escuro na superfície
- FA negativo = mantém a cor do meio inalterada
- Maiores detalhes e outras provas consultar o fascículo de meio de cultura.

## 3.4 Identificação das enterobactérias de importância clínica

### 3.4.1 Considerações

- Valores positivos ou negativos referem-se a 80% ou mais de definição; para saber o real percentual de provas positivas ou negativas consultar a tabela geral.

- b) PB (padrão bioquímico) = probabilidade teórica da bactéria em questão apresentar o padrão bioquímico analisado (os testes considerados são indicados pelo sinal). Exemplo: PB para *Proteus vulgaris* em relação às provas, H<sub>2</sub>S +(98%) FA +(95%) Indol + (98%) (multiplicar os percentuais de ocorrência) = 92%.
- c) Quando o PB é baixo significa ter outro padrão mais frequente.
- d) Os padrões bioquímicos pouco frequentes terão menor probabilidade de isolamento.
- e) Não é aplicado quando se considera gênero pois envolve várias espécies com diferentes padrões de testes (ex: *Salmonella* spp.).
- f) Valores seguidos do sinal positivo (+) ou negativo (-) significa o percentual de cepas com resultado do teste positivo ou negativo. Ex: Lisina 75%+ = 75% das cepas são lisina positivas.
- g) V = valores >20% e <80% de reações positivas ou negativas; essas provas podem ser úteis para diferenciar duas espécies ou dois gêneros quando a reação só ocorre para uma delas. Ex.: ureia em relação a *E. coli* e *Citrobacter*. *E. coli* é negativa e *Citrobacter* variável. Se a reação encontrada for positiva, exclui-se *E. coli*. Pela importância clínica e epidemiológica, padrões não comuns de *Yersinia* e *Salmonella* spp. foram considerados, pois na prática a motilidade pode ser duvidosa e o H<sub>2</sub>S pode ser falso negativo.
- h) As provas destacadas com fundo cinza têm a finalidade de facilitar a busca de provas-chave na diferenciação bacteriana.
- i) Recomenda-se de rotina utilizar as provas do nível 1 que, para a maioria das bactérias da rotina, permite uma caracterização adequada. Quando houver necessidade (provas não conclusivas, fins epidemiológicos, etc) usar as provas de nível 2.

Lac MC= lactose em Mc Conkey

**Tabela 6** Identificação Bioquímica Simplificada das Principais Enterobactérias

Nível de Complexidade 1						
H <sub>2</sub> S	fenilalanina	indol	motilidade	Citrato	DNAse	Tabela
+	+					6.1
-	+					6.2
+	-	+				6.3a
+	-	-				6.3b
-	-	+	-			6.4
-	-	+	+			6.5
-	-	-	-			6.6
-	-	-	+	-		6.7
-	-	-	+	+	-	6.8a
-	-	-	+	+	+	6.8b

**Tabela 6.1** H<sub>2</sub>S (gás sulfídrico) positivo, Fenilalanina positivo

Indol +	<i>Proteus vulgaris</i>	PB 92%
Indol neg	<i>Proteus mirabilis</i>	PB 94%

**Tabela 6.2** H<sub>2</sub>S negativo, Fenilalanina positivo

Indol +	Citrato +	Ureia v	<i>Providencia spp.</i>	PB 88%
	Citrato neg	Ureia +	<i>Morganella morganii</i>	PB 72%
Indol neg	Citrato neg	Ureia +	<i>P. penneri</i>	PB 69%
	Citrato v	Ureia neg	<i>Enterobacter spp.</i>	PB <16%

**Tabela 6.3** H<sub>2</sub>S positivo, Fenilalanina negativo

a) Indol positivo							
Bactérias/Provas	Citrato	Motilidade	urease	lisina	lac (MC)	PB	
<i>Citrobacter freundii</i>	78%	89%	v	neg	+	25%	
<i>Edwardsiella tarda</i>	neg	+	neg	+	neg	99%	
b) Indol negativo							
Bactéria/Provas	urease	citrato	lisina	Motilidade	gás	sorotipagem	PB
<i>Salmonella spp.</i>	neg	+	+	+	+	+	
<i>S. typhi</i>	neg	neg	+	+	neg	+	97%
<i>S. gallinarum/S. pullorum</i>	neg	neg	+	neg	v	+	90%
<i>C. freundii</i>	v	+	neg	+	+	neg	52%

**Tabela 6.4** H<sub>2</sub>S negativo, FA negativo, Indol positivo, motilidade negativa

Bactéria/Provas	citrato	urease	lisina	lactose	gás	sorotipagem	PB
<i>Y. enterocolitica</i> <sup>1</sup>	neg	75%+	neg	neg	neg	+Yersinia	50%
<i>Shigella spp.</i>	neg	neg	neg	neg	neg	+Shigella	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	+	Não	99%
<i>E. coli inativa (rara)</i>	neg	neg	v	75%neg	neg	Invasora <sup>2</sup>	80%

1 – motilidade positiva à temperatura ambiente e negativa a 37°C

2 – em coprocultura testar p/*E. coli* invasora

**Tabela 6.5** H<sub>2</sub>S negativo, FA negativo, Indol positivo, Motilidade positiva

Bactéria/Provas	citrato	urease	lisina	lactose	gás	PB
<i>E. coli</i>	neg	neg	+	+	+	97%
<i>Citrobacter spp.</i>	+	v	neg	v	+	
<i>Aeromonas spp.</i> <sup>1</sup>	v	neg	+	neg <sup>2</sup>	v	

1 – oxidase positiva (verificar *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio*)

2 – *Aeromonas* Dnase positiva e *Plesiomonas* Dnase negativa

**Tabela 6.6** H<sub>2</sub>S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Bactéria/Provas	urease	citrato	lisina	gás	lactose	comentário	PB
<i>Shigella</i> spp. (colônia pequena)	neg	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>1</sup>	pos	pos	pos	pos	pos	colônia mucóide	100%
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>2</sup>	75%+	neg	neg	neg	neg	sorotipagem	50%
<i>P. agglomerans</i> <sup>3</sup>	neg	v	neg	neg	v	15% mot neg	9,6%

1 – cepas isoladas do trato respiratório superior, especialmente nariz podem ser ureia negativas e bioquimicamente pouco ativas (citrato V, lisina V), denominadas *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*

2 – motilidade(+) à temperatura ambiente

3 – pode ocorrer falsa motilidade negativa em meio semi-sólido e positiva em caldo

**Tabela 6.7** H<sub>2</sub>S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato negativo

Bact/Provas	lisina	lactose	sorotipagem	PB
<i>Hafnia alvei</i>	+	neg	negativa	7%6
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	neg	+	37%
<i>Salmonella paratyphi A</i>	neg	neg	+	90%
<i>P. agglomerans</i>	neg	v	negativa	25%
<i>Salmonella typhi</i>	pos	neg	pos	12%

**Tabela 6.8** H<sub>2</sub>S negativo, FA negativo, Indol negativo, Motilidade positiva, Citrato positivo

DNase/gelatinase negativos						
Bactéria/Provas	lisina	urease	lactose	gás	Sorotipo	PB
<i>Enterobacter aerogenes</i>	pos	neg	pos	++	neg	95%
<i>Enterobacter cloacae</i>	neg	v	pos	++	neg	95%
DNase/gelatinase positivos						
Bactéria/Provas	lisina	urease	lactose	gás	pig. verm.	PB
<i>Serratia marcescens</i>	pos	85% neg	neg	55% pos	v	95%
<i>Serratia liquefaciens</i>	pos	neg	90% neg	75% pos	neg	76%
<i>Serratia rubidae</i> <sup>1</sup>	55% pos	neg	pos	70% neg	v	85%

1 – raramente isolada

**Tabela 7** Identificação Bioquímica Simplificada das Principais enterobactérias

Nível de Complexidade 2						
H <sub>2</sub> S	fenilalanina	indol	motilidade	citrato	DNase	tabela
+	+	+				7.1a
+	+	-				7.1b
-	+	-				7.2a
-	+	+				7.2b
+	-	+				7.3
+	-	-				7.4
-	-	+	-			7.5
-	-	+	+			7.6
-	-	-	-			7.7
-	-	-	+	-		7.8
-	V	-	+	+	-	7.9
-	-	-	+	+	+	7.10

**Tabela 7.1** H<sub>2</sub>S positivo, Fenilalanina positivo

a) Indol positivos			
Bactéria/Provas	ornitina	sacarose	PB
<i>Proteus vulgaris</i>	neg	+	92%
<i>Morganella morganii</i>	+	neg	20%
b) Indol negativos			
	ornitina	citrato	PB
<i>Proteus mirabilis</i>	+	V (65%+)	94%
<i>Proteus penneri</i>	neg	neg	30%

**Tabela 7.2** H<sub>2</sub>S negativo, Fenilalanina positivo

a) Indol negativo				
Bactéria/Provas	urease	citrato	sacarose	ornitina
<i>Proteus penneri</i>	+	neg	+	neg
<i>Morganella morganii</i>	+	neg	neg	+
<i>P. agglomerans</i>	neg	+	75%+	neg
<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	+	+	+
b) Indol positivo				
Bactéria/Provas	Citrato			
<i>Morganella morganii</i>	neg			
<i>Providencia spp.</i>	+			

**Tabela 7.3** H<sub>2</sub>S positivo, Fenilalanina negativo e indol positivo

Bactéria/Provas	citrato	urease	lisina	ornitina	lactose	sacarose
<i>Citrobacter freundii</i>	78% +	44% +	neg	neg	78 %+	89%+
<i>Edwardsiella tarda</i>	neg	neg	+	+	neg	neg

**Tabela 7.4** H<sub>2</sub>S positivo, Fenilalanina negativo e indol negativo

Bactéria/Provas	Lisina	citrato	Ureia	ornitina	Motilidade	arabinose	Gás	Sorotip
<i>S. paratyphi A</i>	neg	neg	neg	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	neg	78%+	44+	neg	89%+	+	89%+	neg
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	neg	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	+	neg	neg	neg	+	neg	neg	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	25%+	neg	+	+	neg	+	+
<i>S. gallinarum</i>	+	neg	neg	neg	neg	+	neg	+
<i>S. pullorum</i>	+	neg	neg	+	neg	+	+	+
Outras <i>Salmonellas</i>	+	+	neg	+	+	+	+	+

Triagem rápida para principais bactérias H <sub>2</sub> S+			
Bactéria/prova	PYR	Glicerol	Fenilalanina
<i>Salmonella</i> spp.	neg	neg	neg
<i>Citrobacter</i> spp.	+	+	neg
<i>Proteus</i> spp.	neg	V	+

**Tabela 7.5** H<sub>2</sub>S negativo, Fenilalanina negativo, Indol positivo, Motilidade negativa

Bactéria/Provas	citrato	ureia	lisina	ornitina	lactose	gás	sorotip	PB
<i>Y. enterocolitica</i> <sup>1</sup>	neg	75% +	neg	+	neg	neg	+	50%
<i>Shigella</i> spp.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	+	50%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	neg	+	++	NI	99%
<i>E. coli</i> inativa (rara)	neg	neg	40%+	20%+	25%+	neg	Invasora <sup>2</sup>	80%

1 – motilidade positiva à temperatura ambiente e negativa a 35-37°C

2 – em coprocultura testar p/*E. coli* invasora

**Tabela 7.6** H<sub>2</sub>S negativo, Fenilalanina negativo, Indol positivo, motilidade positiva

Bactéria/Provas	citrato	ureia	lisina	ornitina	lactose	gás	PB
<i>E. coli</i>	neg	neg	90%+	65 +	+	+	97%
<i>C. diversus (koseri)</i> <sup>1</sup>	+	75%+	neg	+	50%+	+	97%
<i>Citrobacter amalonaticus</i> <sup>1</sup>	+	85%+	neg	+	35%+	+	97%
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>2</sup>	neg	75%+	neg	+	neg	neg	vide 2
<i>Pantoea agglomerans</i>	50%+	20%+	neg	neg	40%+	20%+	16%
<i>Aeromonas spp</i> <sup>3</sup>	V	neg	+ <sup>4</sup>	+	neg	V	

1 – *C. koseri* = malonato+, *C. amalonaticus*= malonato negativo

2 – motilidade negativa a 35-37°C e positiva a temperatura ambiente

3 – oxidase positiva: *Aeromonas* é Dnase positiva e *Plesiomonas shigelloides* é Dnase negativa

4 – *Aeromonas caviae* é lisina negativa e lactose positiva

**Tabela 7.7** H<sub>2</sub>S negativo, Fenilalanina negativo, Indol negativo, Motilidade negativa

Bactéria/Provas	Ureia	citrato	Lisina	gás	lactose	comentário	PB
<i>Shigella spp.</i> (colônia pequena)	neg	nega	neg	neg	neg	Sorotipagem positiva	50%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	Colônia Mucóide	100%
<i>Klebsiella spp.</i> <sup>1</sup>	neg	V	V	V	V	Mucóide	
<i>Citrobacter freundii</i>	V	78%+	neg	+	78%+	11% motilidade negativa	16%
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>2</sup>	75%+	neg	neg	neg	neg	Sorotipagem positiva	50%
<i>Pantoea agglomerans</i> <sup>3</sup>	neg	V	neg	neg	V	15% motilidade negativa	9,6%

1 – cepas isoladas do trato respiratório superior, especialmente nariz podem ser ureia negativas e bioquimicamente pouco ativas (cittrato V, lisina V), denominadas *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*

2 – motilidade(+) à temperatura ambiente

3 – pode ocorrer falsa motilidade (negativa em meio semi-sólido e positiva em caldo)

**Tabela 7.8** H<sub>2</sub>S negativo, Fenilalanina neg, Indol negativo, Motilidade +, Citrato neg

Bactéria/Provas	Lisina	Ornitina	Lactose	Urease	Arabinose	Sorologia	PB
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	neg	neg	+	neg	76%
<i>Salmonella typhi</i> <sup>1</sup>	+	neg	neg	neg	neg	+	
<i>S. choleraesuis</i>	+	+	neg	neg	neg	+	
<i>Y. enterocolitica</i> <sup>2</sup>	neg	+	neg	75%+	+	+	vide 2
<i>S. paratyphi A</i>	neg	+	neg	neg	+	+	
<i>Pantoea agglomerans</i>	neg	neg	40%+	20%+	+	neg	25%

1 – H<sub>2</sub>S pode ser positivo no TSI com 48h

2 – motilidade negativa a 35°C e positiva a 25°C

**Tabela 7.9** Tabela fracionada – H<sub>2</sub>S negativo, FA variável, Indol negativo, Motilidade

Positiva, Citrato positivo					
Dnase e Gelatina negativos					
a) Lisina negativa, Ornitina negativa e fenil negativo					
Bactéria/Provas	Arginina	Gás		Esculina	
<i>Citrobacter freundii</i>	67%+	+		neg	
<i>E. agglomerans</i>	neg	neg		60%+	
b) Lisina negativa e Ornitina positiva					
Bactéria/Provas	Ureia	Fenil	Malonato	Esculina	ocorrência
<i>Enterobacter cloacae</i>	65%+	neg	75%+	30%+	comum
<i>Enterobacter sakazaki</i>	neg	50%+	18%+	+	raro
c) Lisina positiva, ornitina positiva e fenil negativo					
Bactéria/Provas		Ureia		Lactose	
<i>E. aerogenes</i>		neg		+	
<i>Enterobacter gergoviae</i>		+		55%+	

**Tabela 7.10** Tabela completa – H<sub>2</sub>S negativo, FA variável, Indol neg., Motilidade positiva, Citrato positivo, Dnase e Gelatina negativos

Bactéria/Provas	Ureia	Fenil	Lisina	Arginina	Ornitina	Malonato	Gás	Lactose	Esculina
<i>C. freundii</i>	44%+	0	0	67%+	0	11%+	89%+	78%+	0
<i>E. aerogenes</i>	2%+	0	98%+	0	98%+	95%+	100%+	95%+	98%+
<i>E. cloacae</i>	65%+	0	0	97%+	96%+	75%+	100%+	93%+	30%+
<i>E. agglomerans</i>	20%+	20%+	0	0	0	65%+	20%+	40%+	60%+
<i>E. gergoviae</i>	93%+	0	90%+	0	100%+	96%+	98%+	55%+	97%+
<i>E. sakazakii</i>	1%+	50%+	0	99%+	91%+	18%+	98%+	99%+	100%+

**Tabela 7.11** H<sub>2</sub>S neg., Fenilalanina neg., Indol neg., Motilidade positivo, Citrato positivo, Dnase e Gelatina (positivas)

Bactéria/Provas	Lisina	Ornitina	L-arabinose	Malonato	Motilidade	Lactose
<i>Serratia marcescens</i>	99% +	99% +	Neg	Neg	Pos	Neg
<i>S. marcescens biog</i> <sup>1</sup>	55% +	65% +	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>Serratia liquefaciens</i>	95% +	95% +	Pos	Neg	Pos	Neg
<i>Serratia rubidae</i>	55% +	neg	Pos	Pos	Pos	Pos

Tabela 7.12 Caracterização geral das principais enterobactérias de importância clínica (%)

Bactéria/Provas	Indol	Citrato	H <sub>2</sub> S	Ureia	Fenilala	Lisina	Arginina	Ornitina	Motil.
<i>Citrobacter freundii</i>	33	78	78	44	0	0	67	0	89
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	99	99	0	75	0	0	80	99	95
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	100	95	5	85	0	0	85	95	95
<i>Edwarsiella tarda</i>	99	1	100	0	0	100	0	100	98
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	0	2	0	98	0	98	97
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	100	0	65	0	0	97	96	95
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	99	0	93	0	90	0	100	90
<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	99	0	1	50	0	99	91	96
<i>Escherichia coli</i>	98	1	1	1	0	90	17	65	95
<i>Escherichia coli inativa</i>	80	1	1	1	0	40	3	20	5
<i>Shigella dysenteriae</i>	45	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	50	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Shigella boydii</i>	25	0	0	0	0	0	10	2	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	2	98	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	10	0	4	0	100	6	98	85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	98	0	95	0	98	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	95	0	90	1	99	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	30	0	10	0	40	6	0	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	95	0	20	95	95	V	0	95	V
<i>Pantoea agglomerans</i>	20	50	0	20	20	0	0	0	85
<i>Proteus mirabilis</i>	2	65	98	98	98	0	0	99	95
<i>Proteus vulgaris</i>	98	15	95	95	99	0	0	0	95
<i>Proteus penneri</i>	0	0	30	100	99	0	0	0	85
<i>Providencia rettgeri</i>	99	95	0	90	98	0	0	0	94
<i>Providencia stuartii</i>	98	93	0	30	95	0	0	0	85
<i>Providencia alcalifaciens</i>	99	90	0	0	90	0	0	0	96
<i>Salmonella spp.</i>	1	95	95	1	0	98	70	97	95
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	97	0	0	98	3	0	97
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	25	50	0	0	95	55	100	95
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	10	0	0	0	15	95	95
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	100	0	0	90	10	95	0
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	100	10	95	0
<i>Salmonella outras</i>	1	90	100	0	0	99	70	99	99
<i>Serratia marcescens</i>	1	98	0	15	0	99	0	99	97
<i>Serratia marcescens bio 1</i>	0	30	0	0	0	55	4	65	14
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	90	0	3	0	95	0	95	95
<i>Serratia rubidae</i>	0	95	0	2	0	55	0	0	85
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	0	0	75	0	0	0	95	2

Bactéria/Provas	gelatina	Malonato	Gás glicose	lactose	sacarose	esculina	DNase
<i>Citrobacter freundii</i>	0	11	89	78	89	0	0
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	0	95	98	50	40	1	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	1	97	35	9	5	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	100	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	100	95	100	98	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	75	100	93	97	30	0
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	96	98	55	98	97	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	0	18	98	99	100	100	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	95	95	50	35	0
<i>Escherichia coli inativa</i>	0	0	5	25	15	5	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	0	0	3	1	1	0	0
<i>Shigella boydii</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	2	1	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	50	98	5	10	7	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	93	97	98	99	99	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	95	97	100	100	100	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	3	50	30	20	80	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	95	0	0	75	60	0
<i>Morganella morganii grupo</i>	0	1	99	1	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	65	20	40	75	60	0
<i>Proteus mirabilis</i>	90	2	90	2	15	0	50
<i>Proteus vulgaris</i>	91	0	85	2	97	50	80
<i>Proteus penneri</i>	50	0	45	1	100	0	40
<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	10	5	15	35	0
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	0	2	50	0	10
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0	85	0	15	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	90	1	1	5	2
<i>Salmonell typhi</i>	0	0	0	1	0	0	0
<i>Salmonella cholerasuis</i>	0	0	95	0	0	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	0	99	0	0	0	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	0	0	0	0	0	0	10
<i>Salmonella pullorum</i>	0	0	90	0	0	0	0
<i>Salmonella outras</i>	1	V	100	V	1	0 ou 15	1
<i>Serratia marcescens</i>	90	3	55	2	99	95	98
<i>Serratia marcescens bio 1</i>	30	0	0	4	100	90	82
<i>Serratia liquefaciens</i>	90	2	75	10	98	97	85
<i>Serratia rubidae</i>	90	94	30	100	99	94	99
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	6	5	5	95	25	5

### 3.5 Identificação sorológica

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, encontram-se conjuntos de amostras bacterianas bioquimicamente homogêneas e sorologicamente relacionadas, que constituem os gêneros e, segundo alguns critérios, podem dividir-se em espécies.

As amostras relacionadas bioquimicamente são divididas em subgrupos ou tipos, por critério sorológico, de acordo com a presença dos antígenos somático (**O**), flagelar (**H**) e de envoltório ou cápsula (**K**). Desse modo, os sorotipos são divisões baseadas no relacionamento antigênico, enquanto os biotipos são amostras do mesmo sorotipo que diferem em características bioquímicas.

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

- a) Preparar uma suspensão bastante densa (aspecto leitoso) da bactéria a ser testada, utilizando-se solução salina a 0,85%. A massa bacteriana é proveniente do Ágar TSI usado na identificação bioquímica ou, de preferência, em Ágar nutriente inclinado após repique para obtenção de massa de germes. Coloca-se a salina sobre o crescimento bacteriano ocorrido na superfície inclinada do meio e, após alguns minutos, agitar o tubo de modo a obter a suspensão bacteriana. Bactérias em fase rugosa tendem a se autoaglutinar, e não devem ser utilizadas na classificação sorológica.
- b) Sobre uma lâmina limpa misturar uma gota do anti-soro conhecido e da suspensão bacteriana a ser testada, e, com movimentos circulares, tornar a mistura bastante homogênea continuando o movimento durante um ou no máximo dois minutos. O aparecimento de aglutinação, nesse intervalo de tempo, indica positividade da reação.
- c) Algumas vezes, é necessário o aquecimento da suspensão bacteriana em banho-maria fervente, durante 15 minutos, com finalidade de eliminar estruturas mais externas da célula que têm ação interferente na reação. Após resfriamento da suspensão repete-se o teste. Caso ocorra a aglutinação, confirma-se a prova.

#### 3.5.1 Identificação de *Salmonella*:

No gênero *Salmonella* existe uma grande quantidade de sorotipos, que não são mais considerados como espécies, e sua identificação sorológica completa e detalhada é uma tarefa restrita aos denominados Laboratórios de Referência. Para identificação rotineira no laboratório clínico, utiliza-se basicamente três antisoros:

- a) Anti-*Salmonella* polivalente somático (**Grupos A,B,C,D,E**)
- b) Anti-*Salmonella* somático, Grupo D (**S. typhi**)
- c) Anti-*Salmonella*, anti **Vi**

Quando o denominado antígeno de virulência (Vi) está presente, poderá bloquear a aglutinação do antígeno somático do grupo D (*Salmonella typhi*). Desse modo, a suspensão deverá ser aquecida em banho-maria fervente e testada novamente com os três anti-soros citados, dando o resultado abaixo no caso de *Salmonella typhi*.

A partir de uma reação positiva feita apenas com o antígeno somático polivalente, existe condição de confirmar a amostra como sendo do gênero *Salmonella*, sem especificar o sorotipo ou sorovar.

Anti-soros	Antígeno vivo	Antígeno aquecido
Anti-soro poli somático	+	+
Grupo D somático	-	+
Anti Vi	+	-

Após a identificação bioquímica e aglutinação com soro polivalente, as amostras poderão ser testadas com os soros A, B, C, D, E monovalentes. A bactéria pertencerá ao sorogrupo em cujo soro houver aglutinação. Se a reação for negativa deve-se aquecer a metade da suspensão em banho-maria fervente e repetir o teste. A metade não aquecida deverá ser utilizada para determinação de antígenos flagelares.

A identificação até sorotipos poderá ser feita com auxílio dos soros flagelares (a, b, c, d, i, 1, 2, 5), e através de sua utilização é possível identificar as seguintes amostras:

Grupo Sorológico	Sorotipos
Grupo O <sub>2</sub> (A)	<i>Salmonella Paratyphi A</i>
Grupo O <sub>4</sub> (B)	<i>Salmonella Paratyphi B</i> e <i>S. Typhimurium</i>
Grupo O <sub>7</sub> (C <sub>1</sub> )	<i>Salmonella Paratyphi C</i> e <i>S. Cholerae suis</i>
Grupo O <sub>5</sub> (D <sub>1</sub> )	<i>Salmonella Typhi</i>

### 3.5.2 Identificação de *Shigella*:

O gênero *Shigella* está constituído de apenas quatro sorogrupos, que são identificados sorologicamente, de maneira simplificada, com a utilização de anti-soros polivalentes. Excepcionalmente, utiliza-se apenas o antisoro monovalente de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (bacilo de Shiga), por ser o mais patogênico.

Grupo Sorológico	Espécie Bacteriana	Sorotipos
- Grupo A	<i>Shigella dysenteriae</i>	15 sorotipos
- Grupo B	<i>Shigella flexneri</i>	8 sorotipos
- Grupo C	<i>Shigella boydii</i>	19 sorotipos
- Grupo D	<i>Shigella sonnei</i>	1 sorotipo

As culturas suspeitas deverão ser testadas, primeiro com os soros contra *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, que representam mais de 95% das amostras de *Shigella* isoladas em nosso meio. Caso não haja aglutinação, prosseguir com os outros soros.

Não ocorrendo aglutinação, é possível que a cultura seja rica em antígenos de superfície que geralmente impedem o contato do soro com o antígeno somático O. Esses antígenos devem ser destruídos pelo aquecimento da suspensão bacteriana por 15 minutos em banho-maria fervente, procedimento que pode ser adotado como de rotina na sorologia desse gênero.

### 3.5.3 Identificação de *Escherichia coli*

As amostras de *Escherichia coli* que causam diarreia pertencem a cinco grupos principais: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), a qual inclui o subgrupo referido como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Não existe nenhuma prova bioquímica que possa, seguramente, distingui-las entre si ou de outros tipos de *E. coli* pertencentes à flora normal do intestino. As cepas diarreio gênicas de *E. coli* são identificadas através de métodos moleculares, tais como PCR utilizando iniciadores específicos, ou métodos para verificação da produção de toxinas, realizadas somente em laboratórios de referência ou de pesquisa. As cepas de EPEC e EIEC podem ser identificadas presuntivamente por provas de sorotipificação rotineira. Considerando que um mesmo sorogrupo pode pertencer a uma ou mais categorias diarreio gênicas, as amostras devem ser encaminhadas a laboratórios de referência para confirmação.

#### Soro Anti *E. coli* Enteropatogênica Clássica (EPEC):

- Polivalente A: anti 026, 055, 0111, 0119
- Polivalente B: anti 0114, 0125, 0142, 0158
- Polivalente C: anti 086, 0126, 0127, 0128

Para os laboratórios que ainda utilizam a sorotipificação, recomenda-se que essa técnica seja feita utilizando-se a mesma técnica descrita para outras enterobactérias. Um melhor resultado é obtido, repicando-se cerca de cinco colônias características a partir do Ágar EMB (Eosin Metilen Blue) ou Mc

Conkey, para um tubo contendo Ágar Nutriente Inclinado, com finalidade de obter massa de germes. É feita então uma suspensão bacteriana em solução salina, a qual será testada utilizando-se anti-soros polivalentes, abrangendo os sorotipos mais prevalentes na população.

**Soro Anti *E. coli* Enteroinvasora (EIEC):**

- Polivalente A: anti 028ac, 029, 0136, 0144, 0152
- Polivalente B: anti 0112ac, 0124, 0143, 0164, 0167

**Soro Anti *E. coli* O 157 (EHEC):**

- utilizar o soro para O157:H7.

**A) Observações importantes:**

- Bactérias isoladas com o mesmo padrão de provas de materiais nobres em surtos de infecção relacionada à assistência à saúde ou isoladas de infecções da comunidade que possam suspeitar de um surto, ou pela gravidade da doença, ou por um padrão não esperado de resistência, devem ser remetidas ao Laboratório de Referência para melhor caracterização.
- No caso de bactérias que não se enquadram nos padrões definidos acima, recorrer a testes suplementares como os descritos abaixo ou usar kits com maior número de provas ou em caso de importância clínica (descritos acima) enviar a Laboratório de Referência.

## Referências Bibliográficas

BARON, E.J., FINEGOLD, S.M. – *Bailey and Scott's. Diagnostic Microbiology*. 8th Ed. St. Louis, Mosby, 1990.

CHRISTENSEN, W.B. – Ureia decomposition as means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol*, 52: 461-466, 1946.

FARMER III, J.J., KELLY, M.T. – Enterobacteriaceae. IN: Balows A.; Hausler, W.J.Jr.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D. & Shadomy, H.J. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 5<sup>th</sup> Ed. ASM. Washington, D.C., 1991.

FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12<sup>th</sup> ed. St.Louis. Mosby Elsevier, 2007, 1031p.

WINN, J JR., ALLEN, S, JANDA, W.M., KONEMAN, E, PROCOP, G, SCHRENKENBERGER, P.C. WOODS, G. *KONEMAN – Color Atlas and Textbook OF Diagnostic Microbiology*. 6<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1535p.

Mc FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore. Ed. William & Wilkins Co., 2000.

VERSALOVIC, J; CARROLL, K.C; GUIDO et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 10<sup>th</sup> ed. Washington DC. American Society for Microbiology ASM Press 2011

OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*, 2<sup>a</sup>. ed Sarvier, 2004 São Paulo Brasil,.

RHODEN, R.A., HERMANN, G.J. *Isolation and identification of Enterobacteriaceae in the clinical laboratory*. U.S. DHEW. Center for Disease Control. Atlanta Ga., 1974.

SACK, R.B., TILTON, R.C., WEISFELD, A.S. CUMITECH 12. *Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea*. Coord. Ed. S.J. Rubin. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1980.

TOLEDO. M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano desaminase. *Rev. Microbiol*. 13(04): 309 – 315, 1982.

TOLEDO. M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. MILI. Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev. Microbiol*. 13(04): 230 – 235, 1982.

GARRITY, GMB; DAVID, R; CASTENHOLZ, RW. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* Garrity, (Eds.) Second edition – Springer 721p.



## Capítulo 4:

# Bastonetes Gram-Negativos Não Fermentadores

Carlos Emílio Levy  
Doroti de Oliveira Garcia

### 4.1 Introdução

Os bacilos Gram-negativos classificados como não fermentadores (BNFs) são micro-organismos aeróbios, não esporulados, que se caracterizam por serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de fermentação, degradando-os pela via oxidativa.

A identificação dos BNFs sempre foi um desafio para os laboratórios de rotina em microbiologia, considerando que a maioria deles não realiza esse tipo de identificação, ou o faz de maneira elementar em virtude da pouca incidência em amostras ambulatoriais, assim como pela complexidade e elevado custo dos esquemas completos de identificação.

A caracterização desse grupo de bactérias é de grande importância nos casos de infecção relacionada à assistência à saúde. *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* na atualidade estão entre as bactérias mais isoladas em hemoculturas e amostras do trato respiratório de grandes hospitais. No entanto, os demais BNFs representam um percentual pequeno de isolamentos, quando comparados com outros agentes etiológicos, mas alguns deles apresentam resistência elevada a vários antibióticos (complexo *B. cepacia* e *S. maltophilia*) e são capazes de causar infecções graves. Essas bactérias colonizam e causam infecções oportunistas, em especial em pacientes graves oriundos de CTI e submetidos a procedimentos invasivos. Muito há por se conhecer sobre a importância clínica, caracterização laboratorial, taxonomia, sensibilidade a drogas e patogenicidade desse grupo de micro-organismos, sendo importante classificá-los em nível de gênero e espécie.

O número de bactérias não fermentadoras conhecidas é muito grande. Foram selecionadas aquelas atualmente consideradas de maior importância clínica (\*) e as demais para diagnóstico diferencial entre si.

#### 4.1.1 BNFs de importância clínica consideradas nesse capítulo\*:

<i>Acinetobacter</i> spp.*	<i>Alcaligenes</i> spp.*
<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> *	<i>Elizabethkingia</i> e <i>Chryseobacterium</i> spp.*
<i>Methylobacterium</i> spp.	<i>Moraxella</i> spp.*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i> *	<i>Roseomonas</i> spp.
<i>Stenotrophomonas</i> spp.*	<i>Shewanella</i> spp.
<i>Sphingobacterium</i> spp.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

#### 4.1.2 Triagem inicial para identificação de rotina dos BNFs

A partir de colônias isoladas em cultura pura com 24-72 horas de crescimento, nos meios de cultura e isolamento primário, deve-se proceder a realização das técnicas de identificação e diferenciação dos BNFs.

Observar se há pigmento da colônia isolada (amarelo, róseo, cor metálica)

#### 4.1.3 Testes necessários para triagem inicial para identificação de rotina dos BNFs

- Tubo com TSI (tríplice açúcar ferro)
- Tubo de TSA (tripticase soja agar)\*<sup>1</sup> inclinado
- Disco de oxidase ou reativo de oxidase
- Caldo TSB (tripticase soja caldo) para motilidade em lâmina
- Coloração de Gram
- Semeadura em placa de Ágar MacConkey

\*<sup>1</sup> – ou outro meio similar, sem adição de corantes para verificar pigmento e manter o inóculo.

Semear uma única colônia nos meios TSI, TSA e TSB e incubar a 30°C por 16-24 horas. Realizar coloração de Gram, oxidase, motilidade em lâmina a fresco, semear em placa de Ágar MacConkey\*<sup>2</sup> e observar o crescimento a 30°C por 24-72 horas, pois alguns BNFs crescem lentamente.

\*<sup>2</sup> – ou considerar o crescimento no primo isolamento, quando utilizado o Ágar MacConkey.

## 4.2 Semeadura, leitura e interpretação das provas de identificação utilizadas na triagem inicial

### TSI

- Semear com agulha picando até o fundo do tubo e na superfície do ágar inclinado.

### Leitura TSI

- Não fermentador: o meio permanece inalterado, vermelho (alcalino) no ápice e na base.
- Verificar a produção de H<sub>2</sub>S.

### Disco de oxidase

Retirar uma alçada da massa bacteriana (a partir do TSA), utilizando alça de platina ou descartável.

Esfregar sobre a fita ou disco teste; pode umedecer o papel com 1 gota de salina estéril. A leitura é feita em 15 a 30 segundos.

A cor violeta forte aparece rapidamente. Complexo *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia* podem dar reação fraca ou lenta, em alguns casos após 30 segundos.

### Reativo de Oxidase

Umedecer um papel de filtro, colocado no interior de uma placa de Petri, com solução de oxalato de p-aminodimetilanilina a 1%\*.

Esfregar uma alçada da massa bacteriana (a partir do TSA) no papel de filtro umedecido, utilizando alça de platina ou descartável.

A leitura é feita em 15 a 30 segundos.

A cor púrpura forte aparece rapidamente nas amostras oxidase positiva. Complexo *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia* podem dar reação fraca ou lenta, em alguns casos após 30 segundos.

\*Preparar a solução e alíquotar em pequenas frações. Conservar a -20°C. Descongelar apenas no momento do uso.

### Caldo TSB – Motilidade

Colocar uma gota do caldo com crescimento bacteriano (16-24 horas a 30°C) sobre uma lâmina nova.

Cobrir a gota com uma lamínula e levar ao microscópio. Observar com aumento de 400 x. Motilidade Positiva: presença de bactérias cruzando o campo em diferentes direções ou girando em torno dela mesma.

Motilidade Negativa: movimentos vibratórios fracos.

Movimento Browniano: Quando o movimento de todas as bactérias é numa mesma direção, provavelmente é o movimento do líquido entre a lâmina e a lamínula.

**Obs: Verificar a motilidade em temperaturas de 37°C e 20°C (ambiente).**

## Gram

Observar a coloração, morfologia e a disposição das células bacterianas.

### Grupamento inicial para a identificação dos bacilos gram-negativos não fermentadores mais frequentemente isolados e de importância clínica

GÊNERO	MORFOLOGIA CELULAR	OXIDASE	MOTILIDADE/TIPO	Cresc. em Ágar MacConkey	OF GLICOSE
<i>Pseudomonas</i>	Bacilar	+a	+/polar	+	O/I
<i>Alcaligenes/ Achromobacter</i>	Bacilar	+	+/peritríqueo	+	O/I ou A
<i>Burkholderia</i>	Bacilar	+ lento	+/polar	+	O
<i>Stenotrophomonas</i>	Bacilar	+ lento	+/polar	+	O/I
<i>Acinetobacter</i>	Coco bacilarCocóide aos pares	neg	neg	+	O/I
<i>Moraxella</i>	Cocobacilar	+	neg	V	O
<i>Elizabethkingia/ Chryseobacterium</i>	Bacilar (pleomórfico)	+	neg	V	O

<sup>a</sup> exceto *P. luteola* e *P. oryzihabitans* que são oxidase negativa

O = oxidativo | I = inerte | A = alcalino | V = variável | neg = negativo

### Observações:

- Produção de H<sub>2</sub>S em TSI – se positivo: suspeita de *Shewanella* spp.
- Colônias bem rugosas, amarelas, oxidase negativa, móveis – suspeita de *Pseudomonas oryzihabitans* e *P. luteola*
- Para visualização de flagelos *vide* coloração específica no final desse capítulo.

No caso de identificações duvidosas, rever:

- **Motilidade:** é comum falso negativo; repetir com caldo incubando 6 horas.
- **Oxidase:** reações duvidosas repetir com repique novo.

## 4.3 Testes necessários para a identificação bioquímica dos BNFs após a triagem inicial

Tubo de OF* glicose (com vaselina)	Tubo de OF* glicose (sem vaselina)
Tubo com lisina	Tubo com arginina
Tubo com ornitina (complementar em alguns casos)	Tubo controle de aminoácidos
Disco de PYR	Caldo TSB crescimento 42°C
Tubo ágar citrato	Tubo ágar ureia
Tubo de caldo indol	Disco de Polimixina
Tubo com ágar esculina	Disco de Imipenem
Tubo com gelatina	Placa de DNase
Tubo com caldo NaCl 6%	

\* pode ser utilizado o MEVAG (Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides) como base para a oxidação-fermentação é um meio mais sensível para a detecção da oxidação de açúcares, mesmo em quantidades mínimas. Pode ser utilizado com maior eficácia que o OF (*vide* fascículo de meios de cultura).

### Semeadura, leitura e interpretação das provas de identificação bioquímica

A partir do crescimento no tubo de TSA (ou similar) utilizado para a realização da prova de oxidase, deve-se proceder a realização de provas de identificação e diferenciação dos BNFs. Se necessário, semear em mais de um tubo de TSA (ou similar) para a obtenção de maior quantidade de massa bacteriana. Preparar uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,85%, correspondente à escala 0,5-1,0 de McFarland.

PROVAS	SEMEADURAS	LEITURA E INTERPRETAÇÃO
Tubo de OF glicose (com e sem vaselina)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Picar com agulha até o fundo do tubo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fermentador: os dois tubos ficam amarelos (ácido)</li> <li>Oxidativo:               <ul style="list-style-type: none"> <li>tubo sem vaselina amarelo</li> <li>tubo com vaselina verde</li> </ul> </li> <li>Inerte ou alcalino: dois tubos não mudam de cor (inerte) ou o tubo sem vaselina fica azulado (alcalino). Aguardar, no mínimo, 72h para definir como inerte, pois pode ocorrer a oxidação tardia ou lenta.</li> </ul>
Tubo com pedaço de filme com gelatina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilizar um volume da suspensão bacteriana suficiente para deixar o fragmento imerso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incubar a 30°C. Se negativo, aguardar no mínimo 72h. Se positivo, ocorre precipitado cinza no fundo do tubo</li> </ul>
Placa de DNase	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear com alça em "spot" (círculo de 1 cm de diâmetro)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adicionar HCl 1N e aguardar 5 minutos</li> <li>Observar a presença de halo transparente em volta do inóculo positivo enquanto o restante do meio fica leitoso</li> <li>Se negativo, repetir o teste com leitura em 72h</li> </ul>
Tubo com lisina, arginina, ornitina, controle de aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Usar inóculo denso ou 3 gotas da suspensão bacteriana; pode adicionar 2 mL de vaselina líquida no tubo com lisina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>"Comparar os tubos testes dos aminoácidos com o controle negativo</li> <li>Tubo controle negativo deve ficar azul esverdeado pálido e as provas positivas ficam de cor púrpura</li> <li>Se negativo, aguardar até 05 dias</li> </ul>
Ureia	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear com agulha inóculo denso na superfície do meio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A cor rosa forte aparece em todo o meio após 24 a 72 h de incubação. Uma ligeira mudança de cor, rósea no ápice, que não progride após um tempo de incubação mais longo, é considerada negativa</li> <li><i>Bordetella bronchiseptica</i>: reação positiva em 4 h</li> </ul>
Citrato de Simmons	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear com agulha na superfície do meio ou uma gota da suspensão bacteriana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A cor azul forte aparece no pico, e após um tempo de incubação mais longo estende-se a todo o meio</li> </ul>
Caldo TSB – crescimento a 42°C e 44°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear 1-2 gotas da suspensão bacteriana no caldo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ocorre turbidez no meio ou é nítido o aumento da densidade bacteriana</li> <li>Ideal comparar com controle com mesmo inóculo mantido a temperatura ambiente</li> </ul>
Tubo com caldo NaCl 6,5%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear 1-2 gotas da suspensão bacteriana no caldo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A presença de turbidez e mudança de cor indicam crescimento</li> </ul>

PROVAS	SEMEADURAS	LEITURA E INTERPRETAÇÃO
Tubo com ágar esculina	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear com agulha, em estria na superfície do meio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ocorre um precipitado negro intenso nas provas positivas a partir de 6 horas de incubação até 48h</li> <li>Cor castanho-escuro é considerada prova negativa; a cor deve-se à produção de pigmentos por alguns BNFs</li> </ul>
Tubo de caldo indol	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inocular 3 gotas da suspensão bacteriana no caldo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Colocar 5 gotas de xilol e agitar bem o tubo.</li> <li>Adicionar 5 gotas do reagente de Erlich ou Kovacs.</li> <li>Observar a presença de anel púrpura-pálido ou intenso que revelam prova positiva</li> </ul>
Discos de polimixina e imipenem	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear com <i>swab</i> (como para antibiograma) em Ágar Mueller Hinton</li> <li>Colocar os discos</li> <li>Incubar a <math>35 \pm 2^\circ\text{C}</math> por 16-24 hs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Polimixina: Qualquer halo em torno do disco significa sensibilidade. Gênero <i>Burkholderia</i> é intrinsecamente R</li> <li>Imipenem: <i>S. maltophilia</i> é intrinsecamente R</li> </ul>
Disco de PYR	<ul style="list-style-type: none"> <li>Colocar o disco sobre colônias de crescimento recentes ou fazer suspensão densa</li> <li>Depositar 3 a 4 gotas sobre o disco de PYR</li> <li>Incubar durante 4 horas numa placa vazia com umidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Colocar o disco teste em contato com o crescimento bacteriano</li> <li>Colocá-lo sobre uma lâmina</li> <li>Depositar uma gota do reagente que acompanha o teste</li> <li>A presença de cor alaranjada é prova positiva; mantendo a cor amarela a prova é considerada negativa</li> <li>Recomenda-se testar controles positivo e negativo</li> </ul>

## 4.4 Procedimentos para a identificação bioquímica dos BNFs

### 4.4.1 Resultado do OF-Glicose (OF-G)

<b>Bacilo (cocobacilo) Gram-negativo oxidase negativa: OF-G oxidativo/inerte:</b>		
<b>motilidade negativa:</b>	Cocobacilos ou cocos Gram-negativos aos pares	Tabela 1
<b>motilidade positiva:</b>	Bacilos Gram-negativos	Tabela 3 ou 4
<b>Cocos Gram-negativo, oxidase positiva, motilidade negativa, OF-G inerte</b>		Tabela 2
<b>Bacilo Gram-negativo oxidase positiva lenta OF-G oxidativo/inerte, Móveis</b>		Tabela 4
<b>Se pigmento rosa:</b>		Tabela 8
<b>Bacilo Gram-negativo oxidase positiva; OF-G oxidativo/inerte/alcalino:</b>		
<b>motilidade negativa e pigmento amarelo:</b>		Tabela 5
<b>motilidade positiva:</b>		
	se OF-G Oxidativo seguir	Tabela 6
	se TSI com H <sub>2</sub> S seguir	Tabela 7
	se OF-G Inerte/alcalino, seguir	Tabela 8
	se pigmento rosa, seguir	Tabela 9

**Observações:**

**Lisina e ornitina** podem ser negativas em 24h e positivar com 48-72h. Rever quando houver duas reações positivas, pois raramente ocorrem.

**Caldo NaCl 6,5%** pode turvar mas não virar o indicador no caso de *Alcaligenes* (OF glicose alcalino).

**4.4.2 Tabelas de identificação dos BNFs**

**Tabela 1** Coco-bacilos ou cocos Gram-negativo aos pares, NF, Oxidase negativa e Motilidade negativa

Micro-organismos <sup>a</sup>		OF-G	Cresc. 44°C	Citrato	Gelatina	Hemólise <sup>b</sup>
Complexo <i>A.baumannii</i> – <i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i> / <i>A. genoespécie 13TU</i>	O	+	+	neg	neg
	<i>A. calcoaceticus</i> / <i>A. genoespécie 3</i>	O	neg	+	neg	neg
<i>A. haemolyticus</i>		I/O	neg	+	+	+
<i>A. lwoffii</i>		I	neg	neg	neg	neg

<sup>a</sup>colônias lisas, não pigmentadas, semelhantes às de enterobactérias

<sup>b</sup>em Ágar sangue (prova opcional)

neg= negativo | O= oxidativo | I= inerte

**Tabela 2** Cocos Gram-negativo (NF), Oxidase positivo, Motilidade negativa, OF-G inerte

Micro-organismos	Urease	Gelatina	DNase	Cresc em Ágar Mac Conkey
<i>Moraxella catarrhalis</i>	neg	neg	+	neg
<i>Moraxella canis</i>	neg	neg	+	+
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> / <i>Oligella ureolytica</i>	positivo	neg	neg	+
<i>Moraxella lacunata</i>	neg	pos	neg	neg
<i>Moraxella</i> spp.*	neg	neg	neg	V

\* *Moraxella* spp.: *nonliquefaciens*, *lincolnii*, *osloensis*, *atlantae* e *Oligella urethralis*

neg= negativo V = variável

**Tabela 3** Bacilos Gram-negativo (BNF), Oxidase negativa, Motilidade positiva, OF-G oxidativo, Lisina negativa

Micro-organismos	Lisina	Arginina	DNase	Pol	IPM	Características da colônia
<i>Pseudomonas luteola</i>	Neg	+	Neg	S	S	Bem rugosa, pigmento amarelo, aderente
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Neg	neg	Neg	S	S	Bem rugosa, pigmento amarelo, aderente

neg – negativo Pol – polimixina IPM – imipenem S – sensível R – resistente

**Tabela 4** Bacilos Gram-negativo (BNF), Oxidase negativa ou positiva lenta, Motilidade positiva<sup>a</sup>, OF-G oxidativo ou inerte, Lisina positiva

Micro-organismos	Oxidase	Lisina	Arginina	DNase	Pol	IPM	Características da colônia
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	+ lenta	maioria +	neg	neg	R	S	Cremosa, lisa, algumas com pigmento bem amarelo em TSI <sup>b</sup>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	neg/ + lenta	93% +	neg	+	S	R	Lisas, amarelo pálido em meio claro

neg= negativo | S= sensível | Pol= polimixina | R= resistente | V= variável

<sup>a</sup> – Complexo *B. cepacia* pode apresentar fraca motilidade, confundindo com cepas imóveis

<sup>b</sup> – em Ágar MacConkey tornam-se frequentemente rosa escuro a vermelho devido à oxidação da lactose após incubação mais longa (4 a 7 dias)

Provas opcionais para as tabelas 3 e 4		
Micro-organismos	Esculina	PYR
<i>Pseudomonas luteola</i>	+	neg
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	neg	neg
Complexo <i>B. cepacia</i>	V	+
<i>S. maltophilia</i>	V	+

neg= negativo V = variável

**Tabela 5** Oxidase positiva, motilidade negativa e OF-G oxidativo, bacilos (BNF) com pigmento amarelo e crescimento em Ágar MacConkey variável

Micro-organismos	Indol	DNase	Pol	Ureia
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	+	+	R	neg
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	+	neg	R	neg
<i>Sphingomonas spp</i> <sup>a</sup>	neg	neg	S	neg
<i>Sphingobacterium spp</i> <sup>b</sup>	neg	V	R	+

<sup>a</sup>motilidade ocorre a 18-22°C, mas não a 37°C; a reação de oxidase é geralmente lenta, raramente negativa

<sup>b</sup>*S. multivorum*, *S. spiritivorum* e *S. thalophilum*

neg – negativo V – variável S – sensível R – resistente

**Tabela 6** Bacilos Gram-negativo (BNF), Oxidase positiva, Motilidade positiva, OF-Glicose oxidativo – vide fluxograma para facilitar a interpretação

Micro-organismos	Pol	Lisina	Arginina	NaCl 6%	Gelatina	Cresc. a 42°C	Características da colônia
<i>A. xylosoxidans</i>	S	neg	13% +	69% +	neg	84% +	Não pigmentadas, lisas, semelhantes ao <i>Acinetobacter</i>
<i>P. aeruginosa</i>	S	neg	+	V	82% +	+	Pigmentos
<i>P. fluorescens</i>	S	neg	+	V	+	neg	Pigmentos
<i>P. putida</i>	S	neg	+	+	neg	neg	Pigmentos
<i>P. stutzeri</i>	S	neg	neg	+	neg	V	Seca
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	R	neg	+		V	+	
Complexo <i>B. cepacia</i>	R	80% +	neg		V	83% +	pigmento amarelo (V)
<i>Sphingomonas spp</i> <sup>a</sup>	R	neg	neg	neg	neg	neg	pigmento amarelo

<sup>a</sup> – móveis em temperatura ambiente <sup>b</sup> – crescimento leve

neg= negativo | S= sensível | Pol= polimixina | R= resistente | V= variável

#### Provas complementares para a Tabela 6

Micro-organismos	Esculina	PYR	piocianina (P)	pioverdina ou fluoresceína (F)	Coloração flagelos*
<i>A. xylosoxidans subsp. xylosoxidans</i>	neg	+	neg	neg	Peritríqueo
<i>P. aeruginosa</i>	neg	V	V	65% +	Polar (1)
<i>P. fluorescens</i>	neg	V	neg	96% +	Polar (>1)
<i>P. putida</i>	neg	neg	neg	93% +	Polar (>1)
<i>P. stutzeri</i>	neg	neg	neg	neg	Polar (1)
<i>B. pseudomallei</i>	V	neg	neg	neg	Polar (≥ 2)
Complexo <i>B. cepacia</i>	V	neg	neg	neg	Polar (≥ 2)
<i>Sphingomonas spp</i> <sup>a</sup>	+	25% +	neg	neg	Polar (1-2)

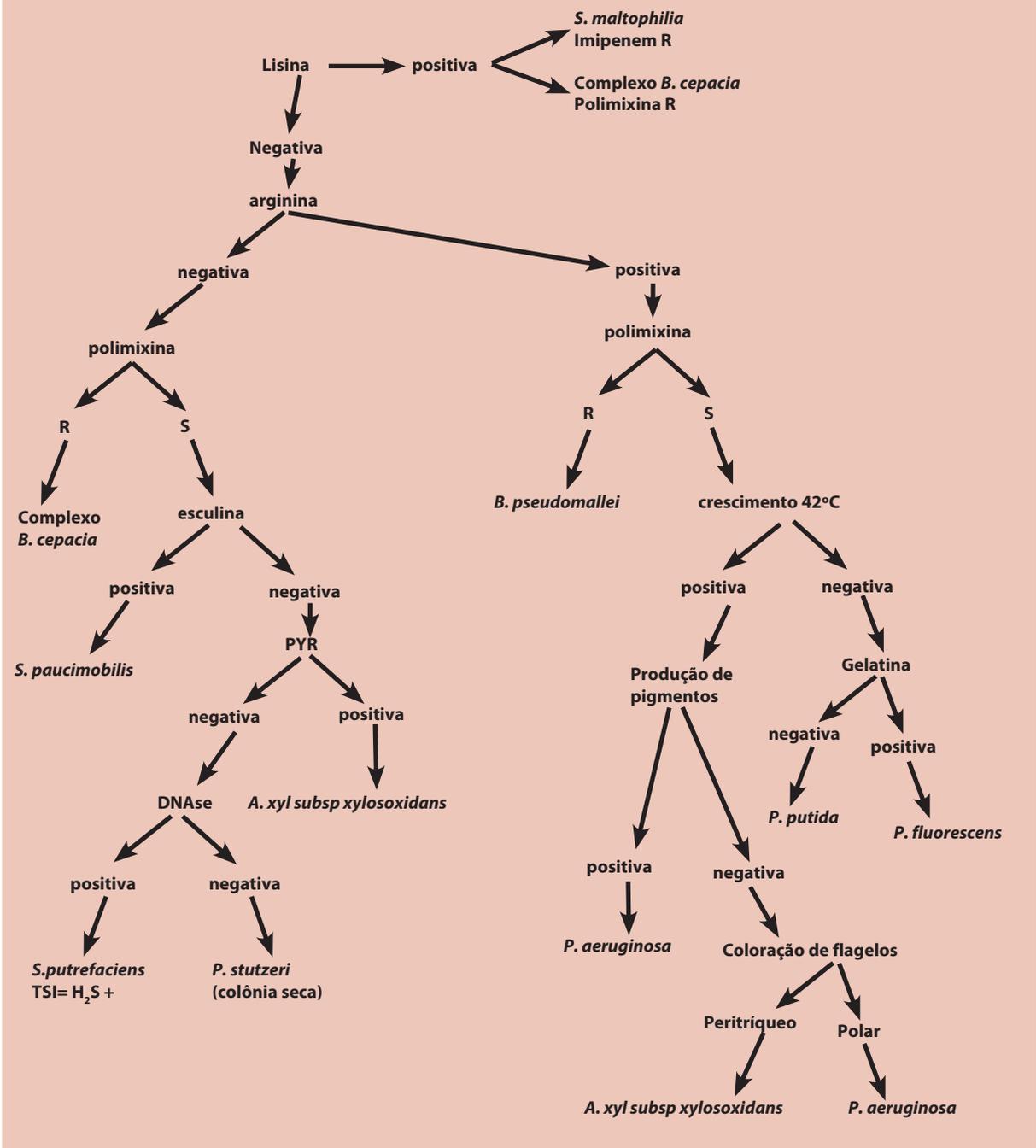
neg= negativo V = variável

\* vide considerações no final do capítulo

**Tabela 7** BNF, Oxidase, Motilidade e DNase positivas, com H<sub>2</sub>S no TSI, OF-G variável

Micro-organismos	Ornitina	NaCl 6,5%	NaCl 0%
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	43% +	+
<i>Shewanella algae</i>	neg	+	neg

**Fluxograma Auxiliar para as Tabelas 4, 5 e 6**



**Tabela 8** BNF Oxidase positiva, Motilidade positivo, OF-G inerte/alcalino

Micro-organismos	Ureia	NaCl 6,5%	DNase	Gelatina	PYR	Coloração de flagelos <sup>a</sup>
<i>Achromobacter denitrificans</i>	neg	75% neg	neg	neg	+	Peritríqueo
<i>Alcaligenes faecalis</i>	neg	+	neg	78%neg	neg	Peritríqueo
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	++	+ <sup>b</sup>	neg	neg	neg	Peritríqueo
<i>S. maltophilia</i> <sup>c</sup>	neg	78% neg	+	93% +	neg	Polar (> 2)

<sup>a</sup> – provas complementares | <sup>b</sup> – turva o meio, mas não muda a cor do indicador | <sup>c</sup> – raramente pode ser oxidase positiva

**Tabela 9** Bacilos e coco-bacilos Gram-negativos não fermentadores (NF), Oxidase positiva ou positiva fraca, OF-G variável, com pigmento róseo

Micro-organismos	Motilidade	Morfologia	Urease	Cresc em Ágar Mac Conkey	Cresc. a 42°C	Características das colônias
<i>Methylobacterium</i> spp.	+	Bacilos	23% +	neg	neg	Colônia seca coral
<i>Roseomonas</i> spp.*	V	Cocobacilos	+	+	+	Colônias mucóides rosadas

\* – oxidase positiva fraca (geralmente após 30s) ou oxidase negativa

#### 4.5 Tabelas complementares de consulta para identificação de BNFs contendo mais provas e Gêneros e espécies menos frequentes

Cocobacilos Gram-negativos, Oxidase e motilidade negativos							
Micro-organismos		OF-G	Cresc. a 44°C	Citrato	Malonato	Gelatina	Hemólise em Ágar sangue
Complexo <i>A. baumannii</i> – <i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i> / <i>A. genoespécie 13TU</i>	O	+	+	+	neg	neg
	<i>A. calcoaceticus</i> / <i>A. genoespécie 3</i>	O	neg	+	+	neg	neg
<i>A. haemolyticus</i>		I/O	neg	+	neg	+	+
<i>A. lwoffii</i>		I	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.		I/O	neg	+	V	V	V

O= oxidativo | I= inerte | neg= negativo | V= variável

Bacilos Gram-negativos (BNFs), Oxidase negativa ou positiva lenta, Motilidade positiva, crescimento em Ágar MacConkey positivo									
Micro-organismos	Oxidase	OF-G	IPM	POL	Esculina	DNase	Lisina	Arginina	Cr 42°C
<i>P. luteola</i>	neg	0	S	S	+	neg	neg	+	94% +
<i>P. oryzihabitans</i>	neg	0	S	S	neg	neg	neg	14% +	33% +
<i>S. maltophilia</i>	neg/+ lenta	85% o	R	S	39% +	+	93% +	neg	48% +
<i>Complexo B. cepacia</i>	neg/+ lenta	0	S	S	63% +	neg	80% +	neg	83% +

IPM = imipenem | POL = polimixina | neg = negativo | O = oxidativo | S = sensível | R = resistente | V = variável

Bacilos Gram-negativos (BNF), Oxidase positiva, Motilidade negativa, OF-G oxidativo, crescimento em Ágar MacConkey variável						
Micro-organismos	Motilidade	OF-G	Ureia	Indol	DNase	POL
<i>Elizabethkingia. meningoseptica</i>	neg	O lento	neg	+	+	R
<i>C. indologenes</i>	neg	O lento	neg	+	neg	R
<i>Sphingomonas</i> spp.	neg*	O	neg	neg	neg	S
<i>Sphingobacterium</i> spp.	neg	O	V	neg	V	R

\* – pode ser positiva a 20°C

POL – polimixina | neg – negativo | O – oxidativo | S – sensível | R – resistente | V – variável

Oxidase positiva, Motilidade negativa, OF-G inerte e cocoide				
Micro-organismos	Ureia	Gelatina	DNase	Cresc em Ágar MacConkey
<i>M. catarrhalis</i>	neg	O lento	+	neg
<i>M. canis</i>	neg	O lento	+	+
<i>Psychrobacter phenylpyruvica/ Oligella ureolytica</i>	+	neg	neg	+
<i>M. lacunata</i>	neg	+	neg	neg
<i>Moraxella</i> spp. *raras	neg	neg	neg	V

neg = negativo | V = variável

Bacilos Gram-negativos (BNFs), Oxidase positiva, Motilidade positiva e OF-G inerte ou alcalino, crescimento em Ágar MacConkey positivo							
Micro-organismos	Morfologia	Ureia	Citrato	Redução Nitrato	Nitrato/gás	Cresc a 42°C	Coloração de flagelos
<i>Achromobacter denitrificans</i> <sup>a</sup>	Bacilo	neg	+	+	+	V	Peritricqueo
<i>Achromobacter piechaudii</i> <sup>a</sup>	Bacilo	neg	+	+	neg	V	Peritricqueo
<i>Alcaligenes faecalis</i> <sup>a</sup>	Bacilo	neg	+	neg	neg	V	Peritricqueo
<i>B. bronchiseptica</i> <sup>a</sup>	cocobacilo	++	+	+	neg	V	Peritricqueo
<i>Comamonas</i> spp <sup>b</sup>	Bacilo	neg	+	+	neg	V	Polar (> 2)
<i>P. pseudoalcaligenes</i> <sup>b</sup>	Bacilo	neg	V	neg	neg	+	Polar (1)
<i>P. alcaligenes</i> <sup>b</sup>	Bacilo	neg	V	54% +	neg	neg	Polar (1)

<sup>a</sup> – OF-G alcalino

<sup>b</sup> – OF-G inerte

Bacilos Gram-negativos (BNFs), Oxidase positiva, Motilidade positiva e OF-G oxidativo								
Micro-organismos	Cresc em MC	Cresc a 42°C	Gelatina	Esculina	POL	Lisina	Arginina	Coloração de flagelos
<i>A. xylooxidans subsp xylooxidans</i>	+	84% +	neg	neg	S	neg	V	Peritríqueo
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	82% +	neg	S	neg	+	Polar (1)
<i>P. fluorescens</i>	+	neg	+	neg	S	neg	+	Polar (>1)
<i>P. mendocina (rara)</i>	+	+	neg	neg	S	neg	+	Polar (1)
<i>P. putida</i>	+	neg	neg	neg	S	neg	+	Polar (>1)
<i>P. stutzeri</i>	+	69% +	neg	neg	S	neg	neg	Polar (1)
<i>Sphingomonas</i> spp.	neg	neg	neg	+	R	NT	NT	Polar (1-2)
Complexo <i>B. cepacia</i>	+	V	V	V	R	V	neg	Polar
<i>B. pseudomallei</i>	+	+	V	V	R	neg	+	Polar (≥2)
<i>S. putrefaciens</i>	+	V	V	neg	S	neg	neg	Polar (1-2)

NT= não testado (não citado na literatura) | V= variável | neg= negativo | MC= Ágar MacConkey | POL= polimixina

Bacilos Gram-negativos (BNFs), oxidase positiva, OF-G variável, ureia positiva, com pigmento rosa					
Micro-organismos	Motilidade	Morfologia	Cresc em Ágar MacConkey	Cresca 42°C	Características das colônias
<i>Methylobacterium</i> spp.	+	Bacilo	neg	neg	Colônia seca, coral, bacilos com vacúolos
<i>Roseomonas</i> spp.	V	Cocobacilo	+	+	Colônias mucóides, rosadas, cocobacilos

neg= negativo | V= variável

#### 4.6 Coloração de flagelos (Clark, 1976)

A coloração de flagelos pelo método de Leifson pode ser uma prova complementar muito útil em casos de identificação de *P. aeruginosa* não produtora de pigmentos, que pode ser confundida com *A. xylooxidans subsp. xylooxidans* e também nos casos de bactérias OF-inerte ou alcalino.

Componentes do corante:

- NaCl            0,5 g
- Ácido tânico        1,0 g
- Acetato p-rosanilina ou acetato de sódio            0,3 g
- P-rosanilina HCl    0,1 g
- Álcool etílico 95°    33 mL
- H<sub>2</sub>O destilada        67 mL

Os corantes são colocados em um becker e dissolvidos aos poucos no álcool com a ajuda de um bastão. Em outro becker, dissolver o NaCl e o ácido tânico na água. Misturar as duas soluções e deixar na geladeira em frasco bem fechado. Agitar durante 4-5 dias para dissolver bem o corante. Após esse período está pronto para uso. Aliquotar em pequenas frações e armazenar a 5° C (semanas) ou a -10° C/-20° C (meses). Agitar antes de usar.

### **Técnica:**

As lâminas devem estar bem limpas, livres de gordura. Lavar as lâminas com sabão neutro, enxaguar muito bem, sem tocá-las com as mãos, e deixá-las imersas em álcool por pelo menos 3 dias, trocando o álcool diariamente.

### **Preparo do inóculo:**

Semear a cepa a ser testada em um tubo grande de TSA inclinado, de preferência com água de condensação (pode ser adicionado em torno de 1 mL de solução salina fisiológica a 0,85% no fundo do tubo). Incubar a 30°C por 16-24 hs.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, cuidadosamente, retirar a suspensão bacteriana que se formou no fundo do tubo através de capilaridade (não aspirar, pois pode haver quebra dos flagelos). Introduzir cuidadosamente essa suspensão em um tubo grande inclinado, com 10 mL de água destilada estéril. Deixar descansando por 10 minutos, mantendo o tubo inclinado, sem movimentá-lo.

Segurar a lâmina inclinada e colocar uma gota da suspensão na parte superior da lâmina. Deixar que a gota escorra lentamente até o fim da lâmina para que não arrebe os flagelos.

Deixar a lâmina secar naturalmente e corar.

Cobrir a lâmina com o corante por 10-15 minutos. Cobrir com água destilada até retirar o excesso do corante.

Deixar a lâmina secar naturalmente e observar ao microscópio ótico no aumento de 1.000 x.

Obs: os flagelos geralmente encontram-se no final da lâmina.

## Referências Bibliográficas

CLARK, W.A. A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol.* 3: 632-634, 1976.

HUGH, R. & LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol* 66: 24-26, 1953.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. *Diagnostic Microbiology* 6ª ed., 2006.

LAFFINEUR, K.; JANSSENS, M.; CHARLIER, J.; AVESANI, V.; WAUTERS, G.; DELMÉE. Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods. *J. Clin. Microbiol.*, 40(3):1085-1087, 2002.

MACFADDIN, J.F. *Biochemical Tests for Identification of medical Bacteria*. Third ed. Lippincott Williams & Williams PA USA, 912 p, 2000.

MURRAY, P. R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 9<sup>th</sup> ed., 2007.



## Capítulo 5:

# Bacilos Curvos ou Espiralados e outros Relacionados de Importância Clínica

Carla Taddei de Castro Neves  
Carlos Emílio Levy  
Marina Baquerizo Martinez

## 5.1 Introdução

Esse capítulo apresenta os principais bacilos curvos ou espiralados de importância clínica, relacionados às principais patologias, fontes de infecção e recursos diagnósticos para sua caracterização. Por se tratar de agentes raros, com exceção dos *Campylobacter* spp., não serão abordados em profundidade, devendo o microbiologista encaminhar a cepa isolada para Laboratório de Referência ou consultá-lo sobre recursos disponíveis para tentativa de isolamento.

### 5.1.1 Principais bactérias curvas ou espiraladas

Agente	Doença	Reservatório	Transmissão
<i>Arcobacter</i> spp.	Bacteremia, gastroenterite, endocardite e peritonite	Gado, humanos, animais domésticos	Alimentos 1, fecal-oral.
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Doença de Lyme	Roedores	Carrapatos
<i>Borrelia recurrentis</i>	Febre recorrente epidêmica	Humanos	Sarna ( <i>P.humanus</i> )
<i>Campylobacter coli/jejuni</i>	Gastroenterite	Carnes contaminadas ( <i>frango</i> ), leite e água	Alimentos 1, fecal-oral
<i>Campylobacter fetus</i>	Bacteremia, infecção extraintestinal	Humanos	Fecal-oral
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite, úlcera péptica, câncer gástrico	Humanos, macacos, gatos	Alimentos 1, Fecal-oral
<i>Helicobacter</i> spp.	Gastroenterite, bacteremia, etc.	Animais domésticos, humanos.	Fecal-oral, alimentos
<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirose	Cães, gatos, porcos, ratos	Alimentos-água 2
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	Humanos	Sexual, transplacentária
<i>Vibrio</i> spp.	Cólera, gastroenterite	Alimentos, água	Alimentos 1, fecal-oral

1 – Ingestão de alimentos e água contaminados

2 – Ingestão ou exposição a alimentos ou água contaminados com urina de animal infectado

### 5.1.2 Recursos diagnósticos

Agente	Testes *
<i>Arcobacter</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: bacilos Gram-negativos curvos ou helicoidais.</li> <li>Cultura: cresce entre 15 a 30°C, em ambiente de microaerofilia, em meio seletivo, como CAMPY-CVA.</li> <li>Sorologia: Não disponível.</li> <li>Ensaio Molecular: PCR utilizando iniciadores específicos.</li> </ul>
<i>B. burgdorferi</i> (doença de Lyme)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: espiroquetas visualizadas por coloração de prata de Warthin-Starry ou complexadas com anticorpos marcados por fluoresceína, em biópsia de lesões de pele ou tecidos.</li> <li>Cultura: meio BSK II em ambiente de microaerofilia, entre 30-37°C por 6 semanas.</li> <li>Sorologia, Imunofluorescência e ELISA.</li> <li>Ensaio Molecular: uso de sondas específicas ou PCR.</li> </ul>
<i>Borrelia</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: espiroquetas coradas por Giemsa ou Wright, em amostras de sangue colhidas em picos febris.</li> <li>Cultura: igual de <i>B. burgdorferi</i>.</li> </ul>
<i>Campylobacter coli</i> e <i>C. jejuni</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: bacilos finos e curvos, fracamente corados por Gram (Gram-negativo).</li> <li>Cultura: cresce a 37 e 42°C em ambiente de microaerofilia, em meio seletivo como Campy-CVA.</li> <li>Ensaio Molecular: PCR utilizando iniciadores específicos.</li> </ul>
<i>C. fetus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: bacilos finos e curvos, fracamente corados por Gram (Gram negativo).</li> <li>Cultura: cresce a 37 e 42°C em ambiente de microaerofilia, em meio seletivo como Campy-CVA.</li> <li>Ensaio Molecular: PCR utilizando iniciadores específicos.</li> </ul>
<i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: bacilos curvos ou espiralados, detectados em biópsia gástrica corada por H&amp;E, Giemsa, coloração pela prata de Warthin-Starry ou Gram (Gram-negativo).</li> <li>Recurso rápido: teste da urease em biópsia gástrica (sensibilidade &gt;90%).</li> <li>Cultura: cresce em meios seletivos ou não em microaerofilia a 37°C por 5-7 dias.</li> <li>Sorologia: útil para determinar doença ativa por Enzima-Imunoensaio.</li> <li>Ensaio Molecular: PCR utilizando iniciadores específicos.</li> </ul>
<i>Leptospira</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: Bactérias estreitas, flexíveis, enroladas em espiral, com as extremidades em forma de gancho, detectadas no sangue, LCR e urina, por microscopia em campo escuro (baixa sensibilidade), por imunofluorescência direta ou coloração pela técnica de impregnação pela prata (Fontana).</li> <li>Cultura: primeiros 10 dias de doença LCR e sangue colhido com heparina em meio de Fletcher incubado à temperatura ambiente por 2 a 16 semanas. Cultura do sedimento urinário alcalinizado após a 1ª semana da doença.</li> <li>Sorologia: aglutinação ou ELISA são sensíveis e específicos.</li> <li>Ensaio Molecular: PCR.</li> </ul>
<i>Treponema pallidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: espiroquetas longas e finas, com espiras rígidas e regulares, observadas em microscopia de campo escuro ou coloração pela prata (Fontana) de esfregaços de linfa de lesões. Testes de imunofluorescência direta são mais sensíveis.</li> <li>Sorologia: testes não treponêmicos (VDRL) ou testes treponêmicos (FTA-abs) são muito úteis para diagnóstico.</li> </ul>
<i>Vibrio</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscopia: Bacilos Curvos Gram Negativos, em forma de “vírgula”</li> <li>Cultura: enriquecimento em Água Peptonada. Crescimento em Ágar TCBS – diferencia as espécies <i>V. cholerae</i> e <i>V. fluvialis</i> (colônias amarelas) de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. mimicus</i> (colônias verdes).</li> <li>Sorologia: aglutinação</li> <li>Ensaio Molecular: PCR utilizando iniciadores específicos</li> </ul>

\* Recursos não citados: não úteis ou não disponíveis

BSK II = meio de Barbour Stoenner-Kelly

Campy-CVA= Meio seletivo para *Campylobacter* com cefoperazona, vancomicina e anfotericina.

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

## 5.2 *Campylobacter*

Em caso de gastroenterite, as fezes são preferencialmente coletadas para isolamento de espécies de *Campylobacter*, porém, *swabs* retais também são aceitáveis para cultura. As amostras devem ser enviadas rapidamente ao laboratório ou em meio de transporte de Cary-Blair semi-sólido. Em amostras de sangue colhidas em meios convencionais, essas podem suportar o crescimento do *C. fetus* que é a espécie que causa com maior frequência infecções extraintestinais.

A coloração de Gram deve usar no lugar da safranina a carbol-fucsina ou fucsina básica a 0,1% durante 2 minutos. Exame de fezes costuma revelar presença de leucócitos, mas a ausência não contraindica a cultura ou a suspeita diagnóstica. O Gram das fezes tem sensibilidade entre 70 a 90% e elevada especificidade.

A maioria das espécies de *Campylobacter* exige microaerofilia contendo cerca de 5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>, obtidos com geradores específicos e não apenas com vela. Para aumentar a chance de isolamento em fezes recomenda-se a filtração das fezes em filtro de acetato de celulose >0,45 µm. Vários são os meios de cultura específicos para coprocultura por serem seletivos, sendo na atualidade os mais recomendados o Ágar Carvão Desoxicolato Cefoperazona, o meio Campy CVA (Cefoperazona, Vancomicina e Anfotericina) e o meio de Karmali (base de Columbia ágar, carvão ativado e suplemento de antibióticos).

Amostras de hemocultura devem ser repicadas em meios não seletivos com geradores para microaerofilia. Fazer o teste de crescimento a 25, 37 e 42°C (todos crescem a 37°C). No exame direto em gota direta no microscópio entre lâmina e lamínula pode-se observar a motilidade tipo hélice em movimento.

As provas de crescimento devem ser feitas em Ágar Mueller Hinton com 5% de sangue de carneiro em microaerofilia. O teste de sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina pode ser feito em qualquer meio não seletivo e será considerado sensível à presença de qualquer tamanho de halo.

Principais espécies de <i>Campylobacter</i> e <i>Arcobacter</i>								
Bactéria	Catalase	H <sub>2</sub> S-TSI	Cresc. 15oC	Cresc. 25oC	Cresc. 42oC	Mac Conkey	Ácido Nalidixico	Cefalotina
<i>C. jejuni</i>	+	neg	neg	neg	+	neg	sensível ou resistente	resistente
<i>C. coli</i>	+	neg	neg	neg	+	neg	sensível	resistente
<i>C. fetus</i>	+	neg	neg	+	neg	neg	sensível ou resistente	sensível
<i>Campylobacter</i> spp.	variável	+	neg	neg	+	neg	sensível ou resistente	sensível
<i>Arcobacter</i>	+	neg	+	+	variável	variável	sensível	variável

\* *C. lari* = resistente

### 5.3 Vibrios, aeromonas e plesiomonas

A suspeita da presença de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* é evidenciada pelo:

- Isolamento de bactéria Gram negativa fermentadora da glicose (TSI fermentador) e oxidase positiva.
- Materiais clínicos que podem, eventualmente, ser associados com maior frequência de isolamentos de Vibrios, Aeromonas e Plesiomonas.

Principais bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva e sua associação com diferentes quadros clínicos:				
Bactéria	Diarreia	Infecções partes Moles	Sepse	Outros
<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	frequente	pouco comum	Raro	Raro
<i>P. shigelloides</i>	frequente	Raro	frequente	Raro
<i>A. hydrophila</i>	frequente	frequente	frequente	frequente
<i>A. caviae</i>	frequente	Raro	frequente	frequente
<i>A. veronii</i>	frequente	Raro	frequente	frequente

#### 5.3.1 Vibrio

As espécies do Gênero *Vibrio* são bacilos curvos ou às vezes retos, longos, anaeróbios facultativos, móveis, fermentadores da glicose, em geral sem produzir gás, e oxidase positivas. Além do *Vibrio cholerae*, existem mais de 10 espécies patogênicas para o ser humano. Algumas espécies podem causar gastroenterite, outras infecções cutâneas e bacteremias.

A cólera é causada pelo *V. cholerae* produtor da toxina CT (toxina colérica), responsável por diarreia secretória intensa. O bacilo é disseminado por via fecal-oral (água e alimentos contaminados) em surtos e epidemias associadas à falta de condições sanitárias adequadas. O quadro clínico pode variar de assintomático à diarreia aguda com morte em 5 horas por desidratação e distúrbio eletrolítico. Casos esporádicos podem ocorrer por ingestão de ostras e outros pescados crus ou mal cozidos.

O material utilizado para identificação do agente deve ser preferencialmente, fezes, porém, amostras de *swab* retal ou de vômitos podem ser utilizadas. A coleta do material quando for fecal deverá ser feita utilizando o meio de transporte de Cary Blair, e as cepas suspeitas ou confirmadas de *Vibrio* deverão ser encaminhadas a Laboratório de Referência, para registro epidemiológico.

Algumas outras espécies de *Vibrios* além do *V. cholerae* necessitam de NaCl para crescimento. Ágar sangue e Mac Conkey permitem o crescimento da maioria das espécies, e nesse último meio as colônias são semelhantes às de bastonetes não fermentadores. A diferença é que no TSI, EPM ou IAL há fermentação da glicose, como ocorre também com *Aeromonas* e *Plesiomonas*. São oxidase positivas, a maioria é esculina negativa, DNase positivo e quase todos crescem em caldo com NaCl 6%.

Em casos de surtos ou em regiões onde a cólera é endêmica, a triagem das amostras e confirmação do gênero pode ser realizada utilizando um meio seletivo para *Vibrio*, como o Ágar TCBS (tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose). Cepas de *V. cholerae* fermentam a sacarose e aparecem como colônias amarelas e cepas de *V. parahemolyticus* não fermentam a sacarose e aparecem como colônias verdes.

### 5.3.2 *Aeromonas* e *pleSIomonas*

Vivem em ambientes aquáticos em todas as partes do mundo. Podem ser encontradas em água de fonte, água de lagos, águas poluídas, etc. *Plesiomonas* preferem águas tropicais e não marinhas, sendo a *Aeromonas* mais tolerante às diferentes condições ambientais. *Aeromonas* têm sido isoladas em carnes, meio ambiente aquático e produtos do mar, e suas diferentes espécies causam doenças não só no homem como em animais, peixes, répteis, cobras e pássaros.

Em nossa experiência é comum o isolamento de *Aeromonas* em abscesso pós-picada de cobra, líquido biliar em pacientes com colicistite, diarreia, sepse (em pacientes com doença hepática crônica) e abscessos cutâneos pós-

-acidentes (corto-contusos) em lagos, tanques, etc. A chance de detectar *Aeromonas* e *Plesiomonas* depende da adoção do procedimento em se fazer o teste da oxidase em bactérias com características de *Escherichia coli* lactose negativa.

As principais características das *Aeromonas* são: lactose negativa, H<sub>2</sub>S negativo, fenilalanina negativa, indol positivo, motilidade positiva, e crescem bem em meios ricos e seletivos, como Ágar Mac Conkey e Ágar Salmonella-Shigella.

Principais provas diferenciais entre <i>Aeromonas</i> spp., <i>E. coli</i> e <i>Citrobacter</i> spp.						
Bactéria	Citrato	Ureia	Lisina	H <sub>2</sub> S	Lactose	Gás
<i>E. coli</i>	Neg	Neg	+	Neg	Variável	+
<i>Citrobacter</i> spp.	+	Variável	Neg	Variável	Variável	+
<i>Aeromonas</i> spp.	Variável	Neg	+	Neg	Neg	Variável

1 – *Aeromonas caviae*: lisina negativa e lactose positiva

Provas diferenciais para bactérias fermentadoras da glicose, oxidase positiva: <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> e <i>Vibrio</i>				
Provas	<i>V. cholerae</i>	Outros vibrios	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Plesiomonas</i> spp.
Cresce sem NaCl <sup>1</sup>	+	Neg	+	+
Cresce com 6% NaCl <sup>1</sup>	+	+	Neg	Neg
Oxidase	+	+	+	+
DNAse	+	+	+	Neg

1 – crescimento em caldo nutriente

2 – exceto *V. mimicus*

Provas para diferenciar as principais espécies de <i>Aeromonas</i> e <i>Plesiomonas</i>									
Bactérias	Indol	LIS	ARG	ORN	ARA	LAC	SAC	ESC	HEM
<i>A. hydrophila</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Positivo	Variável	Positivo	Positivo	Positivo
<i>A. caviae</i>	Variável	Neg	Positivo	Neg	Positivo	Variável	Positivo	Positivo	Neg
<i>A. sobria</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	Neg	Positivo	Neg	Positivo
<i>A. veronii</i>	Positivo	Positivo	Neg	Positivo	Neg	Neg	Positivo	Positivo	Positivo
<i>A. jandaei</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Positivo
<i>A. schubertii</i>	Neg	Positivo	Positivo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Variável
<i>P. shigelloides</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

LIS = lisina ARG = arginina ORN = orninina ARA = arabinose LAC = lactose SAC = sacarose

ESC = esculina HEM \* = hemólise/sangue carneiro

## Referências Bibliográficas

WINN, J. Jr.; ALLEN, S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRENKENBERGER, P. C. WOODS, G. K. – Color Atlas and Textbook OF Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1535p.

MC FADDIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore. Ed. William & Wilkins Co., 2000.

MURRAY, P. R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> ed. Washington DC. American Society for Microbiology ASM Press 2007., 2256p

MURRAY, P. R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 10<sup>th</sup> ed. Washington DC. American Society for Microbiology ASM Press 2010., 2252p



## Capítulo 6: Bacilos Gram Positivos

Ana Luíza de Mattos Guaraldi  
Carlos Emílio Levy

### 6.1 Introdução

Esse capítulo aborda diversos aspectos práticos para identificação dos seguintes gêneros de Bacilos Gram-positivos (BGPs) de importância clínica:

<b>Irregulares (Corineformes)</b>	<i>Arcanobacterium, Corynebacterium, Cellulosimicrobium, Gardnerella, Oerskovia, Rothia</i>
<b>Regulares</b>	<i>Erysipelothrix, Listeria</i>
<b>Esporulados</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Ramificados (Actinomicetos)</b>	<i>Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces</i>

Alguns BGPs que são citados no texto para fins de diagnóstico diferencial e foram abordados detalhadamente em outros capítulos incluem as micobactérias e os anaeróbios estritos e/ou facultativos pertencentes aos gêneros *Actinomyces, Bifidobacterium, Clostridium, Eubacterium, Lactobacillus, Mobiluncus, Propionibacterium*.

### 6.2 Orientação geral para a identificação de BGPs

O significado clínico do isolamento de BGPs é altamente dependente do contexto do isolamento da amostra. Assim como para os demais patógenos humanos, mais do que um retrato do crescimento nas placas de Petri de BGPs, o laudo microbiológico deve ser o resultado de uma leitura interpretativa e crítica. O microbiologista na sua rotina diária para decidir a importância dos BGPs isolados deve considerar o potencial patogênico do agente e os dados clínicos do paciente. A comunicação e interação entre o laboratório de microbiologia e o médico é bastante útil.

- Materiais clínicos oriundos de sítios estéreis (sangue, LCR, líquido pericárdico, urina) assim como de regiões anatômicas contaminadas, biópsias, escarro, LBA, abscessos ou feridas devem ser valorizados, desde que os quadros clínicos sejam compatíveis.
- Valorizar o achado em pacientes imunocomprometidos, incluindo idosos, portadores de neoplasias ou do vírus HIV. Valorizar também os achados em pacientes imunocompetentes uma vez que diversas espécies de BGP's também podem causar infecções graves, e por vezes fatais, em indivíduos previamente saudáveis.
- O material deve ser colhido a partir do sítio da infecção e com anti-sepsia rigorosa para evitar contaminação.
- Mesmo em líquidos estéreis há risco de contaminação, por isso solicita-se a coleta de no mínimo duas hemoculturas.
- Realizar exame microscópico pela coloração de Gram diretamente do material clínico descrevendo aspectos qualitativos e quantitativos possibilitará verificar se há predomínio do agente em questão e presença de células inflamatórias e de micro-organismos no interior de macrófagos/neutrófilos.
- No LCR o resultado do Gram do sedimento e a presença de neutrofilia reforçam a hipótese de ser agente infeccioso.
- Fazer coloração de Ziehl-Neelsen ou de Kinyoun, uma vez que o laboratório deve ficar atento para o isolamento de BGP's como *Rhodococcus* e *Nocardia* que exibem graus variados de álcool-ácido resistência.
- Utilizar meios de cultura ricos além de meios seletivos que permitam o crescimento e isolamento do BGP em questão. As condições de incubação devem ser observadas atentamente, uma vez que a maioria dos BGP's requer um mínimo de 48 horas de incubação para o crescimento em meios ricos tais como o Ágar sangue de carneiro.
- Observar características da colônia: pigmento, tamanho, cheiro, consistência, hemólise. Para observar esporos e hifas aéreas algumas vezes é necessário deixar a colônia envelhecer ou crescer em meios pobres.
- Lembrar que esse grupo de micro-organismos pode variar muito quanto às características morfológicas, de acordo com o material clínico, culturas jovens ou velhas, meios sólidos ou líquidos, meios ricos ou pobres, sem que represente contaminação ou cultura mista.
- É sempre interessante fazer repiques em meios sólidos e líquidos para observar variações na morfologia celular, particularmente quando frente a amostras de co-cobacilos e BGP's ramificados.
- Considerar o número de espécimes clínicos de que foram isolados BGP's.
- Alguns desses BGP's são habitantes de pele e mucosas e podem causar infecção mista associada ou não com anaeróbios estritos.
- Nos casos de isolamento de mais de um tipo de micro-organismo, considerar se ocorre predominância ou co-predominância de BGP's além do tipo, número relativo e patogenicidade dos outros micro-organismos associados.

- Em casos de abscessos é interessante fazer semeadura quantitativa (com alça calibrada), sendo sugestivo o isolamento em cultura pura ou  $>10^4$  UFC/mL.
- Em urina, é sugestivo quando isolado como único agente, bacterioscopia concordante, leucocitúria, sintomas de infecção urinária e contagem  $\geq 10^{2-4}$  UFC/mL, dependendo da idade e das condições imunológicas do paciente. Em casos de infecções mistas é sugestivo quando isolado como agente predominante e/ou contagem  $\geq 10^5$  CFU/mL.

### Quadros clínicos relevantes associados aos bacilos gram-positivos

Bactéria	Quadros clínicos
<i>Arcanobacterium</i>	Faringite, pneumonia, infecção de partes moles, pielonefrite, artrite séptica, septicemia, endocardite e meningite
<i>Bacillus</i>	Antraz, intoxicação alimentar, septicemia e pneumonia
<i>Cellulosimicrobium</i>	Septicemia neonatal, artrite séptica, tenossinovite e endoftalmite pós-trauma
<i>Corynebacterium</i>	Difteria, pneumonia, infecção urinária, infecção por cateter e de ferida cirúrgica, septicemia, endocardite, peritonite, osteomielite e meningite
<i>Erysipelothrix</i>	Celulite, septicemia e endocardite
<i>Gardnerella</i>	Vaginose, endometrite pós-parto e infecção urinária
<i>Lactobacillus</i>	Septicemia, endocardite, peritonite, meningite e abscessos
<i>Leifsonia</i>	Septicemia, peritonite, infecção urinária e meningite
<i>Listeria</i>	Meningite, septicemia e aborto
<i>Nocardia</i>	Infecção invasiva pulmonar, septicemia, abscesso cerebral, infecção linfocutânea e cutânea superficial (micetoma, abscesso, celulite) e endocardite
<i>Oerskovia</i>	Endocardite, bacteriemia, meningite, peritonite, nefrose e endoftalmite
<i>Rhodococcus</i>	Infecção pulmonar (pneumonia piogranulomatosa e cavitação, abscesso e malacoplaquia), septicemia, abscesso cerebral e hepático, osteomielite e pericardite
<i>Rothia</i>	Endocardite, septicemia, pneumonia, aneurisma micótico, peritonite e osteomielite
<i>Turicella</i>	Otite média, mastoidite e bacteriemia
<i>Streptomyces</i>	Micetoma, pneumonia, bacteremia, pericardite e endocardite

### 6.2.1 Triagem inicial para bacilos gram-positivos

Bactéria	Esporo	AAR*	Ramif.	Hemólise*	Catalase	Observações
<i>Actinomyces</i>	-	-	-	-	v	Alguns aerotolerantes
<i>Arcanobacterium</i>	-	-	-	beta	-	Pleomórfico
<i>Bacillus</i>	+	-	v	v	+	Mobilidade V
<i>Cellulosimicrobium</i>	-	-	v	-	+	Penetração no Ágar
<i>Corynebacterium</i>	-	-	-	v	+	Pleomórfico; imóvel
<i>Erysipelothrix</i>	-	-	-	alfa	-	Crescimento de 5 a 42oC; pH 6,7 a 9,2; H <sub>2</sub> S positivo
<i>Gardnerella</i>	-	-	-	beta**	-	Gram-lábil
<i>Listeria</i>	-	-	-	beta	+	Mobilidade a 25-28 oC
<i>Nocardia</i>	-	+	+	-	+	Hifas; crescimento em lisozima
<i>Oerskovia</i>	-	-	v	-	+	Penetração no Ágar
<i>Propionibacterium</i>	-	-	+	-	v	Alguns aerotolerantes
<i>Rhodococcus</i>	-	+	v	-	+	Formas cocoides; pigmento coral
<i>Rothia</i>	-	-	+	-	v	Pleomórfico
<i>Streptomyces</i>	-	-	+	-	+	Hifas

V, variável; AAR, álcool-acido resistência fraca ou parcial; Ramif., células ramificadas; \*, sangue carneiro; \*\*, sangue de coelho ou humano a 3%

### 6.3 Corineformes

Os bastonetes gram-positivos irregulares (BGPIs) ou corineformes formam um grupo bastante heterogêneo morfológicamente e com poucas características bioquímicas em comum.

<i>Arcanobacterium</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Exiguobacterium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Rothia</i>
<i>Leifsonia</i>	<i>Dermabacter</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Oerskovia</i>	<i>Gardnerella</i>
<i>Curtobacterium</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Turicella</i>

#### A) Dentre os corineformes estão os seguintes gêneros:

A reclassificação taxonômica desse grupo de micro-organismos é frequente conforme aumenta o grau de conhecimento relativo a suas características fenotípicas e genotípicas, portanto, dificultando a valorização microbiológica e clínica do isolamento, a escolha do esquema de identificação para o diagnóstico laboratorial, a identificação de gênero e espécies além da antibioticoterapia.

Em virtude da relevância clínica, é recomendável caracterização e provas diferenciais para os seguintes gêneros:

Gênero	Catalase	Metabolismo Oxidativo/fermentativo	Mobilidade	Nitrato	Ureia	Esculina	Glicose	Maltose	Sacarose	Manitol	Xilose	Outras
<i>Arcanobacterium</i>	-	F	-	-	-	v	+	v	v	v	v	
<i>Arthrobacter</i>	+	O	v	v	v	v	v	v	v	-	-	
<i>Brevibacterium</i>	+	O	-	v	-	-	v	v	v	-	-	Odor de corpo ou queijo
<i>Cellulomonas</i>	+	F	v	+	-	+	+	+	+	v	+	
<i>Cellulosmicrobium</i>	+	F	-	+	-	+	+	+	+	-	+	Penetração em Ágar; xantina positiva
<i>Corynebacterium</i>	+	F/O	-	v	v	v	v	v	v	v	v	
<i>Dermabacter</i>	+	F	-	-	-	+	+	+	+	-	v	Bacilos curtos
<i>Gardnerella</i>	+	F	-	-	-	-	+	+	v	-	-	Gram-lábil
<i>Leifsonia</i>	+	O	+	v	-	v	+	v	v	+	+	Pigmento amarelo; DNAse-positiva; Crescimento em 6,5% NaCl V
<i>Microbacterium</i>	v	F/O	v	v	v	v	+	+	v	v	v	
<i>Oerskovia</i>	+	F	v	+	-	+	+	+	+	-	+	Penetração em Ágar; xantina negativa
<i>Rothia</i>	v	F	-	+	-	+	+	+	+	-	-	Aderência ao Ágar V

F, fermentação; O, oxidação; +, positivo; -, negativo; v, variável

### 6.3.1 *Corynebacterium*

Atualmente, o gênero *Corynebacterium* é composto de 110 espécies, sendo aproximadamente 40 dessas consideradas de relevância médica. Além das corinebactérias produtoras de toxina, que são patógenos obrigatórios para humanos e/ou animais (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*), diversas outras espécies podem fazer parte da microbiota anfibiônica normal humana e/ou atuar como patógenos oportunistas.

As infecções humanas causadas pelas corinebactérias vêm adquirindo crescente importância tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, e podem levar ao óbito tanto pacientes imunocomprometidos quanto imunocompetentes.

O aparecimento de amostras multirresistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento e o aumento do número de casos de infecções de origens diversas, por vezes culminando em óbito, têm contribuído para aumentar o interesse pelas corinebactérias.

Dentre os fatores predisponentes às infecções pelas corinebactérias oportunistas destacam-se os estados de malignidade, idade avançada, transplantes,

Aids, diabetes, neutropenia, hospitalização e/ou antibioticoterapia por período prolongado além de procedimentos invasivos (cateterismo, implantes e válvulas). Em alguns casos, é difícil a distinção entre colonização e infecção.

Embora a maioria das infecções graves por corinebactérias multiresistentes seja atribuída ao *C. jeikeium*, têm sido descritos quadros de infecções por amostras multiresistentes de outras espécies, incluindo *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. afermentans* e *C. pseudodiphtheriticum*, particularmente em hospitais.

Além dos métodos bioquímicos convencionais encontram-se comercialmente disponíveis sistemas semiautomatizados de identificação. Métodos moleculares geralmente são utilizados em Laboratórios de Referência.

As principais espécies de corinebactérias estabelecidas como patógenos humanos estão apresentadas no quadro a seguir.

Micro-organismos	Quadros clínicos principais
<i>C. diphtheriae</i> *	Difteria, úlceras cutâneas, endocardite, septicemia, pneumonia e osteomielite
<i>C. ulcerans</i>	Difteria, faringite, pneumonia, nódulos pulmonares granulomatosos e úlceras cutâneas
<i>C. jeikeium</i> <sup>MR</sup>	Infecção de ferida cirúrgica e prótese, septicemia, pneumonia, endocardite, peritonite e meningite
<i>C. urealyticum</i> <sup>MR*</sup>	Infecção urinária (cistite encrustada), ferida cirúrgica, septicemia, pneumonia, endocardite, peritonite, osteomielite
<i>C. striatum</i> <sup>MR*</sup>	Pneumonia, septicemia, endocardite, osteomielite, peritonite e meningite
<i>C. amycolatum</i> <sup>MR</sup>	Septicemia, peritonite, endocardite e mastite
<i>C. afermentans</i>	Septicemia, endocardite, empiema, abscesso pulmonar, hepático e cerebral, otite
<i>C. minutissimum</i> *	Eritrasma, abscesso mamário, septicemia e endocardite
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> *	Pneumonia, endocardite, faringite e conjuntivite
<i>C. xerosis</i> *	Infecção de ferida cirúrgica, endoftalmite, septicemia, endocardite e osteomielite
* Espécies que podem ser encontradas colonizando superfícies cutâneo-mucosas de portadores assintomáticos; MR, maioria das amostras são multiresistentes aos agentes antimicrobianos	

Esquema simplificado de caracterização bioquímica das principais espécies de corinebactérias de importância clínica												
Espécies	Catalase	Metabolismo Oxidativo/fermentativo	Lipofilia	Redução Nitrato	Hidrólise Ureia	Hidrólise Esculina	PYZ	Glicose	Maltose	Sacarose	CAMP	Outros
<i>C. afermentans</i>	+	O	v	-	-	-	+	-	-	-	v	DNase -
<i>C. amycolatum</i>	+	F	-	v	v	-	+	+	v	v	-	DNase -
<i>C. diphtheriae</i>	+	F	v	v	-	-	-	+	+	v	-	Hemólise*; DNase +; Glicogênio V
<i>C. jeikeium</i>	+	O	+	-	-	-	+	+	v	-	-	DNase - GFrutose -; alactose +
<i>C. minutissimum</i>	+	F	-	-	-	-	+	+	+	v	-	Frutose +; Tirosina +
<i>C. propinquum</i>	+	O	-	+	-	-	v	-	-	-	-	Tirosina +
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	+	O	-	+	+	-	+	-	-	-	-	DNase -
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	F	-	v	+	-	-	+	+	v	Rev	DNase - β hemólise*; Glicogênio -
<i>C. striatum</i>	+	F	-	+	-	-	+	+	-	v	v	Tirosina +
<i>C. ulcerans</i>	+	F	-	-	+	-	-	+	+	-	Rev	Hemólise*; DNase +; Glicogênio +; Gelatina +;
<i>C. urealyticum</i>	+	O	+	-	+	-	+	-	-	-	-	DNase -
<i>C. xerosis</i>	+	F	-	v	-	-	+	+	+	+	-	DNase -

PYZ, Atividade pirazinamídica; +, positivo; -, negativo; V, variável; Rev, reação reversa; \*, hemácias carneiro

### 6.3.1.1 *Corynebacterium diphtheriae*

Apesar da vacinação compulsória, a espécie tipo do gênero, o *C. diphtheriae*, permanece constante motivo de preocupação da Saúde Pública dos países nos diferentes continentes. No Brasil, a difteria incide de forma endêmica, com o aparecimento de surtos epidêmicos nas diversas regiões. A prevalência do bacilo diftérico fermentador de sacarose difere da maioria dos países onde são isoladas apenas amostras sacarose-negativas.

A difteria é um processo infeccioso agudo, muitas vezes fatal, caracterizado por uma inflamação local, com formação de pseudomembrana na orofaringe e linfadenopatia cervical. A produção da toxina diftérica e sua liberação na corrente sanguínea levam à morte celular, principalmente nos órgãos de alta perfusão, como fígado, rins, glândulas adrenais, coração e nervos. A imunidade contra a difteria é medida da por anticorpos primariamente contra a toxina, portanto, pessoas imunizadas podem ser portadoras do micro-organismo.

Na era da vacinação, o ressurgimento da difteria na população adulta pode ser parcialmente justificado pela maior prevalência de baixos níveis de IgG antitoxina diftérica entre esses indivíduos. Quadros clínicos atípicos, com ausência de formação de pseudomembrana, podem ocorrer em indivíduos parcialmente imunizados e infectados por amostras toxinogênicas. *C. diphtheriae*, independentemente de sua capacidade de produção de toxina, também tem sido observado como agente etiológico de endocardites, além de outras infecções invasivas em indivíduos previamente submetidos à vacinação.

<b>Quadro clínico de difteria clássica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· A faringite produz sintomas como dor de garganta, febre baixa, tosse, fadiga, dificuldade em deglutir e náuseas. As crianças podem ter febre alta. Os ganglios linfáticos regionais (no pescoço) ficam muito inchados. Sintomas da intoxicação sistêmica podem incluir miocardite, hipotensão, paralisia de músculos e de nervos sensitivos.</li> </ul>
<b>Outros quadros clínicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Difteria cutânea, endocardite, pneumonia, septicemia, osteomielite e infecções relacionadas ao uso de cateter.</li> </ul>
<b>Coleta de material</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· O material de orofaringe, nasofaringe e/ou de lesão cutânea deve ser colhido das bordas da pseudomembrana. Durante a coleta, não deve ser removida a pseudomembrana dos sítios de infecção de modo a evitar um aumento da liberação de toxina diftérica na corrente sanguínea.</li> </ul>
<b>Isolamento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· No diagnóstico bacteriológico da difteria, a cultura bacteriana deve ser feita através de semeadura da secreção em meio de Ágar sangue utilizado na pesquisa de <i>Streptococcus pyogenes</i> e outros patógenos eventuais. Dentre os meios específicos para a pesquisa de <i>C. diphtheriae</i>, podem ser utilizados meios de enriquecimento como o meio de Loeffler, além de meios seletivos contendo telurito de potássio (Ágar chocolate-telurito ou Ágar sangue-cistina-telurito). Nos meios contendo telurito, o bacilo diftérico apresenta maior resistência quando comparado a outras bactérias e forma colônias de coloração cinza ao negro, cujo tamanho e outras características dependem da subespécie. O meio de Loeffler é bastante rico em soro que propicia um crescimento bacteriano mais rápido (4 a 16 horas) além de permitir o desenvolvimento de morfologia celular característica das corinebactérias, o que favorece o exame microscópico a partir do cultivo primário.</li> </ul>
<b>Bacterioscopia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· A bacterioscopia direta do material clínico após coloração pelo método de Gram pode ser sugestiva quando visualizados bastonetes ou coco-bacilos dispostos em formato de letras chinesas ou paliçadas. Granulações metacromáticas, quando presentes, podem também ser visualizadas pela coloração de Albert Laybourn.</li> </ul>
<b>Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· As peculiaridades de superfície celular bacteriana e as propriedades bioquímicas permitiram a distribuição das amostras de <i>C. diphtheriae</i> em quatro subespécies denominadas <i>gravis</i>, <i>intermedius</i>, <i>mitis</i> e <i>belfanti</i>. O <i>C. diphtheriae</i> subsp. <i>gravis</i> apresenta colônias grandes, achatadas e rugosas, raramente apresentando granulações metacromáticas. São capazes de fermentar glicogênio e amido. O <i>C. diphtheriae</i> subsp. <i>intermedius</i> apresenta colônias diminutas, achatadas e umbilicadas, não hemolíticas. O <i>C. diphtheriae</i> subsp. <i>mitis</i> apresenta colônias lisas, convexas, negras e brilhosas; hemolíticas e frequentemente com granulações metacromáticas. O <i>C. diphtheriae</i> subsp. <i>belfanti</i> se diferencia da subespécie <i>mitis</i> pela incapacidade de redução do nitrato.</li> </ul>

<b>Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Os bacteriologistas devem tomar cuidado ao descartar os micro-organismos classificados como “difteróides”, já que há relatos de amostras de bacilo diftérico isoladas de locais inusitados como sangue e/ou que exibem comportamentos atípicos, como as amostras fermentadoras de sacarose.</li> <li>A pesquisa de produção de toxina pelo teste de Elek ainda é realizada pela maioria dos laboratórios em todo o mundo apesar de já ter sido descrita uma técnica de PCR multiplex usando iniciadores para os genes dtxR e tox que permitem simultaneamente a identificação da espécie <i>C. diphtheriae</i> e a capacidade de produção de toxina diftérica.</li> <li>Em casos de dificuldades na identificação bioquímica e na pesquisa de produção de toxina de amostras clínicas potencialmente toxinogênicas, recomenda-se encaminhar o material ou contactar Laboratórios de Referência em Difteria para orientação.</li> </ul>
----------------------	---

### 6.3.1.2 *Corynebacterium ulcerans*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recentemente passou a ser considerada como uma espécie distinta do <i>C. diphtheriae</i>. O micro-organismo é capaz de causar processos infecciosos em humanos e animais (mastite bovina), por vezes fatais. Em humanos, tem sido crescente o número de casos de quadros infecciosos diversos que não tiveram contatos prévios com animais de fazendas ou derivados alimentares, inclusive no Brasil. Além dos quadros de difteria, o micro-organismo pode causar faringite, pneumonia, nódulos pulmonares granulomatosos e úlceras cutâneas.</li> <li>Além de produzir toxina antígenicamente homóloga à toxina diftérica, o <i>C. ulcerans</i> também produz fosfolipase D.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Os micro-organismos produzem colônias fracamente hemolíticas e são diferenciados do <i>C. diphtheriae</i> através dos resultados positivos nos testes de hidrólise da ureia e de CAMP reverso (inibe a beta-hemólise do <i>Staphylococcus aureus</i> em Ágar-sangue de carneiro), à semelhança de <i>C. pseudotuberculosis</i>. Produzem resultados positivos nos testes de glicogênio de hidrólise da gelatina e negativo no teste PYZ.</li> </ul>

### 6.3.1.3 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Deve ser lembrado nos casos infecções em veterinários ou trabalhadores de zona rural com quadros de linfadenite ulcerativa ou abscessos relacionados a procedimentos de aborto de gado.</li> <li>Além de fosfolipase D, essa espécie também pode ser produtora de toxina diftérica.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>As colônias são pequenas, branco-amareladas; PYZ-negativas; urease e CAMP-reverso positivas.</li> </ul>

### 6.3.1.4 *Corynebacterium jeikeium*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Os micro-organismos podem ser encontrados colonizando a superfícies cutâneo-mucosas dos indivíduos hospitalizados e de integrantes do corpo clínico. O isolamento de amostras pode ocorrer a partir de diversos materiais clínicos, principalmente de feridas cirúrgicas, sangue e fluido cefalorraquidiano.</li> <li>Frequentemente ocorre transmissão nosocomial inclusive de amostras multirresistentes que apresentam sensibilidade apenas a vancomicina.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>As colônias são puntiformes, branco-acinzentadas e lipofílicas (crescem em caldo BHI apenas na presença de 1% de Tween 80); metabolismo oxidativo glicose em base CTA (cystine trypticase Ágar) semi-sólido; urease e esculina negativas e PYZ-positivas.</li> </ul>

### 6.3.1.5 *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Micro-organismo frequentemente encontrado na microbiota de naso e orofaringe de humanos, tem sido relacionado principalmente com quadros de infecções do trato respiratório inferior em pacientes imunocomprometidos incluindo portadores do vírus HIV, diabetes, transplantados ou portadores de tumores malignos, além de doenças coronarianas, inclusive em ambiente hospitalar. O micro-organismo também foi relacionado com processos infecciosos do trato respiratório inferior em indivíduos imunocompetentes.</li> <li>· O estabelecimento do potencial patogênico do <i>C. pseudodiphtheriticum</i> é baseado em critérios adotados para outros patógenos do trato respiratório inferior.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Exibem colônias esbranquiçadas e ligeiramente secas; hidrolisam a ureia e reduzem o nitrato, mas são incapazes de produzir ácidos a partir de carboidratos comumente testados.</li> </ul>

### 6.3.1.6 *Corynebacterium urealyticum*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <i>C. urealyticum</i> é comumente encontrado em animais e na pele e mucosas de humanos predominantemente em áreas perigenitais femininas. Está entre as espécies de corinebactérias de significado clínico mais frequentemente isoladas.</li> <li>· É fundamentalmente um patógeno oportunista do trato urinário e pode estar relacionado com quadros de cistite (cistite incrustante), pielouretrite e pielonefrite. Adicionalmente, a espécie tem sido relacionada com quadros de infecção de ferida cirúrgica, septicemia, pneumonia, endocardite, peritonite e osteomielite.</li> <li>· Na maioria das oportunidades, os isolados clínicos de <i>C. urealyticum</i> são multirresistentes, inclusive para a penicilina.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Como as demais espécies lipofílicas, exibem colônias puntiformes, convexas, lisas, esbranquiçadas; aeróbio estrito e não fermentador com elevada atividade ureásica.</li> </ul>

### 6.3.1.7 *Corynebacterium amycolatum*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Micro-organismos não lipofílicos, que apresentam parede celular desprovida de ácidos micólicos.</li> <li>· Em humanos, casos de endocardite foram associados ao uso de dispositivos intravasculares. A multirresistência aos agentes antimicrobianos é frequentemente observada entre as amostras clínicas.</li> <li>· É a espécie de corinebactéria não lipofílica mais encontrada em quadros de mastite bovina.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· As colônias são acinzentadas, secas e cerosas com bordos irregulares após 24 h de incubação. Exibem comportamento bioquímico semelhante ao das espécies pertencentes ao complexo <i>C. minutissimum/C. xerosis/C. striatum</i> apresentado abaixo.</li> </ul>

### 6.3.1.8 Complexo *C. minutissimum*/*C. xerosis*/*C. striatum*

<p><b>Importância clínica</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· O <i>C. minutissimum</i> tem sido relacionado com quadros de eritrasma, abscessos, infecção oftalmológica, pielonefrite e infecções endovenosas associados ao uso de dispositivos intravasculares em pacientes portadores de neoplasias. Quadros de bacteremia também foram observados em pacientes imunocompetentes.</li> <li>· O <i>C. xerosis</i> é uma corinebactéria não lipofílica cujas colônias podem apresentar aspecto ressecado, daí o nome (xeros = seco), e tem sido isolado em casos de endocardite e feridas cirúrgicas.</li> <li>· A semelhança de <i>C. minutissimum</i> e <i>C. xerosis</i>, o <i>C. striatum</i> também está incluído entre os micro-organismos da microbiota de pele que podem ser transmitidos para outros indivíduos no ambiente hospitalar. Além de outros processos infecciosos, o <i>C. striatum</i> também foi relacionado com quadros de endocardite.</li> </ul>
<p><b>Isolamento e Identificação</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· As espécies <i>C. amycolatum</i>/<i>C. minutissimum</i>/<i>C. xerosis</i>/<i>C. striatum</i> podem ser diferenciadas através das seguintes reações: <i>C. amycolatum</i> e <i>C. minutissimum</i> não crescem a 20°C ao contrário de <i>C. xerosis</i> e <i>C. striatum</i>; <i>C. xerosis</i> não fermenta glicose a 42°C; a maioria das amostras de <i>C. amycolatum</i> é resistente ao composto vibriocida 0/129; amostras de <i>C. striatum</i> podem expressar discreta reatividade ao teste de CAMP.</li> <li>· Uma vez que apresentam características bioquímicas similares, muitas vezes, as espécies só podem ser diferenciadas através de análise genotípica.</li> </ul>

### 6.3.1.9 *C. Afermentans*

<p><b>Importância clínica</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>, não lipofílico, é componente da microbiota humana de pele e tem sido isolado principalmente de hemoculturas.</li> <li>· Amostras <i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> são frequentemente susceptíveis aos antibióticos β-lactâmicos. Entretanto, já foram observadas amostras multirresistentes.</li> <li>· Amostras de <i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i> isoladas de sangue e de feridas cutâneas superficiais foram susceptíveis aos antibióticos β-lactâmicos à semelhança de <i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i>.</li> </ul>
<p><b>Isolamento e Identificação</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Aproximadamente 60% das amostras <i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> são CAMP-positivas.</li> <li>· <i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i> é a única espécie lipofílica que pode apresentar reação positiva no teste de CAMP.</li> </ul>

### 6.3.2 *Arcanobacterium haemolyticum*

<p><b>Importância clínica</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Juntamente com <i>S. pyogenes</i> tem sido considerado como agente etiológico de faringites, identificados e relatados com a finalidade de tratamento. Está associado também com quadros de infecções de partes moles, septicemia, endocardite e osteomielite.</li> </ul>
<p><b>Isolamento e Identificação</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· São bacilos delicados e curvos e alguns apresentam dilatação terminal e ramificações rudimentares. Crescem em 24-48h como colônias pequenas e beta-hemolíticas. A hemólise é melhor visualizada em sangue de coelho, e cresce melhor em ambiente de CO<sub>2</sub>. Pode se apresentar como dois tipos de colônias no mesmo cultivo: lisas, mucóides e brancas ou secas e cinza. Produz a prova de CAMP reverso (inibição da hemólise). Colônias mais velhas tendem a adquirir a forma de coco-bacilo, que pode ser confundido com estreptococos. Em caldo tendem a formar ramificações e em anaerobiose filamentosos.</li> </ul>

### 6.3.3 *Gardnerella vaginalis*

<b>Características gerais</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <i>G. vaginalis</i> apresenta classificação taxonômica incerta e portanto, para fins didáticos, é estudada no grupo dos corineformes. Coram-se irregularmente pelo cristal violeta em virtude da parede celular ser muito mais delgada do que os demais micro-organismos gram-positivos.</li> </ul>
<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Faz parte da microbiota vaginal de cerca de 70% das mulheres em idade reprodutiva, mas está associada à vaginose bacteriana, quando predomina na flora vaginal em substituição ao <i>Lactobacillus</i> (bacilos de Doderlein). A vaginose bacteriana e a presença de <i>G. vaginalis</i> estão associadas também ao parto prematuro, ruptura prematura de membranas e corioamnionite. Essa bactéria é comumente isolada em hemoculturas de pacientes com febre puerperal e pós-aborto. Pode causar sepse em recém-nascidos e raramente infecção urinária em adultos ou em outros sítios anatômicos.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Crescem no ágar sangue humano e de coelho produzindo hemólise beta. São incapazes de produzir hemólise quando cultivadas em ágar sangue de carneiro. São visualizadas e caracterizadas no exame citológico e/ou na coloração de Gram pela presença das "clue cells", que são células epiteliais abarrotadas de pequenos bacilos Gram lábeis, de modo a perder sua definição morfológica. Pequenos bacilos ou coco-bacilos irregulares, Gram-lábeis (por vezes Gram-negativa e por outras vezes parcialmente e fracamente Gram-positiva), imóveis, sem cápsula; anaeróbio facultativo, fermentador lento, catalase e esculina negativos</li> </ul>

### 6.3.4 *Rothia dentocariosa*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Pertence à microbiota da cavidade oral, e pode estar associada a quadros de endocardite, septicemia, pneumonia, aneurisma micótico, peritonite e osteomielite.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Bacilos ou coco-bacilos, retos ou ramificados. As colônias são brancas salientes e às vezes rugosas (em forma de rodas de carroça); catalase-variável, imóvel, fermentador de glicose, maltose e sacarose; esculina positiva.</li> </ul>

### 6.3.5 *Oerskovia turbata*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <i>Oerskovia turbata</i> são bactérias do meio ambiente ou solo, relacionadas com raros casos de bacteremia e infecções em implantes de próteses.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· São micro-organismos cocóides ou na forma de bacilos resultantes da quebra de micélios; ramificados e com hifas vegetativas com capacidade de penetração no ágar.</li> <li>· Crescimento em ágar sangue de carneiro e ágar chocolate; colônias com pigmento amarelo após 24-48h em anaerobiose ou em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>; catalase positiva e mobilidade variável; fermentação rápida da glicose, maltose e sacarose, hidrólise da esculina, gelatina e amido; xantina e hipoxantina-negativas.</li> </ul>

### 6.3.6 *Cellulosimicrobium cellulans*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Anteriormente caracterizados como <i>Oerskovia xanthineolytica</i>, são bactérias encontradas no meio ambiente ou solo e raramente relacionados com quadros clínicos humanos como bacteremia, meningite, endocardite, peritonite, nefrose, implante de próteses, e endoftalmite. A maioria das infecções foi observada em pacientes hospitalizados e associada à quebra de cadeia asséptica.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Micro-organismos morfológicamente e bioquimicamente similares a <i>O. turbata</i>. Apresentam colônias amareladas, com penetração no ágar após 24-48h; ao contrário de <i>O. turbata</i>, são imóveis, xantina e hipoxantina-positivas.</li> </ul>

## 6.4 Bacilos gram-positivos regulares

### 6.4.1 *Listeria monocytogenes*

<b>Características gerais</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Dentre as sete espécies do gênero <i>Listeria</i>, a única importante para o homem é a <i>L. monocytogenes</i>, encontrada no solo, em matéria orgânica em decomposição, água, leite e derivados, carne além de ser componente da microbiota de diversos mamíferos, aves, peixes e insetos.</li> </ul>
<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Importância clínica particularmente para idosos e indivíduos imunocomprometidos causando meningite, encefalite ou septicemia. Em pacientes grávidas, a infecção pode causar amnionite, infecção do feto com aborto, parto prematuro, meningite neonatal e sepsis neonatal. Surto epidêmicos podem ocorrer e estão geralmente relacionados com a contaminação de alimentos.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Bacilos anaeróbios facultativos, uniformes, não ramificados, apresentando-se isolados ou dispostos em cadeias pequenas. Crescem em ágar sangue, ágar chocolate, CLED, ágar nutriente, TSA e ágar Mueller Hinton, mas não em MacConkey. As colônias são pequenas, crescendo melhor entre 30°C e 37°C, e crescem também à temperatura ambiente e a 4°C em 3 a 4 dias.</li> <li>· A partir de hemoculturas, LCR, placenta, alimentos e água, semear em ágar sangue de carneiro, coelho ou cavalo, com base TSA, embora cresça também com outras bases (Mueller Hinton, Columbia, Brucella, BHIA, etc). Existem meios seletivos indicados em investigações epidemiológicas.</li> <li>· Os micro-organismos produzem reação positiva no teste da catalase e negativa nos testes da oxidase, ureia, gelatina, indol e H<sub>2</sub>S; ácido a partir de glicose; hemólise beta em ágar sangue de carneiro e CAMP-positivo. A mobilidade é observada em temperaturas de 25°C a 28°C, porém é negativa a 37°C. Além dos resultados positivos nos testes de hidrólise da esculina e crescimento em 6,5% NaCl é observada reação rápida na prova da esculina.</li> <li>· Sistemas semi-automatizados de identificação desses micro-organismos são encontrados disponíveis comercialmente.</li> </ul>

### 6.4.2 *Erysipelothrix rhusiopathiae*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Presentes na natureza, em matéria orgânica, urina, fezes e carcaça de animais. Além disso podem ser encontrados em animais, peixes, pássaros e causar erisipela em suínos.</li> <li>· No homem, estão relacionados com quadros de doença ocupacional de veterinários e manuseadores de carne e animais caracterizada por celulite que aparece no local da inoculação após 2 a 7 dias. A lesão costuma ser violácea e com muita dor, acompanhada de edema endureado, sem supuração e bem delineado nas bordas. Ocorre linfangite regional e artrite adjacente. Disseminação da doença e endocardite podem ocorrer, particularmente em imunossuprimidos, cujo prognóstico é grave. Cicatrização pode ocorrer em 2 a 4 semanas ou meses, com possibilidade de recaída.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Material ideal para isolamento é a biópsia colhida de maneira asséptica. <i>Swabs</i> de lesão em geral fornecem resultado negativo, pois o agente encontra-se na profundidade da borda endurecida.</li> <li>· Bacilos curtos de extremidades arredondadas, anaeróbios facultativos, não esporulado, não álcool-ácido resistente, ocorrem só em cadeias curtas ou longas, sem ramificar. Crescem em ágar sangue, ágar chocolate, caldo tripticase soja, a 35°C aerobiose ou 5% CO<sub>2</sub>. Crescem entre 5°C a 42°C e em caldo 6,5% NaCl.</li> <li>· No ágar sangue crescem em 24 a 72h, como colônias minúsculas, lisas e transparentes, mas o outro tipo de colônia, maior, rugosa e chata pode aparecer, bem como uma hemólise esverdeada em baixo da colônia no ágar sangue. As colônias lisas são bacilos ou coco-bacilos Gram-positivos; às vezes corando-se mal pelo Gram.</li> <li>· Os micro-organismos fermentam lentamente a glicose sem produzir gás, são catalase negativa, imóveis, esculina, ureia e indol negativos; lactose positiva e sacarose negativa. Caracterizam-se por crescerem em meio TSI produzindo H<sub>2</sub>S.</li> </ul>

### 6.5 Principais diferenças entre BGPS e cocos – gram-positivos

Bactéria	Gram	Catalase	Mobilidade 25°C	Hemólise	CAMP	NaCl 6,5%/ Esculina
<i>Corynebacterium</i>	bacilos e coco-bacilos pleomórficos	+	-	v	v	v/v
<i>Enterococcus</i>	cocos ou coco-bacilos em cadeias	-	-	v	-	+/+
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> <sup>1</sup>	coco-bacilos ou filamentos longos	-	-	alfa	-	-/-
<i>Kurthia</i> <sup>2</sup>	bacilos grandes, cadeias, cocoide em cultura velha	+	+	-	-	-/-
<i>Lactobacillus</i>	coco-bacilos e cadeias longas	-	-	-	-	-/-
<i>Listeria monocytogenes</i>	bacilos curtos ou coco-bacilos regulares e largos	+	+	beta	+	+/+
<i>Streptococcus beta hemolíticos</i>	cocos em cadeias	-	-	beta	-/+ <sup>3</sup>	-/-

1, H<sub>2</sub>S positivo; 2, glicose negativo; 3, *S. agalactiae*; -, negativo; +, positivo; V, variável; Rev, reação reversa; \*, sangue de coelho ou humano a 3%

## 6.6 Bacilos gram-positivos anaeróbios que devem ser diferenciados

### 6.6.1 *Lactobacillus*

Os lactobacilos fazem parte da microbiota da boca, intestino e flora vaginal (bacilo de Doderlein) humana. São catalase negativos, imóveis e apresentam capacidade de crescer em ágar sangue e ágar chocolate como colônias puntiformes. Esses micro-organismos têm sido associados frequentemente a quadros de endocardite e bacteremia, levando a óbito aproximadamente 30% dos pacientes. Casos de peritonite, abscessos e meningites também têm sido relatados.

### 6.6.2 *Mobiluncus*

Anaeróbios estritos, curvos, móveis encontrados no trato genital e reto de humanos. Os micro-organismos podem ser encontrados juntamente com *G. vaginalis* em pacientes com quadros de vaginose.

### 6.6.3 *Propionibacterium, Eubacterium e Bifidobacterium*

Anaeróbios estritos que são analisados juntamente com os demais anaeróbios.

## 6.7 Bacilos esporulados aeróbios e anaeróbios facultativos

### 6.7.1 *Bacillus*

O gênero *Bacillus* compreende cerca de 259 espécies de bacilos aeróbios ou anaeróbios facultativos, formadores de endosporos, gram-lábeis; a maioria é catalase positiva. Todos exibem mobilidade, exceto as espécies *B. anthracis* e *B. mycooides*.

*B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. megaterium* expressam cápsula polipeptídica na presença de íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e em anaerobiose ou em atmosfera de  $\text{CO}_2$ .

As formas vegetativas são retas largas, podendo ser alongadas, dispostas isoladamente ou em cadeias. A morfologia e a disposição intracitoplasmática dos esporos são úteis para sua classificação:

- cilíndricos, ovais, redondos, e riniformes
- central, subterminal, terminal
- dilatando ou não a célula vegetativa de origem

A maioria dos micro-organismos aeróbios formadores de esporos são saprófitas amplamente distribuídos na natureza. Entretanto, algumas espécies são

oportunistas e outras são patógenos obrigatórios para animais, incluindo os humanos. Os micro-organismos do gênero *Bacillus* são encontrados principalmente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal, em condições ambientais bastante variadas, temperatura, umidade, salinidade e pH.

As duas espécies de maior relevância clínica e que devem ser reconhecidas pelo laboratório de microbiologia são o *B. anthracis* e *B. cereus*.

### 6.7.2 Principais espécies de *Bacillus* relacionadas com quadros de infecções humanas

Espécie	Quadros clínicos
<i>B. anthracis</i>	Anthrax cutâneo, anthrax intestinal, antrax pulmonar, antrax meningite
<i>B. cereus</i>	Intoxicação alimentar, necrose ou gangrena de partes moles, bacteremia e septicemia, infecções pulmonares, endocardite, meningite, osteomielite e endoftalmite pós-trauma
<i>B. circulans</i>	Infecções de partes moles, abscessos, bacteremia, septicemia e meningite
<i>B. coagulans</i>	Infecções de córneas e bacteremia
<i>B. licheniformis</i>	Intoxicação alimentar, bacteremia e septicemia
<i>B. subtilis</i>	Intoxicação alimentar, bacteremia, septicemia, endocardite e infecções respiratórias
<i>B. thuringiensis</i>	Intoxicação alimentar e gastroenterite

#### A) Diferenças entre *Bacillus* e *Clostridium*

<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>
Endosporos em aerobiose	Endosporos em aerobiose
Catalase positivos	Catalase negativos

#### B) Diferenças entre *B. anthracis*, *B. cereus* e espécies relacionadas

Espécies	Morfologia colonial *	Mobilidade	Hemólise	Penicilina	Citrato	Lecitinase
<i>B. anthracis</i>	branco acinzentado	-	-	sensível	v	(+)
<i>B. cereus</i>	esverdeado claro	+	+	resistente	+	+
<i>B. mycoides</i>	rizóides/ espalhando	-	(+)	resistente	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	esverdeado claro	+	+	resistente	v	+

\*Ágar sangue; positivo; negativo; variável; (), reação fraca

A produção de material capsular por amostras virulentas de *B. anthracis* pode ser demonstrada em ágar nutriente acrescido de 0,7% de bicarbonato de sódio, incubado por uma noite em condições de microaerofilia (método da vela). Colônias capsuladas de *B. anthracis* exibem aspecto mucoide e a cápsula pode ser evidenciada através do método de coloração com tinta da Índia (nanquim).

### 6.7.2.1 *Bacillus cereus*

Em seres humanos, *B. cereus* pode causar duas enfermidades transmitidas por alimentos, a síndrome diarreica e a síndrome emética:

- Síndrome diarreica – de aparição tardia; caracterizada pelo aparecimento de dor abdominal e diarreia 8 a 16 h em decorrência da ingestão de alimentos contaminados com os esporos, sendo mais comuns os vegetais (crus ou cozidos), produtos cárneos, leite e derivados, massas e outros alimentos à base de amido e farinhas. Os esporos são ingeridos juntamente com os alimentos e, uma vez no intestino, esses esporos germinam e causam a doença em função das toxinas que o micro-organismo é capaz de produzir.
- Síndrome emética – caracteriza-se por um período de incubação bastante curto (uma a cinco horas); causada por alimentos que já possuem a toxina produzida pela bactéria; vômitos, náuseas e mal-estar geral após a ingestão de alimentos contaminados, principalmente pratos orientais preparados com arroz, além de alimentos derivados de leite, doces e massas.

### 6.7.2.2 *Bacillus anthracis*

<b>Características gerais</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Carbúnculo, carbúnculo hemático, antraz ou ainda antrax foi no passado causa importante de mortalidade em herbívoros domésticos como vacas, cabras, ovelhas. Atualmente as infecções de carbúnculo são raras nos países desenvolvidos, mas não excepcionais nos subdesenvolvidos. O número de casos foi reduzido significativamente em decorrência de imunização e melhoria das condições de higiene.</li> <li>· Os casos humanos de carbúnculo devem-se normalmente à exposição a animais infectados ou a carne ou pele infectada. As vítimas têm profissões relacionadas com a manipulação de animais ou de produtos derivados (trabalhadores da área rural e veterinários; manuseio industrial de ossos, lã, crina, e outros produtos animais).</li> <li>· Na comunidade, o risco de infecção é preocupante nas regiões do globo potencialmente ameaçadas por ataques biológicos.</li> </ul>
<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· O anthrax cutâneo, quando não tratado, pode ser fatal em aproximadamente 20% dos casos, principalmente quando a lesão encontra-se próxima a cabeça ou pescoço. No local de inoculação, aparece após 2 a 3 dias uma pequena mancha ou pápula. Em seguida, ocorre o aparecimento de anel de vesículas em torno da pápula, que ulcera, seca, escurece formando uma escara característica que cresce, fica mais espessa e aderente aos planos profundos. O edema pode ser importante, mas tem a característica de ser indolor e sem pus.</li> <li>· As formas pulmonares e intestinais são raras e mais graves, e na maioria das vezes fatais em decorrência da dificuldade em diagnosticar o quadro clínico.</li> <li>· No antrax pulmonar o esporo inalado é transportado pelos macrófagos do pulmão para o sistema linfático onde os esporos germinam e causam septicemia que é fatal.</li> <li>· O anthrax intestinal é semelhante ao cutâneo, atingindo a mucosa com lesões e eventualmente gastroenterite devido à ingestão de carne contaminada.</li> <li>· Atenção ao fato de que evolução nos casos fatais é inicialmente caracterizada por sintomas leves como fadiga, mal-estar e febre baixa, ou às vezes até sem sintomas, quando repentinamente se instala dispnéia, cianose, febre elevada, desorientação, falência circulatória, choque, coma e morte em poucas horas.</li> </ul>

## 6.8 Actinomicetos

BGPs que apresentam como característica em comum a produção de filamentos ou hifas vegetativas, sendo que alguns também apresentam hifas aéreas, semelhanças na composição e padrão de ácidos graxos de parede celular.

O gênero *Oerskovia*, embora apresente hifas vegetativas, foi analisado juntamente com o grupo de micro-organismos corineformes.

Nesta oportunidade serão abordados os gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. Dentre os demais actinomicetos raros ou de menor importância clínica estão incluídos os gêneros *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Actinomadura* e *Nocardiopsis*.

### Informações importantes sobre os actinomicetos

Para a adequada caracterização dos actinomicetos que apresentam semelhança morfológica com os fungos, é importante considerar os seguintes aspectos:

- Origem do material clínico, valorizando os abscessos.
- Número de micro-organismos isolados e correlação com a bacterioscopia direta do material clínico.
- Possibilidade de contaminação com bactérias da mucosa oral.
- Pigmento da colônia.
- Análise morfológica da bactéria pelo microcultivo em lâmina, idêntico ao utilizado no setor de Micologia, empregando ágar fubá sem dextrose a 25°C.

### Identificação presuntiva de actinomicetos

Gênero	Micélio aéreo	Conídio	AAR fraca ou parcial	Metabolismo glicose	Crescimento em lisozima
<i>Gordonia</i>	-	-	+	oxidativo	v
<i>Nocardia</i>	+	v	+	oxidativo	+
<i>Rhodococcus</i>	-	-	+	oxidativo	v
<i>Oerskovia</i>	-	-	-	fermentativo	-
<i>Rhotia</i>	-	-	-	fermentativo	-
<i>Streptomyces</i>	+	+	-	oxidativo	v
<i>Tsukamurella</i>	-	-	+	oxidativo	+

6.8.1 *Nocardia*

<b>Características gerais</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· O gênero <i>Nocardia</i> compreende atualmente 22 espécies. As nocardias são micro-organismos saprófitas de solo, aeróbios estritos, imóveis e catalase positivas; levemente álcool-ácido resistentes quando visualizados pelo método de Kinyoun-modificado. Usualmente formam hifas aéreas, algumas vezes observadas apenas ao microscópio. As hifas ramificadas quando fragmentadas podem exibir formas cocóides e bacilares.</li> </ul>
<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· O número de casos de nocardioses humanas vem aumentando significativamente, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos apresentando doença pulmonar, neoplasias, infecções pelo vírus HIV, história prévia de alcoolismo, cirurgia, trauma, transplantes ou uso de corticosteróides. O maior número de casos clínicos tem sido observado em pacientes adultos, predominantemente do sexo masculino (razão Masc:Fem = 3:1), a partir da terceira década de vida. As manifestações clínicas, severidade e/ou prognóstico da doença são extremamente variáveis e relacionados com via de infecção e eficiência do sistema imunológico do indivíduo. Na maioria dos casos de nocardioses ocorre manifestação clínica disseminada.</li> <li>· Indivíduos imunocomprometidos podem desenvolver doença de evolução progressiva e doença disseminada ou pulmonar crônica, por vezes apresentando pneumonia necrotizante e cavitação pulmonar.</li> <li>· As nocardioses cutâneas são usualmente apresentadas em quatro formas clínicas: micetoma, infecção linfocutânea, infecção cutânea superficial (abscesso ou celulite) e infecção cutânea secundária com doença disseminada freqüentemente de caráter crônico e de difícil diagnóstico.</li> <li>· Em indivíduos imunocompetentes, foram observados quadros de endocardite, abscesso pulmonar e cerebral em adultos, além de quadros de linfadenite necrotizante em crianças e pneumonia em neonato.</li> <li>· O maior número de óbitos ocorre em pacientes apresentando quadros de abscesso cerebral, infecções sistêmicas e pneumonias.</li> <li>· As nocardias são transmitidas principalmente por inalação e mais raramente através de inoculação direta na pele. A doença cutânea primária pode ocorrer a partir de feridas contaminadas com resíduos do solo. Embora a doença esteja mais relacionada à distribuição comunitária, surtos nosocomiais de nocardioses em pacientes imunocomprometidos também tem sido observados. No ambiente hospitalar, parece ocorrer a disseminação bacteriana por vias aéreas e transmissão pessoa a pessoa, inclusive pós-cirúrgica.</li> </ul>
<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Diversas espécies tem sido relacionadas com quadros de nocardioses humanas. Dentre as espécies predominantemente isoladas podemos destacar <i>Nocardia asteroides</i>, <i>Nocardia farcinica</i>, <i>Nocardia brasiliensis</i> e <i>Nocardia otitidiscaviarium</i>.</li> <li>· <i>N. asteroides</i> são responsáveis pela maioria dos casos de infecções invasivas em humanos, sendo predominantemente relacionadas com quadros pulmonares e raramente com infecções cutâneas. A maioria dos casos de artrite séptica foi relacionada com <i>N. asteroides</i> e <i>N. farcinica</i>.</li> <li>· <i>N. farcinica</i> tem sido relacionado com quadros de infecções nosocomiais pós-cirúrgicas em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas e vasculares. A diferenciação de <i>N. farcinica</i> dos demais membros do complexo <i>asteroides</i> torna-se ainda mais relevante em virtude da multiresistência aos agentes antimicrobianos.</li> </ul>

### Isolamento e Identificação

- Quando colhido o material por punção, biópsia ou mesmo *swab* da lesão profunda, deve ser processado rapidamente; existe uma característica do material descrita como grânulos de enxofre, especialmente nos micetomas.
- A bacterioscopia pode revelar bacilos irregulares com ramificações e parcialmente ou fracamente álcool-ácido resistentes pelo Ziehl ou Kinyoun. Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina caracterizam os grânulos, mas não os filamentos da bactéria. O Gram ou a coloração de metenamina prata de Gomori são úteis.
- A presença de hifas aéreas diferencia as nocardias dos outros gêneros relacionados – *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Tsukamurella*. As micobactérias de crescimento rápido podem apresentar hifas de substrato curtas ramificadas em ângulo agudo, porém sem ramificações secundárias, enquanto as nocardias exibem hifas complexas com ramificações em ângulo reto e com ramificações secundárias.
- No isolamento de nocardias podem ser utilizados meios de cultivo usualmente empregados na rotina laboratorial (ágar sangue, ágar chocolate, ágar Sabouraud dextrose, ágar seletivo para *Legionella* e Lowenstein Jensen), sendo necessário tempo de incubação prolongado (4 a 14 dias).
- Com exceção da *N. asteroides*, a maioria das nocardias apresenta beta-hemólise em ágar sangue de carneiro. Crescem em meio de parafina (como fonte única de carbono), juntamente com *Rhodococcus* e algumas micobactérias. Uma característica importante é a variedade na cor das colônias lisas ou rugosas, indo do branco giz ao amarelo, salmão, alaranjado e violeta, dependendo da espécie, tempo de incubação e do meio de cultivo utilizado.
- O envio da amostra clínica a um Laboratório de Referência pode ser requerido para a identificação da espécie.

### Características diferenciais das principais espécies de nocardia de interesse clínico

Nocardia	Catalase	Cultivo 35/45°C	Lisozima	Esculina	Glicose	Galactose	Inositol	Trealose	Gelatina	Xantina	Hipoxantina	Pigmento*
<i>N. nova</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	branco giz; laranja
<i>N. farcinica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	branco giz; laranja
<i>N. asteroides</i>	+	v	+		+	v	-	v	-	-	-	salmão; laranja
<i>N. brasiliensis</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	amarelo; laranja
<i>N. otitidiscaviarium</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	marrom claro

\*, Leitura do teste após 72h de incubação; +, reação positiva; -, reação negativa; v, reação variável

### 6.8.2 *Streptomyces*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alguns milhares de espécies de <i>Streptomyces</i> já foram caracterizados, sendo na quase totalidade saprófitas. O <i>Streptomyces somaliensis</i> é responsável pelo micetoma de cabeça e pescoço. Outras espécies foram identificadas em casos de pericardite crônica e infecções de partes moles pós-traumáticas (<i>S. griseus</i>).</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O abscesso pode revelar a presença de grânulos duros. O método de Gram revela uma massa de BGPs finos. Não é fastidioso, cresce melhor em meio Sabouraud dextrose incubado a temperatura ambiente entre 4 a 10 dias de incubação. Pode-se visualizar no microcultivo hifas finas e longas com ramificações, hifas aéreas e conídios (via assexuada de propagação com forma arredondada). Não é álcool-ácido resistente, e apenas os conídios podem apresentar essa propriedade; metaboliza a glicose por oxidação e cresce a 50oC. As colônias são mais secas com diferentes pigmentos (creme, marron, preto, etc), com a presença ou não de hifas aéreas. Uma característica importante das colônias é o cheiro de terra molhada.</li> </ul>

### 6.8.3 *Rhodococcus*

<b>Importância clínica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>R. equi</i> está relacionado com infecções em humanos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, especialmente entre pacientes que apresentavam síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), neoplasias ou terapias imunossupressoras.</li> <li>Quadros de pneumonias causados pelo <i>R. equi</i> podem surgir como o primeiro sintoma de infecção pelo HIV. As manifestações clínicas pulmonares incluem abscessos pulmonares, pneumonia piogranulomatosa e cavitação de aspecto semelhante à tuberculose pulmonar, sendo comum a presença de febre, tosse e dores no peito. Alguns autores sugerem que a detecção de infecção por <i>R. equi</i> deveria ser rotineiramente utilizada como um critério para o diagnóstico de SIDA.</li> <li>Outras patologias humanas, tais como malacoplaquia pulmonar, abscessos cerebrais e na tireóide, mediastinite, pericardite, linfadenite, osteomielite, endoftalmite e infecção de feridas, além de adenite retroperitoneal, com diarreia sanguinolenta e/ou abscesso no psoas, também podem estar associadas à infecção por <i>R. equi</i>.</li> <li>Infecções pulmonares, associadas ou não a acometimentos extrapulmonares, são observadas na maioria dos casos de infecção em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Entretanto, lesões exclusivamente extrapulmonares ocorreram principalmente entre indivíduos imunocompetentes.</li> </ul>
<b>Isolamento e Identificação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Em indivíduos imunologicamente competentes o <i>R. equi</i> foi relacionado com quadros de meningite, osteomielite, artrite séptica, endoftalmite e retinite em indivíduos imunocompetentes, além de processos infecciosos em crianças (9 meses e 13 anos de idade).</li> <li>Em algumas oportunidades, o desenvolvimento de infecção por <i>R. equi</i> foi relacionado com o contato prévio dos pacientes com animais.</li> <li>O <i>R. equi</i> é agente etiológico de broncopneumonias supurativas, linfadenites e enterites em equinos, responsável por aproximadamente 10% dos casos de pneumonia e 3% de morte em potro. Infecção pelo <i>R. equi</i> também pode ocorrer em bovinos, caprinos, ovinos, suínos além de cães e gatos. O <i>R. equi</i> pode ser isolado de animais sadios e assintomáticos, principalmente em regiões rurais endêmicas. Em raras oportunidades outras espécies do gênero <i>Rhodococcus</i> e dos gêneros <i>Gordonia</i> e <i>Tsukamurella</i> foram associados a infecções em humanos. <i>Rhodococcus</i> sp. foram isolados de casos de septicemia endoftalmite. <i>Gordonia</i> spp. de infecções cutâneas, pulmonares e sistêmicas enquanto <i>Tsukamurella</i> spp. foram isoladas de casos de meningite, pneumonia e peritonite.</li> </ul>

### Isolamento e Identificação

- O diagnóstico clínico diferencial deve ser feito com micobactérias, fungos, nocardia e actinomicetes. Hemoculturas com elevada frequência podem ser positivas.
- O *R. equi* é aeróbio, não formador de esporos, imóvel, catalase-positivo, DNase e gelatinase negativos, CAMP positivo (utilizando cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de beta-lisina), incapaz de hidrolizar a esculina, apresenta variabilidade na redução do nitrato e produção de urease e não fermenta açúcares. Alguns autores descreveram amostras de *R. equi* esculina-positivas e/ou capazes de metabolizar a glicose.
- A colheita e o transporte dos espécimes seguem os procedimentos comumente utilizados na rotina laboratorial. As amostras de *R. equi* podem ser isoladas principalmente a partir de sangue, secreções do trato respiratório, extremidades de cateteres e de outros sítios de infecções de acordo com o quadro clínico do paciente. Procedimentos invasivos, como a broncoscopia, podem favorecer o isolamento do micro-organismo nas secreções do trato respiratório inferior.
- Na bacterioscopia direta dos espécimes clínicos, o *R. equi* pode ser observado sob a forma de bastonetes ou cocobacilos localizados extra ou intracelularmente. Em algumas oportunidades o micro-organismo apresenta-se álcool-ácido resistente pelos métodos de coloração de Ziehl ou de Kinyoun. Entretanto os procedimentos de descontaminação dos espécimes clínicos utilizados para micobactérias podem ser prejudiciais ao isolamento do micro-organismo.
- A maioria dos meios de cultivo empregados na rotina microbiológica permite o crescimento dos micro-organismos do gênero *Rhodococcus*, *Gordonia* e *Tsukamurella*. Meios seletivos específicos também podem ser utilizados na rotina microbiológica (NANAT). As culturas devem ser incubadas em aerobiose ou em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em temperaturas entre 35 e 37°C. Devem ser examinadas a cada dois dias durante a primeira semana de incubação e 3 a 4 dias durante a segunda e terceira semanas. Nos cultivos realizados em meios sólidos, inicialmente o *R. equi* pode originar colônias esbranquiçadas, não hemolíticas, comumente mucóides, que frequentemente podem adquirir coloração rosada ou salmão dentro de 4 a 7 dias. No entanto, outras colorações, tais como vermelho, coral, laranja, amarelo, creme até o branco podem ser observadas mais raramente, sendo também infrequente a formação de colônias não mucóides.
- A diferenciação entre as espécies dos gêneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* e *Nocardia* pode ser difícil. As cepas de *R. equi* são sensíveis aos antimicrobianos vancomicina, eritromicina e gentamicina permitindo uma diferenciação preliminar das cepas de nocardias.
- As dificuldades no diagnóstico microbiológico parecem decorrer do isolamento de amostras bacterianas que assemelham-se morfológica e bioquimicamente ao *R. equi* (*Rhodococcus equi-like*). Segundo alguns autores, também tem sido frequente a caracterização errônea do *R. equi* como *Mycobacterium* ou o seu descarte como mero contaminante.
- Além dos métodos bioquímicos convencionais encontram-se comercialmente disponíveis sistemas semiautomatizados de identificação, além de métodos moleculares.

## Referências Bibliográficas

- Belmares J, Detterline S, Pak JB, Parada JP. *Corynebacterium* endocarditis species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infect Dis*. 2007; 7:4.
- Bernard KA. General approaches to the identification of aerobic gram-positive rods. In J Versalovic, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 10<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. USA; 2011. p.377-80.
- Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. *Bras J Microbiol* 2003; 34: 39-44.
- Conville PS, Witebsky FG. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes. In J Versalovic, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. Eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. USA; 2011. p.443-71.
- Dias AA, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS, Silva Junior FC, Napoleão F, Nagao PE, Villas-Bôas MH, Hirata Junior R, Guaraldi AL. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saude Publica*. 2012; 45:1176-91. Review. English, Portuguese.
- Efstratiou A, Engler KH, Dawes CS, Sesardic D. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. *J Clin Microbiol* 1998; 36:173-7.
- Formiga LCD. Diagnóstico microbiológico da difteria. *Rev Bras Patol Clin* 1986; 22: 52-8, 90-3, 122-30.
- Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In J Versalovic, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 10<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. USA; 2011. p. 413-42.
- Gomes DL, Martins CA, Faria LM Santos LS, Santos CS, Sabbadini PS, Souza MC, Alves GB, Rosa AC, Nagao PE, Pereira GA, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *J Med Microbiol* 2009; 58:1419-27.
- Graevenitz AV, Pünter V, Gruner E, Pfyfer GE, Funke G. Identification of coryneform and other Gram-Positive rods with several methods. *APMIS* 1994; 102:381-9.
- Janda WM. The corynebacteria revisited new species, identification kits, and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Newslett* 1999; 21 (Supl.22):175-82.
- Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1346-51.

Koneman EW, Allen SD, Jande WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. The aerobic Gram-positive bacilli. In: EW Koneman, SD Allen, WM Jande, PC Schckerberger, WC Winn eds. Color Atlas and textbook of Microbiology. 15<sup>th</sup> ed. Lippincott. Philadelphia. EUA.1995:651-97.

Lagrou K, Verhaegen J, Janssens M, Wauters G, Verbist L. Prospective study of catalase-positive coryneform organisms in clinical specimens: identification, clinical relevance and antibiotic susceptibility. *Diag Microbiol Infect Dis* 1998; 30:7-15.

Lederman ER, Crum NF. A case series and focused review of nocardiosis: clinical and microbiologic aspects. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83:300-13.

Logan NA, Hoffmaster AR, Shadomy SV, Stauffer KE. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In J Versalovic, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 10<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. USA; 2011. p. 381-402.

Macías J, Pineda JA, Borderas F, Gallardo JA, Delgado J, Leal M, Sánchez-Quijano A, Lissen E. *Rhodococcus* or *Mycobacterium*? An example of misdiagnosis in HIV Infection. *AIDS* 1997; 11:253-4.

Marshall RJ, Johson E. Corinebacteria: incidence among samples submitted to a clinical laboratory for culture. *Med Lab Science* 1990; 47: 36-41.

Martins C, Faria L, Souza M, Camello T, Velasco E, Hirata R Jr, Thuler L, Mattos-Guaraldi AL. Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:905-13.

Mattos-Guaraldi AL, Damasco PV, Gomes DL, Melendez MG, Santos LS, Marinelli RS, Napoleão F, Sabbadini PS, Santos CS, Moreira LO, Hirata R Jr. Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries. *J Med Microbiol* 2011; 60:1685-8.

Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Curr Microbiol* 1998; 37:156-8.

Mattos-Guaraldi AL, Hirata Jr R, Damasco PV. Difteria no Brasil e no Mundo: Aspectos do cenário atual. *Rev Imunizações SBIIm* 2011; 4: Suplem 1: s1-s19.

Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Jr R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – An overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 987-93.

Mattos-Guaraldi AL, Sampaio JL, Santos CS, Pimenta FP, Pereira GA, Pacheco LG, Miyoshi A, Azevedo V, Moreira LO, Gutierrez FL, Costa JL, Costa-Filho R, Damasco PV, Camello TC, Hirata Jr R. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:396-400.

- Matulionyte R, Rohner P, Uckay I, Lew D, Garbino J. Secular trends of nocardia infection over 15 years in a tertiary care hospital. *J Clin Pathol* 2004; 57:807-12.
- McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:357-417.
- Napoleão F, Damasco PV, Camello TC, Vale MD, Andrade AF, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL. Pyogenic liver abscess due to *Rhodococcus equi* in an immunocompetent host. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1002-4.
- Pereira GA, Pimenta FP, Santos FR, Damasco PV, Hirata JR, Mattos-Guaraldi AL. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:507-10.
- Pimenta FP, Hirata R Jr, Rosa AC, Milagres LG, Mattos-Guaraldi AL. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *J Med Microbiol* 2008; 57:1438-9.
- Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata R, Jr, Camello TC, Mattos-Guaraldi AL. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46:307-11.
- Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:20-34.
- Ribeiro MG, Salerno T, Mattos-Guaraldi AL, CamelloTCF, Langoni H, Siqueira AK, Paes AC, Fernandes MC, Lara GHB. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2008; 50:177-85.
- Ribeiro MG, Takai S, Vargas AC, Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Ohno R, Okano H, Silva AV. Identification of virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi* in humans with and without acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Amer J Trop Med Hyg* 2011; 85:510-3.
- Riegel P. Les Corynébactéries, aspects bactériologiques et cliniques. *Ann Biol Clin* 1998; 56:285-96.
- Soto A, Zapardiel J, Soriano F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *J Clin Pathol* 1994; 47:756-59.
- Takai S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Vet Microbiol* 1997; 56:167-76.
- Tkachuk-Saad O, Prescott J. *Rhodococcus equi*: isolation and partial characterization. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2696-700.
- Trost E, Blom J, Soares Sde C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schröder J, Jaenicke S, Dorella FA, Rocha FS, Miyoshi A, Azevedo V, Schneider MP, Silva A, Camello TC, Sabbadini PS, Santos CS, Santos LS, Hirata R Jr, Mattos-Guaraldi AL, Efstratiou A, Schmitt MP, Ton-That H, Tauch A.

Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *J Bacteriol* 2012; 194:3199-215.

Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vanechoutte M, Delmee M. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2624-8.

Wellinghausen N. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In J Versalovic, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. USA; 2011. p.403-12.

## Capítulo 7: Fastidiosos

*John Anthony McCulloch  
Carlos Emílio Levy  
Marina Baquerizo Martinez*

### 7.1 Introdução

#### 7.1.1 Características gerais dos fastidiosos

Esse grupo heterogêneo de bactérias apresenta como característica comum exigências especiais de condições de cultivo, em relação às enterobactérias e à maioria dos bacilos Gram-negativos não fermentadores. As condições de cultivo variam para cada micro-organismo, tal como uma concentração de CO<sub>2</sub> maior do que a da atmosfera, um maior tempo de incubação (30 dias no caso de espécies do gênero *Brucella*), ou a suplementação de meios de cultivo com fatores especiais de crescimento, etc.

#### 7.1.2 Pontos-chave para classificação

Os fastidiosos são bactérias Gram negativas ou Gram lábeis (coram-se de forma tênue pela safranina).

Muitos, mas não todos, são coco-bacilos e oxidase positivos; não crescem em ágar MacConkey. Para teste de fermentação de carboidratos exigem uma base mais rica do que a base O/F, usualmente empregada. Uma opção para testar a fermentação de carboidratos é usar CTA como base (*vide* fascículo de Meios de Cultura). Para cultivo *in vitro*, o inóculo deve ser denso, sendo que muitas vezes é necessária a adição de 2 ou 3 gotas de soro de coelho ou cavalo para permitir o crescimento nos meios utilizados para provas bioquímicas.

Com exceção das espécies do gênero *Capnocytophaga* spp., que crescem formando colônias grandes e com aparência de véu em torno da colônia, os demais fastidiosos crescem lentamente e necessitam 48 a 72 horas para que as colônias fiquem plenamente visíveis, ainda que diminutas.

Alguns desses patógenos em potencial estão associados a síndromes clínicas bem definidas, embora não frequentes, tal como a brucelose e tularemia. É importante nesses casos obter informações adicionais com o médico assistente ou o paciente/familiares para facilitar o processo de identificação microbiológica. Sempre se deve valorizar isolados de hemocultura, principalmente se ocorrerem em mais de uma amostra, ou em materiais com bom valor preditivo de infecção, tais como LCR, líquidos pleural, pericárdico e sinovial e lavado broncoalveolar.

Cabe destacar que alguns fastidiosos podem positivar sistemas automatizados de hemocultura ao mesmo tempo em que a bacterioscopia pode apresentar-se aparentemente negativa tanto pelo pequeno tamanho da bactéria como pela má coloração pela safranina.

A topografia do local de isolamento é uma pista importante, pois diferentes espécies pertencentes aos gêneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Capnocytophaga*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Kingella* e *Cardiobacterium* podem ser encontrados em pele e mucosas enquanto que bactérias do gênero *Gardnerella* o são em locais específicos, tal como no trato genital.

Como o tratamento de infecções causadas por bactérias fastidiosas pode requerer a utilização de esquemas terapêuticos pouco usuais, é extremamente importante chegar à definição do gênero ao qual um isolado fastidioso pertence ou encaminhá-lo a um Laboratório de Referência se o gênero não puder ser definido no laboratório de rotina. A correta identificação de um fastidioso também é importante por motivos de epidemiologia, uma vez que um aumento na incidência de infecções por essas bactérias caracterizaria um surto, e logo, um problema de saúde pública.

O diagnóstico correto de casos isolados de brucelose, legionelose e coqueluche (causada por *Bordetella pertussis*) tem importância individual e coletiva, sendo por isso de suma importância que o microbiologista tenha em mente esses patógenos e saiba caracterizá-los ou tenha a iniciativa de encaminhar o espécime clínico ou a cepa isolada para Laboratório de Referência.

A *Pasteurella* spp., embora considerada uma bactéria fastidiosa, cresce com facilidade em Ágar Sangue, Ágar Chocolate, e comporta-se no TSI como fermentador, todavia não cresce em meio MacConkey. É oxidase positiva.

A transmissão de algumas bactérias fastidiosas ocorre através de contato com fluidos biológicos contaminados (saliva, sangue e fezes), através de acidente com materiais perfuro-cortantes ou mordedura de animais domésticos.

cos ou silvestres, que podem transmitir infecções por bactérias dos gêneros *Pasteurella*, *Bartonella*, *Francisella* e *Brucella*.

Destaca-se ainda a necessidade de precauções especiais no manuseio de alguns desses agentes pelo seu potencial patogênico (gêneros *Brucella* e *Francisella*).

Com base na importância clínica e epidemiológica, esse grupo de bactérias será dividido em dois grupos:

- **Grupo A:** maior interesse clínico e epidemiológico
- **Grupo B:** casos clínicos esporádicos/microbiota oral humana

#### A) Grupo A – Maior interesse clínico e epidemiológico

Bactéria	Hospedeiro principal	Via de transmissão
<i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Bartonella</i> spp.	Gatos, humanos infectados, outros desconhecidos.	Mordida ou arranhão de gato; picada de piolho infectado
<i>Brucella</i> spp.	Mamíferos domésticos	Leite e derivados, carne, sangue, secreções de animais doentes
<i>Francisella</i> spp.	Animais silvestres	Picada de carrapato ou mosquito infectado em zona endêmica
<i>Haemophilus</i> spp.	Homem	Secreções de vias aéreas
<i>Legionella</i> spp.	Meio ambiente/água	Inalação de água contaminada
<i>Pasteurella</i> spp.	Animais domésticos/silvestres	Mordida e secreções de animais domésticos e silvestres

#### B) Grupo B – Casos clínicos esporádicos

Bactéria	Fonte
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Cavidade oral humana
<i>Cardiobacterium hominis</i>	Cavidade oral humana
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Cavidade oral humana
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Água e solo
<i>Eikenella corrodens</i>	Cavidade oral humana
<i>Kingella</i> spp.	Cavidade oral humana
<i>Streptobacillus</i> spp.	Cavidade oral de roedores

**As características desse grupo heterogêneo são:**

- Dificuldade ou ausência de crescimento em meios ricos como Ágar Sangue e Ágar Chocolate.
- Exigência de incubação em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>.
- Dificuldade em caracterizá-los, pois exigem meios enriquecidos.
- Crescimento lento e pouca importância clínica, talvez pela dificuldade do seu isolamento e caracterização.
- Os gêneros *Actinobacillus*, *Capnocytophaga* e *Eikenella* têm em comum o fato de pertencerem à microbiota da cavidade oral humana e estarem relacionados a doenças gengivais e, a partir desse foco, doenças sistêmicas especialmente em indivíduos imunocomprometidos.
- As espécies dos gêneros *Kingella* e *Cardiobacterium* são residentes do trato respiratório humano.
- Em contraste, as bactérias desse grupo que não são encontradas em seres humanos são: *Chromobacterium violaceum* que é encontrada na natureza, em água e solo; e o gênero *Streptobacillus*, na orofaringe e nasofaringe de camundongos selvagens e de laboratório.

**7.1.3 Principais fastidiosos e diagnóstico**

Bactéria	Material clínico	Meio específico	Incubação
<i>Bordetella pertussis</i>	Swab de nasofaringe	Meio de Bordet & Gengou	7 dias
<i>Bartonella</i> spp.	Sangue, gânglios, biópsias	Ágar chocolate, Ágar sangue de carneiro	5 a 15 dias
<i>Brucella</i> spp.	Sangue, aspirado de medula	Rotina de Hemocultura ou meio de Castañeda	Até 30 dias
<i>Francisella</i> spp.	Gânglios, biópsias	Ágar chocolate enriquecido	7 dias
<i>Haemophilus</i> spp.	Sangue, LCR	Ágar chocolate de cavalo	48-72 h até 7 dias
<i>Legionella</i> spp.	Secreções ou aspirados de trato respiratório inferior	Meio específico BCYE*	7 a 14 dias
<i>Pasteurella</i> spp.	Sangue, LCR, lesões	Ágar sangue, Ágar chocolate	24 a 72 h

\* ágar extrato de levedura, carvão, com pirofosfato férrico e alfa-cetogluturato.

### 7.1.4 Principais provas diferenciais para os fastidiosos

Bactérias	Oxidase	Catalase	Motilidade	Ágar	Sangue	Chocolate
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	neg/+	fraco	+	neg	+	+
<i>Bartonella</i> spp.	neg	neg	variável	+	+	
<i>Bordetella pertussis</i>	+	variável	neg	neg	neg	
<i>Brucella</i> spp.	+	+	neg	+	+	
<i>Capnocytophaga</i> spp.	neg	neg	neg	+	+	
<i>Cardiobacterium hominis</i>	+	neg	neg	+	+	
<i>Chromobacterium</i> spp.	V	+	+	+	+	
<i>Eikenella corrodens</i>	+	neg	neg	+	+	
<i>Francisella tularensis</i> neg	neg	+	fraco	neg	neg	+

## 7.2 *Bartonella*

A classificação taxonômica dos membros do gênero *Bartonella* ainda não é definitiva e agrupa as espécies *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae* e *Afipia felis*.

***B. bacilliformis*** – é o agente etiológico da verruga peruana (febre de Oroya), doença geograficamente restrita à região dos Andes, caracterizada por profunda anemia, trombocitopenia, adenopatia, mialgia, delírio, coma e alta mortalidade.

***B. quintana*** – é causa de doença febril que afetou soldados na I Guerra Mundial, conhecida como febre das trincheiras, e é relacionada à picada por piolhos infectados e má higiene. Caracterizada por febre e bacteremia com duração variável. Casos associados à infecção por HIV foram relatados.

***B. henselae*** – pode causar bacteremia, principalmente em imunossuprimidos, bem como uma síndrome conhecida como doença da arranhadura do gato. O quadro de bacteremia caracteriza-se de forma insidiosa por fadiga, dores no corpo, perda de peso e febre progressiva. A doença da arranhadura do gato manifesta-se inicialmente com uma pápula ou pústula localizada cerca de uma semana após a lesão causada pelo animal (gato ou cão que arranha ou morde). Após 1 a 7 semanas ocorre adenopatia regional. Um terço dos pacientes apresenta febre e um em seis apresenta supuração do linfonodo afetado. A maioria dos pacientes evolui sem outros sintomas. A cura espontânea ocorre entre 2 a 4 meses do início da infecção. *B. quintanae* e *B. henselae* podem causar um quadro de angiomatose bacilar caracterizado por proliferação neovascular envolvendo pele, gânglios e fígado. A infecção por *B. elizabethae* ainda é pouco conhecida.

**Afipia felis** – foi considerada por vários anos como sendo o agente etiológico da doença da arranhadura do gato, que é hoje atribuída à *B. henselae*. Seu papel na patogênese dessa doença ainda não está bem esclarecido.

**Isolamento** – As espécies do gênero *Bartonella* podem ser isoladas de hemoculturas, lesões cutâneas, biópsias e gânglios.

O SPS (polianetol sulfonato) que é o anticoagulante comumente usado em hemoculturas é inibidor de espécies do gênero *Bartonella*, por isso deve-se usar outro anticoagulante.

Quando há suspeita clínica, deve-se incubar por pelo menos sete dias, até 40 dias. Vários meios enriquecidos podem permitir o crescimento das espécies do gênero *Bartonella*. O caldo infusão coração de preparo recente, com 5-10% de sangue desfi-brinado de coelho ou cavalo é adequado, bem como o ágar chocolate.

Essas espécies podem crescer no meio de cultura do sistema Bactec, todavia o alarme de CO<sub>2</sub> que indica o crescimento bacteriano pode não ser acionado. *Bartonella* spp. exige atmosfera úmida e temperatura de 35-37°C por 3 a 4 semanas. *B. bacilliformis* e *Afipia felis* crescem melhor entre 25 a 30°C.

**Identificação** – Colônias podem crescer rugosas ou lisas, de um mesmo material. São bacilos Gram-negativos pequenos, às vezes curvos. As espécies *B. quintana* e *B. henselae*, que são as mais frequentemente isoladas, são caracterizados pelas seguintes provas: catalase e oxidase negativas, motilidade em lâmina presente (que não é devida a flagelos, uma vez que essas espécies não o possuem, mas sim a fímbrias). O período de incubação é longo (maior do que sete dias). A espécie *B. henselae* é bastante aderente ao meio.

**Provas para diferenciação de espécies de Bartonella e de A. felis**

Espécies	Catalase	Oxidase	Ureia	Flagelo	Motilidade
<i>B. bacilliformis</i>	+	neg	neg	+	+
<i>B. quitanae</i>	neg	neg	neg	+	*
<i>B. henselae</i>	neg	neg	neg	+	*
<i>B. elizabethae</i>	neg	neg	neg	neg	neg
<i>A. felis</i>	+	+	+	+	+

\* Motilidade por fímbrias

## 7.3 *Bordetella* sp.

### 7.3.1 Características gerais

O gênero *Bordetella* compreende as espécies *B. pertussis*, responsável pela coqueluche ou tosse comprida, e *B. parapertussis*, com quadro clínico semelhante ao da coqueluche, mas em geral menos severo. Ambas as espécies são exclusivamente patogênicas para humanos. A *B. bronchiseptica* e *B. avium* são bactérias comensais de mamíferos e aves, causando infecções em cães (tosse dos cães) e a *B. avium* causa rinite em perus. São patógenos oportunistas para humanos que entram em contato com esses animais. Foram classificadas mais recentemente como pertencentes ao gênero *Bordetella* as espécies *B. holmesii* e *B. hinzii*.

### 7.3.2 Importância clínica

A *Bordetella pertussis* causa a coqueluche em crianças não vacinadas, com quadro clínico bastante característico: Período prodromico que inicia 5 a 10 dias após a aquisição do agente, com sintomas semelhantes a um resfriado ou gripe. Essa fase é altamente contagiosa e os sintomas são inespecíficos. Segue-se o período paroxístico, com quadro de tosse convulsiva, persistente e característica, seguida de inspiração ruidosa. Podem ser acompanhadas de cianose e vômito e várias complicações, tal como convulsões, insuficiência respiratória, encefalopatia e infecções secundárias. A convalescença ocorre cerca de quatro semanas após início dos primeiros sintomas.

### 7.3.3 Material clínico e Semeadura

Para cultivo, podem ser coletadas secreção de nasofaringe por aspiração ou *swab* seguido de semeadura imediata em meio de Bordet & Gengou suplementado com 40 g/mL de cefalexina (para inibir os contaminantes da microbiota) recém-preparado. Um meio alternativo mais específico e sensível é o MCS (Ohtuska et al., 2009). Os meios devem ser incubados a 35°C por 5 dias até a obtenção de colônias. Pode-se realizar uma prova de imunofluorescência utilizando material colhido da nasofaringe, em concomitância com o cultivo, que por sua vez é mais específico, e não pode ser omitido. O cultivo, todavia não é sensível já na fase de convalescença, quando então a melhor opção para diagnóstico é a sorologia do paciente. Devido às dificuldades inerentes à cultura, outros métodos têm sido utilizados com algumas vantagens. Estão entre esses a imunofluorescência direta (FA) e o PCR realizados a partir do material clínico. Diferentes iniciadores ou primers têm sido usados para PCR. Uma combinação de métodos incluindo testes sorológicos talvez seja a melhor abordagem.

Vários meios de transporte são indicados, incluindo caseína hidrólise ácida a 1% (Casamino Ácido) e meio de Amies acrescido de carvão. Vários meios de isolamento foram descritos, O meio tradicional consiste em base de batata (Bordet-Gengou) ou de carvão suplementado com glicerol, peptona e sangue de cavalo ou carneiro. Antimicrobianos com cefalexina devem ser adicionados para diminuir o crescimento da microbiota.

### 7.3.4 Isolamento e Identificação

As espécies do gênero *Bordetella* são cocobacilos Gram-negativos pequenos e aeróbios estritos. Na coloração de Gram, a safranina deve ser deixada por 2 minutos. Para *B. pertussis* e *B. parapertussis* os Laboratórios de Referência devem dispor de identificação sorológica para acelerar a identificação.

Provas diferenciais para espécies de <i>Bordetella</i>						
Espécies	Oxidase	Motilidade	Ureia	Ágar Sangue e Chocolate	B & G ou Regan-Lowe	Salmonella-Shigella
<i>B. pertussis</i>	+	neg	neg	neg	+ 3-6 dias	neg
<i>B. parapertussis</i>	neg	neg	+ em 24h	+	+ 2-3 dias	neg
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	+ em 4h	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. avium</i>	+	+ <sup>2</sup>	neg	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. holmesii</i>	neg	neg	neg	+	+ 1-2 dias	+
<i>B. hinzii</i>	+	+	variável	+	+ 1-2 dias	+

1 – necessita de meio específico: Bordet & Gengou (infusão de batata + glicerol + sangue de carneiro) ou Regan Lowe. 2 – mais evidente a 25°C

## 7.4 *Brucella* sp.

A brucelose é uma doença de sintomas vagos, de curso insidioso com febre baixa, calafrios, sudorese noturna, cefaleia, mialgia e artralgia. Pode ser acompanhada, na forma crônica, de alterações hematológicas importantes como leucopenia, pancitopenia, trombocitopenia e anemia hemolítica.

### 7.4.1 Importância clínica

A brucelose pode ser contraída através da ingestão de leite e seus derivados ou de carne de mamíferos infectados. Profissionais como veterinários, açougueiros ou trabalhadores rurais que manipulam carne e sangue desses animais estão sujeitos à infecção. Há relatos de contração de brucelose devido a acidentes em laboratórios que trabalham com *Brucella* sp. A hemocultura exige um tempo maior do que 5 a 7 dias de incubação. É importante a infor-

mação de suspeita clínica para orientar o laboratório na pesquisa e caracterização do agente.

#### 7.4.2 Material clínico e Semeadura

Sangue, aspirado de medula, aspirado e biópsia de gânglios, fígado, baço, LCR e outros materiais. A partir do segundo dia de febre, as hemoculturas podem apresentar-se positivas, ocorrendo também hemoculturas positivas em pacientes afebris. Outro recurso utilizado para facilitar o isolamento é o método de lise-centrifugação:

- Colher 5 a 10mL de sangue em tubo de 50mL com 1,5mL de citrato de sódio a 4%.
- Adicionar cerca de 40mL de água destilada estéril.
- Centrifugar 2.000g por 30 minutos.
- Transferir 0,5mL do sedimento para uma placa de ágar sangue e semear. Pode-se fazer o mesmo com LCR e aspirado de medula.
- Incubar 35°C em estufa com atmosfera de 5% a 10% de CO<sub>2</sub> (com gerador de CO<sub>2</sub> ou estufa apropriada).

#### 7.4.3 Isolamento e Identificação

As espécies do gênero *Brucella* são aeróbios OF oxidativos, crescem nos frascos de hemocultura, meio de Thayer Martin, ágar sangue, ágar chocolate tendo como ágar base Trypticase Soy ágar ou *Brucella* Ágar, mas não cresce em Mc Conkey. O crescimento é visível em 48 a 72 horas após inóculo. As colônias são pequenas, brancas a creme, e através da coloração de Gram visualizam-se coco-bacilos bem finos e pequenos.

Espécies mais importantes são:

- *melitensis*, *abortus*, *suis* e *canis*.
- Ureia positivos: *B. suis* (1 a 30 minutos), *B. canis* (1 a 30 minutos) e *B. abortus* (1 a 2 h).
- no meio ureia de Christensen.
- H<sub>2</sub>S com tira de acetato positivo: *B. abortus* e de *B. suis* (biotipo 1).
- CO<sub>2</sub> para crescimento: biotipos de *B. abortus* e *B. ovis*.

Provas para a diferenciação de coco-bacilos Gram-negativos					
Bactéria	Oxidase	Motilidade	Ureia	Ágar Sangue	Mac Conkey
<i>Brucella</i> spp.	+	neg	+	+	neg
<i>Bordetella bronchiseptic</i>	+	+	+	+	neg
<i>Acinetobacter</i> spp.	neg	neg	variável	+	+
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	+	neg	+	+	+
<i>Pasteurella</i> spp.	*	neg	variável	+	neg
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	neg	variável	neg	neg

\* cresce no TSI como fermentador acidificando ápic e base sem gás.

Considerando que as espécies do gênero *Brucella* são de difícil identificação em laboratório não especializado, um isolado que for identificado no laboratório de rotina como pertencente a esse gênero deve ser encaminhado a um laboratório de referência para confirmação. Suspeitar quando houver quadro clínico sugestivo, quando o isolado for encontrado em amostra de sangue ou medula, cuja cultura resulta em crescimento de coco-bacilos finos que se coram fracamente, são oxidase e catalase positivas, e que crescem lentamente em ágar sangue ou chocolate. A prova de soroaglutinação com anticorpos específicos é útil como elemento da caracterização.

## 7.5 *Francisella tularensis*

É um coco-bacilo pequeno, Gram-negativo, não-móvel e pleomórfico, aeróbio estrito e capsulado.

Apresenta grande resistência à perda da viabilidade no meio ambiente, sobrevivendo semanas em meios úmidos, carcaças de animais, água e lama. É o agente etiológico da tularemia, uma doença de animais selvagens transmitida por vetores artrópodes hematófagos. É transmitida principalmente por carrapatos, mas também por mosquitos.

Nos Estados Unidos prevalece o biovar A, mais grave, enquanto que no hemisfério sul prevalece o biovar B que causa tularemia em uma forma clínica mais branda, sendo raramente diagnosticada, principalmente devido ao pouco conhecimento sobre a bactéria e a doença pelos profissionais de saúde.

### 7.5.1 Fontes de transmissão

Centenas de espécies de animais silvestres, bem como algumas espécies domésticas (incluindo cães, gatos e pássaros), podem ser portadores desse agente. Cerca de uma dezena de espécies diferentes de inseto servem de vetores. A

transmissão pode ocorrer também por contato direto com animais infectados através de sua mordida, exposição ao sangue, carne contaminada e eventualmente água contaminada por esses animais, e até mesmo pela inalação de aerossóis deixados pelos animais infectados.

### 7.5.2 Quadro clínico

A bactéria é extremamente infectante, sendo que o material clínico suspeito deve ser manipulado de acordo com as práticas de biossegurança nível 2, mas culturas puras dessa espécie devem ser manipuladas de acordo com as práticas de biossegurança nível 3. A dose infecciosa é de apenas 10 células injetadas por via subcutânea ou 25 células inaladas. Logo após a penetração do agente, o que ocorre em geral pela pele, aparecem sintomas semelhantes aos da gripe: febre, tremores, cefaleia e mialgia. Após um período de incubação de 2 a 10 dias, forma-se uma úlcera no local de penetração, que pode persistir por meses. Os linfonodos que drenam a região inicialmente afetada ficam entumecidos e então pode ocorrer necrose do tecido. Se a bactéria conseguir atingir a circulação sanguínea, o quadro de endotoxemia típico se manifesta. Esses casos são pouco frequentes e ocorrem quando o inóculo for grande ou o paciente é imunocomprometido. A mortalidade alcança 60%, ocorrendo toxemia, cefaleia intensa, febre elevada e contínua, com delírios, prostração e choque.

A forma úlcero-ganglionar ocorre em cerca de 80% dos casos relatados. A úlcera é endurecida, eritematosa, e de difícil cicatrização. Outras formas relatadas são a óculo-ganglionar, a ganglionar sem úlcera, a pleuropulmonar e a gastrointestinal.

### 7.5.3 Material clínico e Semeadura

Os materiais que oferecem maior valor preditivo positivo são aqueles obtidos a partir de raspados de úlceras, biópsias e escarro. A *Francisella tularensis* cresce em ágar chocolate suplementado com o suplemento comercialmente disponível Isovitalex<sup>®</sup>. Um laboratório de referência deve ser consultado sobre as técnicas e procedimentos mais recentes para a correta identificação dessa espécie e, se necessário, pode realizar a confirmação da identificação da amostra.

### 7.5.4 Isolamento e Identificação

A bacterioscopia de material clínico de lesões ou biópsias raramente ajuda, pois o micro-organismo é muito pequeno e cora mal pelo método de Gram, tornando difícil a sua observação por microscopia óptica. Esse agente deve ser considerado sempre que houver doença associada a picada de carrapato e formação de úlcera com comprometimento ganglionar. Entretanto, o diag-

nóstico microbiológico é difícil, sendo na maioria das vezes feito com base em testes de aglutinação em amostras pareadas colhidas com intervalo de 2 a 3 semanas e armazenadas a – 20°C.

## 7.6 *Haemophilus* sp.

Diferentes espécies pertencentes ao gênero *Haemophilus* podem ser encontradas como parte da microflora da nasofaringe e orofaringe em até 50% da população. As espécies são geralmente não capsuladas. *H. influenzae* pode causar vários tipos de infecção, sendo *H. influenzae* do tipo b a sub-espécie mais virulenta. A partir do início do século XXI, com o aumento da vacinação contra *Haemophilus influenzae*, houve uma drástica redução na incidência dessa bactéria nas populações vacinadas.

Doenças causadas pelo *H. influenzae* tipo b ocorrem principalmente na infância, sendo meningite, epiglote, pericardite, pneumonia, artrite séptica, osteomielite, celulite facial. Mais raramente, *H. influenzae* pode causar peritonite e infecção urinária em crianças menores que cinco anos. As doenças causadas por cepas não b e não tipáveis (em maiores de 9 anos e adultos associados a doença de base predisponente, como neoplasia, AIDS, alcoolismo, DPOC) incluem traqueobronquite e pneumonia, bacteremia, conjuntivite, otite (sendo a segunda espécie mais prevalente, depois do pneumococo) e sinusite.

### 7.6.5 *Haemophilus aphrophilus*

Essa espécie faz parte da microbiota do trato respiratório superior, especialmente em placas dentárias e no sulco gengival; pode causar endocardite e abscesso cerebral e mais raramente meningite, pneumonia e bacteremia em pacientes com comprometimento imunológico. A endocardite não está necessariamente relacionada a uma lesão valvular prévia, mas a associação com embolia arterial é frequente. Existem relatos também de isolamento em otites, sinusites e epiglotes. Essa espécie cresce bem em ágar chocolate no isolamento primário e em ágar sangue de carneiro nos subcultivos sem exigência de fatores X e V, mas as colônias são muito pequenas de cor amarelada, têm cheiro de cola e necessitam de 48 a 72h para boa visualização. Em caldo, essa espécie tem a característica de aderir-se às paredes do tubo, assim como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* o faz. Não crescem em meio MacConkey.

### 7.6.6 *Haemophilus ducreyi*

É o agente etiológico do cancro mole, que é uma afecção de transmissão exclusivamente sexual, mais frequente nas regiões tropicais. Caracteriza-se por lesões múltiplas (podendo ser única) e habitualmente dolorosas. Denomina-se também de cancróide, cancro venéreo, cancro de Ducrey. O período

de incubação é geralmente de 3 a 5 dias, podendo-se estender por até 2 semanas. O cancro mole é muito mais frequente no sexo masculino. Devido ao declínio da incidência da infecção, à contaminação das lesões com flora genital, que inibe e/ou dificulta o isolamento da espécie e ao frequente uso prévio de antibióticos o isolamento dessa bactéria é difícil.

O material para o isolamento deve ser colhido de úlceras genitais, removendo-se previamente a secreção superficial ou lavando-a com salina estéril e utilizando um *swab*. Recomenda-se semear imediatamente e fazer em paralelo um esfregaço a ser observado por microscopia. Em geral é de difícil cultivo. Emprega-se ágar chocolate de cavalo com base GC ou meio Mueller Hinton. O acréscimo de vancomicina pode ajudar a inibir bactérias Gram-positivas. A coloração de Gram em esfregaços do material da base da úlcera, ou do material obtido por aspiração do bubão permite a observação de bacilos Gram-negativos intracelulares dispostos em cadeias, geralmente paralelas, acompanhados de cocos Gram-positivos. A colocação de um disco de vancomicina pode ajudar a inibir bactérias Gram positivas. Na bacterioscopia, aparecem coco-bacilos Gram lábeis agrupados e em cadeias como cardumes.

#### 7.6.7 Identificação de espécies do gênero *Haemophilus*

##### **Características:**

- Anaeróbio facultativo.
- Não crescem no TSI e no OF-glicose.

Melhor meio de cultura para *Haemophilus influenzae* é o ágar chocolate com sangue de cavalo. A base GC usada para *Neisseria* sp. é indicada, embora os hemófilos cresçam em meios com outras bases, tal como Columbia e Mueller Hinton. Esse gênero exige uma atmosfera com alta umidade e uma concentração CO<sub>2</sub> entre 3 a 5%, especialmente para as espécies *H. influenzae* e *H. aphrophilus*. O ágar chocolate suporta muito bem o crescimento dos *Haemophilus*, mas para outros fastidiosos recomenda-se adicionar suplemento de crescimento (vitox<sup>®</sup>, isovitalex<sup>®</sup>).

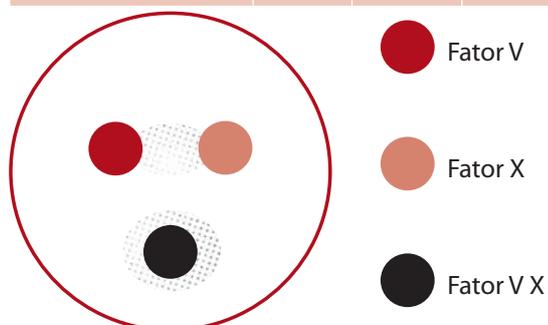
- As diferentes espécies de hemófilos podem apresentar reação de oxidase fracamente positiva e demorada (cerca de 25 a 20 segundos).
- Em amostras de LCR, pode ser útil a utilização de técnicas de soroaglutinação com partículas de látex, mas a confirmação bioquímica e sorológica em laboratório de referência é necessária.
- O antibiograma deve ser realizado em meio padronizado HTM (*vide* capítulo sobre meios de cultura).

- Verificar hemólise em ágar sangue de cavalo GLI = glicose SAC = sacarose LAC = lactose

Obs.: Fermentação de açúcares com base CTA e 1% de açúcar adicionado de fator X e V (vide cap. meios de cultura); vide leitura de fatores X e V

### 7.6.8 Técnica para testar fatores X e V

Principais provas para diferenciar algumas espécies de <i>Haemophilus</i>									
Espécies	Fator X	Fator V	Hemólise *	Ureia	Indol	GLI	SAC	LAC	Catalase
<i>H. influenzae</i>	+	+	neg	+	neg	variável	neg	neg	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	neg	variável	neg	neg	+
<i>H. parainfluenzae</i>	neg	+	neg	+	+	variável	variável	neg	variável
<i>H. ducreyi</i>	+	neg	fraca	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<i>H. ducreyi</i>	neg	neg	neg	neg	neg	+	+	+	neg



- Usar meio ágar tripticase soja ou BHI ágar.
- Discos comerciais impregnados com os fatores X=hemina/hematina e V=NAD ou coenzima I.
- Semear a bactéria como se fosse fazer um antibiograma e colocar os discos com pinça a uma distância de 1,5 cm um disco do outro. Flambar a pinça antes e após a retirada de cada disco.
- Após 24h de incubação em jarra com vela e umidade a 35°C, verificar crescimento próximo aos discos:
  - *Haemophilus influenzae*: Crescimento entre os discos (exige X e V).

### 7.6.9 Prova do satelitismo

- Semear com *swab* uma suspensão em salina cerca de 1 a 2 da escala MacFarland no centro de uma placa de ágar sangue de carneiro.
- Semear em uma única estria um repique de *S. aureus* hemolítico (ATCC 25923).
- Incubar 18 a 24h em jarra com vela e umidade ou CO<sub>2</sub> a 5%.
- Verificar crescimento de colônias pequenas próximas a zona de hemólise do estafilococo.

- Encaminhar cepas isoladas de líquidos nobres (sangue, LCR, pleural, pericárdico) a Laboratórios de Referência para confirmação e sorotipagem.

## 7.7 *Legionella* sp.

### 7.7.1 Importância clínica

Pneumonia com ou sem sepsis é a manifestação clínica mais importante, podendo ocorrer também infecções de partes moles e sinusite. Está em geral associada a surtos cuja fonte é a água contaminada com esse agente. Largamente distribuída na natureza em ambiente úmido e água potável e ocasionalmente em chuveiros. Está associada à presença de outras bactérias e amebas de vida livre na água. A presença de bactérias do gênero *Legionella* em material clínico humano está invariavelmente associada à doença clínica.

### 7.7.2 Espécies e manifestações clínicas

Existem algumas dezenas de espécies de *Legionella*, sendo a espécie mais importante a *L. pneumophila*, sorogrupos 1 e 6. A doença pode apresentar-se nas formas subclínica, não pulmonar, pneumonia e doença extrapulmonar. A forma não pulmonar tem período de incubação curto (horas a dias), sendo autolimitada e sem evidências radiológicas de comprometimento pulmonar. Os sintomas são febre, mal-estar, mialgia e tosse. A pneumonia é a forma mais frequente de manifestação da doença, acompanhada dos mesmos sintomas acima descritos para a forma não pulmonar e em geral com tosse não produtiva. A doença apresenta rápida progressão e, nos casos graves, a formação de abscessos são sugestivos da legionelose. Bacteremia é comum e o comprometimento dos mais variados órgãos e tecidos já foi descrito.

### 7.7.3 Materiais recomendados

- Escarro.
- Aspirado traqueal e outros que nesse caso específico estão indicados como úteis.
- Lavado/escovado bronco-alveolar.
- Biópsia pulmonar ou outros tecidos e aqueles obtidos em autópsia.
- LCR e outros líquidos de derrame.
- Urina (pesquisa de antígenos) – conservar a 20°C.
- Para transporte: usar frasco estéril com água destilada estéril, mas não salina, que pode inibir o cultivo. Sempre que possível concentrar os materiais por centrifugação, evitando formar aerossóis.

#### 7.7.4 Recursos diagnósticos mais utilizados

Sensibilidade e especificidade de recursos diagnósticos para legionelose			
Teste	Sensibilidade	Especificidade	Observação *
Cultura	70%	100%	Método de escolha
Aglutinação pelo látex	55-90%	85-99%	-
Imunofluorescência indireta	70-80%	>95%	Útil com cultura ou fins epidemiológicos

#### 7.7.5 Cultura em meio enriquecido

Cresce em meio suplementado com extrato de levedura, l-cisteína, sais de ferro e alfacetoglutarato em meio denominado BCYEa ou BCYE, e seu crescimento é favorecido pela incubação em 5% de CO<sub>2</sub>. Para materiais com microbiota, como para secreção traqueal e escarro, acidificar o meio por 15 minutos a pH 2,0 com tampão ácido (0,2M HCl e 0,2M KCl) e em seguida neutralização a pH 7,0 com KOH 0,1N.

#### 7.7.6 Cultura em meio seletivo

Recomenda-se uso de meio seletivo, adicionando ao meio BCYE os antibióticos: polimixina B, cefamandol e anisomicina ou vancomicina, polimixina B e anfotericina B. As colônias são azuladas ou esverdeadas.

#### 7.7.7 Cultura em meio diferencial BCYE

Adicionado de glicina, vancomicina, púrpura de bromocresol e azul de bromotimol, a cor das colônias é indicativa da espécie, sendo: *L. pneumophila* (branco esverdeado), *L. micdadei* (colônias azul claro ou acinzentadas), outras legionelas (colônias verde bem claro). Crescem bem no frasco utilizado pelo BACTEC®.

#### 7.7.8 Identificação

São bacilos Gram-negativos finos que se coram fracamente pela fucsina ou safranina da coloração de Gram. Após repiques, tornam-se filamentosos.

#### 7.7.9 Características e procedimentos

- Aeróbio estrito.
- No primeiro isolamento a presença de l-cisteína é imprescindível.
- No meio BCYEa o crescimento pode ser observado a partir do 3º ao 5º dia a 35°C.
- Semear o material também em ágar sangue como controle, pois a *Legionella* não deverá crescer.
- Aguardar 14 dias de incubação para descartar as culturas como negativas.

### 7.7.10 Características da *L. Pneumophila*

- oxidase positiva fraca
- catalase positiva
- não sacarolítica
- motilidade positiva
- gelatinase positiva
- hidrólise do hipurato positiva
- sensível a macrolídeos, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim e a quinolonas.

A identificação com base apenas em testes laboratoriais é difícil. A suspeita deve ser baseada na clínica, no aspecto da colônia, crescimento em meio BCYEa, dependência da l-cisteína, ausência de crescimento em ágar sangue e ágar chocolate não suplementados.

A imunofluorescência direta de amostras clínicas utilizadas para cultura é um método complementar para diagnóstico da legionelose. Encaminhar cepas suspeitas a Laboratório de referência para confirmação.

## 7.8 *Pasteurella* sp.

A infecção pelo gênero *Pasteurella* constitui uma zoonose, pois se trata de bactéria que faz parte da microbiota oral e do trato respiratório superior de alguns mamíferos não humanos e aves. As diferentes espécies estão associadas a infecções em humanos relacionadas à mordida dos animais descritos abaixo ou com o contato com o sangue, carne, carcaça, ou outros materiais de animais infectados/colonizados.

A *P. multocida* é a espécie mais comumente isolada em material clínico humano, em geral associada à mordida ou arranhadura de cães e gatos. Caracteriza-se pela formação de abscessos ou celulite e, eventualmente, osteomielite. Infecções respiratórias podem ocorrer, incluindo pneumonia lobar, com ou sem derrame e empiema. Em pacientes imunocomprometidos, com cirrose ou neoplasias essa espécie pode causar bacteremia e septicemia.

Principais espécies de <i>Pasteurella</i> e doenças relacionadas	
Bactéria	Doenças Relacionadas
<i>P. multocida</i>	Microbiota do trato respiratório de mamíferos e aves (domésticos e silvestres, encontrado na boca de cerca de 50% dos cães e gatos). Pode causar infecções em mamíferos e diarreia em aves.
<i>P. pneumotropica</i>	Trato respiratório de roedores, cães, gatos, entre outros.
<i>P. haemolytica</i>	Infecções pulmonares em bovinos, mastite em ovelhas, sepse em ovinos e caprinos.
<i>P. aerogenes</i>	Infecções pulmonares em bovinos, mastite em ovelhas, sepse em ovinos e caprinos.
<i>P. dagmatis</i> (n. sp1)	Trato respiratório de cães e gatos

### 7.8.1 Diagnóstico de zoonoses

Para facilitar o isolamento e identificação de espécies do gênero *Pasteurella*, é muito importante a informação clínica, pois deve-se também considerar outras zoonoses tal como brucelose, micobacterioses, tularemia, leptospirose e yersiniose.

#### A) Caracterização microbiológica

- Coco-bacilo ou bacilo Gram-negativo – podem ser capsulados.
- Anaeróbio facultativo (fermentador) – TSI ácido/ácido.
- Oxidase positiva em colônias isoladas em ágar sangue ou ágar chocolate.
- Catalase positiva.
- Motilidade negativa.
- Indol positivo.
- Sacarose positiva.
- Muitas espécies são ornitina positivas.
- Todas são oxidase positiva, catalase positiva e fermentadoras da glicose.

Provas diferenciais das espécies de <i>Pasteurella</i> sp. de importância clínica						
Espécie	Hemólise	MacConkey	Indol	Ureia	Ornitina	OF Glicose
<i>P. multocida</i>	neg	neg	positivo	neg	positivo	F sem gás
<i>P. pneumotropica</i>	neg	V	positivo	positivo	positivo	F gás V
<i>P. haemolytica</i>	positivo	V 72%	neg	neg	V	F sem gás
<i>P. aerogenes</i>	neg	positivo	neg	positivo	V	F sem gás
<i>P. dagmatis</i> (n. sp1)	neg	neg	positivo	positivo	positivo	F sem gás

Obs.: a *P. multocida* cresce bem em ágar sangue de carneiro e ágar chocolate, formando pequenas colônias acinzentadas. Não cresce em ágar Mac Conkey. Tem odor forte característico e podem ser diferenciadas entre si por poucas provas (*vide* tabela acima), mas dependendo do animal-fonte, outras espécies menos frequentes podem estar envolvidas.

## 7.9 *Actinobacillus* sp.

São habitantes das mucosas do trato respiratório e urinário de humanos e outros animais. As três espécies mais importantes são: *A. actinomycetemcomitans*, *A. urea* e *A. hominis*.

*A. actinomycetemcomitans* está relacionada à doença periodontal e particularmente à periodontite juvenil localizada, bem como à endocardite e abscesso cerebral como complicação de infecção na cavidade oral. A doença periodontal está associada à endocardite pelos seguintes agentes:

- *A. actinomycetemcomitans*
- *Cardiobacterium hominis*
- *E. corrodens*
- *Kingella* spp.

As outras espécies de *Actinobacillus* são patógenos oportunistas e causam raramente infecções do trato respiratório e bacteremia.

### 7.9.1 Principais características para diagnóstico

São coco-bacilos Gram-negativos ou pequenos bacilos que crescem em aerobiose, em uma atmosfera com umidade de 5% a 10% de CO<sub>2</sub> ou anaerobiose em ágar sangue e ágar chocolate. Recomenda-se adicionar suplementos com vitaminas e sangue lisado de carneiro ou cavalo ao ágar chocolate. As colônias ficam bem visíveis com 48 a 72 h de incubação, são brancas acinzentadas, com um pregueamento no centro, fortemente aderentes ao meio e pegajosas no primeiro isolamento.

Provas diferenciais entre os principais fastidiosos									
Bactérias	Oxidase	Catalase	CO <sub>2</sub>	MacConkey	Ureia	Indol	Glic	TSI	Motil
<i>Actinobacillus</i> <sup>1</sup>	neg ou + fraco	+	+	variável	neg	neg	+	ac/ac	neg
<i>Cardiobacterium</i>	+	neg	+	neg	neg	+	+	ac/ac	neg
<i>Eikenella</i>	+	neg	+	neg	neg	neg	neg	alcalino	neg
<i>Kingella</i>	+	neg	+	neg	neg	neg	+	alcalino	neg
<i>Kingella</i>	neg <sup>2</sup>	neg	+	neg	neg	neg	+	Não cresc. <sup>3</sup>	neg
<i>Streptobacillus</i>	neg	neg	+	neg	neg	neg	+	Não cresce	neg
<i>Chromobacterium</i>	variável	+	neg	+	neg	neg	+	ac/ac	+

### Principais características das bactérias fastidiosas analisadas

<i>Actinobacillus</i> sp.	Cocobacilos a bacilos longos, anaeróbios facultativos, colônias cinza, aderentes ao meio, com centro da colônia enrugado
<i>Cardiobacterium</i> sp.	Bacilos que podem apresentar formas semelhantes a gota d'água
<i>Eikenella</i> sp.	Cocobacilos com extremidades arredondadas, cheiro de água clorada, colônias podem corroer o meio
<i>Kingella</i> sp.	Pequenos cocobacilos
<i>Capnocytophaga</i> sp.	Fusiforme e curvo, colônias crescem espalhadas
<i>Streptobacillus</i> sp.	Filamentos longos
<i>Chromobacterium</i> sp.	Pode ter forte pigmento violeta, cresce em ágar MacConkey

## 7.10 *Capnocytophaga* sp.

As espécies *Capnocytophaga gingivalis*, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. ochracea* e *C. sputigena* fazem parte da microbiota da cavidade oral humana, enquanto outras espécies podem ser encontradas na boca de animais domésticos. O isolamento de *Capnocytophaga* sp. ocorre com maior frequência em hemoculturas, em pacientes neutropênicos com mucosite, mas estão também implicadas na doença periodontal juvenil (*C. gingivalis* e *C. ochracea*), periodontite em adultos (*C. sputigena*) e isoladas em placas dentais supragengivais em adultos (*C. granulosa* e *C. haemolytica*). As doenças localizadas (ceratites, abscessos e endoftalmites), bem como doenças sistêmicas (septicemia, endocardite, osteomielite), ocorrem em pacientes imunocomprometidos ou não.

### 7.10.1 Morfologia e cultivo

A morfologia de espécies do gênero *Capnocytophaga* é bem característica, facilitando a sua identificação, pois lembra um *Fusobacterium* sp. aerotolerante. Tem as extremidades afiladas e o centro mais largo, podendo ser encurvada e eventualmente cocoide.

Para cultivo, crescem melhor com 5 a 10% de CO<sub>2</sub> e em anaerobiose, o que pode levar à confusão com o anaeróbio estrito, se não for feita a prova de crescimento em aerobiose com CO<sub>2</sub>. Chama a atenção o fato de crescer melhor em ágar sangue de carneiro que em ágar chocolate sem suplemento de vitaminas. Não crescem em ágar MacConkey. O crescimento pode ocorrer em 24 a 72 h. A colônia é chata e sua borda é irregular; com incubação mais longa, nota-se o espalhamento em torno da colônia, semelhante ao que ocorre com *Proteus* sp., mas em escala muito reduzida, cerca de 2 a 4 mm de diâmetro. A espécie *C. haemolytica* apresenta um poder hemolítico discreto, e a espécie *C. ochracea* tem cheiro de amêndoas.

### 7.10.2 Identificação

As *Capnocytophaga* sp. de origem humana são oxidase e catalase negativas, produzem ácido a partir da glicose em caldo enriquecido com soro de coelho com inóculo denso. São motilidade negativa; indol negativo; lisina, ornitina e arginina negativas. A maioria é esculina positiva (*C. gingivalis* é variável). A diferenciação entre as espécies é difícil. As amostras de origem animal (*C. canimorsus* e *C. cynodegmi*) são oxidase, catalase e arginina positivas.

## 7.11 *Eikenella* sp.

Também é uma espécie que faz parte da microbiota da cavidade oral humana e pode causar infecções periodontais, sendo encontrada na placa bacteriana subgengival em adultos com periodontite. Isolada de material obtido do trato respiratório inferior, abscessos de partes moles, sangue e fluídos estéreis infectados em casos de infecções pleuropulmonares, infecções pós-cirúrgicas, artrite, meningite, endocardite e septicemia.

### 7.11.1 Cultivo, bacterioscopia e identificação

É anaeróbio facultativo, mas cresce melhor em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em ágar sangue e chocolate, mas não em ágar MacConkey. O crescimento é lento, necessitando de 2 a 4 dias para boa visualização das colônias. Em cerca da metade das cepas, pode-se observar a corrosão do ágar, que é sua característica marcante. Produz um pigmento amarelo claro e tem odor de hipoclorito no ágar sangue e ágar chocolate.

Na bacterioscopia são observados bacilos delgados ou coco-bacilos Gram-negativos com extremidades arredondadas. Bioquimicamente, caracteriza-se por ser oxidase positiva, catalase negativa, motilidade negativa e ornitina positiva; provas negativas para a utilização de carboidratos, ureia, indol e esculina.

## 7.12 *Kingella* sp.

Espécies do gênero *Kingella* fazem parte do trato respiratório e genito-urinário humanos. *K. kingae* é a espécie mais importante e é um patógeno oportunista responsável por casos graves de endocardite, osteomielite, septicemia, com provável porta de entrada em lesões da mucosa da orofaringe. A doença valvular pode estar ou não associada à doença cardíaca prévia. A osteomielite ocorre com maior frequência em crianças menores de 5 anos. Os quadros sépticos podem ser semelhantes à doença meningocócica.

### 7.12.1 Cultivo, bacterioscopia e identificação

A *K. kingae* cresce em ágar sangue e ágar chocolate com 5% de CO<sub>2</sub>, após pelo menos 48 h de incubação, mas não em ágar MacConkey. Tem como característica ser beta-hemolítica no ágar sangue de carneiro, não produz hemólise intensa. Pode crescer numa mesma placa de isolamento como colônias lisas e convexas ou fazendo corrosão, ou colônias espalhadas como se fossem móveis.

São coco-bacilos que ocorrem aos pares ou cadeias curtas, podendo ser confundida com *Neisseria* spp. São oxidase positiva, motilidade e catalase negativas, e acidificam a glicose lentamente.

## 7.13 *Cardiobacterium hominis*

Fastidiosos oxidase positivas e catalase, ureia e esculina negativas				
Bactérias	Hemólise	Indol	Ornitina	Glicose
<i>C. hominis</i>	neg	+	neg	+
<i>E. corrodens</i>	neg	neg	+	neg
<i>K. kingae</i>	+	neg	neg	+

*Cardiobacterium* sp. faz parte da microflora do trato respiratório humano e ocasionalmente do trato urogenital. Está associada quase exclusivamente a quadros de endocardite, precedidos de manipulação dentária.

### 7.13.1 Cultivo, bacterioscopia e identificação

Cresce em 3 a 5 dias em hemoculturas, mas não causa alterações no meio (turvação, hemólise, película ou grumos). Cresce em 3 a 5 dias em 5 a 7% de CO<sub>2</sub>, em ágar sangue e ágar chocolate, mas não em ágar MacConkey. As colônias são branco-amareladas e podem manifestar um pequeno espraiamento, simulando motilidade no ágar como o *Proteus* spp., e eventualmente pode apresentar corrosão do ágar.

São bacilos Gram-negativos, podendo apresentar pleomorfismo com extremidades dilatadas como bulbos que podem reter corante cristal violeta da coloração de Gram e apresentam arranjos característicos em agrupamentos de rosetas e formas isoladas como gota d'água ou halteres. Deve-se observar essas características para não confundi-los com bacilos Gram-positivos.

Uma prova fundamental é a pesquisa de produção de indol, que deve ser feita em caldo tripton, com inóculo denso, com incubação de 48 h, e extração com xilol e uso do reagente de Ehrlich.

## 7.14 *Chromobacterium violaceum*

Encontrada na natureza no solo e na água, a infecção em geral está relacionada a lesões cutâneas após contato com esses elementos. As lesões localizadas ou formas septicêmicas graves com múltiplos abscessos têm sido esporadicamente relatadas. Mais raramente, diarreia e infecção urinária têm sido descritos.

### 7.14.1 Cultivo e bacterioscopia

É um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo, reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondadas, isolados ou em arranjos aos pares ou em cadeias curtas.

Diferente da maioria dos fastidiosos, cresce, além de no ágar sangue e chocolate, também em ágar MacConkey. Apresenta colônias convexas, lisas e de cor violeta forte, embora algumas variantes sem cor possam ocorrer. Algumas cepas podem ser fracamente hemolíticas no ágar sangue.

## 7.15 *Streptobacillus moniliformis*

Encontrado na nasofaringe e orofaringe de ratos, camundongos e outros roedores domésticos, tal como a cobaia. As infecções estão relacionadas à mordida desses roedores ou ingestão de leite ou alimentos contaminados. A febre por mordedura do rato apresenta quadro clínico bem definido com período de incubação de cerca de 10 dias, início abrupto com febre alta, tremores, cefaleia intensa, vômitos e artralgia migratória.

Ocorre um *rash* semelhante ao do sarampo, com erupções maculopapulares podendo ser pustulosa, com petéquias ou púrpuras nas extremidades, incluindo região palmar e plantar. Complicações graves podem ocorrer, como endocardite, pericardite, septicemia e abscesso cerebral. Sem tratamento, pode evoluir favoravelmente em 2 semanas ou pode se tornar crônica; a mortalidade chega a 10%.

### 7.15.1 Cultivo, bacterioscopia e identificação

É um bacilo Gram-negativo muito pleomórfico, podendo ter em culturas mais velhas de 1 a 150  $\mu\text{m}$  de comprimento (habitualmente bactérias têm de 1 a 3  $\mu\text{m}$ ), com eventuais dilatações como um colar de pérolas, sem apresentar ramificações, quebrando em formas coco-bacilares. Em culturas jovens pode apresentar uma morfologia mais uniforme. O isolamento é feito a partir de hemocultura, aspirado de derrames (devem ser centrifugados para concentrá-los) e abscessos.

### A) Meios de cultivo

Colher sangue para hemocultura com citrato. Não devem ser usadas hemoculturas com SPS, pois esse é inibidor do *S. moniliformis*.

Cultivar em meio bifásico TSA/TSB ou ágar infusão coração ou caldo infusão coração, suplementados com 10% de soro de cavalo ou 15% de soro de coelho, e 0,5% de extrato de levedura.

Incubar em jarra de anaerobiose ou 10% CO<sub>2</sub> a 35-36°C e umidade.

Após cerca de três dias crescem colônias cinzas de 1-2 mm de diâmetro, com consistência butirosa, podendo surgir colônias variantes com aparência de ovo frito como a de colônias de micoplasmas. Em caldo de cultura, crescem em 2 a 3 dias com aparência de bolas de pêlo.

As provas bioquímicas exigem a adição de soro de cavalo ou coelho para suportar o crescimento. São oxidase, catalase, indol e ureia negativos; e positivos para esculina, H<sub>2</sub>S com a prova da tira de acetato de chumbo e hidrólise da arginina. Acidificam lentamente a glicose em base CTA com 0,5% de soro de cavalo.

## Referências Bibliográficas

FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12<sup>th</sup> ed. St. Louis. Mosby Elsevier, 2007, 1031p.

WINN, J. JR.; ALLEN, S.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRENKENBERGER, P.C.; WOODS, G.K. – Color Atlas and Textbook OF Diagnostic Microbiology. 6th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 1535p.

MC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore. Ed. William & Wilkins Co., 2000.

MURAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC. American Society for Microbiology ASM Press 2007., 2256p

OHTSUKA, M.; KIKUCHI, K.; SHUNDO, K.; OKADA, K.; HIGASHIDE, M.; SUNAKAWA, K.; HIRAMATSU, K. (2009). Improved selective isolation of *Bordetella pertussis* by use of modified cyclodextrin solid medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4164-7.



## Capítulo 8:

### *Bactérias Anaeróbias Estritas*

*Lycia M. Jenne Mimica  
Marina Baquerizo Martinez*

#### **8.1 Introdução**

Bactérias anaeróbias estritas são dominantes na microbiota anfibiótica humana e são isoladas de diversas infecções. Algumas dessas infecções são graves e apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade. Não é com facilidade que se define o termo “anaeróbio”. Com finalidades práticas, podemos definir bactéria anaeróbia estrita com base na quantidade de oxigênio que ela pode tolerar, na exigência de uma tensão de oxigênio reduzida e o não crescimento em superfície de um meio de cultura sólido sob uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> (18% de O<sub>2</sub>). O oxigênio é letal ao anaeróbio estrito porque na sua redução são formadas substâncias intermediárias tóxicas (radical hidroxila/anion superóxido/peróxido de hidrogênio) que são removidas, eventualmente, por enzimas da família das superóxido desmutase e peroxidase, presentes em quantidades variáveis em algumas espécies, que assim garantem certa tolerância ao O<sub>2</sub>. Os anaeróbios exigem, além da exclusão do O<sub>2</sub>, um ambiente com potencial de óxido-redução (Eh) baixo que pode também variar em função do pH estabelecido. É importante salientar que esse grupo de bactérias é formado por espécies que variam de aerotolerantes a muito exigentes quanto à ausência de oxigênio. As mais estritas crescem em atmosferas com 0,5% de oxigênio, muitas crescem em atmosferas ao redor de 3% e algumas podem crescer ainda em concentrações de até 6% de oxigênio (Tabela 1).

**Tabela 1** Diferenças quanto à sensibilidade ao O<sub>2</sub> entre espécies de bactérias

Espécies	% de O <sub>2</sub> no ar atmosférico					
	0,1	0,5	1,0	3,0	6,0	10,0
<i>C. haemolyticum</i>	++	++	0	0	0	0
<i>C. novyi</i>	++	++	++	++	+,v	0
<i>P. oralis</i>	++	++	++	++	+,v	0
<i>P. melaninogenica</i>	++	++	++	++(v)	+,v	0
<i>B. fragilis</i>	++	++	++	++	+,v	0
<i>F. nucleatum</i>	++	++	++	++	++	0

++ crescimento; + pouco crescimento; 0 sem crescimento; v cepa dependente

Essa labilidade dos anaeróbios estritos ao oxigênio explica as dificuldades existentes nos laboratórios para seu isolamento e estudo. A introdução dos aminoglicosídeos como agentes antimicrobianos de largo espectro veio a determinar a importância das bactérias anaeróbias em diversas infecções, uma vez que tais bactérias são intrinsecamente resistentes a essa classe de antibióticos. A partir dessa época, as bactérias anaeróbias não esporuladas (cocos e bacilos Gram-positivos; bacilos Gram-negativos) tiveram seu papel reconhecido na etiologia das infecções, particularmente nas intra-abdominais, nas do trato genital feminino e nas pleuropulmonares. A partir da década de 1970 foram desenvolvidos procedimentos práticos de laboratórios para criar atmosferas de anaerobiose. Até esse momento, somente as infecções provocadas pelos micro-organismos mais resistentes, dentro desse grupo, os esporulados do gênero *Clostridium*, eram diagnosticadas com maior frequência. Hoje se sabe que as infecções por *Clostridium* são menos frequentes que as infecções provocadas por outros gêneros de bactérias anaeróbias.

Um fato que também merece ser destacado, para explicar a frequência com que essas bactérias provocam infecção, é que os anaeróbios estritos são habitantes normais do organismo humano, ultrapassando em número os aeróbios e anaeróbios facultativos. Assim, os anaeróbios estritos estão em proporções 5 a 1000 vezes maiores que os aeróbios estritos e facultativos na microbiota normal do tubo digestivo, pele, trato respiratório superior e genital feminino.

Quando existem fatores predisponentes, essas bactérias provocam processos patológicos em diferentes órgãos e sistemas. Por esse motivo, a maior parte das infecções provocadas pelas bactérias anaeróbias estritas são infecções chamadas endógenas. É a própria microbiota do indivíduo que em determinado momento provoca o processo infeccioso, sendo esse tipo de infecção pouco ou nada contagioso. As infecções provocadas pelo gênero *Clostridium* são fundamentalmente adquiridas a partir do meio ambiente externo e por esse motivo são chamadas de infecções exógenas. Nas mucosas, onde os anaeróbios estritos são prevalentes como microbiota, a atmosfera anaeróbia é conseguida devido ao metabolismo de micro-organismos facultativos e

aeróbios estritos frente a compostos orgânicos, enzimas, restos celulares, entre outros. A ação desses micro-organismos baixa o potencial redox nesses locais.

Como as bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias estritas favorecem a multiplicação dos anaeróbios, por consumirem o oxigênio existente no local e por produzirem alguns fatores de crescimento como substâncias secundárias do seu metabolismo (por exemplo, *Staphylococcus* sp. produz vitamina k), a maior parte das infecções por bactérias anaeróbias estritas são infecções mistas. Assim, são frequentes as infecções conjuntas com Enterobactérias, *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*.

Alguns aspectos clínicos fazem suspeitar de uma infecção com envolvimento de bactérias anaeróbias, sendo os principais esses abaixo relacionados:

- Secreção Fétida
- Infecção nas proximidades de superfície mucosa
- Tecido necrótico
- Presença de gás em tecidos ou secreção
- Tromboflebite séptica
- Coloração negra em secreção com sangue
- Infecção decorrente de mordida humana ou de animal
- Presença de grânulos de enxofre nas secreções
- Terapêutica prévia com aminoglicosídeo
- Gangrena gasosa

A presença de lesão com aspecto de micetoma e a observação de grânulos de enxofre no pus é característica de uma infecção por *Actinomyces*. A infecção por anaeróbios secundária a uma mordida de animal ou do ser humano é explicada pela existência de um grande número dessas bactérias na cavidade oral desses hospedeiros. Associados a esses elementos clínicos, existem alguns outros, laboratoriais, que sedimentam ainda mais a suspeita de uma infecção por anaeróbios estritos:

- Ocorrência de formas pleomórficas na coloração de Gram (como regra geral, os anaeróbios são mais pleomórficos que os aeróbios e anaeróbios facultativos).
- Observação no material clínico de bacilos Gram-positivos esporulados que lembram *Clostridium*.
- Observação de bactérias no material clínico corado pela coloração de Gram, que não crescem nos meios mantidos em atmosferas de aerobiose.
- Crescimento de bactérias somente na parte inferior de tubos com meios de caldo Tioglicolato.

### 8.1.1 Fatores predisponentes

Uma variedade de condições predispõe um indivíduo a desenvolver infecção por anaeróbios. Baixo potencial de oxi-redução facilita o crescimento de bactérias anaeróbias. A causa clínica mais comum de diminuição do potencial redox é a anóxia dos tecidos resultante normalmente de lesões vasculares, compressão, hipotermia, choque, edema e outras condições que levam à má perfusão.

Quanto às doenças sistêmicas ou condições gerais como corticoterapia, terapêutica de tumores, leucopenia, hipergamaglobulinemia, colagenoses, diabetes, esplenectomias, embora relacionadas como predisponentes, não há evidência concreta de que realmente estejam associadas a maior incidência de infecção por anaeróbios.

## 8.2 Coleta de material

Devido à presença marcante de bactérias anaeróbias como microbiota das mucosas e pele e às características endógena e polimicrobiana das infecções por anaeróbios, a coleta de materiais clínicos para a pesquisa de bactérias anaeróbias representa uma das etapas cruciais para a realização de um diagnóstico de qualidade. As amostras devem ser colhidas de forma que não entrem em contato com oxigênio e não se contaminem com bactérias anaeróbias da microbiota. Por esse motivo sempre que possível devem ser aspiradas com seringa e agulha, da qual é eliminado o ar imediatamente após a obtenção da amostra. Amostras de tecido e biópsia também são adequadas para pesquisa de anaeróbios. A coleta com *swab* deve ser rejeitada, quando for inevitável, incluir em meio semi sólido. Não são aceitáveis para o processamento laboratorial espécimes como urina obtida por micção espontânea, escarro expectorado, secreções vaginais e de feridas localizadas próximas a sítios contaminados e fezes, pelo fato de que a presença de micro-organismos componentes da microbiota impossibilitam definições quanto à etiologia dos processos infecciosos. Em resumo, apenas espécimes clínicas que não estejam contaminadas com as bactérias anaeróbias da microbiota são aceitáveis (Tabela 2).

**Tabela 2** Amostras clínicas aceitáveis para isolamento de bactérias anaeróbias

Local	Amostras clínicas aceitáveis	Amostras clínicas não aceitáveis
Cabeça e pescoço	Aspirados de abscessos Biópsias de materiais cirúrgicos Swabs obtidos durante o ato cirúrgico	Swabs da oro e nasofaringe
Pulmão	Aspirado transtraqueal Punção percutânea Biópsias de mat. cirúrgicos Amostras de broncoscopia (protegida) Swabs obtidos durante o ato cirúrgico	Escarro expectorado Escarro induzido Aspirado endotraqueal Amostras de broncoscopia não protegida
SNC	Aspirados de abscessos Biópsias de materiais cirúrgicos Swabs obtidos durante o ato cirúrgico	Swabs mantidos em aerobiose
Abdomem	Fluido peritoneal por punção Aspirados de abscessos Biópsias de materiais cirúrgicos Swabs obtidos durante o ato cirúrgico	Swabs mantidos em aerobiose
Trato urinário	Aspirado supra-púbico	Urina por micção espontânea Urina por cateter
Trato genital feminino	Amostras por culdoscopia Aspirado endometrial (protegido) Aspirados de abscessos Biópsias de materiais cirúrgicos Swabs obtidos durante o ato cirúrgico DIU	Swabs vaginais ou cervicais
Ossos e articulações	Aspirados com agulha e seringa Biópsias de mat. cirúrgicos Swabs obtidos durante o ato cirúrgico	Material superficial obtidos com Swabs
Tecidos moles	Aspirados com agulha e seringa Biópsias de materiais cirúrgicos Aspirados de sinus Aspirados com agulha e seringa de material profundo	Swabs superficiais
Intestino	Somente para pesquisa de toxinas	

### 8.3 Transporte do material

A etapa de transporte do material coletado também requer cuidados especiais centrados na manutenção de condições anaeróbias, visando minimizar os efeitos deletérios da exposição ao oxigênio atmosférico. O tempo depende do material e do volume da amostra. Grandes quantidades de material purulento (> 3 mL), mantidas em tubos vedados, têm viabilidade por 2-3 horas. Tubos gaseificados (mistura de N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> apenas), meios de transporte semi-sólidos contendo agentes redutores

como a cisteína, dispostos em camada alta (Cary-Blair pre-reduzido, tioglicolato) ou envelopes geradores de gás podem ser utilizados.

O transporte não deve ser feito na seringa em que o material foi colhido, pelo risco ocupacional que representa; o material deve ser inoculado em meio de transporte semi sólido pré reduzido, como tioglicolato (fig. 1). A amostra deve ser mantida entre 18 e 22°C durante o transporte.

## 8.4 Processamento do material

Sempre é feita uma coloração de Gram da amostra recebida e, quando necessário, de esporos. O bacterioscópico pode orientar o clínico quanto ao diagnóstico e à terapêutica precoce. Por exemplo, a observação de bacilos Gram-positivos esporulados em um processo com aspecto de gangrena gasosa é indicativo de *Clostridium* e de gangrena gasosa.

Figura 1 Material colhido por aspiração inoculado em tioglicolato



A análise macroscópica da amostra clínica pode fornecer informações importantes sobre a natureza e qualidade da amostra. Deve-se observar a presença de pus, necrose, odor fétido e presença de grânulos sulfurosos.

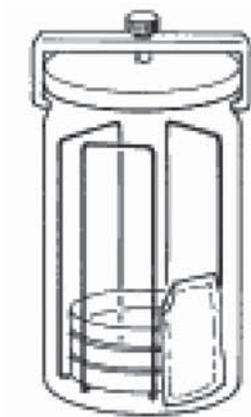
A observação da quantidade de bactérias na amostra permite orientar o bacteriologista se ele deve enriquecer previamente a amostra em um caldo ou semear o material diretamente nos meios de isolamento.

#### 8.4.1 Produção de anaerobiose

Existem vários procedimentos para conseguir no laboratório uma atmosfera de anaerobiose adequada à multiplicação das bactérias anaeróbias patogênicas ao ser humano. Por exemplo: o uso de tubos com meios sólidos pré-reduzidos – a anaerobiose é mantida dentro do tubo e os meios utilizados são reduzidos e possuem indicadores de oxi-redução.

O sistema mais empregado em laboratórios clínicos é o sistema das jarras de anaerobiose com geradores químicos que permitem obter uma atmosfera adequada para a multiplicação dessas bactérias. Existem diversos tipos de geradores. Os mais utilizados são os que provocam o consumo do oxigênio através da reação desse com o  $H_2$ , gerado pela presença de um haleto, formando água. A atmosfera da jarra é substituída por  $CO_2$ , gerado pela presença de bicarbonato. Dentro da jarra é colocada, além dos geradores químicos, uma fita de papel de filtro impregnada de azul de metileno, que é um indicador de anaerobiose. Quando a atmosfera do interior da jarra tem condições adequadas de anaerobiose, a fita, inicialmente azul, é alterada para branca. Numa jarra de tamanho médio de 2,5 litros, coloca-se aproximadamente 10 placas e vários tubos. Nesse sistema o conteúdo de  $O_2$  da jarra cai a 0.4%, em aproximadamente 1 hora e meia, de forma que as condições anaeróbias estão presentes bem antes da transformação do azul de metileno, que acontece por volta de 4-6 horas.

Figura 2 Jarra de anaerobiose



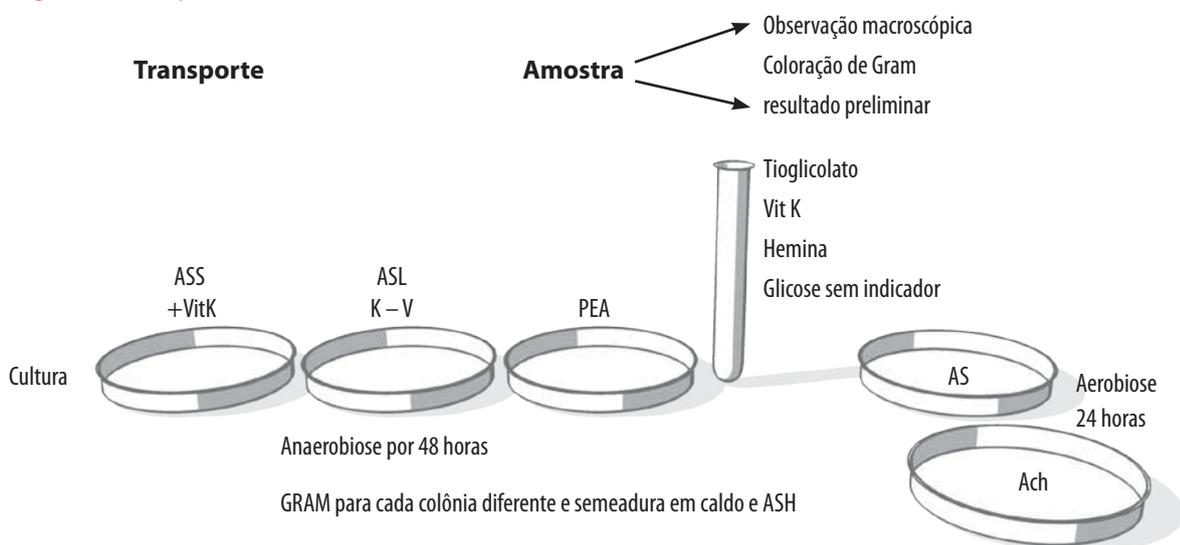
#### 8.4.2 Isolamento

As amostras são semeadas em duas placas de ágar preparadas com sangue desfibrinado de carneiro em uma concentração de 5%. As bases utilizadas podem ser Ágar Brucella, Ágar Columbia ou Ágar BHI. Aos meios se adicionam também vitamina K e hemina bovina. Uma das placas é incubada a 35-37°C em atmosfera aeróbia acrescida de 5% de  $CO_2$ , e uma segunda é

incubada a 35-37°C em uma atmosfera de anaerobiose. A essa se acrescenta hemina bovina (100 ug/mL), vitamina K (10 ug/mL) e extrato de levedura (2 mg/mL). Como meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos (ASL), pode-se utilizar uma terceira placa, cujo meio foi acrescido de canamicina e vancomicina, além da vitamina K e hemina bovina.

Para se obter um meio mais eficaz quanto à produção de pigmentos, o sangue de carneiro deve ser lisado pelo frio. Outro meio seletivo bastante utilizado é o Ágar feniletialcool, suplementado com sangue de carneiro, hemina e vitamina K, nas mesmas concentrações utilizadas no meio não seletivo. Esse meio é seletivo para bactérias anaeróbias, pois inibe o crescimento de bactérias facultativas tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

**Figura 3** Esquema de trabalho recomendado



ASS= ágar sangue suplementado | ASL= ágar sangue suplementado lisado | PEA= ágar feniletialcool | AS= ágar sangue | Ach= ágar chocolate

A adição dos antibióticos cria um meio seletivo para bacilos Gram-negativos anaeróbios já que essa categoria de bactérias é resistente aos aminoglicosídeos e bactérias Gram-positivas são sensíveis à vancomicina. Como a maior parte das infecções provocadas pelos anaeróbios estritos são infecções mistas, o uso de meios seletivos auxilia no isolamento bacteriano. Não se justifica o uso de mais uma placa sem antibiótico porque aumentam os custos sem aumentar o isolamento de anaeróbios.

Essas placas são incubadas dentro da jarra de anaerobiose a 35-37°C de temperatura durante 48 horas. Quando se suspeita, pelo quadro clínico ou pela coloração de Gram da amostra, que estamos em presença de uma infecção

por *Clostridium*, que são de crescimento mais rápido, as jarras podem ser abertas após 18 a 24 horas de incubação.

Por outro lado, bactérias de crescimento mais lento, como *Actinomyces*, podem demorar sete dias ou mais para formar colônias visíveis.

## 8.5 Identificação bacteriana

### 8.5.1 Comprovação de anaerobiose estrita

Após a incubação, as placas são examinadas e, agora o passo mais importante, é a comprovação de que as bactérias isoladas nos meios de cultura incubados em anaerobiose são anaeróbias estritas.

Para esse fim, as características macroscópicas e microscópicas (coloração de Gram) dos diferentes tipos de colônias, obtidos após a incubação dos meios de cultura em anaerobiose, devem ser observados. Além disso, cada tipo deve ser semeado em ágar sangue (AS) e em ágar sangue suplementado (ASS) a fim de se separar os micro-organismos facultativos dos anaeróbios estritos. A primeira placa deve ser incubada a 35-37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e a segunda em anaerobiose. Somente os facultativos crescerão na primeira condição.

Só é feito o diagnóstico de anaeróbio estrito quando, após 24 a 48 horas da nova incubação, a bactéria apenas crescer na placa de anaerobiose. A morfologia microscópica observada pela coloração de Gram das colônias orienta para uma identificação preliminar do grupo de anaeróbio isolado.

Bactérias anaeróbias estritas, de importância em patologia humana de acordo com sua morfologia na coloração de Gram.

#### *Cocos Gram-positivos*

- *Peptostreptococcus*
- *Peptococcus niger*

#### *Cocos Gram-negativos*

- *Veillonella*
- *Acidaminococcus*
- *Megasphaera*

#### *Bacilos Gram-positivos não esporulados*

- *Propionibacterium*
- *Bifidobacterium*
- *Actinomyces*

- *Eubacterium*
- *Lactobacillus*

#### **Bacilos Gram-positivos esporulados**

- *Clostridium*

#### **Bacilos Gram-negativos**

- *Bacteroides*
- *Fusobacterium*
- *Prevotella*
- *Porphyromonas*
- *Campylobacter*
- *Sutterella*
- *Bilophila*

### **8.5.2 Identificação bacteriana presuntiva**

A morfologia microscópica obtida pela coloração de Gram, acrescido do teste de anaerobiose, é um resultado presuntivo importante, que deve ser imediatamente passado ao clínico. Já nessa etapa o laboratório informa que o paciente tem uma infecção por uma bactéria anaeróbia estrita que pertence a um determinado grupo morfológico.

Métodos convencionais para a identificação de bactérias anaeróbias usam, frequentemente, procedimentos que utilizam as bactérias isoladas em cultura pura para o estudo da fermentação de diversos carboidratos e outras atividades bioquímicas. Esses procedimentos envolvem trabalho intensivo e consomem muito tempo. Muitos laboratórios não estão aptos a manterem a vasta seleção de meios e substâncias exigidas para a identificação bioquímica. Devido a esses fatores, cada vez mais a pesquisa de métodos alternativos rápidos e simples é estimulada. Os micrométodos, tais como API 20A e Minitek, foram os primeiros a serem propostos como alternativas ao método convencional. Os dois métodos possuem um melhor desempenho com bactérias anaeróbias de crescimento rápido (grupo *B. fragilis* ou *C. perfringens*). Outros sistemas como RapID ANA II® estão baseados principalmente na detecção rápida de glicosidases e aminopeptidases. O inóculo pesado e o curto tempo de incubação (quatro horas) evitam a contaminação e fornecem rapidamente resultados, cuja especificidade na identificação das espécies varia entre 60 a 90%.

A pesquisa de ácidos graxos produzidos pelo metabolismo da fermentação da glicose utilizando-se cromatografia a gás é um método rápido, específico e sensível para diversas espécies. O equipamento e os programas com-

putadorizados necessários representam um custo inicial elevado, porém, subsequentemente, ele é menor. Devido à característica polimicrobiana das infecções por anaeróbios, a reação em cadeia da polimerase (PCR) não é preconizada para o diagnóstico, com exceção para tecidos ou fluídos estéreis. Sondas de ácidos nucleicos para pesquisa de bactérias anaeróbias não estão ainda padronizadas e não são encontradas comercialmente. Contudo, laboratórios de microbiologia oral e empresas que trabalham com esse segmento desenvolveram um conjunto de sondas para a identificação de bactérias envolvidas na doença periodontal. Essas sondas são bastante eficientes na identificação de colônias provenientes da placa de cultura do primeiro isolamento ou de micro-organismos isolados em cultura pura.

A interpretação de resultados de uma cultura mista, contendo múltiplos isolados, é difícil. Culturas semiquantitativas em conjunto com a bacterioscopia são úteis para a definição do que é importante ou não entre os isolados. A natureza das bactérias isoladas pode também dar indícios da importância delas no processo infeccioso. Na maioria das vezes, a manutenção de um diálogo entre o médico e o microbiologista é essencial para uma apropriada interpretação dos resultados bacteriológicos obtidos.

#### A) A identificação de gênero e espécie é feito a partir de:

- Provas bioquímicas: fermentação de açúcares, produção de indol, redução de nitrato, pesquisa de urease, crescimento em presença de bile, liquefação da gelatina, hidrólise de esculina etc.
- Produção de pigmentos
- Hemólise
- Aprofundamento no ágar
- Susceptibilidade a antimicrobianos
- Formação de ácidos detectados por cromatografia gasosa
- Sorologia

As seguintes considerações práticas são úteis para a orientação do microbiologista para uma conduta adequada, sem a necessidade de aparelhos ou metodologias dispendiosas por parte do laboratório:

- Na presença de cocos Gram-positivos, quando necessário o laboratório deve fazer o diagnóstico diferencial de *Peptostreptococcus* ou *Peptococcus* que são os mais frequentemente isolados nesse grupo morfológico. Para a diferenciação entre espécies e gêneros são utilizados os seguintes testes: disco de SPS, indol, urease, fosfatase alcalina e alfa galactosidase.
- Na presença de cocos Gram-negativos, o laboratório deve fazer o diagnóstico presuntivo de *Veillonella*, gênero mais frequente nesse grupo.

Para o diagnóstico diferencial com os outros cocos Gram-negativos a prova utilizada é a redução do nitrato e, para diagnóstico de outras espécies, a cromatografia gasosa.

- Na presença de bacilos Gram-positivos esporulados, o laboratório deve fazer o diagnóstico de *Clostridium*. Na dúvida no diagnóstico de bacilo esporulado, recomenda-se o tratamento com álcool etílico a 95%, durante 1 hora à temperatura ambiente e ressemeadura posterior. Além disso, a suspensão bacteriana pode ser aquecida a 80°C durante 10 minutos, esfriada e feita ressemeadura. Após um ou outro procedimento, só sobrevivem bactérias esporuladas. É importante salientar que *C. perfringens* dificilmente se apresenta na forma esporulada no material clínico. Ele só esporula em condições bastante adversas. Para o diagnóstico diferencial das outras espécies de *Clostridium* devem ser feitas provas bioquímicas como hidrólise da gelatina, fermentação da glicose, lecitinase, lipase, produção de indol, ureia, nitratos, e motilidade.
- Na presença de bacilos Gram-positivos não esporulados recomendamos fazer a prova de catalase, redução de nitratos, hidrólise de esculina, urease, e produção de pigmento. Para o diagnóstico definitivo, deve ser feita a pesquisa do perfil da produção de ácidos graxos pela cromatografia gasosa.
- A presença de bacilos Gram-negativos em forma de fuso é indicativo de *Fusobacterium*. Na presença de bacilos pleomórficos ou cocobacilos, recomenda-se seguir o esquema acima descrito. Essas provas junto com a produção de pigmento permitem fazer o diagnóstico presuntivo de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*. Frente aos discos de antibióticos, a bactéria é considerada sensível se o halo de inibição é de 12mm ou maior; como inóculo para a semeadura utiliza-se uma suspensão com turvação semelhante ao número 3 de escala de MC Farland ou uma turvação semelhante após incubação em meio de tioglicolato.
- A prova da bile é considerada positiva, se existir crescimento bacteriano no quadrante respectivo. Ainda deve ser observado se o crescimento na presença de bile foi estimulado. Para a produção de pigmento, recomendamos a observação direta das colônias no meio de ASL ou ASS, e, em caso de não existir pigmento evidente, iluminar a placa com luz ultravioleta ( $\lambda$  de 360 nm). Colônias de *Prevotella melaninogenica* aparecem de cor tijolo avermelhado.
- Para a prova de indol, recomendamos passar uma colônia, a partir do meio com triptofano, com ajuda de uma alça de platina num papel filtro impregnado em 1% de paradimetilaminocinamaldeído (em ácido clorídrico 10%). Uma reação positiva produz imediatamente uma cor azul.

O diagnóstico presuntivo é feito de acordo com a seguinte tabela:

Bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos					
Bactérias	Rifampicin	Kanamicina a 1.000 mcg	Bile 20%	Indol	Pigmento
<i>Bacteroides grupo fragilis</i>	sensível	resistente	+	+/-neg	neg
<i>Prevotella</i> sp.	sensível	resistente	neg	+/-neg	+
<i>Porphyromonas</i> sp.	sensível	resistente	neg	+	+
<i>Bacteróides</i> sp.	sensível	sensível resistente	neg	neg	neg
<i>F. mortiferum</i>	resistente	sensível	+	neg	neg
<i>F. variium</i>	resistente	sensível	+	+	neg
<i>Fusobacterium</i> spp.	sensível	sensível	neg	+	neg

Para Rifampicin a Kanamicina: Sensível = halo de inibição com 12mm ou mais de diâmetro Resistente = ausência de halo ou menor que 12 mm de diâmetro

A diferenciação dos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas* é realizada pela capacidade de fermentar glicose que é positiva para o primeiro gênero e negativa para o segundo.

Alguns sistemas comerciais manuais ou automatizados permitem fazer o diagnóstico das diferentes espécies de anaeróbios utilizando numerosas provas bioquímicas. Alguns utilizam a ação de enzimas bacterianas pré-formadas podendo fazer esse diagnóstico após 4 horas de incubação. Destes os mais frequentemente utilizados são: API®, Vitek® e Microscan®. Esses sistemas mais caros não são fundamentais para o diagnóstico dos grupos bacterianos e para uma orientação terapêutica adequada.

Em algumas infecções é importante, para o diagnóstico, determinar a presença de toxinas como acontece nas infecções intestinais por *Clostridium difficile*. Essa determinação é feita com provas imunológicas para a pesquisa da toxina nas fezes, disponíveis comercialmente.

## 8.6 Provas de sensibilidade a antimicrobianos

O estudo da sensibilidade dessas bactérias é importante pelo aumento crescente de sua resistência frente aos diversos antimicrobianos disponíveis. Essa resistência é mais comum nos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, mas pode estar presente também nos gêneros *Clostridium*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

### 8.6.1 Método da difusão em disco

O método do disco difusão não é adequado para estudar a sensibilidade das bactérias anaeróbias estritas. O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomenda um método de diluição em ágar, onde as concentrações de antimicrobianos são incorporadas ao meio Wilkins-Chalgren. Cada placa tem uma concentração de um antimicrobiano. As bactérias são semeadas utilizando o inoculador múltiplo de “Steers” e as placas colocadas em jarras com gerador de anaerobiose. A leitura é feita após 48 horas de incubação na estufa, determinando-se a CIM (concentração inibitória mínima).

### 8.6.2 Método da Fita com gradiente de difusão

Um método alternativo mais prático é a determinação da sensibilidade utilizando fitas de plástico impregnadas com gradiente de concentração de antimicrobianos como no método do E test<sup>®</sup>. As bactérias são semeadas em forma similar à empregada no método do disco para aeróbios. São colocadas duas fitas cada uma com um antibiótico diferente em cada placa de 9 cm de diâmetro. Em geral é necessário testar 6 antibióticos (3 placas). Os antimicrobianos com maior atividade *in vitro* e *in vivo* frente aos anaeróbios estritos são: cloranfenicol, clindamicina, cefoxitina, metronidazol, penicilina e amoxicilina com ácido clavulânico. As placas são incubadas dentro de jarra de anaerobiose a 35-37°C de temperatura. A leitura é feita após 48 horas de incubação, e a sensibilidade é interpretada em ambos métodos seguindo as últimas tabelas publicadas pelo CLSI. Salientamos que existe uma boa correlação nos resultados obtidos com as duas metodologias descritas. Contudo há relatos de falsa resistência ao metronidazol quando o Etest é utilizado. Esse fenômeno pode ser resultado das condições do teste e da qualidade do meio de cultura empregado. Geralmente, o problema é eliminado quando se utiliza meios recém-preparados ou mantidos em anaerobiose antes do uso.

## Referências Bibliográficas

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE GUIDELINES. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2012 Approved standards M100-S22. 22<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: 2012.

ISENBERG, HD (Ed): Clínicl Microbiology Procedures Handbook, 3<sup>rd</sup> edition, 2007, ASM Press, Washington

MANDELL, G. & BENNETT, J.; DOLIN, R. Principles and Practice Infectious Diseases. 7<sup>th</sup> ed., London, Churchill and Livingstone, 2010.

MURRAY, P. R. et al. Manual of Clínicl Microbiology. 10<sup>th</sup> ed. Washington DC. American Society for Microbiology ASM Press 2010, 2252p.







**Acesse o site  
da ANVISA**

Baixe o leitor de QR  
Code em seu celular e  
fotografe este código

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa  
SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200  
CEP: 71205-050  
Brasília - DF  
Telefone: 61 3462 6000

**[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)**  
**[www.twitter.com/anvisa\\_oficial](https://www.twitter.com/anvisa_oficial)**  
**Anvisa Atende: 0800-642-9782**  
**[ouvidoria@anvisa.gov.br](mailto:ouvidoria@anvisa.gov.br)**