



MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA



Portal Educação



Copyright © Portal Educação

2013 – Portal Educação

Todos os direitos reservados

R: Sete de setembro, 1686 – Centro – CEP: 79002-130

Telematrículas e Teleatendimento: 0800 707 4520

Internacional: +55 (67) 3303-4520

atendimento@portaleducacao.com.br – Campo Grande-MS

Endereço Internet: <http://www.portaleducacao.com.br>

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - Brasil

Triagem Organização LTDA ME

Bibliotecário responsável: Rodrigo Pereira CRB 1/2167

Portal Educação

P842m Microbiologia veterinária / Portal Educação. - Campo Grande: Portal Educação, 2013.

140p. : il.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-8241-710-2

1. Medicina veterinária. 2. Imunologia veterinária. I. Portal Educação. II. Título.



CDD 636.089601

2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO A MICROBIOLOGIA	8
1.1	CLASSIFICAÇÃO DOS SERES VIVOS E ABRANGÊNCIA DA MICROBIOLOGIA	8
1.1.1	Nomenclatura científica	10
1.1.2	Hierarquia taxonômica	11
1.1.3	Microorganismos eucariontes, procariontes e vírus	12
1.2	MÉTODOS DE OBSERVAÇÃO	14
2	BACTERIOLOGIA GERAL	17
2.1	MORFOLOGIA E ESTRUTURA DA CÉLULA BACTERIANA.....	17
2.1.1	Tamanho da célula bacteriana	17
2.1.2	Forma e arranjo	17
2.1.3	Material genético	19
2.1.4	Estruturas citoplasmáticas	20
2.1.5	Envoltório celular gram-positivo e gram-negativo	21
2.1.6	Membrana citoplasmática	22
2.1.7	Organelas de locomoção	22
2.1.8	Outras estruturas importantes	23



2.1.8.1 Fímbrias ou pilis.....	23
2.1.8.2 Cápsula.....	24
2.1.8.3 Esporos.....	24
2.2 NUTRIÇÃO E METABOLISMO BACTERIANO	25
2.2.1 Crescimento, sobrevivência e morte de microrganismos	26
2.2.2 Cultura de micro-organismos.....	28
2.2.3 Padrões de metabolismo microbiano produtor de energia	29
2.2.4 Exigências para o crescimento	32
2.2.5 Métodos de cultivo	35
2.3 NOÇÕES DE GENÉTICA BACTERIANA E MECANISMOS DE VARIAÇÃO GENÉTICA.....	36
2.3.1 Conversão lisogênica.....	37
2.3.2 Transdução	38
2.3.3 Conjugação.....	39
2.3.4 Transformação.....	40
2.4 CONTROLE DOS MICRORGANISMOS	41
2.4.1 Agentes físicos	41
2.4.2 Agentes químicos.....	42
2.4.3 Agentes antimicrobianos.....	43
2.4.3.1 Mecanismos de ação	44
2.4.3.2 Resistência.....	45
3 BACTERIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA	47
3.1 MICROBIOTA INDÍGENA E MECANISMOS DE PATOGENICIDADE	47
3.2 BIOLOGIA, PATOGENIA E IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS PATOGENICAS PARA OS ANIMAIS	47
3.2.1 Cocos gram-positivos - gênero staphylococcus spp.....	47
3.2.1.1 Staphylococcus aureus.....	51



3.2.1.2Staphylococcus intermedius	53
3.2.1.3Staphylococcus hyicus.....	54
3.2.1.4Diagnóstico laboratorial.....	54
3.2.1.5Tratamento.....	55
3.2.2 Cocos gram-positivos - gênero streptococcus spp.	55
3.2.2.1Streptococcus equi	58
3.2.2.2Streptococcus suis	58
3.2.2.3Tratamento.....	58
3.2.3 Bacilos gram-positivos	59
3.2.3.1Gênero corynebacterium sp.....	59
3.2.3.2Listeria sp.....	61
3.2.3.3Erysipelothrix sp.....	63
3.2.3.4Gênero bacillus sp.	64
3.2.3.5Mycobacterium spp.....	66
3.2.3.6Nocardia sp.....	67
3.2.3.7Actinomyces sp.....	67
3.2.4 Bacilos gram-positivos esporulados – gênero clostridium sp.....	68
3.2.5 Bacilos gram-negativos fermentadores: família enterobacteriaceae	68
3.2.6 Bacilos gram-negativos não-fermentadores	69
3.2.6.1Pseudomonas spp.	69
3.2.6.2Pasteurella sp.	70
3.2.6.3Fusobacterium sp.	70
3.2.6.4Actinobacillus sp.	71
3.2.6.5Haemophilus sp.	71
3.2.6.6Moraxella sp.....	71



3.2.6.7	Bordetella sp.	72
3.2.6.8	Burkholderia mallei	72
3.2.6.9	Burkholderia pseudomallei	72
3.2.6.10	Campylobacter sp.	72
3.2.6.11	Brucella spp.	73
3.2.7	Micoplasmas	75
3.2.8	Rickettsia sp.	76
3.2.9	Ehrlichia sp.	77
3.2.10	Chlamydia sp.	80
3.2.11	Espiroquetas e microrganismos espiralados	81
3.2.11.1	Leptospira spp.	81
3.2.11.2	Borrelia spp.	87
4	VIROLOGIA GERAL	89
4.1	ESTRUTURA VIRAL	90
4.2	MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO VIRAL	91
4.3	CULTIVO E QUANTIFICAÇÃO LABORATORIAL	92
4.4	REPLICAÇÃO VIRAL	94
4.5	RESPOSTA IMUNE ÀS INFECÇÕES VIRAIS	94
5	VIROLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA	96
5.1	PARVOVÍRUS	96
5.2	HERPESVÍRUS	96
5.3	ADENOVÍRUS	97
5.4	POXIVÍRUS	98
5.5	PICORNAVÍRUS	98
5.6	ORTHOMYXOVÍRUS	99



5.7	RETROVÍRUS	99
5.8	RHABDOVÍRUS	100
5.9	ARENAVÍRUS	101
5.10	REOVÍRUS	101
5.11	CORONAVÍRUS	101
5.12	PRÍONS	102
5.13	PAPILOMAVÍRUS	102
5.14	PARAMYXOVÍRUS	103
6	INTRODUÇÃO À MICOLOGIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS	104
6.1	ESTRUTURA E CRESCIMENTO	105
6.1.1	Bolores	105
6.1.2	Leveduras	107
6.2	CITOLOGIA	107
6.3	PAREDE CELULAR	108
6.4	REPRODUÇÃO	108
6.5	ESTUDO VISUAL DOS FUNGOS	109
6.5.1	Estudo macroscópico	109
6.5.2	Estudo microscópico	110
7	MICOLOGIA ESPECIAL E CLÍNICA	111
7.1	AGENTES DE MICOSES SUPERFICIAIS: MICROSPORUM SP., TRICHOPHYTON SP., EPIDERMOPHYTON SP.	111
7.2	AGENTES DE MICOSES SUBCUTÂNEAS: SPOROTHRIX SCHENCKII, H. CAPSULATUM	112
7.3	AGENTES DE MICOSES SISTÊMICAS: COCCIDIOIDES IMMITIS, CRIPTOCOCCUS NEOFORMANS, ASPERGILLUS SPP.	112
7.4	MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES	114



8	REQUISITOS BÁSICOS PARA INSTALAÇÃO E FUNCIONAMENTO DE UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA.....	115
9	COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAIS CLÍNICOS	124
10	RECEPÇÃO DE AMOSTRAS E OBSERVAÇÕES PRELIMINARES.....	127
11	PREPARO DE MEIOS DE CULTURA	128
12	EXAMES MICROSCÓPICOS.....	130
13	COLORAÇÃO	131
13.1	A FRESCO	131
13.1.1	Entre lâmina e lamínula.....	131
13.1.1.1	Salina.....	131
13.1.1.2	Hidróxido de potássio	132
13.1.1.3	Exame de campo escuro	132
13.1.1.4	Tinta da china	132
13.2	FIXADOS E CORADOS	133
13.2.1	Coloração azul de metileno de Loeffler.....	133
13.2.2	Coloração de Wright Giemsa.....	133
13.2.3	Coloração de Gram.....	134
13.2.4	Coloração de Ziehl-Neelsen.....	134
14	CONTROLE DE QUALIDADE	135
15	BIOSSEGURANÇA.....	136
	REFERÊNCIAS	137



1 INTRODUÇÃO À MICROBIOLOGIA

Os microrganismos são definidos, em princípio, como seres microscópicos, individualmente invisíveis a olho nu. Apesar de ser uma visão bastante simplificada, pode-se dizer que esta é uma definição correta.

São organismos dotados de uma vasta diversidade biológica, tanto morfológica como fisiológica e ecológica. Podem apresentar as formas celulares mais variadas e são capazes de realizar todos os tipos de reações bioquímicas metabólicas conhecidas. Quanto à obtenção de energia, esta pode ocorrer por processos quimiotróficos como por processos fototróficos, e organotróficos como litotróficos.

As extraordinárias manifestações de vida dos microrganismos constituem um campo fértil para investigações, e têm propiciado inúmeros conhecimentos relativos aos mecanismos de doenças, produção de vacinas e fármacos, técnicas diagnósticas, técnicas de controle de poluição, dentre outras.

1.1. CLASSIFICAÇÃO DOS SERES VIVOS E ABRANGÊNCIA DA MICROBIOLOGIA

O primórdio do conhecimento relativo à existência dos microrganismos ocorreu no final do século XVII com Antony Van Leeuwenhoek, um comerciante de tecidos que tinha como

hobby, a fabricação de lentes. Leeuwenhoek desenvolveu um sistema de lentes (Figura 1), que ao colocar uma lente sobre a outra, obteve um maior aumento, tornando possível a visualização de estruturas que para a época ainda eram desconhecidas. Num primeiro momento estas estruturas foram chamadas de animáculos (animais pequenos). Posteriormente estes animáculos foram chamados de micróbios.

Admite-se a existência de aproximadamente 10 milhões de espécies de vida no planeta, dos quais o maior contingente compreende o grupo dos microrganismos.

A organização dessa diversidade é feita com base em agrupamentos, partindo das características gerais, comuns a todos, até chegar às particularidades relativas e restritas a um determinado grupo.

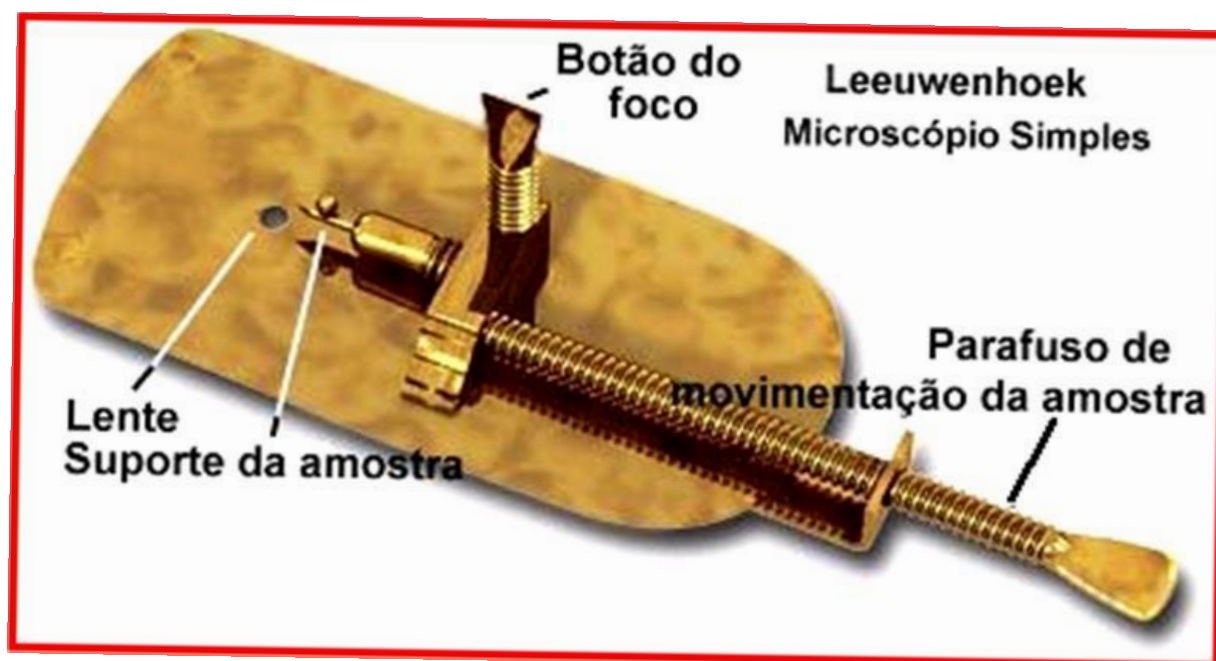


Fig. 1. Microscópio simples desenvolvido por Antony van Leeuwenhoek.

Segundo Whitaker os organismos podem ser classificados nos reinos monera, protista, fungi, plantae e animália (Figura 2).

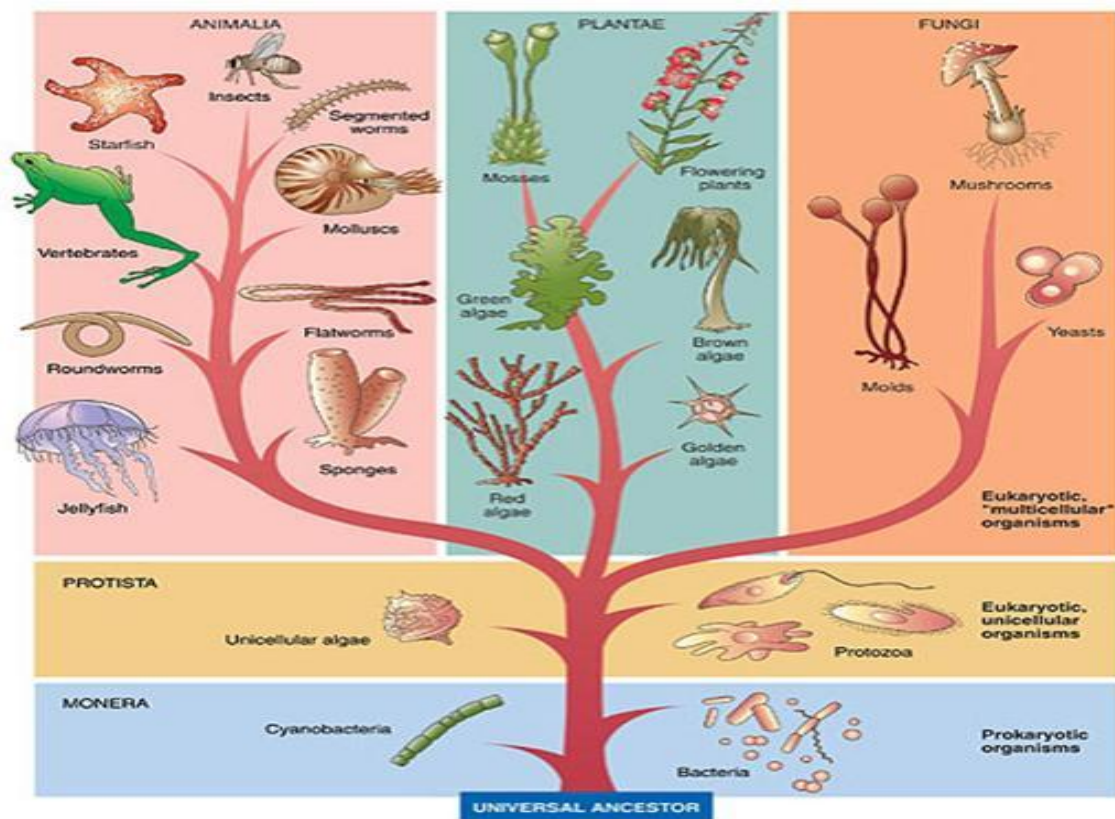


Fig. 2. Classificação dos organismos segundo Whittaker

As várias categorias de microrganismos incluem as eubactérias, arqueobactérias, algas, protozoários e fungos. Os vírus não são considerados microrganismos, deste modo serão referidos como partículas infecciosas.

1.1.1 Nomenclatura científica

A classificação visa reunir os grupos ou agrupamentos que podem ser relacionados por meio de características de similaridades, tendo como táxon básico a espécie. Enquanto nas plantas e animais superiores existe uma evidente ordenação dos grupos taxonômicos em filo, subfilo, classe, ordem, subordem, família, subfamília, gênero e espécie; nas bactérias, a classificação usualmente se representa por família, gênero e espécie.



A nomenclatura é o meio utilizado para se denominar as unidades definidas por meio da classificação. Na microbiologia, como nas outras áreas da biologia, adota-se a nomenclatura binária para denominação da espécie. Isto é, cada espécie tem um nome que se refere ao gênero e outro específico. O primeiro nome se escreve com letra inicial maiúscula e o epíteto com minúscula, sendo sublinhado ou quando impresso também podendo ser em itálico.

Todas as regras de nomenclatura para bactérias, fungos, protozoários e vírus são publicadas no código internacional e universal de nomenclatura. A referência universal quanto à classificação bacteriana e respectivas nomenclatura está respaldada pelo Bergey's manual of systematic bacteriology.

1.1.2 Hierarquia taxonômica

No decorrer da longa evolução dos esquemas de classificação dos seres vivos, o primeiro passo foi dado no século XVIII por meio de uma proposta de Linnaeus, referente aos reinos plantae e animália. No decorrer do século XIX, com as descobertas e o isolamento das bactérias, o reino plantae foi ampliado com a inclusão destes seres.

Diante da polêmica suscitada por esta nova classificação, Haeckel propôs a criação de um novo grupo denominado por reino protista. Porém, continuaram as dúvidas sobre esta classificação, permanecendo por praticamente cem anos, até que em 1969, Whitaker ampliou o sistema de Haeckel, criando cinco reinos, monera (procariotos), protista (protozoários), fungi (fungos filamentosos e leveduriformes), plantae e animália (organismos superiores - plantas e animais).

Um passo extraordinário relativo à classificação taxonômica (filogenia) dos microrganismos foi dado por Carl Woese em 1987. Este pesquisador analisando o RNA ribossomal (rRNA) chegou a conclusão que os seres vivos tem três origens moleculares distintas, propondo o reconhecimento de três linhas evolucionárias, que leva a três domínios conhecidos como Bacteria, Archaea e Eukarya. Hoje os microrganismos podem ser encontrados em todos estes três domínios.

1.1.3 Micro-organismos Eucariontes, Procariontes e vírus

Os fungos e protozoários são seres vivos enquadrados dentro do grupo de micro-organismos eucariotos. Apresentam uma organização celular mais complexa que os procariotos. Possui núcleo definido (material genético envolto por uma membrana nuclear), membrana plasmática típica, citoplasma com citoesqueleto que é responsável pelo suporte à célula e organelas com papéis específicos, e ainda mitocôndrias.

Os fungos possuem parede celular composta principalmente de quitina, mas nunca de peptidoglicano. Podem ser divididos em dois grupos filamentosos (pluricelulares) e leveduriformes (unicelulares) (Figura 3). Os fungos filamentosos podem se reproduzir assexuadamente e/ou sexuadamente.



Fig. 3. **Figura que representa as formas de crescimento dos fungos. A esquerda forma unicelular (levedura) e a direita forma filamentosa multicelular (bolor de pão).** Fonte: www.windowsucaredu/

Os protozoários são unicelulares e heterotróficos, não possuem parede celular e reproduzem assexuadamente.

As bactérias são seres unicelulares enquadrados dentro do grupo de micro-organismo procariotos. Podem apresentar várias formas, que variam de esféricas chamadas de cocos, bastonetes chamadas de bacilos a espirais (Figura 4). As bactérias apresentam uma organização simples, compreendendo uma parede celular rígida (formada por peptidoglicanos ou

lipopolisacarídeos), membrana plasmática e material genético livre no citoplasma.

O processo mais comum de reprodução das bactérias é o de fissão binária, a célula se divide em duas.

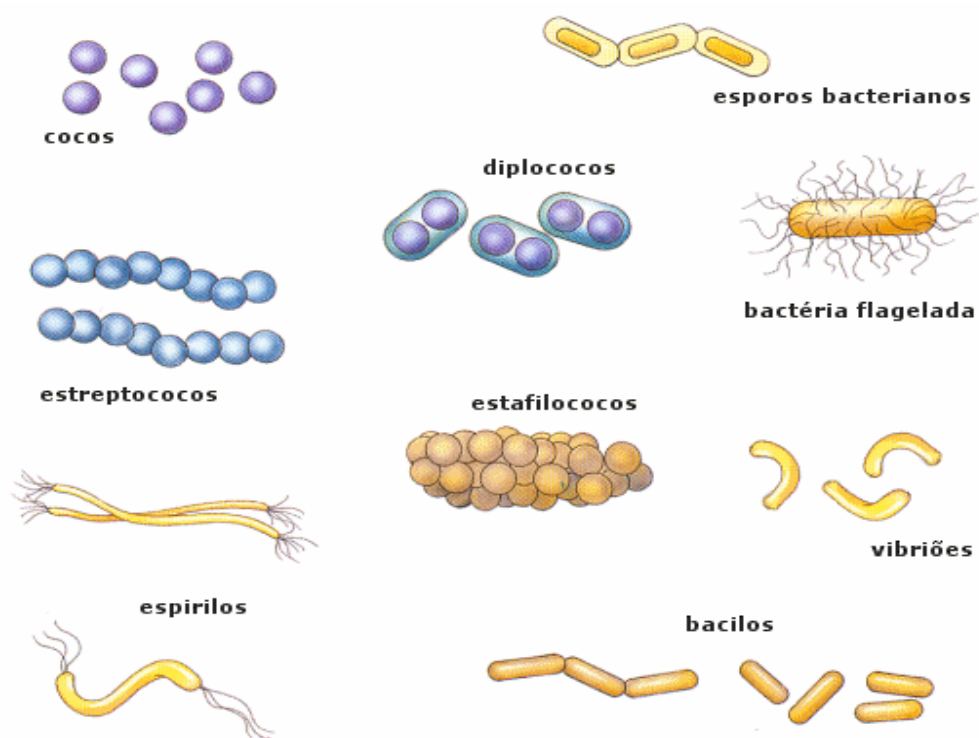


Fig . 4. **Morfologia básica de várias bactérias .** Fonte [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

Os vírus, ou partícula infecciosa não possuem estrutura celular. Basicamente são considerados elementos genéticos compostos por DNA (ácido desoxirribonucléico) ou RNA (ácido ribonucléico) e uma capa protéica (capsídeo) (Figura 5).

As partículas virais podem ser consideradas de duas formas distintas, agentes de doença, quando a infecção na célula hospedeira leva a ruptura e morte, e agentes de hereditariedade, quando a partícula viral entra na célula causando apenas modificações genéticas na célula hospedeira.

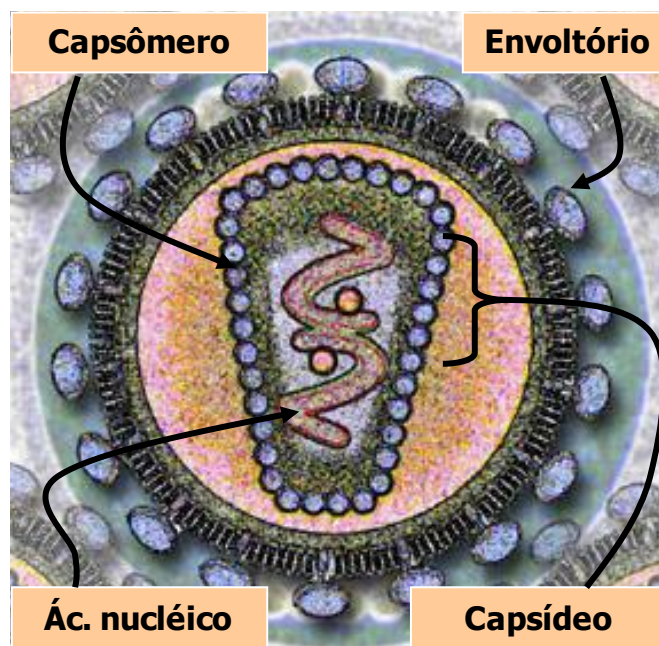


Fig . 5. Esquema representativo dos componentes de uma partícula viral. [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

1.2 MÉTODOS DE OBSERVAÇÃO

Como os micro-organismos e seus componentes são muito pequenos, eles são medidos em unidades que não são familiares a muitos de nós em nossa vida diária. Os microrganismos e seus componentes estruturais são medidos em unidades chamadas de micrômetros- μm ($0,000001\text{ m}$ ou 10^{-6} m) e nanômetros-nm ($0,000000001\text{ m}$ ou 10^{-9} m).

Como os microrganismos são muito pequenos, a sua visualização se faz necessário com o auxílio de um microscópio. O termo microscópio deriva do latim onde micro, significa pequeno; e do grego onde skopos, significa olhar.

Os microscópios da atualidade produzem ampliações com grande clareza que é superior ao observado por Leeuwenhoek.

A microscopia óptica se refere ao uso de qualquer tipo de microscópio que use luz para observação de espécimes. Existem vários tipos de microscopia óptica, como:



a) Microscópio óptico composto: utiliza a luz visível como fonte de iluminação e apresenta uma série de lentes. Podemos calcular a ampliação total da amostra, multiplicando a potência da ampliação das lentes objetivas pela ocular.

b) Microscopia de campo escuro: utiliza um condensador de disco opaco, que bloqueia diretamente a luz que penetra na lente objetiva. Este método é utilizado para examinar microrganismos vivos que estão invisíveis no microscópio óptico composto por não serem corados por métodos padrão, ou que foram distorcidos pela coloração.

15

c) Microscopia de contraste de fase: utiliza o conhecimento das ondas dos raios luminosos que podem estar em fase ou fora de fase (seus picos e vales se combinam). O pico de onda do raio luminoso de uma fonte coincide com o pico de onda da outra fonte, interagindo para produzir um reforço (brilho relativo). Contudo, se o pico de onda de uma fonte interage com a parte inferior (vale) da outra fonte de luz, os raios interagem e produzem uma interferência (escuridão relativa). Este tipo de microscopia permite o exame detalhado das estruturas internas dos micro-organismos vivos.

d) Microscopia de contraste com interferência diferencial: utiliza o mesmo método da microscopia de contraste de fase, pois utiliza as diferenças nos índices de refração. No entanto, este método utiliza dois feixes de luz ao invés de um e um prisma que adiciona cores nas estruturas internas dos microrganismos.

e) Microscopia de fluorescência: utiliza o princípio de que algumas estruturas microbianas são capazes de absorver comprimentos de luz de ondas curtas (ultravioleta) e produzir luz em um comprimento de onda maior (visível). Alguns microrganismos absorvem luz ultravioleta naturalmente; agora, caso a estrutura não floresça naturalmente é utilizado corantes fluorescentes, como o fluorocromo.

Na microscopia eletrônica, um feixe de elétrons é utilizado no lugar do feixe de luz. Os feixes viajam livremente em ondas. Com isto a potência de resolução do microscópio eletrônico é superior a dos microscópios ópticos. Ao invés de utilizar lentes de vidro, um microscópio



eletrônico utiliza lentes eletromagnéticas para focalizar o feixe de elétrons na amostra.

A microscopia de varredura por sonda utiliza vários tipos de sonda para identificar estruturas microbianas examinando de perto a superfície de um espécime sem modificá-lo ou expô-lo à radiação de alta energia.



2 BACTERIOLOGIA GERAL

Atualmente, existem diversos sistemas disponíveis para identificar, classificar e tipar uma bactéria. Tais sistemas englobam, basicamente, análises referentes aos:

- I) Aspectos morfológicos, provas fisiológicas e bioquímicas, sorotipagem, biotipagem e perfil de resistência a antimicrobianos;
- II) Análise de parede celular, lipídios, proteínas e enzimas;
- III) Aspectos genotípicos.

17

2.1. Morfologia e estrutura da célula bacteriana

As células bacterianas são caracterizadas morfolologicamente pelo seu tamanho, forma e arranjo. O tamanho, a forma e o arranjo das bactérias constituem sua morfologia e sua aparência externa.

2.1.1 Tamanho da célula bacteriana

Quanto ao tamanho variam de 0,3 por 0,8 μm até 10 por 25 μm . E as espécies de maior interesse médico veterinário medem entre 0,5 a 1,0 μm por 2 a 5 μm .

2.1.2 Forma e arranjo



O grupo mais homogêneo quanto ao tamanho (células menores 0,8-1,0 μm) é o que exhibe as formas de cocos (esféricas). Os cocos tomam denominações diferentes de acordo com o seu arranjo:

- a) Diplococos: cocos agrupados aos pares. Ex.: *Neisseria meningitidis*.
- b) Tétrades: agrupamentos de quatro cocos. Ex.: *Tetragenococcus*.
- c) Sarcina: agrupamentos de oito cocos em forma cúbica. Ex.: *Sarcina*.
- d) Estreptococos: cocos agrupados em cadeias. Ex: *Streptococcus pneumoniae*.
- e) Estafilococos: cocos em grupos irregulares, lembrando cachos de uva. Ex.:

Staphylococcus aureus.

- f) Micrococos: cocos que se separam completamente após a divisão celular. Ex.:

Micrococcus luteus.

As formas de bastonete são células cilíndricas, que apresentam grande variação na forma e tamanho entre gêneros e espécies. Dentro da mesma espécie os bastonetes são relativamente constantes sob condições normais de crescimento, podendo variar em tamanho e espessura (longos e delgados; pequenos e grossos; extremidade reta, convexa ou arredondada). Quanto ao arranjo podem variar em:

- a) Diplobacilo: bastonetes agrupados aos pares. Ex.: *Corynebacterium accolens*.
- b) Estreptobacilos: bastonetes agrupados em cadeias. Ex.: *Corynebacterium bovis*.
- c) Paliçada: bastonetes alinhados lado a lado, como palitos de fósforo. Ex.:

Corynebacterium diphtheriae.

- d) Tricomas: similares a cadeias de bastonetes, mas com uma área de contato

muito maior entre as células adjacentes. Ex: *Beggiatoa*.

- e) Cocobacilos: bacilos curtos, que se assemelham aos cocos. Ex.: *Brucella*

melitensis.

As formas espiraladas constituem o terceiro grupo morfológico sendo caracterizada por células de forma espiral que se dividem em:

- a) -Espirilos: possuem corpo celular rígido e se movem à custa de flagelos externos

dando uma ou mais voltas espirais em torno do próprio eixo. Ex: *Aquaspirillum*.

- b) Espiroquetas: possuem corpo celular flexível e locomovem-se provavelmente à custa de contrações do citoplasma, podendo dar várias voltas completas em torno do próprio eixo. Ex: *Treponema pallidum*.
- c) Vibrião: possuem corpo celular curvo, assemelhando-se a uma vírgula. Ex.: *Vibrio cholerae*.

A Figura 6 mostra um esquema representativo das formas e arranjos bacterianos descritos acima.

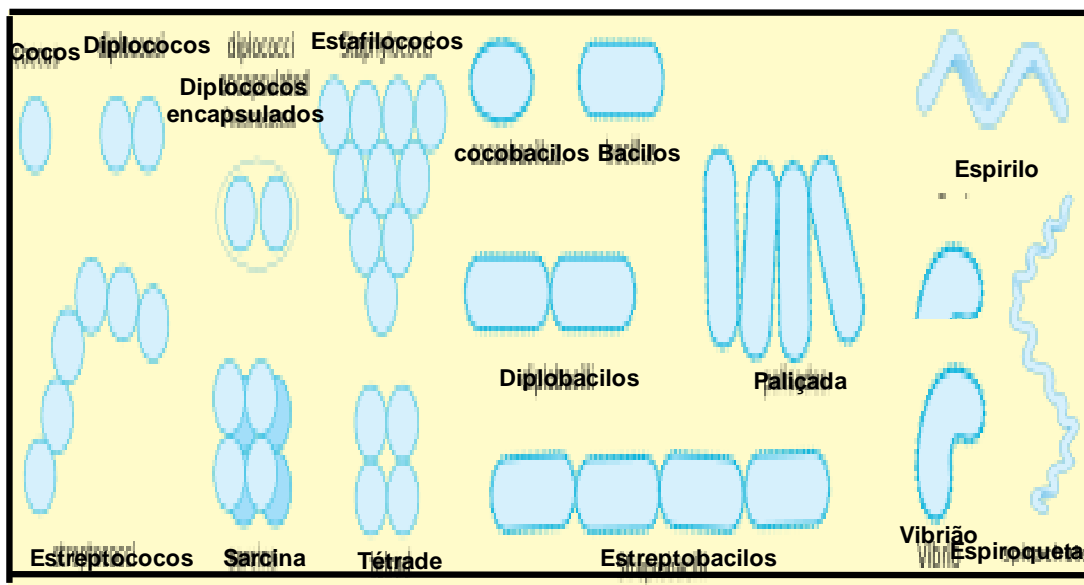


Fig. 5. Esquema representativo das formas e arranjos bacterianos.
www.upload.wikimedia.org/

2.1.3 Material genético

O material genético da bactéria é chamado de nucleóide, um cromossomo circular constituído por uma única molécula de DNA não delimitado por membrana nuclear. O cromossomo bacteriano contém todas as informações necessárias à sobrevivência da célula e é



capaz de autoduplicação.

Os plasmídeos são moléculas menores de DNA, também circulares, cujos genes não codificam características essenciais, porém muitas vezes conferem vantagens seletivas à bactéria que as possui. Essas moléculas chamadas plasmídeos são capazes de autoduplicação independente da replicação do cromossomo, e podem existir em número variável no citoplasma bacteriano.

2.1.4 Estruturas citoplasmáticas

A observação interna das estruturas celulares bacterianas nos dá uma idéia de como a bactéria funciona no ambiente.

O citoplasma, como em qualquer célula tem em torno de 80% de água, ácido nucleico, proteínas, carboidratos, lipídios, íons inorgânicos, compostos de baixo peso molecular e com várias funções. Esse fluido denso é o sítio de muitas reações químicas.

Os ribossomos estão presentes em grande número nas células bacterianas, conferindo ao citoplasma aparência granular quando observado ao microscópio eletrônico. O conjunto de diversos ribossomos, que durante a síntese protéica está ligado a uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) recebe o nome de polissomo.

Compõem o citoplasma grânulos de reserva, que embora as células procariotas não apresentem vacúolos, podem acumular substâncias sob a forma de grânulos de reserva, constituídos de polímeros insolúveis. São comuns polímeros de glicose, fosfato inorgânico e lipídios.

Os mesossomos são invaginações da membrana citoplasmática que podem ser simples dobras ou estruturas tubulares ou vesiculares. Eles podem colocar-se próximos à membrana citoplasmática ou afundar-se no citoplasma.

Os mesossomos profundos e centrais parecem estar ligados ao material nuclear da célula, estando envolvidos na replicação de DNA e na divisão celular.

Os mesossomos periféricos penetram muito pouco no citoplasma, não são restritos à localização central da bactéria e não estão associados com o material nuclear. Pesquisadores



acreditam estar envolvidos na secreção de certas enzimas a partir da célula, tais como as penicilinases que destroem a penicilina. Outros pesquisadores associam ainda aos mesossomos o valor funcional das mitocôndrias, atribuindo a eles papel na respiração bacteriana.

2.1.5 Envoltório celular gram positivo e gram negativo

A parede celular bacteriana é uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. Ela é constituída por ácido diaminopimérico, ácido murâmico e ácido teicoico além de aminoácidos, carboidratos e lipídios. Todos esses compostos estão reunidos para formar substâncias poliméricas complexas que por sua vez estruturam a parede celular. Uma macromolécula complexa denominada peptidoglicano (também chamada de mucopeptídeo ou mureína) forma a estrutura rígida da parede celular.

Além disso, a parede celular protege a célula, mantém a pressão osmótica intrabacteriana, impedindo o rompimento da célula em razão à entrada de água, e funciona como suporte de antígenos somáticos bacterianos.

A divisão das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é de acordo com sua resposta à coloração de Gram, que é decorrente das diferenças na composição e estrutura da parede celular.

As bactérias Gram-positivas possuem uma quantidade maior de peptidoglicano em sua parede celular, o que torna a parede dessas bactérias mais espessa e rígida. É composta de proteínas, lipídios, peptidoglicano e ácidos teicóicos. Essas bactérias são sensíveis à lisozima e sua parede constitui o local de ação de alguns antibióticos, além de apresentar elementos básicos para identificação sorológica.

As bactérias Gram-negativas possuem a parede celular menos espessa e elas são mais complexas por apresentarem uma membrana externa cobrindo a fina camada, quase inexistente, de peptidoglicano. A membrana externa da parede celular é o que distingue as bactérias Gram-negativas.

A parede celular das bactérias Gram-negativas serve como uma barreira seletiva para



a entrada e saída de algumas substâncias da célula e pode ainda causar efeitos tóxicos sérios em animais infectados. A estrutura da membrana externa da parede celular é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS estão localizados exclusivamente na camada externa da parede celular, enquanto que os fosfolipídeos estão presentes quase completamente na camada interna da parede celular destas bactérias. Os LPS são compostos por três segmentos ligados covalentemente:

- I) Lipídeo A, firmemente embebido na membrana;
- II) Cerne do polissacarídeo, localizado na superfície da membrana;
- III) Antígenos O, que são polissacarídeos que se estendem (prolongamentos) a partir da superfície da membrana em direção ao meio circundante.

A porção lipídica do LPS é também conhecida como endotoxina e pode atuar causando febre, diarreia, destruição das células vermelhas do sangue, e até quadros mais graves, como um choque potencialmente fatal.

2.1.6 Membrana citoplasmática

A membrana citoplasmática tem espessura de aproximadamente 10 nm e separa a parede celular do citoplasma. É constituída principalmente de lipídeos e proteínas, que desempenham importante papel na permeabilidade seletiva da célula (funciona como uma barreira osmótica).

Ela difere da membrana citoplasmática das células eucarióticas por:

- I) Não apresentarem esteróides em sua composição;
- II) Ser sede de numerosas enzimas do metabolismo respiratório (mesmas funções das cristas mitocondriais);
- III) Controlar a divisão bacteriana por meio dos mesossomos.

2.1.7 Organelas de locomoção



Os flagelos são organelas especiais de locomoção, constituídas por uma estrutura proteica denominada flagelina, que forma longos filamentos delgados e ondulados de 3-12µm que partem do corpo da bactéria e se estendem externamente à parede celular.

Um flagelo tem três partes: o corpo basal (estrutura composta por vários anéis que ancoram o flagelo à membrana citoplasmática), uma estrutura curta e fixa em forma de gancho e um longo filamento helicoidal. O flagelo propulsiona a bactéria por meio do líquido podendo chegar a 100 µm por segundo (o equivalente a 3000 vezes o seu comprimento por minuto). O método exato do movimento é desconhecido (contração das cadeias proteicas com movimento ondulatório; um movimento rotatório a partir da extremidade fixa – gancho). Aparentemente a energia vem da degradação de ligações energéticas de fosfato. Em geral a motilidade ocorre ao acaso embora, às vezes, esteja relacionado com quimiotaxia.

As bactérias recebem denominações especiais de acordo com a distribuição dos flagelos: atríquias (sem flagelo); monotríquias (um flagelo em uma das extremidades); anfitríquias (um flagelo em cada extremidade); lofotríquias (tufo de flagelos em uma ou ambas as extremidades); e peritríquias (cercadas de flagelos).

2.1.8 Outras importantes estruturas

2.1.8.1 Fímbrias ou pilis

As fímbrias ou pilis são organelas filamentosas mais curtas e delicadas que os flagelos, as quais são constituídas por uma proteína chamada pilina, presentes em muitas bactérias (especialmente Gram-negativas).

As fímbrias ou pilis originam de corpúsculos basais na membrana citoplasmática e sua função parece estar relacionada com a troca de material genético durante a conjugação bacteriana (fímbria ou pili sexual), e também com a aderência às superfícies mucosas. As fímbrias ou pilis podem ser removidas sem comprometimento da viabilidade celular e regeneram rapidamente.



2.1.8.2 Cápsula

Muitas bactérias apresentam externamente à parede celular, uma camada viscosa denominada cápsula que constitui uma forma de proteção da bactéria contra as condições externas desfavoráveis. Tal formação pode ser evidenciada com a ajuda de métodos especiais de coloração (nanquim).

Geralmente as cápsulas são de natureza polissacarídea, que podem ser homopolissacarídeas (composta por um único tipo de açúcar) ou heteropolissacarídeas (composta por diferentes açúcares). No entanto, também podem ser constituídas por polipeptídeos.

A cápsula está relacionada com a virulência da bactéria, pois confere resistência à fagocitose, de modo que, em uma mesma espécie, as amostras capsuladas são mais virulentas que as não capsuladas.

Nas bactérias desprovidas de cápsula ocorre a formação de um envoltório viscoso delgado chamado de camada limosa (slime layer) ou por um material limoso mal delimitado (loose slime).

2.1.8.3 Esporos

Os esporos que se formam dentro da célula, chamados endosporos, são exclusivos das bactérias (principalmente as pertencentes ao gênero bacillus e clostridium). Eles possuem parede celular espessa, são altamente refráteis (brilham muito com a luz do microscópio) e altamente resistentes a agentes físicos (dessecação e aquecimento) e químicos adversos (antissépticos e desinfetantes). Esta resistência está ligada à sua parede ou capa impermeável composta de ácido dipicolínico.

Os esporos surgem quando a célula bacteriana não se encontra em um meio ideal para o seu desenvolvimento. A bactéria produtora pode crescer e multiplicar-se por muitas gerações como células vegetativas. Em alguma etapa do desenvolvimento, em ambiente com exaustão de fontes de carbono e nitrogênio ou completa falta de nutrição, ocorre no interior do citoplasma vegetativo a síntese do esporo (sua formação leva por volta de 6 horas). Ela é

iniciada pela condensação de uma nucleoproteína no citoplasma que migra para a extremidade da célula, enquanto esta e o citoplasma são envolvidos por uma membrana dupla derivada da membrana citoplasmática.

O tegumento é formado na membrana dupla e o citoplasma sofre condensação para completar a formação do cerne. Os esporos têm pouca atividade metabólica, podendo permanecer latente por longos períodos, representando uma forma de sobrevivência e não de reprodução.

A Figura 7 mostra as principais estruturas bacterianas descritas acima.

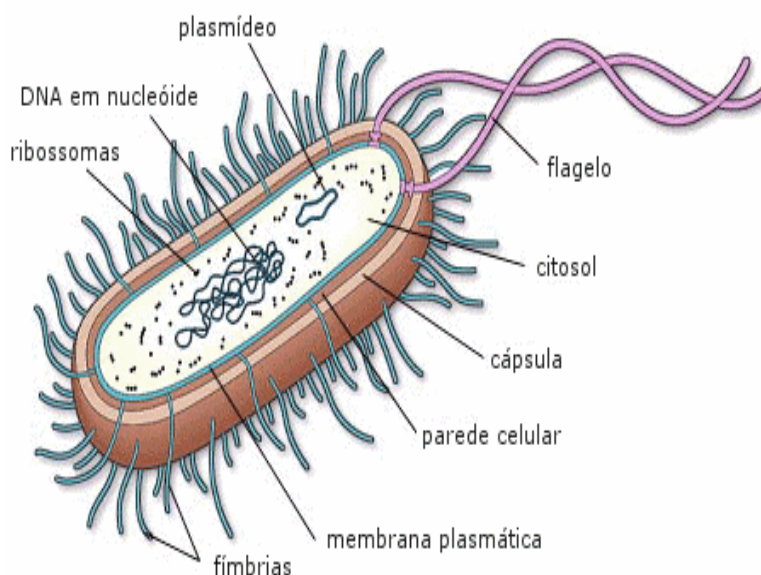


Fig .7. **Estrutura básica de uma bactéria .**

Fonte : [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

2.2 NUTRIÇÃO E METABOLISMO BACTERIANOS



O crescimento e divisão celular necessitam de um ambiente propício com todos os nutrientes e constituintes químicos e físicos necessários para o seu metabolismo. Essas necessidades específicas são dependentes de informações genéticas para cada espécie bacteriana.

Algumas espécies com vasta flexibilidade nutricional, como as *Pseudomonas*, são capazes de sintetizar muitos de seus metabólitos a partir de precursores simples, enquanto outras espécies são mais exigentes, como as *Porphyromonas* e *Treponemas* necessitam de nutrientes complexos para o crescimento e reprodução.

A análise das estruturas bacterianas revela que sua arquitetura é formada por diferentes macromoléculas, em particular, proteínas. Os precursores das macromoléculas podem ser retirados do meio ambiente ou ser sintetizados pelas bactérias a partir de compostos mais simples.

A alternativa escolhida vai depender da disponibilidade do composto no meio e da capacidade de síntese do micro-organismo. As substâncias ou elementos retirados do ambiente e usados para construir novos componentes celulares ou para obter energia são chamados nutrientes. Os nutrientes podem ser divididos em duas classes, macronutrientes e micronutrientes. Ambos os tipos são imprescindíveis, mas os primeiros são requeridos em grandes quantidades por serem os principais constituintes dos compostos orgânicos celulares e/ou serem utilizados como combustível.

Uma vez garantidos pelo ambiente os nutrientes e as condições adequadas para assimilá-los, as bactérias vão absorvê-los e transformá-los para que cumpra suas funções básicas, como o suprimento de energia e de matéria-prima. Como matéria-prima, os nutrientes vão ser transformados em estruturas celulares ou em moléculas acessórias à sua síntese e funcionamento.

2.2.1 Crescimento, sobrevivência e morte de micro-organismos

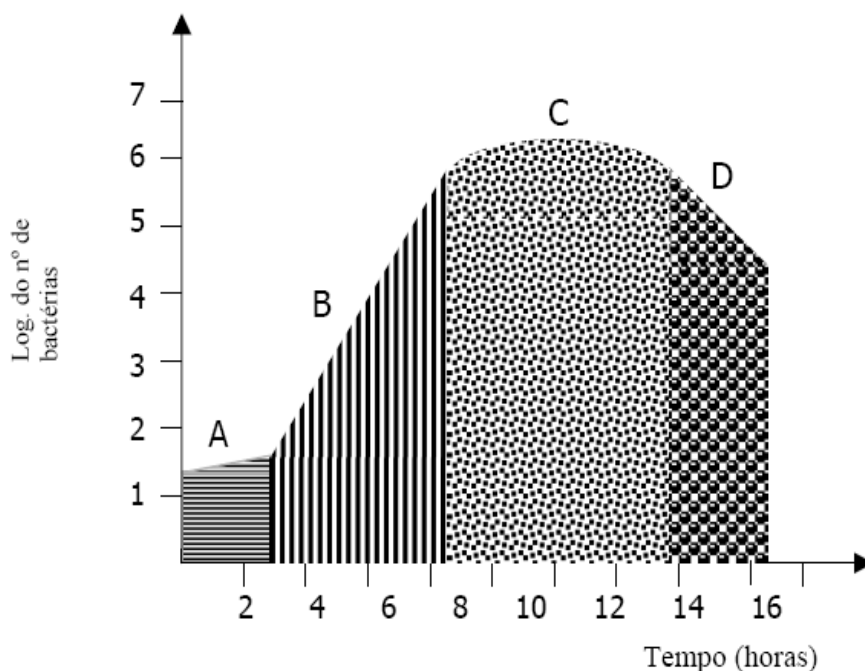
O crescimento bacteriano é inicialmente representado pelo aumento do protoplasma celular, pela síntese de ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lipídios e absorção de água e eletrólitos. Este aumento termina com a divisão da célula bacteriana. A multiplicação

bacteriana é uma resposta necessária à pressão de crescimento.

A reprodução é representada pela cissiparidade, que é a formação de um septo equatorial na região do mesossomo e divisão da célula-mãe em duas células filhas (cocos a divisão ocorre em qualquer direção, enquanto que bacilos e espirais, ocorre no sentido transversal).

Embora as bactérias desenvolvam-se bem em meios de cultura sólidos, os estudos de crescimento são feitos essencialmente em meios líquidos e as considerações que seguem são válidas para essas condições. Quando uma determinada bactéria é semeada num meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura adequada, o seu crescimento segue uma curva definida e característica (Figura 8).

A fase lag de crescimento ocorre quando as células são transferidas de um meio para outro ou de um ambiente para outro. Esta é a fase de ajuste e representa o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente. As células nesta fase aumentam no volume total em quase duas ou quatro vezes, mas não se dividem. Tais células estão sintetizando DNA, novas proteínas e enzimas, que são um pré-requisito para divisão.



curva de crescimento bacteriano



Fig .8. Curva de crescimento bacteriano em meio líquido . Análise laboratorial . A=fase lag ; B=fase log ; C=fase estacionária ; D=fase de morte .
Fonte : [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

Na fase log ou exponencial as células estão dividindo-se a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento. Os componentes celulares como RNA, proteínas, peso seco e polímeros da parede celular estão também aumentando a uma taxa constante.

Como as células na fase exponencial estão se dividindo a uma taxa máxima, elas são muito menores em diâmetro que as células na fase Lag. A fase de crescimento exponencial normalmente chega ao final em razão à depleção de nutrientes essenciais, diminuição de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos.

Durante a fase estacionária há rápido decréscimo na taxa de divisão celular. Eventualmente, o número total de células em divisão será igual ao número de células mortas, resultando na verdadeira população celular estacionária. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de manutenção e é obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular, ou seja, glicogênio, amido e lipídios.

Quando as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células se reproduzem mais lentamente e as células mortas aumentam em números elevados. Nesta fase de morte ou declínio o meio se encontra deficiente em nutrientes e ricos em toxinas produzidas pelos próprios micro-organismos.

2.2.2 Cultura de micro-organismos

Para cultivar micro-organismos deve obedecer a requisitos básicos obrigatórios, como: incubá-los em meios de cultura adequados e incubá-los em condições ambientais igualmente

adequadas. Um inóculo é uma amostra de material, contendo geralmente uma pequena quantidade de micro-organismos obedecida às condições citadas. Os micro-organismos contidos no inóculo multiplicam, aumentando em número e massa.

O meio de cultura é uma mistura de nutrientes necessários ao crescimento microbiano. Basicamente deve conter a fonte de energia e de todos os elementos imprescindíveis à vida das células bacterianas.

A formulação de um meio de cultura deve levar em conta o tipo nutritivo no qual o microorganismo pertence, considerando-se a fonte de energia (luz ou substância química), o substrato doador de elétrons (orgânico ou inorgânico) e a fonte de carbono (orgânica ou inorgânica).

Estabelecidas as condições gerais, o meio de cultura deve ainda atender as necessidades específicas do grupo, da família, do gênero ou da espécie que se deseja cultivar. Assim, é imprescindível acrescentar ao meio de cultivo: vitaminas, sais minerais e aminoácidos, quando estes compostos não são sintetizados pelos micro-organismos que se deseja cultivar (Figura 9).

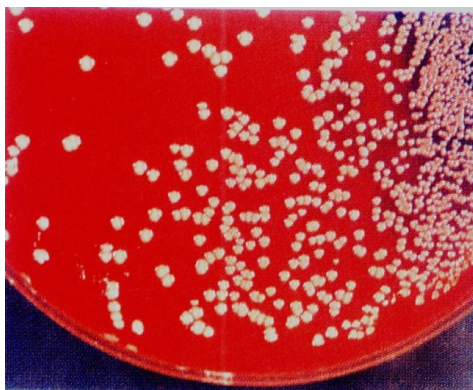


Fig . 9. Cultura em agar sangue do gênero *Staphylococcus* .
Fonte : [www .windows .ucar.org/](http://www.windows.ucar.org/)

2.2.3 Padrões de metabolismo microbiano produtor de energia (fermentação e respiração)

Entre as bactérias há uma imensa variedade de exigências nutritivas. Algumas são capazes de crescer em meio muito simples, constituído de uma solução de glicose, sal de



amônio e alguns sais minerais. A partir desses compostos sintetizam todos os componentes do protoplasma: proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e coenzimas. Outras, todavia, são incapazes de sintetizar determinados compostos orgânicos essenciais para o seu metabolismo.

Para que estes micro-organismos possam crescer, tais compostos devem ser obtidos do meio natural ou artificial em que vivem. Essas substâncias são denominadas fatores de crescimento. Muitos desses fatores são componentes de coenzimas, que, para o homem, são vitaminas.

Na realidade, certas vitaminas, como o ácido fólico, foram descobertas por serem necessárias ao crescimento de determinadas bactérias. As composições dos meios de cultura, portanto, podem ser muito variadas. Um meio pode ter uma composição simples, contendo um único carboidrato como fonte de energia e carbono e alguns sais minerais; em outro extremo estão os meios requeridos por micro-organismos mais exigentes, apresentando composição complexa, contendo várias fontes de carbono e energia, vitaminas e aminoácidos, podendo ainda ser acrescidos de sangue ou soro de animais.

Além da composição qualitativa, o meio de cultura deve obedecer aos limites de quantidade de cada componente suportáveis pelos micro-organismos. Muitas vezes o meio de cultura deve conter substâncias para neutralizar a ação de produtos tóxicos lançados pelos próprios micro-organismos, que sofrem os efeitos de seu acúmulo. Um exemplo rotineiro é adição de tampões para impedir a queda de pH provocada pelos ácidos orgânicos produzidos por fermentação bacteriana.

Os meios podem ser líquidos, (solução aquosa de nutrientes) ou sólidos, quando a solução aquosa é gelificada por um polissacarídeo extraído de algas, o agar. O meio sólido é obrigatoriamente usado quando se pretende separar células. Cada célula individualizada ou agrupamento isolado dá origem, por multiplicação, a um aglomerado que constitui uma colônia. Colônias de diferentes espécies geralmente apresentam características morfológicas diferentes (Figura 10). Os meios de cultura podem ser seletivos, quando contêm uma substância que inibe o crescimento de um determinado grupo de micro-organismos, mas permite o desenvolvimento de outros.

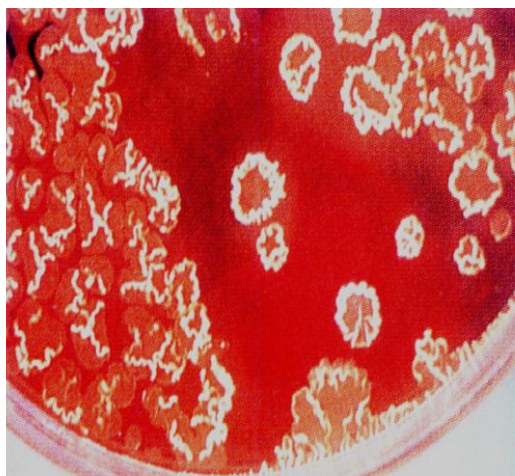


Fig . 10 . **Colônias secas e rugosas de *Bacillus sp.***
Fonte : [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

As substâncias com alto valor energético são sempre aquelas com elevado grau de oxidação, e grande parte das bactérias (exceção às fotossintetizantes) vai obter toda energia de que necessita por oxidação desses substratos. A maioria das reações biológicas ocorre na ausência de oxigênio, por desidrogenação. Em biologia, pode-se dizer que a perda de um elétron equivale à perda de um hidrogênio. Pode-se, então, definir redução como o ganho de um hidrogênio e oxidação como a perda de um hidrogênio.

As substâncias preferencialmente oxidadas por micro-organismos são os açúcares, seguidos de proteínas, peptídios e, mais raramente, os lipídios. As bactérias utilizam energia para o transporte de nutrientes, para o movimento dos flagelos e principalmente para biossínteses.

A fermentação é o metabolismo no qual os compostos orgânicos servem como doadores e receptores de elétrons (hidrogênio). A fermentação conduz, geralmente, à quebra parcial de moléculas de glicose (glicólise).

Dentre os vários tipos de fermentação, pode-se citar:



- a) Fermentação homolática: produção de ácido láctico como produto final.
- b) Fermentação alcoólica: produção de álcool como produto final.
- c) Fermentação mista: produção de álcool, ácido e gás.
- d) Fermentação butileno-glicólica: produção do butileno glicol (não ácido) como produto final.

A respiração é o processo de obtenção de energia onde a decomposição microbiana de substratos cujo receptor de hidrogênio é o oxigênio, respiração aeróbica. Na respiração aeróbica ocorrem as seguintes etapas:

- I) Ciclo de Krebs;
- II) Cadeia transportadora de elétrons;
- III) Fosforilação oxidativa.

Outro processo de respiração é a anaeróbica, onde o oxigênio é substituído por outro receptor inorgânico de elétrons.

2.2.4 Exigências para o crescimento (nutrientes, pH, temperatura, atmosfera gasosa)

O carbono está presente na maioria das substâncias que compõem as células. As bactérias podem utilizar o carbono inorgânico existente no ambiente, na forma de carbonatos ou de CO_2 como única fonte de carbono. São neste caso chamadas de autotróficas. Os micro-organismos que obrigatoriamente requerem uma fonte orgânica de carbono são denominados heterotróficos e as principais fontes são os carboidratos.

O oxigênio é requerido na forma molecular como aceptor final na cadeia de transporte de elétrons aeróbia. Também é elemento importante em várias moléculas orgânicas e inorgânicas.

O hidrogênio é o componente muito frequente da matéria orgânica e inorgânica, também constitui um elemento comum de todo material celular.

O nitrogênio é o componente de proteínas e ácidos nucleicos, além de vitaminas e



outros compostos celulares. Está disponível na natureza sob a forma de gás (N_2) ou na forma combinada. Sua utilização como N_2 é restrita a um grupo de bactérias cujo principal habitat é o solo. Na forma combinada, o nitrogênio é encontrado como matéria inorgânica (NH_3 e NO_3) ou matéria orgânica como aminoácidos, purinas e pirimidinas.

O enxofre faz parte de aminoácidos como a cisteína e a metionina, de vitaminas e de grupos prostéticos de várias proteínas importantes em reações de óxido-redução. Da mesma forma que o nitrogênio, o enxofre pode ser encontrado no ambiente nas formas elementar, oxidada e reduzida. Estas duas últimas aparecem como compostos orgânicos e inorgânicos. Todas as alternativas citadas podem ser utilizadas pelas bactérias, porém são os sulfatos (SO_4 e SO_2) inorgânicos ou os aminoácidos as formas preferencialmente assimiladas. Na forma oxidada, também pode ser aceitor final de elétrons das cadeias de transporte de elétrons anaeróbias.

O fósforo é encontrado na célula na forma combinada às moléculas importantes como os nucleotídeos e como fosfato inorgânico. Nesta última forma é incorporado por meio de poucas reações metabólicas, embora uma delas seja de fundamental importância: a síntese de adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato. As substâncias fosforiladas podem estar envolvidas com o armazenamento de energia (como o ATP) ou atuar como reguladoras de processos metabólicos de muitas enzimas que se tornam ativas ao serem fosforiladas.

Os elementos como: ferro, magnésio, manganês, cálcio, zinco, potássio, sódio, cobre, cloro, cobalto, molibdênio, selênio e outros são encontrados sempre na forma inorgânica, fazendo parte de minerais. São necessários ao desenvolvimento microbiano, mas em quantidades variáveis, dependendo dos elementos e dos micro-organismos considerados.

Estes nutrientes podem atuar de diferentes maneiras, incluindo as seguintes funções principais:

- a) Componentes de proteínas, como o ferro que participa da composição de várias proteínas enzimáticas e do citocromo.
- b) Cofatores de enzimas, como o magnésio, o potássio e o molibdênio.
- c) Componentes de estruturas, como o cálcio que está presente em um dos envoltórios dos esporos.
- d) Osmorreguladores.



A tomada de nutriente e posterior metabolismo é influenciada por fatores físicos e químicos do meio ambiente. Os principais fatores são: temperatura, pH, presença de oxigênio, pressão osmótica e luz.

A temperatura ótima de crescimento está em torno de um intervalo dentro do qual o desenvolvimento ocorre sem atingir o seu máximo. Ultrapassado o limite superior, rapidamente ocorre desnaturação do material celular e, conseqüentemente, a morte da célula bacteriana. As temperaturas inferiores à ótima levam a uma desaceleração das reações metabólicas, com diminuição da velocidade de multiplicação celular, que em caso extremo, fica impedida. As variações quanto ao requerimento térmico permite classificar as bactérias segundo a temperatura ótima para o seu crescimento, em:

- a) Psicotróficas: entre 12 e 17° C.
- b) Mesófilas: entre 28 e 37°C.
- c) Termófilas: entre 57 e 87°C.

Embora existam grupos excêntricos, que necessitam de altas temperaturas para o seu crescimento, a maioria das bactérias patogênicas concentra-se no grupo das mesófilas, principalmente as de interesse médico veterinário.

Os valores de pH em torno da neutralidade são os mais adequados para absorção de alimentos para a grande maioria das bactérias. Existem, no entanto, grupos adaptados a viver em ambientes ácidos e alcalinos.

O oxigênio pode ser indispensável, letal ou inócuo para as bactérias, o que permite classificá-las em:

- a) Aeróbias estritas: exigem a presença de oxigênio para o seu crescimento, como as do gênero *Acinetobacter*.
- b) Microaerófilas necessitam de baixos teores de oxigênio para o seu crescimento, como as *Campylobacter jejuni*.
- c) Facultativas: apresentam mecanismos que as capacitam a utilizar o oxigênio quando disponível, mas podem se desenvolver também em sua ausência, como as *Escherichia coli* e várias bactérias entéricas têm esta característica.
- d) Anaeróbias estritas: não toleram o oxigênio para o seu crescimento, como as *Clostridium tetani*, (bactéria produtora de potente toxina que só se desenvolve em tecidos



necrosados carentes de oxigênio).

2.2.5 Métodos de cultivo

35

A possibilidade de cultivar micro-organismos em laboratório é essencial para o isolamento e caracterização morfológica, para o estabelecimento dos seus perfis bioquímicos, bem como para a sua identificação. O conhecimento das exigências nutricionais dos micro-organismos permite elaborar meios que promovam o seu crescimento in vitro.

Os meios de cultura são preparações sólidas, semissólidas ou líquidas, simples ou complexas que se empregam no laboratório para cultivar micro-organismos, constituindo ambientes artificiais que se assemelham, tanto quanto possível, às condições naturais.

Um meio de cultura destinado à cultura e isolamento de micro-organismos deve ser constituído por:

- a) Uma base nutritiva: geralmente é constituída por caldo de carne ou extrato de carne, uma fonte de compostos azotados, compostos hidrocarbonados e minerais.
- b) Uma substância nutritiva suplementar: usa-se a peptona na proporção de 1%. As peptonas que se usam em bacteriologia são provenientes da caseína e da gelatina de carne, compõem-se de uma mistura de peptídeos e aminoácidos, fontes de azoto necessário ao crescimento bacteriano.
- c) Um fator isotinizante: geralmente é utilizado o cloreto de sódio para manter o meio isotônico.
- d) Um tampão: utiliza sais que impedem a mudança de pH do meio
- e) Uma substância solidificante: utiliza no caso de se pretender um meio sólido ou semissólido, o Agar. O Agar é um extrato polissacarídico de algas marinhas do tipo Gelidium. Este é adequado a culturas microbianas por ser resistente à ação dos micro-organismos. Por outro lado, funde completamente a 100°C, mas não forma gel até ser arrefecido a menos de 45°C.
- f) Uma substância especial: são utilizados corantes e antissépticos, quando se



pretende fazer o estudo bioquímico de um determinado organismo, ou quando se pretende obter isoladamente uma única espécie bacteriana.

Além dos nutrientes requeridos às exigências dos micro-organismos em questão, o meio de cultura deve ser estéril. Deve esterilizar-se o meio após a sua preparação para eliminar os micro-organismos contaminantes. Também é necessário ter os devidos cuidados durante o seu manuseamento, para evitar contaminações possíveis.

Os meios de cultura podem ser classificados de acordo com o estado físico, composição química e objetivos funcionais (Tabela 1).

Tab. 1. Classificação dos meios de cultura

	Classificação dos meios de cultura
Estado físico	Líquido Sólido Semissólido
Composição química	Quimicamente definidos Quimicamente complexos
Objetivos funcionais	De isolamento: Seletivos, Eletivos e Diferenciais De conservação: Simples e Enriquecido

2.3 NOÇÕES DE GENÉTICA BACTERIANA E MECANISMOS DE VARIAÇÃO GENÉTICA

Todas as características microbianas são controladas ou influenciadas pela hereditariedade. Dentro das características hereditárias dos micro-organismos podemos citar: forma e características estruturais (morfológicas), reações bioquímicas (metabolismo), capacidade de se movimentar, capacidade de sobreviver em várias condições ambientais e capacidade de interação com outros micro-organismos.

O genótipo (ou genoma) bacteriano corresponde a sua completa coleção de genes, ao



passo que o fenótipo está relacionado com a expressão das características contidas no genoma (aspectos físicos e atributos).

As bactérias possuem um cromossomo que é formado por uma longa fita dupla de DNA. As informações presentes nos genes para serem exteriorizadas precisam ser transcritas em um mRNA, que termina na tradução da proteína pelo rRNA e RNA transportador (tRNA).

O DNA de qualquer gene do cromossomo está sujeito às alterações, ou mutações. Estas mutações podem ser benéficas, prejudiciais ou letais. Existem ainda as mutações silenciosas ou neutras que não causam qualquer efeito sobre a célula bacteriana.

As bactérias podem adquirir novas características por intermédio dos seguintes mecanismos: conversão lisogênica, transdução, transformação e conjugação.

2.3.1 Conversão lisogênica

A célula bacteriana adquire novos genes provenientes de vírus bacteriófagos.

A Figura 11 mostra o esquema da conversão lisogênica quando o bacteriófago insere seu material genético no citoplasma da célula bacteriana hospedeira. Depois da inserção do DNA viral no material genético da bactéria, a célula bacteriana pode seguir dois caminhos, um de lise (produção de novas unidades virais) e outro de replicação, carregando as novas informações (mutação).

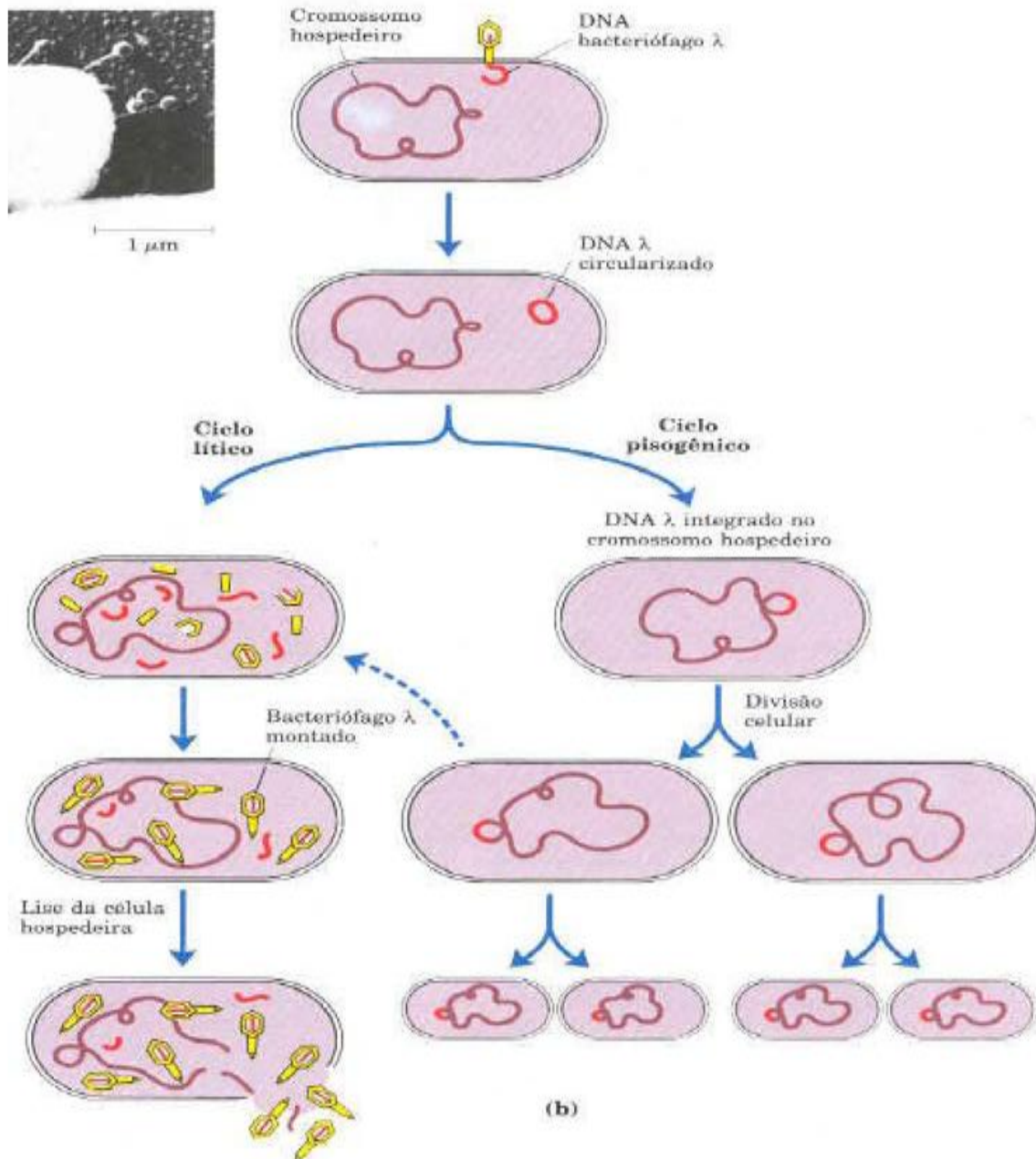


Fig . 11 . Conversão Lisogência . Fonte :
www .windows .ucar .edu/

2.3.2 Transdução

A célula bacteriana adquire novos genes provenientes de outras células bacterianas. Este tipo de mutação envolve a ação de bacteriófagos, que carregam em seu material genético, sequências gênicas bacterianas.

2.3.3 Conjugação

39

Este processo envolve a transferência de informações genéticas entre bactérias por meio do pili ou fímbria sexual. O material genético envolvido neste processo é o plasmídeo (DNA extracromossomal).

Embora muitos genes possam ser trocados entre as bactérias, frequentemente são os genes de resistência aos antibióticos e de fertilidade mais pesquisados. A Figura 12 mostra a transferência de plasmídeo entre duas bactérias via pili ou fímbria sexual.

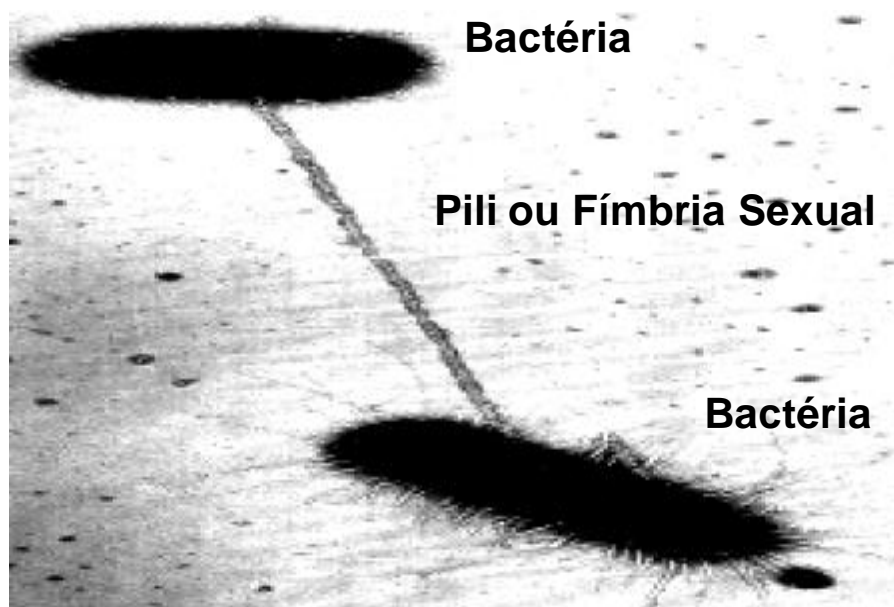


Fig . 12 . Conjugação bacteriana . Fonte :
[www . windows . ucar . edu /](http://www.windows.ucar.edu/)

2.3.4 Transformação

O processo de transformação está envolvido com a captação e inserção de material genético desnudo. Isto significa que material genético presente no meio, no ambiente é assimilado pela bactéria e inserido no material genético cromossomal.

A Figura 13 mostra como ocorre a transformação bacteriana desde a assimilação do material genético desnudo até a recombinação, que leva a alteração genética.

40

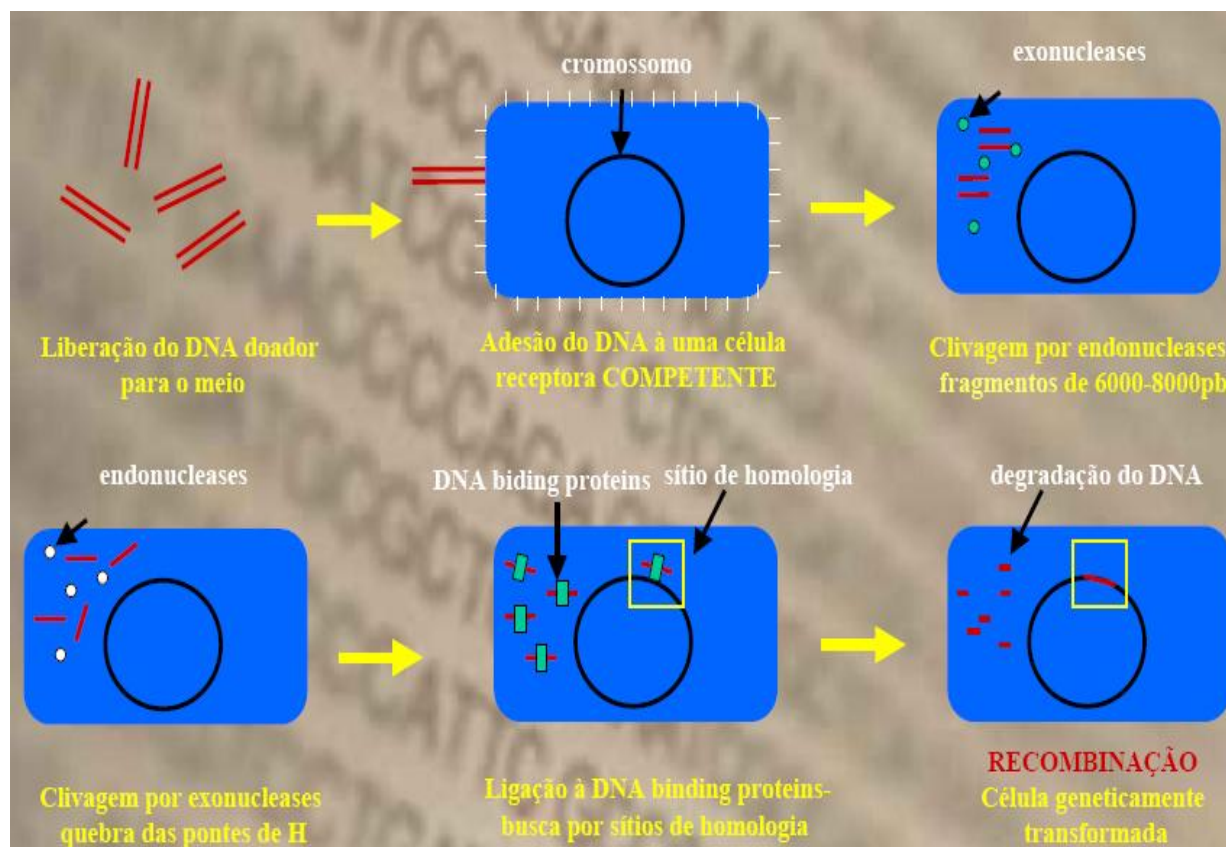


Fig . 13 . Transformação bacteriana . Fonte : [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)



2.4 CONTROLE DOS MICRO-ORGANISMOS

Nas últimas décadas, ocorreram grandes mudanças que atuaram na relação do homem com a natureza e os micro-organismos, tais como:

- a) O crescimento demográfico de forma desordenada criou problemas de saneamento básico e de meio ambiente que favoreceram a dispersão dos micro-organismos.
- b) O desenvolvimento da medicina veterinária, que pode interferir na seleção natural, possibilitando maior sobrevivência dos animais.
- c) Uso indiscriminado de antibióticos, permitindo o aparecimento de micro-organismos resistentes.

O conhecimento científico sobre controle de infecções avançou muito, mas muitos profissionais ainda resistem em implementá-lo integralmente sob variados pretextos (aumento de custos, ignorância e irresponsabilidade). O controle de infecção é constituído por recursos materiais e protocolos que agrupam as recomendações para prevenção, vigilância, diagnóstico e tratamento de infecções, visando à segurança do profissional e dos animais. Por meio do controle da infecção, podemos evitar as infecções sérias, e até mesmo a morte.

Uma preocupação entre os profissionais médicos veterinários está no que chamamos de infecção cruzada, que é a passagem da bactéria de um indivíduo para outro susceptível. Podemos detectar quatro vias possíveis de infecção cruzada:

- I) Do paciente para o médico veterinário;
- II) Do médico veterinário para paciente;
- III) De paciente para paciente via médico veterinário;
- IV) De paciente para paciente por intermédio de instrumentos, equipamentos e pisos.

O controle da infecção é possível pela ação de agentes físicos e químicos, que tem a propriedade de matar a célula microbiana, ou de impedir a sua reprodução.

2.4.1 Agentes físicos



Os agentes físicos que atuam no controle dos micro-organismos são classificados de acordo com a sua ação. Estes agentes desnaturam proteínas, enzimas, DNA e alteram permeabilidade da membrana celular.

Dentre os agentes físicos podemos citar como exemplo:

- a) Calor (seco ou úmido): mata os micro-organismos desnaturando suas proteínas. Ex.: Calor seco - forno de esterilização e flambagem. Calor úmido - fervura, autoclave e vapor de fluxo livre.
- b) Pasteurização: processo que desnatura as proteínas dos micro-organismos levando a sua morte. Ex.: pasteurização simples e pasteurização de alta temperatura e curto tempo.
- c) Filtração: elimina os micro-organismos de uma substância líquida após retê-los em uma membrana de microporos. Ex.: membranas de microporos de 0,2 μm .
- d) Baixas temperaturas: controla o crescimento dos micro-organismos por diminuir o metabolismo bacteriano. Ex.: refrigerador comum e câmara fria.
- e) Ressecamento: a falta de água livre impede o crescimento bacteriano por diminuir o seu metabolismo. Ex.: aumento da quantidade de solutos no ambiente.
- f) Pressão osmótica: elimina os micro-organismos por alterar a permeabilidade osmótica da membrana celular da célula bacteriana. Ex.: aumento da quantidade de solutos no ambiente.
- g) Radiação: elimina os micro-organismos por causar alterações em nível de DNA. Ex.: radiações ionizantes – raio gama e raio X, e radiações não-ionizantes – luz ultravioleta.

2.4.2 Agentes químicos

Os agentes químicos são usados para controlar o crescimento de micro-organismos em ambos os tecidos vivos e os objetos inanimados.

Dentre os agentes químicos podemos citar como exemplo:



- a) Compostos orgânicos (fenol e compostos fenólicos, alcoóis, compostos de amônio quaternário): causam lesão na membrana plasmática (alterando sua permeabilidade), inativam enzimas e desnaturam proteínas. Ex.: hexaclorofeno.
- b) Halogênios: estes compostos inibem a função proteica e impedem o funcionamento do sistema enzimático da célula bacteriana. Ex.: iodo e cloro.
- c) Metais Pesados e seus compostos: eliminam os micro-organismos por desnaturar suas proteínas. Ex.: prata, mercúrio, cobre e zinco.
- d) Peroxigênios, Químicoesterilizantes Gasosos e Biguanidas: estes compostos estão relacionados à lesão na membrana plasmática (alterando sua permeabilidade). Ex.: clorexidina.
- e) Agentes de superfície: reduzem a tensão superficial entre as moléculas de um líquido. São importantes na remoção mecânica dos micro-organismos. Ex.: sabão e detergente.

2.4.3 Agentes antimicrobianos (origem e natureza química)

O homem sempre utilizou substâncias vegetais, gordura, toucinho, mel, sal, cobre e chumbo para combater doenças de natureza infecciosa. As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3000 anos atrás. De maneira empírica chineses utilizavam bolores para tratar tumores e feridas infecciosas. Os sumérios utilizavam uma mistura de vinho, cerveja e zimbro para tratar feridas infeccionadas. Indianos ingeriam certos mofos para curar disenterias. E Índios norte-americanos também utilizavam fungos para o tratamento de feridas.

Na verdade os antimicrobianos são substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que impedem o crescimento dos micro-organismos (bacteriostáticos) ou eliminam os micro-organismos (bactericidas). Os antimicrobianos são classificados de acordo com sua ação. Deste modo podem ser classificados quanto à natureza:

- a) Química, derivados de açúcares (eritromicina), aminoácidos (penicilina) e acetatos (tetraciclina).
- b) Espectro de ação, quando são ativos sobre bactérias Gram-positivas (penicilina), quando são ativos sobre bactérias Gram-negativas (polimixina), quando são ativos sobre



espiroquetas (eritromicina), quando são ativos sobre micobactérias (estreptomicina) e quando apresentam amplo espectro de ação (cloranfenicol).

Os antimicrobianos podem ter efeito bactericida ou bacteriostático de acordo com a sensibilidade dos micro-organismos ou concentração da droga.

2.4.3.1 Mecanismo de ação

Os antimicrobianos são classificados essencialmente por agir sobre:

- a) Parede celular, estes antimicrobianos eliminam os micro-organismos por interferir na síntese da parede celular. Ex.: penicilina.
- b) Membrana plasmática: estes antimicrobianos alteram a permeabilidade da membrana plasmática, interferindo nos processos osmóticos. Ex.: polimixina B.
- c) Material genético: estes antimicrobianos interferem na replicação do DNA. Ex.: novobiocina.
- d) Proteínas: estes antibióticos interferem na síntese proteica de forma reversível ou irreversível. Ex.: cloranfenicol (reversível) e estreptomicina (irreversível).

A Figura 14 mostra alguns antibióticos e seu mecanismo de ação.

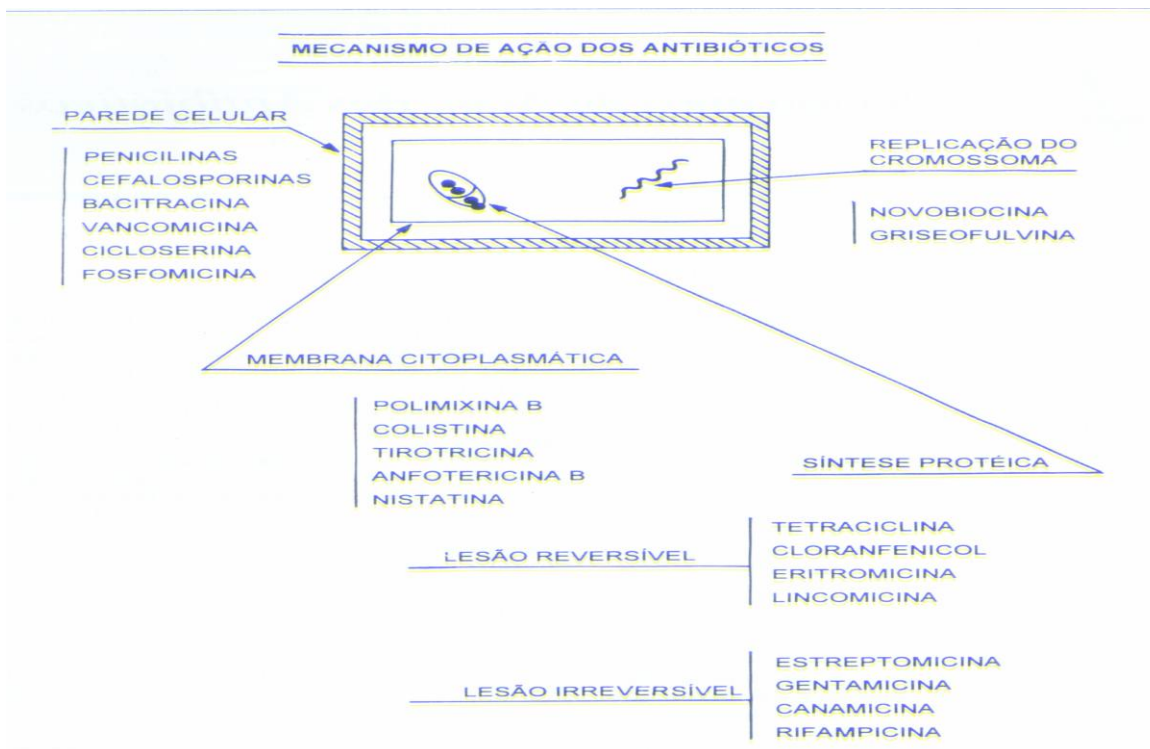


Fig . 14 . **Mecanismos de ação de alguns antibióticos** .Fonte : [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

2.4.3.2 Resistência

Atualmente é muito comum referências sobre bactérias resistentes a medicamentos, ou superbugs como foram denominadas. As bactérias podem desenvolver resistência a um ou mais fármacos, sendo difícil o tratamento destas bactérias.

Alguns grupos bacterianos apresentam naturalmente resistência a alguns antimicrobianos. Quando a resistência é natural chamamos de resistência intrínseca (inerente a bactéria).

As bactérias podem se tornar resistentes aos antimicrobianos por processos mutacionais ou por aquisição de plasmídeos de resistência. Este processo é denominado de resistência adquirida.

A resistência bacteriana pode estar ligada a um destes três princípios (ou a mais de um deles): degradação do fármaco, inativação (modificação) do fármaco e/ou expulsão do fármaco para fora da célula (Figura 15).

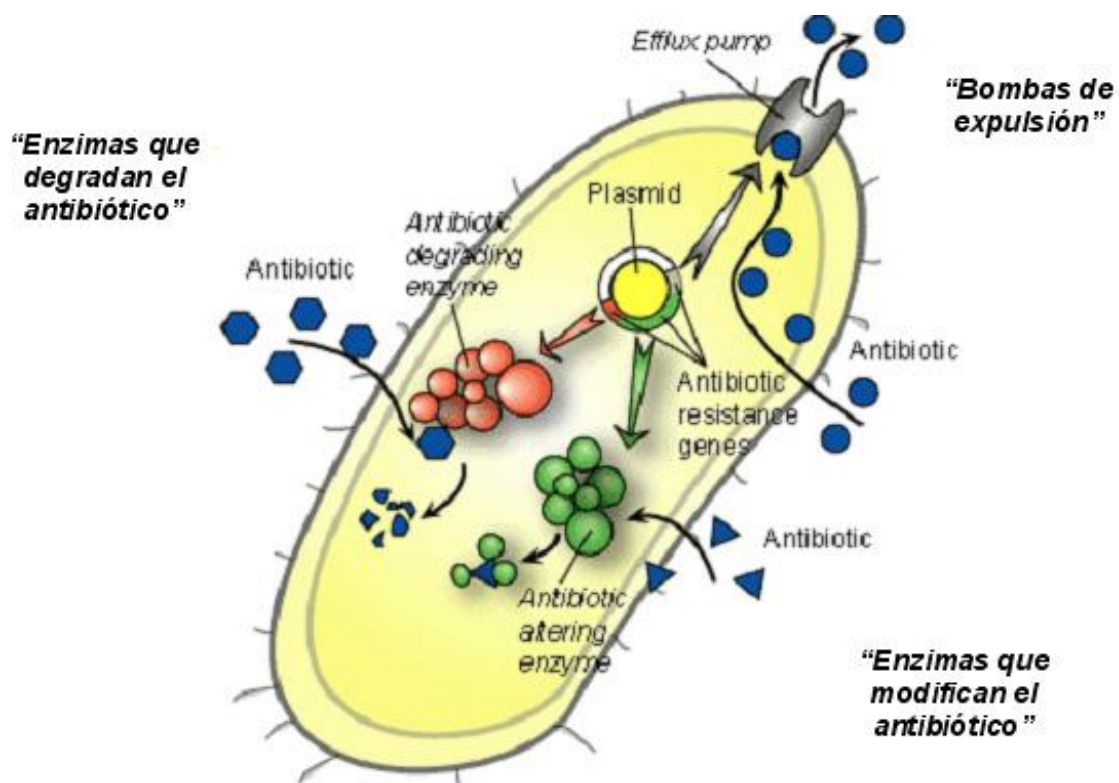


Fig . 15 . Mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos .
Fonte :
[www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)



3 BACTERIOLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA

3.1 MICROBIOTA NATURAL E MECANISMOS DE PATOGENICIDADE

47

Logo após o nascimento, os filhotes são expostos mediante contato, ingestão e inalação aos micro-organismos presentes na mãe. Bactérias, leveduras e outros micro-organismos do ambiente podem colonizar locais específicos na pele e em regiões do trato digestivo, respiratório ou urogenital.

Os micro-organismos que têm êxito na competição por locais particulares formam pouco a pouco uma microbiota normal e estável. Locais diferentes do corpo podem ter uma microbiota residente distinta, sugerindo que a colonização regional pode refletir uma vantagem seletiva por parte dos micro-organismos bem-sucedidos.

3.2 BIOLOGIA, PATOGENIA E IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS PARA OS ANIMAIS

3.2.1 Cocos gram-positivos - Gênero *Staphylococcus* spp.

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas esféricas que se dividem em diversos planos para formar cachos irregulares, com aproximadamente 1 μm de diâmetro e que tendem a formar agrupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva (Figura 1). O nome deriva das palavras gregas *staphyle* e *kokkos* para designar cachos de uva e grão, respectivamente.

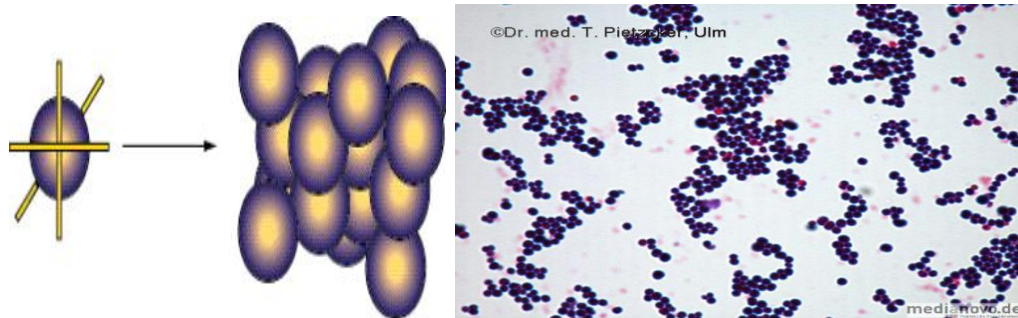


Fig. 1. Planos de divisão de uma célula do gênero *Staphylococcus* (à esquerda) e arranjo das células bacterianas em esfregaço (à direita). Fonte: Tortora *et al.* 2005.

As espécies do gênero *Staphylococcus* estão amplamente distribuídas no mundo todo como comensais na pele, no trato respiratório superior e urogenital inferior de todos os animais de sangue quente. No mínimo 30 espécies de *Staphylococcus* ocorrem como comensais da pele e membranas mucosas; algumas podem atuar como patógenos oportunistas, causando infecções piogênicas.

São relativamente estáveis no meio ambiente, resistentes ao calor, podem tolerar uma concentração aumentada de sal e podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas. A maioria é anaeróbia facultativa e catalase-positiva. São imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos.

No entanto, apesar dos antimicrobianos existentes, da melhora das condições sanitárias e das medidas de controle de infecção hospitalar, este micro-organismo continua a ser um dos mais importantes patógenos nas infecções hospitalares.

Os estafilococos coagulase-positivos *S. aureus* e *S. intermedius*, e o coagulase-variável *S. hyicus* são importantes patógenos de animais domésticos (Tabela 1). A produção de coagulase está correlacionada à patogenicidade.

Tab. 1 Estafilococos coagulase-positivos e sua importância clínica.

ESPÉCIE	HOSPEDEIROS	CONDIÇÕES CLÍNICAS
Staphylococcus aureus ^a	Bovinos	Mastite e impetigo no úbere
	Ovinos	Infecções supurativas (Abscessos), Mastite, Folliculite e dermatite, endometrites, cistites, osteomielites
	Caprinos	Mastite e dermatite
	Suínos	Botriomicose da glândula mamária e Impetigo na glândula mamária
	Equinos	Botriomicose do cordão espermático e Mastite
	Cães e Gatos	Infecções supurativas (Abscessos), Pioderma, endometrite, cistite, otite externa e osteomielite.
	Aves domésticas	Artrite e septicemia nos perus e Pododermatite ulcerativa
Staphylococcus intermedius	Cães	Pioderma, endometrite, cistite, otite externa e outras condições supurativas
	Gatos	Várias condições piogênicas
	Bovinos	Mastite (rara)
Staphylococcus hyicus	Suínos	Epidermite exudativa e artrite



	Bovinos	Mastite (rara)
Staphylococcus delphini	Golfinhos	Lesões supurativas na pele

^aS. aureus pode causar septicemias neonatais e infecções em feridas a muitas espécies.

Em espécimes clínicos, espécies do gênero Staphylococcus devem ser diferenciadas de espécies do gênero Micrococcus (Tabela 2). Os estafilococos são geralmente catalase-positivos, enquanto os estreptococos são catalase-negativos. O gênero Staphylococcus é geralmente classificado por seu aspecto colonial, pelo tipo de hemólise e pelo perfil bioquímico. Em laboratórios de diagnóstico veterinário, a identificação específica de estafilococos coagulase-negativos está reservada àqueles micro-organismos que são isolados em cultura quase pura ou que são recuperados de locais estéreis, como articulações ou fluido cérebro-espinhal.

Tab. 2 Diferenciação de cocos Gram-positivos.

Micro-organismo	Características em esfregaços corados	Produção de coagulase	Produção de catalase	Produção de oxidase
Staphylococcus spp.	Agrupamentos irregulares	+/-	+	-
Micrococcus spp.	Tétrades	+	+	+
Streptococcus e Enterococcus spp.	Cadeias	-	-	-

As colônias de estafilococos são geralmente grandes, opacas, convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo, podendo apresentar hemólise ou não (Figura 2). As colônias de linhagens de *Staphylococcus aureus* de bovinos e humanos são amarelo-douradas. Quanto à hemólise em ágar-sangue bovino ou ovino, quatro hemolisinas são conhecidas: alfa, beta, gama e delta. Cada hemolisina difere antigênica e bioquimicamente, bem como nos seus efeitos sobre as hemácias sanguíneas de diferentes animais. Essas hemolisinas in vivo agem como toxinas.

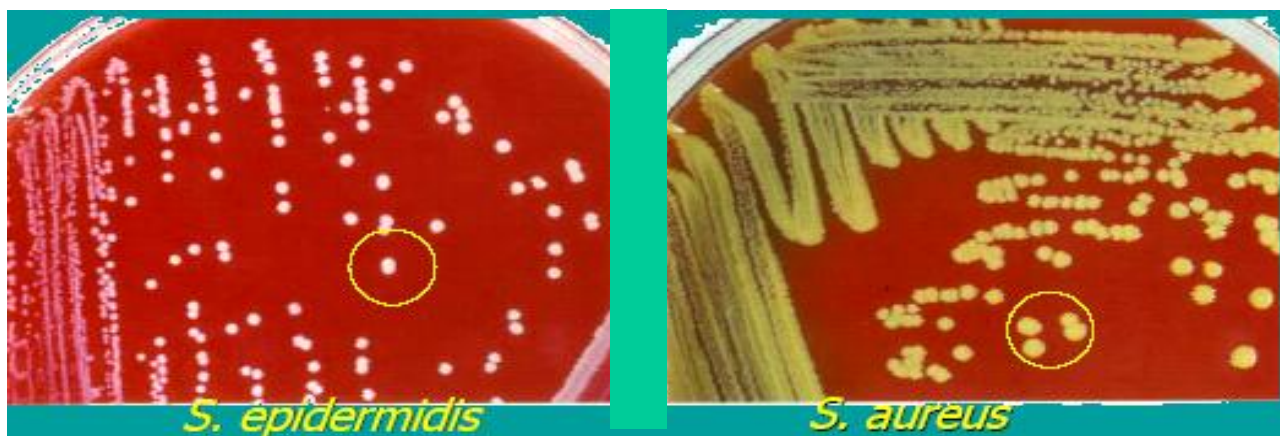


Fig . 4. Característica da colônia do gênero *Staphylococcus* em meio de cultura artificial ágar sangue . Fonte : Tortora et al. 2005 .

Embora todos os animais de sangue quente possam ser acometidos clinicamente por estafilococos coagulase positivos, a prevalência e a forma dessas interações variam entre espécies de hospedeiros.

3.2.1.1 *Staphylococcus aureus*



Em cultura, estas bactérias formam colônias brancas ou douradas em agar sangue. São catalase positiva e coagulase positiva e a maioria das cepas fermenta o manitol anaerobicamente.

Animais ou 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 destes 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 por meio de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados.

As infecções mais comuns acometidas por estas bactérias são: piodermites (Figura 3), furúnculos, sepses da pele, infecções pós-operatória, endocardites, osteomielites, síndrome do choque tóxico, infecções por alimentos e síndrome da pele escaldada (síndrome provocada pela infecção por determinadas cepas de estafilococos que durante a infecção produzem uma exotoxina que causa lesão cutânea. A toxina provoca eritema na pele e ocorre o acúmulo de fluido sob a mesma, provocando seu amolecimento e desta forma qualquer fricção leve na pele pode remover muitas de suas camadas, promovendo a exposição da derme).

Em bovinos, ovinos e suínos é o principal agente causador de mastite. A infecção instala-se pelo canal do teto, e seu curso varia de subclínico a supurativo agudo, gangrenoso ou crônico (Figura 4).



Fig. 3. Aspecto de pioderma em cão. Formação de colaretes epidérmicos e pápulas. Fonte: Carlotiet al. 200



Fig. 4. Mastite clínica em bovinos, ovinos e suínos
Fonte: www.veganoutreach.org

O principal marcador epidemiológico é a tipagem do bacteriófago. E o principal fator de virulência que estão associados a todas as cepas de *S. aureus* é a produção de mucopéptido e coagulase. Algumas cepas ainda são capazes de produzir cápsula, proteína A, proteínas de ligação a fibronectina e de ligação ao colágeno, enterotoxinas, toxinas epidermolíticas, toxinas lesivas à membrana, leucocidina e estafilocinase.

3.2.1.2 *Staphylococcus intermedius*

É o principal agente piogênico de cães e gatos, isolado principalmente de pioderma, de otite externa e de outras doenças supurativas; também ocorre em infecções respiratórias,

genitais, hemolinfáticas, ósseas e articulares; feridas; e infecções de pálpebras e conjuntiva. A Figura 1 mostra o plano de divisão deste gênero de bactéria e a Figura 2 mostra o perfil do crescimento em Agar sangue do gênero *Staphylococcus*. A diferença entre as espécies está na produção das hemolisinas e nos antígenos somáticos (antígenos de superfície) que são identificados por meio de provas sorológicas.

3.2.1.3 *Staphylococcus hyicus*

Este tipo de bactéria causa a epidermite exsudativa suína (eczema úmido), doença que ocorre no mundo inteiro em suínos lactentes e desmamados com mais de três meses de idade. É altamente contagiosa e caracteriza-se por excessiva secreção sebácea generalizada, esfoliação e exsudação na superfície da pele. Na maioria dos casos é sistêmica e rapidamente fatal, acometendo os pulmões, linfonodos, rins e cérebro. Pode ser isolado da mucosa vaginal e da pele de porcas sadias. Os micro-organismos entram na pele de suínos jovens através de pequenas lesões.

A Figura 1 mostra o plano de divisão deste gênero de bactéria e a Figura 2 mostra o perfil do crescimento em Agar sangue do gênero *Staphylococcus*. A diferença entre as espécies está na produção das hemolisinas e nos antígenos somáticos (antígenos de superfície) que são identificados por intermédio de provas sorológicas.

3.2.1.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico das infecções estafilocócicas é feito pelo isolamento e caracterização. Coleta-se aspirados de lesões fechadas em seringas ou recipientes estéreis. Swabs com meio de transporte podem ser utilizados também para coleta do material. O leite deverá ser colhido em recipientes estéreis. Amostras de sangue devem ser colhidas pelo sistema fechado e amostras de urina pelo método de punção ou cistocentese.



O exame direto é realizado nas preparações coradas pelo método de Gram e os estafilococos apresentam-se como cocos gram-positivos aos pares, em cachos ou em cadeias curtas. O isolamento é realizado nos meios de culturas comuns, como por exemplo, o ágar sangue e por meios seletivos, como o ágar manitol salgado. A caracterização pode ser feita por meio de testes bioquímicos como o da catalase e coagulase entre outros. O sangue de bovino é o mais indicado para detecção de toxina beta, produzida pelos estafilococos coagulase positivos.

3.2.1.5 Tratamento

Embora as espécies de *Staphylococcus* possam ser suscetíveis à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e clorafenicol), são também conhecidas pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência as diversas delas. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de testes de suscetibilidade. A penicilina é a droga de escolha se a linhagem for sensível. As linhagens resistentes são produtoras de beta-lactamase (penicilinase), uma enzima que inibe a ação da droga, e são codificadas por genes plasmidiais. O emprego de meticilina e outras penicilinas semissintéticas (tais como a oxacilina, nafcilina e cloxacilina), resistentes à ação das penicilinas, representam uma etapa significativa na terapia antiestafilocócica. Porém há linhagens estafilocócicas resistentes a essas drogas e a escolha é a gentamicina. Em caso de tratamento de infecções estafilocócicas de caráter grave deverá ser recomendado o uso da vancomicina.

3.2.2 Cocos gram-positivos - Gênero *Streptococcus* spp.

Os estreptococos formam um grupo de bactérias que podem infectar muitas espécies animais, causando infecções supurativas como mastite, metrite, poliartrite e meningite.

Esses micro-organismos são bactérias Gram-positivas em forma de cocos que se dividem em apenas um plano. Como as bactérias não se separam facilmente após o plano de divisão, elas tendem a formar cadeias (Figura 5) e, assim, podem diferenciar-se dos estafilococos que comumente se dividem em diferentes planos formando grupamentos semelhantes a cachos de uva. São catalase-negativos, o que também os diferencia dos estafilococos que são catalase positivos. São bactérias fastidiosas e requerem adição de sangue ou soro no meio de cultura.

Os estreptococos têm distribuição mundial. Muitas espécies vivem como comensais na mucosa do trato respiratório superior e no trato urogenital inferior.

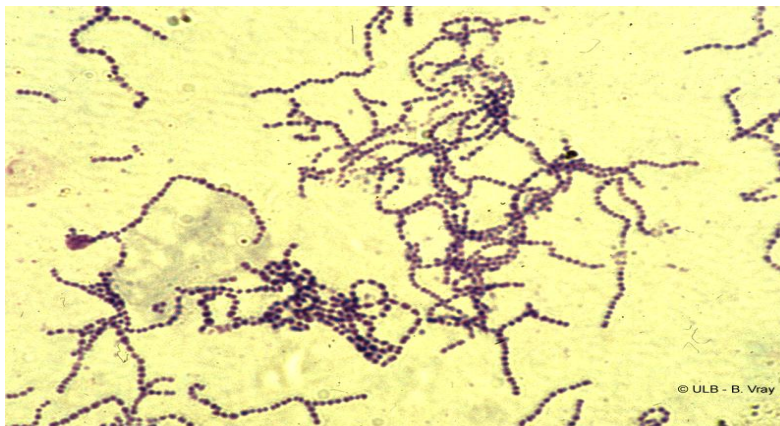


Fig. 5. Arranjo das células bacterianas do gênero *Streptococcus* em esfregaço corado pela técnica de Gram. Fonte: Tortora *et al.* 2005.

Entre os sistemas de nomenclatura desenvolvidos para os estreptococos destacam-se aqueles baseados nas características hemolíticas (de acordo com o tipo de hemólise observado quando estreptococos são colocados em meios de cultura contendo ágar sangue) e antigênicas



(de acordo com a composição antigênica, que é à base da classificação em grupos sorológicos de Lancefield).

Os estreptococos isolados de doenças infecciosas frequentemente provocam lise completa das células vermelhas do sangue (hemólise). Este fenômeno era identificado em meio Agar sangue como uma zona clara ao redor das colônias. Outros estreptococos provocavam um tipo de lise incompleta, na qual as células vermelhas se retraem e se tornam esverdeadas (ocorre somente na presença de oxigênio em consequência à redução da hemoglobina). A hemólise incompleta é denominada alfa hemólise (α -hemólise) e os estreptococos que a produzem foram denominados *Streptococcus viridans*, enquanto que a lise completa das células vermelhas foi denominada beta hemólise (β -hemólise) e os organismos que a provocam foram denominados *Streptococcus hemolyticus*.

Atualmente sabe-se que esses nomes são inadequados e que existem muitas espécies que causam hemólise alfa, outras causam hemólise beta e algumas espécies produzem os dois tipos de hemólise, dependendo da cepa e das condições de crescimento. Existem também muitos estreptococos que não são hemolíticos, os chamados de estreptococos gama (γ -hemólise).

A hemólise somente não foi suficiente para distinguir estreptococos causadores de doença, portanto, foi desenvolvido um método sorológico para a distinção dos estreptococos beta hemolíticos, segundo Dr^a. Rebecca Lancefield. A classificação dos estreptococos em grupos sorológicos baseia-se nas características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, localizado na parede da célula, que pode ser detectado por diferentes técnicas imunológicas. Os estreptococos foram divididos em 20 grupos sorológicos (grupos de Lancefield) designados por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V).

Os estreptococos são frequentemente comensais nas membranas mucosas e, por conseguinte, muitas infecções são oportunistas. As infecções são primárias, como no garrotilho, ou secundárias, como na pneumonia estreptocócica após infecção viral.

Os estreptococos de origem animal têm significado limitado em saúde pública, com exceção do *S. suis*, que podem causar infecções graves em indivíduos que trabalham com



suínos. *Streptococcus canis* é um importante patógeno em cães e está associado à septicemia neonatal, a muitas condições supurativas, à síndrome do choque tóxico. Garrotilho (*S. equi*), meningite estreptocócica suína (*S. suis*) e mastite estreptocócica bovina (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*) são infecções específicas importantes.

3.2.2.1 *Streptococcus equi*

O garrotilho é uma enfermidade específica dos equídeos, infecto-contagiosa, aguda ou subaguda, com descarga purulenta causada por *Streptococcus equi*, envolvendo o trato respiratório "superior" dos equídeos jovens (de três meses a seis anos) com abscessos nos linfonodos regionais. A doença tem maior incidência na faixa etária jovem, porque os animais sofrem queda de imunidade representada pelo desmame, ou pelas mudanças estacionais (alteração do clima), ou ainda em equinos puro sangue pela saída de potros haras para ingressar nas corridas com treinamento intensivo, confinamento e transporte excessivo. A contagiosidade é grande e praticamente todos os susceptíveis apresentarão a enfermidade clínica ou subclínicamente, caracterizando surto epidêmico subsequente ao primeiro caso observado.

3.2.2.2 *Streptococcus suis*

O *S. suis* é conhecido mundialmente como causa de perdas significativas na indústria suína. Está associado às doenças como: meningite, artrite, septicemia e broncopneumonia em suínos de todas as idades, além de casos esporádicos de endocardite, morte neonatal e aborto.

3.2.2.3 Tratamento



Vários antibióticos apresentam boa atividade contra as espécies de *Streptococcus*, mas o de escolha é a penicilina G. Um aspecto importante da terapêutica pela penicilina é o fato de que, até agora, não ocorreu seleção de amostras resistentes a esse antibiótico, pelo menos em escala significativa. Dessa maneira, infecções causadas pelo micro-organismo podem ser tratadas sem a necessidade de antibiograma para verificar se a amostra é resistente. Recomenda-se o uso de eritromicina para pacientes alérgicos à penicilina.

3.2.3 Bacilos gram-positivos

São encontrados largamente na natureza, habitantes do solo, água, pele e mucosas de vários animais, incluindo o homem. A virulência destes micro-organismos varia muito entre as espécies. Neste grupo incluem-se desde *Bacillus anthracis* (agente do carbúnculo hemático) e corinebactérias até *Lactobacillus acidophilus* (não patogênico).

3.2.3.1 Gênero *Corynebacterium* sp.

As corinebactérias (gênero *Corynebacterium* ou *Arcanobacterium* e *Rhodococcus*) são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis, não esporulados, patogênicos ou saprófitas. Algumas espécies fazem parte da microbiota normal da pele, nariz, nasofaringe, orofaringe, mucosa conjuntiva e trato geniturinário. O nome *Corynebacterium* deriva do grego *koryne*, que significa clava. Muitas corinebactérias contêm grânulos metacromáticos, que são depósitos de fosfato rico em energia. Quatro espécies de differóides são patógenos notáveis em animais:

- I) *Arcanobacterium pyogenes* está envolvido em processos supurativos de ruminantes e suínos;
- II) *C. pseudotuberculosis* que causa abscessos caseosos em ruminantes e equinos;

- III) *Rhodococcus equi* produz uma pneumonia supurativa em potros jovens;
- IV) *C. renale* coloniza o trato urogenital.

As corinebactérias apresentam-se sob a forma de bastonetes imóveis, pequenos (0,5 a 6 mm de comprimento por 0,3 a 0,8 mm de largura), não possui cápsula ou esporo, e é Gram-positivo. Caracteriza-se por possuir um corpo bacteriano reto ou ligeiramente curvo, com dilatações irregulares em uma das extremidades, com acentuada tendência pleomórfica (forma em clava, em pêra ou em fuso) e, usando métodos especiais de coloração (corantes derivados da anilina), evidenciam-se grânulos denominados granulações metacromáticas. Outra característica dos bacilos diftéricos é a sua forma de agrupamento, paralelamente (em paliçada), ou formando ângulos retos uns aos outros, (formas em V, em H, em Y), o que lhes dá, em conjunto, a aparência de letras chinesas decorrente da separação incompleta da célula durante a divisão celular (Figura 6).

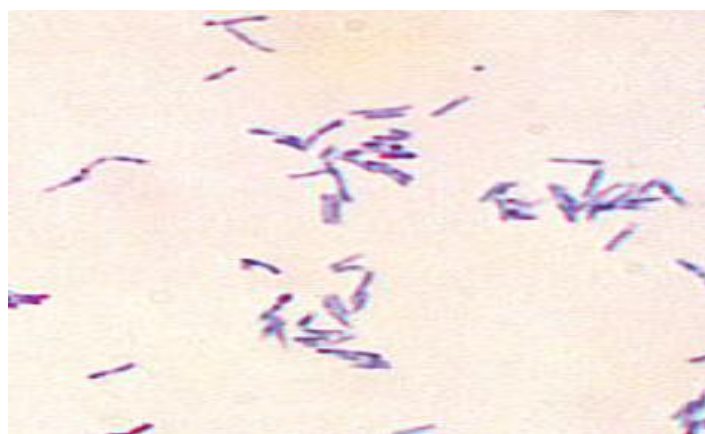


Fig. 6. Células do gênero *Arcanobacterium* sp. e arranjo paralelo (paliçada) em esfregaço corado pelo método de Gram. Fonte: Tortora et al. 2005.

Dentre as características culturais do micro-organismo, o meio completo como o meio de Löffler (com soro coagulado) é o mais comumente usado para a cultura das corinebactérias.



Neste meio, após 8 a 10 horas começam a surgir colônias pequenas, granuladas, com bordas irregulares, na cor creme ou cinza-claro, enquanto que outras bactérias (estreptococos, estafilococos, neissérias, etc.) não se desenvolvem com a mesma rapidez. Outros meios de cultura como Ágar-sangue ou Ágar-chocolate acrescido de telurito de potássio são também indicados para isolamento de corineobactérias que apresenta colônias cinza-escuras ou pretas, resultado da redução intracelular do telurito pelo micro-organismo, e o telurito nas concentrações empregadas inibe outras bactérias sem afetar o crescimento do bacilo diftérico. Três tipos morfolologicamente distintos de colônias são descritos nestes meios:

a)“gravis” – com células bacterianas em formato de bastão, pequenas e irregulares, formando colônias não-hemolíticas, grandes, acinzentadas, irregulares e estriadas – associado a formas graves da doença;

b)“mitis” – com células compridas, encurvadas, em forma de bastão, formando colônias hemolíticas, pequenas, pretas, brilhantes e convexas com uma superfície espessa – associado a formas leves da doença;

c)“intermedius” – com células longas, em forma de bastão, que formam pequenas colônias não-hemolíticas, apresentando características situadas entre os dois extremos, colônias cremosas e transparentes – associado a formas intermediárias da doença.

O diagnóstico bacteriológico é realizado por meio da identificação das corineobactérias a partir do material retirado das lesões (ulcerações), exsudatos de orofaringe e de nasofaringe, ou de outros sítios, dependendo do caso, por meio de swab, antes da administração de qualquer terapêutica antimicrobiana. Estes testes servem para confirmar a impressão clínica e têm importância epidemiológica.

As corineobactérias são sensíveis a vários antibióticos, incluindo penicilinas, eritromicina e tetraciclina.

3.2.3.2 *Listeria* sp.

A espécie de importância médica é a *Listeria monocytogenes*. Esta espécie é classificada como bacilos curtos (frequentemente cocobacilares), anaeróbios facultativos até microaerófilos, ou seja, crescem bem em baixas condições de O_2 e alta concentração de CO_2 , são Gram-positivos, apresentam faixa de crescimento entre 4 e 45°C à 25°C apresentam motilidade característica (Figura 7) e a 37°C são imóveis. Crescem em meios simples usados em laboratório (pH 5,5 - 9,6) e são desprovidos de cápsula.

Bactérias do gênero *Listeria* spp. possuem maior tolerância ao calor que outras bactérias não esporuladas. São catalase-positivas, fermentam glicose e lactose, não produzem sulfeto de Hidrogênio e em agar sangue de carneiro apresentam colônias pequenas, translúcidas e acinzentadas e acentuada hemólise semelhantes ao *Streptococcus pyogenes*.

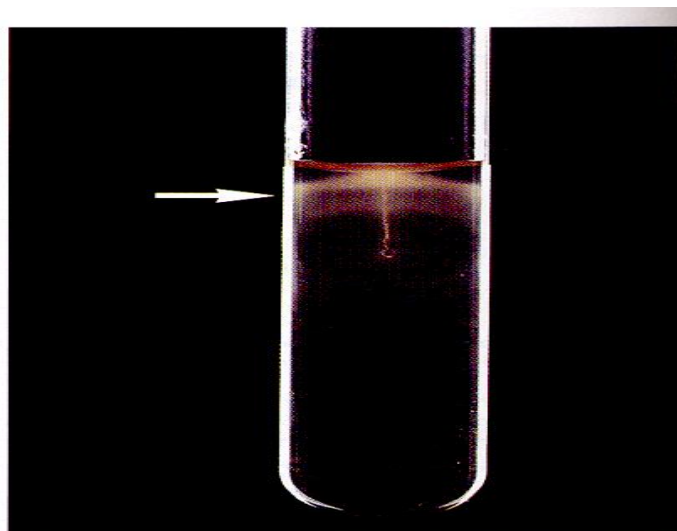


Fig . 7. Bactérias do gênero *Listeria* sp. em meio SIM à 25 °C apresentam motilidade caracterizada por saltos, 2-4 mm abaixo da superfície do ágar. Fonte : Tortora *et al.* 2005 .

Ruminantes são os animais domésticos mais frequentemente afetados. As formas principais de listeriose incluem septicemia, meningoencefalite e aborto. As fêmeas gestantes são



mais susceptíveis, apesar dos efeitos na mãe serem mínimos. É devastador para o feto ou recém-nascido.

Em neonatos, a doença ocorre de duas formas:

a) Fase primária – neonato infectado via transplacentária, produção de septicemia e granuloma localizados em órgãos. Resulta em aborto, animais prematuros, ou morte após o nascimento. O filhote nasce com distúrbio cardiorrespiratório, vômitos, diarreia, meningite, hepatoesplenomegalia, e lesões de pele;

b) Fase Tardia – neonato é infectado a partir do trato genital durante o parto. A infecção usualmente começa 1-4 semanas após o nascimento e manifesta-se como meningite com uma alta fatalidade.

O prognóstico é ruim em neonatos; as mães infectadas devem ser tratadas assim que a doença for diagnosticada. Penicilina é a droga de escolha. Pode-se usar eritromicina ou tetraciclina.

3.2.3.3 *Erysipelothrix* sp.

Na classificação, *Erysipelothrix rhusiopathiae* é a única espécie patogênica e de maior importância. Pode ser isolada de uma grande variedade de nichos ambientais, bem como do sistema digestivo e do tecido linfóide de animais saudáveis.

São bacilos Gram-positivos, curtos, delgados, pleomórficos, não esporulados. Apresentam cápsula relacionada à virulência. O crescimento em agar sangue produz hemólise alfa ou gama; pode formar colônias lisas ou rugosas, com filamentos finos e longos; crescem em meios ricos em glicose e requer 48h para crescimento à 30-37°C e pH 6,7 e 9,2. São microaerófilas com melhor crescimento em ambiente rico em CO₂ ou ausente de O₂. São catalase negativa, não apresentam motilidade e fermentam glicose e lactose, além produzir sulfeto de H₂.



A doença conhecida como erisipela, ocorre em inúmeras espécies animais (suíno, ovinos, bezerros, perus, patos e outros animais), sendo os suínos os animais mais frequente e intensamente acometidos. As apresentações clínicas incluem septicemia, uma forma cutânea generalizada, artrite e endocardite.

Os suínos que morrem de infecções agudas por *Erysipelothrix* sp. exibem hemorragias da serosa gástrica, dos músculos esqueléticos e cardíacos e do córtex renal. Nas articulações causam exsudação fibrinosa e formação de exsudato inflamatório, com erosão da cartilagem articular. Na endocardite valvular iniciada por embolia bacteriana e inflamação vascular, provoca alterações crônicas e lesões nas válvulas cardíacas.

O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos e isolamento da bactéria a partir das culturas. A susceptibilidade antimicrobiana fica restrita a penicilina, tetraciclina ou eritromicina.

3.2.3.4 Gênero *Bacillus* sp.

Este gênero compreende bacilos Gram-positivos, formadores de esporos, resistentes a condições ambientais adversas, tais como, calor e baixos níveis de umidade. Seu metabolismo é facultativo e crescem bem em agar sangue, produzindo colônias grandes, branco acinzentadas, de bordas irregulares. E algumas espécies são beta-hemolíticas. As espécies de importância são: *Bacillus anthracis* e o *Bacillus cereus*.

Esta bactéria, *Bacillus anthracis* é o agente do carbúnculo hemático, uma zoonose transmissível aos seres humanos. Os animais são infectados por meio da ingestão de esporos ao pastarem em solos contaminados ou comerem alimentos com o bacilo. Em condições normais o homem é infectado por meio da ingestão de carnes contaminadas, por exposição a carcaças, pele, lã, pêlos contaminados ou inalação dos esporos. Esta bactéria apresenta uma cápsula protetora que lhe confere tamanha resistência à fagocitose, vencendo as defesas do hospedeiro.

O *Bacillus anthracis* é um bacilo encapsulado, grande, gram-positivo, imóvel, aeróbico, formador de esporos. A forma bacilar apresenta extremidades retas medindo 4–8 µm de



comprimento por 1–1,3 μm de largura, isolados e também formando cadeias com aspecto de bambu. Ao contrário dos esporos, a forma vegetativa do bacilo é pouco resistente, sendo destruída pela simples putrefação do cadáver e pela ação de desinfetantes comuns.

Os esporos são muito resistentes aos fatores ambientais, podendo apresentar uma sobrevida de até duzentos anos e são vistos como corpos refringentes dentro da bactéria e não deformam a célula. Apresentam a propriedade de se manter viáveis por longo tempo em derivados animais, no meio industrial e no solo. Resistem ao calor e a desinfetantes químicos. Para serem destruídos é necessária uma temperatura ao redor de 140°C, mantida por três horas. Sobrevivem 70 horas em uma solução de cloreto de mercúrio a 0,1%.

Grande parte da virulência do bacilo depende dos polipeptídeos capsulares que de alguma forma, bloqueiam e ou até vencem os mecanismos de defesa do hospedeiro. Sua cápsula antifagocítica é composta de D-glutamato (esta é uma característica diferencial, pois as cápsulas das outras bactérias são polissacarídicas).

O diagnóstico clínico pode ser evidenciado por lesões típicas como úlceras não-dolorosas que se apresentam como uma cicatriz necrótica escura. A lesão conhecida como pústula maligna pode progredir para uma bacteremia e levar o acometido à morte. Também pode ocorrer uma pneumonia específica, principalmente pela inalação de esporos nos caso dos selecionadores de lã de carneiro. Nesse caso, na pneumonia considerada de alto risco, o bacilo é denominado como antrax pulmonar.

O diagnóstico laboratorial pode ser feito por intermédio de técnicas de bacterioscopia (identifica bacilo gram-positivo), cultura (isolamento do *Bacillus anthracis*), além de técnicas de imunodiagnóstico. Testes rápidos de detecção, como a PCR, ainda não estão amplamente difundidos. Testes bacteriológicos e culturas do líquido ascítico, derrames pleurais, líquido cefalorraquidiano (no caso de meningite), e fluido cuidadosamente retirado pela expressão da escara, (embora este último não seja recomendado, pois pode causar a disseminação do patógeno) também podem ser feitos.

Para o tratamento do Anthrax são utilizados antimicrobianos, como as penicilinas, doxiciclina e ciprofloxacina (CiproR). A prevenção primária do Anthrax depende das vacinas. Foram desenvolvidos dois tipos de vacina: animal e humana: a vacina americana atualmente



utilizada é denominada MDPH-PA (produzida até fevereiro/98 pelo Departamento de Saúde Pública de Michigan) ou MDPH-AVA (vacina adsorvida contra o Anthrax). É manipulada e distribuída pela BioPort Corporation Lansing e está indicada para militares, trabalhadores rurais e industriais que lidam com produtos animais, em área de alta incidência, veterinários e quando há riscos de exposição a esporos.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) não recomenda a vacinação em massa. Assim, recomenda-se a vacinação para os indivíduos que têm um risco elevado de exposição ocupacional ao Anthrax.

O *Bacillus cereus* produz uma toxina termorresistente e outra enterotoxina termolábil relacionadas a surtos de intoxicação alimentar. É a espécie do gênero *Bacillus* mais frequente em infecções oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, submetidos à hemodiálise, infusão endovenosa contínua e usuários de drogas endovenosas.

Pode ocasionar bacteremia, septicemia, meningite, abscesso cerebral, pneumonia, endocardite e infecções supurativas em feridas e queimaduras. Quando são isoladas a partir das fezes não tem importância clínica, sendo mesmo considerado habitante do trato gastrointestinal de humanos e animais. Pode também ser isolada do solo, água, poeira e inúmeros alimentos, principalmente, carnes, verduras, cereais, leite e leite em pó.

3.2.3.5 *Mycobacterium* spp.

As micobactérias são bacilos ácido-resistentes e em forma de bastão, aeróbios, não formadores de esporos e imóveis.

As doenças micobacterianas em animais domésticos são geralmente crônicas e progressivas. As doenças em animais domésticos incluem a tuberculose em aves e mamíferos, paratuberculose em ruminantes e lepra felina. Outras duas doenças comuns em bovinos são a tuberculose cutânea e a farcinose.



A tuberculose bovina causada por *Mycobacterium bovis* tem caráter zoonótico e ocorre no mundo todo.

3.2.3.6 *Nocardia* sp.

67

Os membros do gênero *Nocardia* são actinomicetos Gram-positivos aeróbios e saprofíticos. A infecção por este tipo de bactérias está associada à imunossupressão ou a inoculação de uma grande quantidade do micro-organismo.

A nocardiose canina ocorre após inalação, ingestão ou contato com lesões da pele com os micro-organismos. Os sintomas se caracterizam por febre, anorexia e dificuldade respiratória. Em bovinos a nocardiose se caracteriza por mastite com o desenvolvimento de fibrose difusa ou multifocal, e coágulos brancos intermitentemente encontrados no leite.

3.2.3.7 *Actinomyces* sp.

Os actinomicetos formam um grupo de bactérias Gram-positivas que crescem lentamente e produzem filamentos ramificados.

As espécies que tem importância veterinária são *Arcanobacterium pyogenes*, *Actinomyces hordeovulneris*, *Actinomyces bovis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinobaculum suis*.

As bactérias *Arcanobacterium pyogenes* causam infecções em bovinos, ovinos e suínos, onde os principais sinais são abscedação, mastite, pneumonia supurativa, endometrite e piometra. As *Actinomyces bovis* afetam apenas bovinos e fazem lesão nodular na mandíbula.

As *Actinomyces hordeovulneris* causam abscessos cutâneos e viscerais, pleurite, peritonite e artrite em cães. Já as bactérias *Actinomyces viscosus* causam em cães piogranulomas cutâneos e piotórax.



As *Actinobaculum suis* causam cistite e pielonefrite em suínos.

3.2.4 Bacilos gram-positivos esporulados – Gênero *Clostridium* sp.

68

Os clostrídios são bacilos Gram-positivos, grandes, fermentativos, catalase negativo e, a maioria possui flagelo peritríquios. Os clostrídios são saprófitos encontrados nos solo e na água.

As espécies que são susceptíveis a infecção são: cães, gatos, suínos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, leões, macacos, peixes cultivados e aves.

As infecções causadas pelos diversos clostrídios incluem carbúnculo sintomático, edema maligno, gangrena gasosa, febre carbuncular, hepatite necrótica infecciosa e hemoglobinúria bacilar.

3.2.5 Bacilos gram-negativos fermentadores: Família *Enterobacteriaceae*

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram-negativos que fermentam a glicose e ampla variedade de outros açúcares. As enterobactérias estão distribuídas em três grupos patógenos principais, patógenos oportunista e não patógenos.



As principais categorias de doenças produzidas pelas enterobactérias patogênicas estão ligadas as infecções intestinais (colibacilose entérica, diarreia neonatal), ou infecções septicêmicas (colissepticemia, colobacilose sistêmica) e ainda toxemia (toxicemia colibacilar, doença do edema de suínos, diarreia pós-desmame de leitões, mastite em vacas e leitoas).

A salmonelose é de ocorrência comum em animais domésticos e as consequências da infecção variam de acordo com o estado do portador, que vai de um portador subclínico a uma septicemia aguda fatal.

Dentro da categoria das infecções oportunistas pelas enterobactérias as doenças podem apresentar-se em diferentes regiões anatômicas. Os invasores oportunistas têm a característica de evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro que colonizam e sobrevivem nos órgãos afetados.

As condições clínicas associadas a estes tipos de bactérias são: diarreia, infecções em feridas, mastite e endometrite em vacas e leitoas, pneumonia em bezerros e potros, infecções no ouvido e no trato urinário de cães e gatos e septicemia em frangos.

3.2.6 Bacilos gram-negativos não-fermentadores

3.2.6.1 Pseudomonas spp.

As pseudomonas são micro-organismos ambientais de ocorrência mundial tanto na água como no solo. Também são encontrados na pele, nas membranas mucosas e nas fezes. Os roedores silvestres podem agir como reservatório desta bactéria. O principal agente causador de doenças é a espécie *Pseudomona aeruginosa*.



Em bovinos as *Pseudomona aeruginosa* causam mastite, metrite, pneumonia, dermatite e enterite em bezerros. Em ovinos causa podridão da lã e otite média. Em suínos causa infecções respiratórias e otite. Em equinos a *Pseudomona aeruginosa* causa infecções no trato genital e ceratite ulcerativa.

Cães e gatos também sofrem com infecções do tipo ceratite ulcerativa, cistite e otite externa causada por *Pseudomona aeruginosa*. Já foi descrita pneumonia hemorrágica em mustelídeos, septicemia em chinchilas e estomatite necrótica em répteis.

3.2.6.2 *Pasteurella* sp.

A maioria das espécies do gênero *Pasteurella* é comensal e vive nas membranas mucosas do trato respiratório superior de animais domésticos. Sua sobrevivência no ambiente é relativamente curta.

As principais doenças causadas pelas espécies de *Pasteurella* estão associadas com a pasteurelose pulmonar bovina associada ao complexo de pneumonia enzoótica de bezerros. Em outros animais pode causar pneumonia, mastite, renite e cólera aviária.

3.2.6.3 *Fusobacterium* sp.

As espécies de *Fusobacterium* representam mais de 50% dos micro-organismos anaeróbios isolados de infecções mistas de interações sinérgicas. Geralmente são encontradas em mucosas, principalmente do trato digestivo dos animais. No ambiente vivem por curtos períodos.

Estas bactérias causam difteria em bezerros, metrite pós-parto, abscesso hepático e trauma na região adjacente ao esfíncter (conhecido como mancha negra do teto). Em equinos



causam o mau do casco e necrobacilose da parte inferior dos membros por causa de higiene precária. Em suínos as *Fusibacterium* causam trauma na mucosa nasal (renite necrótica).

3.2.6.4 *Actinobacillus* sp.

71

Os actinobacilos são comensais em mucosas de animais, principalmente no trato respiratório superior e na cavidade oral. Os fatores de virulência são poucos conhecidos. As principais doenças que são atribuídas a esta espécie de bactéria são: a inflamação piogranulomatosa crônica de tecidos moles em bovinos (endurecimento da língua – língua de pau), a pleuropneumonia em suínos e a doença sistêmica em potros e em leitões.

3.2.6.5 *Haemophilus* sp.

Os *Haemophilus* são comensais em mucosas de animais, principalmente no trato respiratório superior. Estes micro-organismos são susceptíveis a dessecação e não sobrevivem por períodos longos fora de seus hospedeiros.

As espécies de *Haemophilus* de importância veterinária são *Haemophilus sommus* causador de septicemia, bronquite e meningoencefalite em bovinos. Esta mesma espécie causa, em ovinos, epidermite vulvite e mastite. Em suínos a espécie que causa doença é a *Haemophilus parasuis* (invasor secundário em doença respiratória). Em aves o *Haemophilus paragallinarum* causa coriza infecciosa.

3.2.6.6 *Moraxella* sp.



A *Moraxella* é bastante encontrada em membranas mucosas de bovinos portadores. É um micro-organismo de vida curta no ambiente. Esta bactéria causa ceratoconjuntivite infecciosa bovina, uma importante doença ocular em bovinos. Em equinos com conjuntivite também já foi isolada.

3.2.6.7 *Bordetella* sp.

A *Bordetella* é bastante encontrada em membranas mucosas do trato respiratório superior de animais domésticos. É um micro-organismo de vida curta no ambiente. A espécie de importância veterinária, que causa doenças graves é *Bordetella bronchiseptica*. Esta bactéria causa doenças de ordem respiratória em suínos, cães, filhotes de gatos, equinos, coelhos e roedores.

3.2.6.8 *Burkholderia mallei*

Esta espécie de bactéria é um importante patógeno para equídeos, causa doença aguda e crônica. Manifesta como lesões na pele e no trato respiratório

3.2.6.9 *Burkholderia pseudomallei*

As infecções causadas por esta espécie de bactéria causam lesões supurativas crônicas nos pulmões e em outros órgãos de um grande número de espécies de animais.

3.2.6.10 *Campylobacter* sp.



Muitas espécies de *Campylobacter* são comensais no trato intestinal de animais de sangue quente. *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter lari* coloniza os intestinos de aves e podem acarretar contaminação fecal de cursos d'água.

Em bovinos a espécie *Campylobacter fetus venerealis* é a principal causa da campilobacteriose genital bovina. É transmitido por touros assintomáticos durante o coito a vacas susceptíveis. As bactérias ficam alojadas nas criptas glandulares do prepúcio, assim os touros podem permanecer infectados indefinidamente.

Em cães também podem ocorrer infecções com *Campylobacter jejuni*, sendo causa de diarreia intensa (campilobacteriose intestinal).

3.2.6.11 *Brucella* spp.

Dentro do gênero *Brucella*, são descritas seis espécies independentes, cada uma com seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (cães) e *Brucella neotomae* (rato do deserto). Duas novas espécies, recentemente isoladas de mamíferos marinhos estão sendo estudadas. As três espécies principais, também denominadas clássicas, são subdivididas em: biovariedades ou biovars: *B. abortus* – 7 biovars; *B. melitensis* – 3 biovars; *B. suis* – 5 biovars.

As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos, com morfologia de cocobacilos Gram-negativos, imóveis; podem apresentar-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa ou rugosa (rugosa estrita ou mucóide). Essa morfologia está diretamente associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo da parede celular, e para algumas espécies tem relação com a virulência. *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* normalmente apresentam uma morfologia de colônia do tipo lisa; quando evoluem para formas rugosas ou mucóides, deixam de ser patogênicas. Já as espécies *B. ovis* e *B. canis* apresentam uma morfologia de colônia permanentemente do tipo, rugosa ou mucóide. Embora os bovinos e



bubalinos sejam suscetíveis à *B. suis* e *B. melitensis*, inequivocamente a espécie mais importante é a *B. abortus*, responsável pela grande maioria das infecções.

No animal infectado, as localizações de maior frequência do agente são: linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, útero e úbere. As vias de eliminação são representadas pelos fluidos e anexos fetais – eliminados no parto ou no abortamento e durante todo o puerpério – leite e sêmen.

A principal fonte de infecção é representada pela vaca prenhe, que elimina grandes quantidades do agente por ocasião do aborto ou parto e em todo o período puerperal (até, aproximadamente, 30 dias após o parto), contaminando pastagens, água, alimentos e fômites. Essas bactérias podem permanecer viáveis no meio ambiente por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, ampliando de forma significativa a chance de o agente entrar em contato e infectar um novo indivíduo suscetível. A porta de entrada mais importante é o trato digestivo, sendo que a infecção se inicia quando um animal suscetível ingere água e alimentos contaminados ou pelo hábito de lamber as crias recém-nascidas.

O período de incubação pode ser de poucas semanas e até mesmo de meses ou anos. Considerando-se o momento em que ocorre a infecção, o período de incubação é inversamente proporcional ao tempo de gestação, ou seja, quanto mais adiantada à gestação, menor será o período de incubação. A transmissão pelo coito parece não ser de grande importância entre bovinos e bubalinos. Na monta natural, o sêmen é depositado na vagina, em que existem defesas inespecíficas que dificultam o processo de infecção.

Entretanto, um macho infectado não pode ser utilizado como doador de sêmen; isso porque, na inseminação artificial, o sêmen é introduzido diretamente no útero, permitindo infecção da fêmea com pequenas quantidades do agente, sendo por isso importante via de transmissão e eficiente forma de difusão da enfermidade nos plantéis. A transferência de embriões – realizada segundo os protocolos internacionalmente preconizados de lavagem e tratamento para a redução da transmissão de agentes infecciosos –, não apresenta risco de transmissão de brucelose entre doadoras infectadas e receptoras livres da doença.

Fêmeas nascidas de mães brucélicas podem infectar-se no útero, durante ou logo após o parto. Quando infectadas, essas fêmeas em geral abortam na primeira prenhez, e só



apresentam resultados positivos para os testes sorológicos no decorrer da gestação. Entre aquelas espécies em condições de ter alguma importância na epidemiologia da brucelose bovina, podem ser citados: os equídeos, que podem apresentar lesões articulares abertas, principalmente de cernelha; os cães, que podem abortar pela infecção; e os saprófagos, pela possibilidade de levar restos de placenta ou feto de um lugar para outro.

A principal forma de entrada da brucelose em uma propriedade é a introdução de animais infectados. Quanto maior a frequência de introdução de animais, maior o risco de entrada da doença no rebanho. Por essa razão, deve-se evitar introduzir animais cuja condição sanitária é desconhecida. O ideal é que esses animais procedam de rebanhos livres ou, então, que sejam submetidos à rotina diagnóstica que lhes garanta a condição de não infectado. O controle da brucelose apoia-se basicamente em ações de vacinação massal de fêmeas, no diagnóstico e sacrifício dos animais positivos.

3.2.7 Micoplasmas

As infecções por micoplasmas (Mollicutes) em animais possuem importância histórica e persistem na atualidade interferindo na pecuária. Esses micro-organismos estão associados a diversas doenças, cujos sinais clínicos podem ser na forma aguda, porém normalmente são de caráter crônico.

Os micoplasmas são potenciais causadores de patologias no sistema respiratório, urogenital, glândula mamária, articulações, sistema nervoso, e conjuntiva ocular. Entre as espécies isoladas de bovinos, cerca de 20, *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* são considerados os patógenos de maior importância para o trato genital. Esses micro-organismos estão associados à vulvovaginite granular, endometrite, salpingite, aborto e infertilidade em vacas.



Os micoplasmas são os menores procariotas de vida livre e são desprovidos de parede celular. A morfologia celular é bastante pleomórfica, a célula pode ser esférica, em forma de pêra ou em forma de espiral e filamentosa. São micro-organismos fastidiosos e exigem meios bastante ricos. Crescem de forma lenta e exigem em geral três a sete dias de incubação à 37° C. São anaeróbios facultativos e o pH ideal varia em torno de 6,0 a 7,5.

Cuidados adicionais devem ser adotados na coleta e no transporte do material clínico para minimizar contaminações que podem inviabilizar o seu isolamento. Técnicas moleculares (PCR) têm sido utilizadas para identificação e detecção de micoplasmas e ureaplasmas em amostras clínicas. Essas técnicas são indicadas para a detecção dos micoplasmas em consequência das dificuldades encontradas no cultivo e isolamento desses micro-organismos.

3.2.8 *Rickettsia* sp.

A ordem Rickettsiales consiste em bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias. Todos se multiplicam por divisão binária e estão associados a vetores invertebrados.

Três famílias são de interesse Médico Veterinário: a família Rickettsiaceae engloba parasitos do endotélio vascular (tribo Rickettsieae) e as células fagocitárias (tribo Ehrlichieae). Bartonellaceae são parasitos epiteliais e Anaplasmatidae são parasitos de eritrócitos.

As células medem até 0,5 µm por 1 µm e são imóveis. As riquetsias são propagadas em sacos vitelinos de embriões de galinhas, em culturas celulares e em animais de laboratório, especialmente cobaias ou camundongos. A temperatura ideal varia entre 33° C e 35° C. São parasitas de artrópodes, podem passar por via transovariana em carrapatos e ácaros.

Apenas duas espécies estão associadas de maneira significativa a doenças animais: a) *Rickettsia rickettsii*, agente da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), que infecta



cães. É carregada por mais de 20 espécies de carrapatos ixodídeos e é capaz de produzir uma doença febril e raramente fatal; b) *Coxiella burnetii*, o agente da febre Q, que sobrevive no ambiente e pode ser disseminado por via aerógena. Os hospedeiros incluem os mamíferos e artrópodes.

3.2.9 Ehrlichia sp.

Ehrlichia são parasitas riquetsiais estritamente intracelulares de células sanguíneas da série branca. São bactérias Gram-negativas, pertencentes à Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae e gêneros Ehrlichia e Anaplasma. Causam a erliquiose em animais e seres humanos.

As erlíquias de forma geral são de difícil cultivo. A Ehrlichia canis pode ser cultivada in vitro em linhagem de células monocíticas caninas. Macrófagos de cães obtidos por meio de lavagens peritoniais sucessivas e monócitos de sangue periférico são igualmente susceptíveis a infecção pela E. canis. A E. risticii pode ser cultivada com sucesso em histiócitos humanos. A E. risticii e a E. sennetsu podem ser isoladas in vitro.

➤ Erliquiose monocítica canina

O agente erliquial mais comum encontrado na erliquiose monocítica canina (EMC) é a E. canis, que tem como principal vetor o carrapato marrom do cão Rhipicephalus sanguineus, embora o Dermacentor variabilis também possa experimentalmente transmitir a E. canis. Existem três cepas da E. canis: Florida, Oklahoma e Israel.



A transmissão no carrapato é transestadial, mas não transovariana. As larvas e ninfas se infectam quando se alimentam em um cão com a fase aguda da doença, por intermédio da ingestão de leucócitos infectados. No carrapato, as erliquias se disseminam por hemócitos do intestino para a glândula salivar. Durante a alimentação, os carrapatos inoculam a secreção salivar contaminada com erliquias no interior do sítio de alimentação no hospedeiro. Todos os três estágios podem transmitir a doença (larva, ninfa e adulto).

Os hospedeiros vertebrados mais comuns são os da família Canidae (cães, coiotes, raposa e chagal). Cães em áreas endêmicas e aqueles que são transportados para estas regiões são susceptíveis à doença.

➤ Erliquiose granulocítica canina

O principal agente erliquial que infecta os granulócitos de cães (neutrófilos e eosinófilos) é a *E. ewingii*, tendo como possíveis vetores o carrapato *Amblyomma americanum* e o *Otobius megnini*. Ela causa doença moderada a grave, com claudicação, trombocitopenia e edema articular.

Além da *E. ewingii*, a *E. equi* (*Anaplasma phagocytophilum*) também causa erliquiose granulocítica canina (EGC). A *E. equi* tem como hospedeiros naturais além do cão, o homem, equinos, lhamas e animais experimentais, além dos muare, ovinos, caprinos, gatos e primatas não humanos. O vetor conhecido é o carrapato *Ixodes ricinus*. No cão pode também ser transmitida pelo *R. sanguineus*, causando doença clínica moderada com trombocitopenia.

➤ Erliquiose Trombocítica Canina

O agente etiológico da erliquiose trombocítica canina (ETC) é a *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*), que infecta as plaquetas do cão, podendo eventualmente infectar também os leucócitos. É visualizada como inclusões basofílicas no interior de plaquetas em esfregaços corados com corante de Giemsa. O vetor conhecido é o *R. sanguineus*.



A ETC é uma doença que pode variar de leve a severa no cão. É caracterizada por trombocitopenia cíclica com parasitemia inicial onde um grande número de plaquetas é parasitado.

➤ Outras espécies de Ehrlichia encontradas nos animais

79

Outras espécies de erlíquias podem infectar células mononucleares: *E. chaffeensis* (erliquiose monocítica humana), tendo como vetores conhecidos o *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis*. Tem como hospedeiros naturais conhecidos o cão, seres humanos e cervos, enquanto que experimentalmente podem ser infectados os cães, cervos da cauda branca e ratos de pés brancos. A infecção no cão pode ser subclínica ou leve. A *E. chaffeensis* também foi encontrada em coíotes por meio da PCR, portanto estes animais podem ser reservatórios potenciais para esta erlíquia.

A *E. risticii* (*Neorickettsia risticii*) (erliquiose monocítica equina), tem como vetor suspeito possível o trematódeo *Nanophyes salmincola* que infecta lesmas operculadas do gênero *Infesta* principalmente monócitos, causando infecção leve em cães (trombocitopenia, poliartropatias, anemia, letargia e vômitos).

Em equínos, a *E. risticii* causa uma doença clínica severa conhecida como a Febre do Rio Potomac que pode apresentar como sinais clínicos: pirexia, anorexia, enterite, diarreia aquosa, cólica e laminite.

A *E. equi*, já citada anteriormente como agente infeccioso natural de cães também infecta células polimorfonucleares de equínos, com vetor *I. ricinus*. Os sinais clínicos mais comuns nos equínos são febre, anorexia, hemorragias petequiais e edema de membros.

Em bovinos, a *Ehrlichia bovis* (*Anaplasma bovis*) pode ser transmitida pelo carrapato *Hyalomma* sp, e infecta células mononucleares.

➤ Diagnóstico



Na fase aguda pode ocorrer anemia, trombocitopenia, pancitopenia, linfocitose granular e leucopenia leve. Na fase crônica é comum haver trombocitopenia, leucopenia e anemia mais severas. Podem ser encontradas alterações como hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hipergamaglobulinemia, aumento da alanina amino transferase (ALT) e da fosfatase alcalina.

A *Ehrlichia* sp. pode ser visualizada como corpúsculos de inclusão ou mórulas em leucócitos e plaquetas em esfregaços sanguíneos feitos de sangue total ou papa de leucócitos, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial, aspirados de medula óssea e baço.

80

As riquetsioses respondem bem ao tratamento com tetraciclina e cloranfenicol.

3.2.10 *Chlamydia* sp.

As bactérias do gênero *Chlamydia* são parasitas intracelulares estritos que recebem da célula hospedeira, compostos ricos em energia, os quais não podem sintetizar. São cocobacilos e do ponto de vista estrutural, possuem parede semelhante à das bactérias Gram-negativas, embora a coloração de Gram não seja utilizada na sua identificação.

Há quatro espécies de *Chlamydia*: *C. trachomatis* causa infecções venérea, ocular e respiratória em seres humanos (tracoma, conjuntivite de inclusão, uretrite, linfogranuloma venéreo, epididimite, salpingite e outras infecções dos órgãos genitais); *C. psittaci* afeta muitos mamíferos e pássaros; *C. pneumoniae* causa infecções respiratórias em humanos e *C. pecorum* causa encefalite, poliartrite e enterite em bovinos, ovinos e suínos.

O diagnóstico das infecções por clamídias pode ser feito pelo exame microscópico e isolamento do micro-organismo. O exame microscópico, entretanto, apenas tem valor para o diagnóstico do tracoma. As clamídias podem ser cultivadas em culturas de tecido e no saco vitelino de ovos embrionados.



As drogas de escolha para o tratamento das infecções por clamídias são as tetracíclicas.

3.2.11 Espiroquetas e micro-organismos espiralados

3.2.11.1 Leptospira spp.

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae*, distribuídas em oito diferentes gêneros: *Leptospira*, *Borrelia*, *Serpulina*, *Treponema*, *Brachyspira*, *Spirochaeta*, *Cristispira* e *Leptonema*.

Espiroquetas pertencem à família *Leptospiraceae* cujos principais gêneros estão distribuídos em importantes gêneros, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Algumas diferenças entre *Leptospira*, *Serpulina*, *Treponema* e *Borrelia*.

	<i>Leptospira</i>	<i>Serpulina/Treponema</i>	<i>Borrelia</i>
Morfologia	Muitas espirais finas e firmes	6-14 Espirais regulares	4-8 Espirais frouxas
Comprimento	6-20 μm	5-20 μm	3-20 μm
Diâmetro celular	0,1-0,2 μm	0,1-0,5 μm	0,2-0,5 μm
Flagelo periplasmático	2	6-10	15-20



Discos de inserção	3-5	1	2
Respiração	Aeróbio	Microaeróbio ou anaeróbio	Microaeróbio
Produção de catalase	Presente	Ausente	Ausente
Fonte de energia	Ác. graxo de cadeia longa	Carboidrato e/ou aminoácido	Carboidrato
Transmissão por artrópodes	Não	Não	Sim
Enfermidade causada	Leptospiroses	Sífilis, pinta, caratê	Febre recidivante, Enfermidade de Lyme

Fonte: Gomes, M. J. P. <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/lepto.pdf>

A classificação das espécies do gênero *Leptospira* está baseada no grau de parentesco do DNA. O gênero está dividido em 17 espécies definidas, com pelo menos, 70% de parentesco (DNA) e cuja sequência contém uma divergência de, pelo menos, 5% de bases não pareadas. As amostras de leptospiroses ainda são comumente referidas pelo sorovar. Muitos sorovares estudados são representados por somente uma única cepa referência e, como mais cepas são estudadas, o número de espécies tende a aumentar.

Há dois tipos de classificação; uma genética e outra baseada nos determinantes antigênicos. Ambas reconhecem espécies patogênicas e saprófitas. O gênero *Leptospira* está dividido em grupos patogênicos e saprófitas. As espécies patogênicas contêm oito espécies e as saprófitas possuem cinco espécies distintas, conforme a lista abaixo:



Lista de espécies patogênicas

- 1) *Leptospira interrogans* “sensu stricto”
- 2) *Leptospira borgpetersenii*.
- 3) *Leptospira santarosai*.
- 4) *Leptospira inadai*.
- 5) *Leptospira noguchii*.
- 6) *Leptospira weilii*.
- 7) *Leptospira kirshneri*.
- 8) *Leptospira faineii*.

Lista de espécies saprófitas

- 1) *Leptospira biflexa*.
- 2) *Leptospira meyeri*.
- 3) *Leptospira wolbachii*.
- 4) *Turneria parva* (proposta)
- 5) *Leptonema illini*.

As leptospiros são células helicoidais flexíveis com 0,1 mm de diâmetro e 6 - 20 mm de comprimento (figura 7). São fracamente coradas pelos corantes anilínicos. As células não coradas são visíveis pela microscopia de contraste ou pela microscopia de campo escuro.

A conformação helicoidal é para o lado direito (molas de relógio), existindo em uma ou nas duas extremidades ganchos típicos. Dois flagelos periplasmáticos (fibrila axial e endoflagelo) ocorrem em cada célula onde está inserido em cada extremidade e raramente se sobrepõe na região central.



Fig. 7. Bactéria do gênero *Leptospira* spp. em micrografia eletrônica apresentando a conformação helicoidal .
Fonte : Tortora et al. 2005 .

No meio líquido, possui movimentos característicos com rotação alternada ao longo do eixo e translação em direção à extremidade sem gancho. Em meio mais viscoso são observados movimentos de serpenteio, rolamentos sinuosos. São aeróbias. Colônias difusas são formadas abaixo da superfície do meio com 1% de agar e colônias turvas em meio com agar a 2% são cultivadas em meios artificiais, contendo 10% de soro de coelho ou 1% de albumina sérica bovina com adição de ácidos graxos de cadeia longa e pH 6,8–7,4. A temperatura ótima para seu crescimento está entre 28°- 30°C. Leptospiras são catalase e oxidase positiva. Os cultivos devem ser checados para a presença de contaminantes, após 3–4 dias e subcultivadas após 7–21 dias.

Os meios podem tornar-se seletivos pela adição de vários antimicrobianos, sendo o mais comum: a 5-fluoruracila e sulfado de neomicina, embora polimixina B, rifampicina e vancomicina possam ser utilizados. Um meio frequentemente utilizado é o meio de Ellinghausen—McCullough—Johnson— Harris (EMJH), o qual adiciona 1% de albumina sérica bovina e Tween 80 (fonte de ácidos graxos de cadeia longa); formulações comerciais estão disponíveis no comércio. Meios líquidos e semissólidos, contendo soro incluem: o meio de



Korthof (Peptona, NaCl, NaHCO₃, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) e Fletcher (Peptona, extrato de carne, NaCl, e agar).

Sua multiplicação é por fissão transversa, movimentam-se ativamente, por meio de rotações e flexões ao longo de seu próprio eixo. São visíveis em microscopia de campo escuro ou contraste de fase em aumento de 100 vezes. Células típicas possuem ganchos em cada uma das extremidades, possuindo uma forma de "S" ou de "C". A maioria das leptospiros não é corada pelo Gram. Entretanto, são visíveis quando coradas pela prata (Warthin-Starry ou Levaditi).

O gênero é quimioorganotrófico, utilizando ácidos graxos ou alcoóis graxos, possuindo 15 ou mais átomos de carbono como fonte de energia. Não utilizam carboidratos ou aminoácidos como fonte de energia.

A composição antigênica das cepas de leptospiros usadas como propósitos taxonômicos abaixo da espécie é o sorovar. O método padrão para determinação do sorovar é a aglutinação microscópica com absorção de aglutininas cruzadas. Por conveniência, os sorovares relacionados antigenicamente foram organizados em sorogrupos.

As leptospiros patogênicas estão divididas em 23 sorogrupos e aproximadamente 230 sorovares ou sorotipos. A determinação do sorogrupo e sorovar de uma amostra isolada requerem muita experiência, sendo realizado, principalmente por laboratórios especializados ou de referência.

As leptospiros desenvolveram uma relação eficiente com o hospedeiro, havendo, algumas vezes, infecções latentes sem evidência clínicas de sua presença. As doenças resultantes de infecções por leptospiros variam entre formas fulminantes que resultam em morte e a forma passiva sem sinais clínicos visíveis.

As leptospiros são espiroquetas uniformes quanto ao aspecto morfológico e fisiológico, mas diferem quanto ao aspecto sorológico e epidemiológico. (tabela 4).

O habitat das leptospiros inclui: água estagnada, solo úmido, matéria orgânica em decomposição, plantas, animais e o homem. As leptospiros são relativamente inativas, bioquimicamente. Animais de vida livre no solo, água doce ou do mar, vivendo em associação

com hospedeiros. As amostras não saprófitas causam leptospirose, uma zoonose, primariamente infectando animais domésticos e silvestres os quais atuam como reservatórios. O homem pode contrair leptospirose como hospedeiro acidental. As leptospirose e leptospirose ocorrem em todo o mundo.

Tabela 4. Principais Leptospiras e sorovares associados às doenças nos animais domésticos.

	Espécie	sorotipos	hospedeiro primário
Bovinos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
	<i>borgpetersenii</i>	Hardjo	bovinos
	<i>kirschnerii</i>	Grippotyphosa	suínos
	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Wolffi	
	<i>interrogans</i>	Szwajizak	
		Balcanica	
Ovinos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
Caprinos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
Suínos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
	<i>kirschnerii</i>	Grippotyphosa	suínos
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Bratislava	suínos e eqüinos
Eqüinos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
		Pyrogenes	
		Casteloni	
	<i>borgpetersenii</i>	Hardjo	bovinos
Caninos	<i>interrogans</i>	Canicola	
Suínos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos

Fonte: Gomes, M. J. P. <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/lepto.pdf>



Nos cães, o quadro de leptospirose possui três formas clínicas, incluindo: a) a forma septicêmica; b) a forma hepática e c) a forma renal. Estas formas também podem ocorrer nos bovinos e suínos, entretanto a forma septicêmica está mais restrita aos animais jovens, e o aborto está mais relacionado com a leptospirose nos animais adultos. A maioria das infecções possui curso assintomático. As infecções clínicas estão presentes, principalmente em caninos, bovinos e em suínos. Menos frequentes em equinos, caprinos e raramente nos gatos.

A leptospirose é caracterizada clinicamente em duas fases distintas: 1) Leptospiremia e febre por aproximadamente sete dias. 2) Leptospirúria que pode persistir por dois a três meses. O agente pode ser isolado do sangue, na primeira fase (leptospiremia), e do rim e urina (leptospirúria), durante a segunda fase.

A leptospirose pode ser transmitida de animal para animal e também para o homem. Ratos e animais silvestres são portadores de *Leptospira* spp. Nos roedores e marsupiais, as leptospiros localizam-se nos túbulos renais, podendo ser eliminadas vivas, por meio da urina por várias semanas; podem ainda infectar outros animais domésticos ou o homem.

As leptospiros são pouco resistentes. Elas são rapidamente destruídas pela desidratação. Temperaturas entre 50 - 60°C, geralmente as destrói, em pouco tempo. A resistência aos desinfetantes químicos não é grande. As leptospiros são muito sensíveis ao pH ácido, sendo destruída pelo suco gástrico em 30 minutos. São inibidas em pH abaixo de 6,0 e acima de 8,0 e temperatura abaixo de 10°C ou acima de 36°C.

O tratamento consiste na aplicação parenteral de estreptomicina (25-30 mg/Kg) uma a duas vezes. Pode-se associar penicilina à estreptomicina, provocando um sinergismo de ação antimicrobiana na eliminação do portador. O tratamento com antimicrobiano pode diminuir a resposta imune para a doença e torná-lo suscetível ao mesmo sorovar ou sorotipo.

3.2.11.2 *Borrelia* spp.



São espiroquetas transmitidas e mantidas primariamente por carrapatos. As infecções que eles causam têm fases hematogênicas acompanhadas ou seguidas por manifestações gerais e localizadas.

Os micro-organismos deste gênero são importantes para o homem e animais porque por causar a febre recidivante – atualmente rara (*Borrelia recurrentis*), a doença de lyme (*Borrelia burgdorferi*), espiroquetose em aves (*Borrelia anserina*), além da borreliose bovina (*Borrelia theileri*).

A *B. recurrentis* se coram facilmente com Giemsa. Já, a *B. burgdorferi* e as demais espécies são bem mais difíceis de ser observadas (diagnóstico sorológico). São microaerófilos de crescimento lento. Fermentam glicose e outros carboidratos.

A *B. recurrentis* é transmitida de pessoa para pessoa por piolhos; a *B. burgdorferi* é uma zoonose causada por carrapatos de estrutura rígida (*Ixodes* spp) e a *Borrelia anserina* pelo vetor *Argas persicus*.



4 VIROLOGIA GERAL

Os vírus infectam todas as formas de vida, desde bactéria, fungos e plantas, até os animais e o homem. O termo vírus vem do latim que significa veneno. Este termo foi utilizado como sinônimo de veneno e se referia a agentes de natureza desconhecida que provocavam diversas doenças.

89

No ano de 1935, cristais de vírus foram isolados e observados ao microscópio pela primeira vez. A sua composição parecia principalmente protéica, porém constatou-se mais tarde uma pequena quantidade de ácidos nucleicos.

No início dos anos 40, generalizou-se que todos os vírus continham ácidos nucleicos, o que foi confirmado por estudos com bacteriófagos, que eram vírus bacterianos. Em 1952, foi demonstrado para o bacteriófago T4, que somente o DNA do fago, e não a proteína penetrava na célula bacteriana hospedeira iniciando os eventos de replicação que levavam a produção de centenas de vírus em cada célula infectada.

Uma grande contribuição para a virologia foi à descoberta de que os vírus podem ser cristalizados. Quando o vírus do Mosaico do Tabaco foi cristalizado, forneceu um poderoso argumento para que se pudesse pensar nos vírus como estruturas químicas simples, consistindo somente de proteína e ácido nucleico. Desta forma, se pensamos nos vírus fora das células; consideramos como estruturas moleculares excepcionalmente complexas. No interior das células, a informação levada pelo genoma viral, faz com que a célula infectada produza novos vírus, levando-nos a pensar nos vírus como organismos excepcionalmente simples.

Três propriedades principais distinguem os vírus de outros micro-organismos: o tamanho, os vírus são menores que outros organismos, embora eles variem consideravelmente em tamanho. O genoma, que pode ser formado de DNA ou RNA, nunca ambos (os vírus contêm apenas um tipo de ácido nucléico). E o metabolismo, os vírus não possuem atividade metabólica fora da célula hospedeira; eles não possuem atividade ribossomal ou aparato para síntese de proteínas.



Os vírus diferem de outros parasitas intracelulares porque o ciclo de infecção viral inclui um "período cego" durante o qual não se detecta a presença do vírus, o que não ocorre com os outros parasitas intracelulares.

4.1 ESTRUTURA VIRAL

Os vírus são os menores agentes infecciosos, de 20 a 300 nm de diâmetro. A estrutura viral (Figura 1) é composta por:

- a) Capsídeo, invólucro protéico que protege o genoma viral.
- b) Nucleocapsídeo, conjunto capsídeo com genoma viral.
- c) Capsômeros, aglomerados de polipeptídios.
- d) Envoltório, membrana de lipídio que envolve as partículas virais.

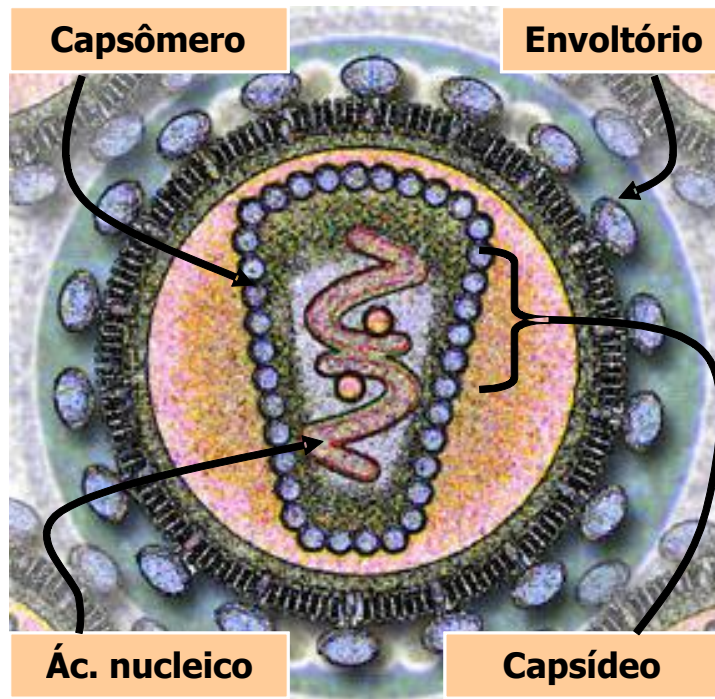


Fig . 1. Esquema representativo dos componentes de uma partícula viral . [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)

Também é importante definir a palavra vírion, que é a partícula viral completa que em algumas instâncias pode ser idêntica ao nucleocapsídeo. E vírus defeituoso é uma partícula viral funcionalmente deficiente em algum aspecto da replicação.

4.2 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO VIRAL



A nomenclatura viral segue as regras do International committee on taxonomy of viruses (ICTV). A classificação dos vírus se baseia nas seguintes características: tipo de ácido nucleico (fita simples ou dupla e estratégia de replicação), tamanho e morfologia (simetria, quantidade de capsômeros e ausência ou presença de envoltórios) (Figura 2), presença de enzimas específicas, susceptibilidade a agentes físicos e químicos (principalmente éter), métodos naturais de transmissão, tropismo celular ou tecidual ou preferência por hospedeiro, patologia (inclusão de corpúsculos), sintomatologia e propriedades imunológicas.

4.3 CULTIVO E QUANTIFICAÇÃO VIRAL

O cultivo in vitro de vírus pode ser feito em culturas de células ou em ovos embrionários sob condições estritamente controladas. O crescimento in vivo é empregado para o isolamento primário de certos vírus e para o estudo das viroses e da ontogênese viral.

A quantificação das partículas viral pode ser contada diretamente no microscópio eletrônico por comparação com uma suspensão padrão de partículas de látex de tamanho similar. A hemaglutinação é outra forma de se quantificar as partículas virais, que ocorre através da aglutinação das hemácias humanas ou de alguns animais por estes vírus. Este teste mensura a quantidade total de vírus presente.

E ainda podemos mensurar a quantidade viral por meios biológicos, por meio da morte dos animais, infecção dos animais ou efeitos citopáticos em culturas de tecidos (diluição final do vírus teste – ensaio de plaques).

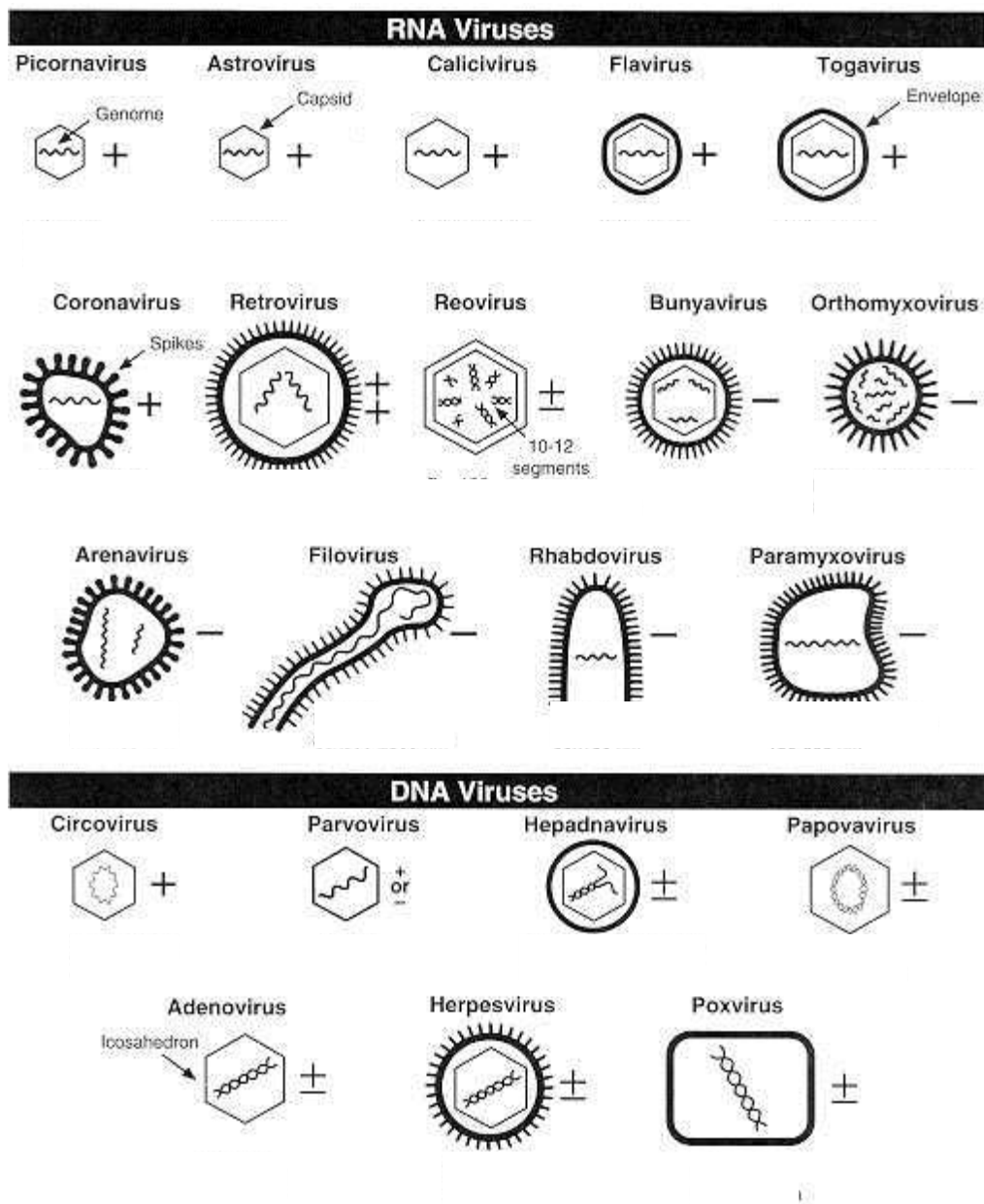


Fig. 2. Classificação dos vírus segundo as características : tipo de ácido nucléico (fita simples ou dupla) e morfologia (simetria, quantidade de capsômeros e ausência ou presença de envoltórios, sinais + = presença / - = ausência). Fonte : www.windows.ucar.edu



4.4 REPLICAÇÃO VIRAL

Os vírus só são replicados dentro de células vivas. O ácido nucleico viral contém informações necessárias para programar a célula hospedeira infectada, de forma que esta passa a sintetizar várias macromoléculas necessárias à produção da progênie viral. Fora da célula susceptível, as partículas virais são metabolicamente inertes.

94

Todo o processo de replicação do material genético viral ocorre após a penetração e o desnudamento do vírus. A penetração da partícula viral ocorre após a interação com moléculas da superfície da célula hospedeira. O desnudamento ocorre após a fusão da partícula viral diretamente com a superfície da célula ou por endocitose mediada pelos receptores.

A replicação e expressão do material genético de um vírus variam bastante, dependendo do tipo de material genético (DNA, RNA, fita simples ou fita dupla e polaridade positiva ou negativa). Porém, de forma genérica todos os vírus precisam assegurar pelo menos três funções importantes, replicação do genoma (enzimas como RNA polimerase), empacotamento do genoma (proteínas estruturais) e proteínas que alteram o metabolismo da célula infectada, permitindo assim a multiplicação viral.

4.5 RESPOSTA IMUNE ÀS INFECÇÕES VIRAIS

A resposta imune contra o vírus inicia-se durante a fase de replicação do material genético e expressão das proteínas virais. As células infectadas produzem uma citocina chamada interferon alfa (do tipo 1) que tem atividade antiviral.



Os vírus, também são processados pelo sistema imune, não em vesículas, mas em estruturas especiais chamadas proteossomas. Os proteossomas fragmentam o vírus em peptídeos que são transportados para o retículo endoplasmático por proteínas associadas ao transporte 1 e 2 (TAP 1 e TAP 2 do inglês, Transport Associate Protein 1 and 2). As moléculas do MHC de classe I também se reúnem dentro do retículo endoplasmático rugoso. As moléculas do MHC de classe I se ligam aos peptídeos do vírus e migram para a superfície celular.

Os linfócitos T CD8 reconhecem as moléculas da classe I, que agora contêm fragmentos de vírus, e liga-se a elas. Quando a conexão se completa, um sinal enviado através da membrana celular que desencadeia a ativação destes linfócitos T antígenos específicos. A maioria destas células se converte em células T killer ou citotóxicas.

Contudo, diferentemente das células NK (natural killer), as células T citotóxicas só matam as células infectadas com o vírus, em particular, que estimulou a sua ativação. Por exemplo, as células T citotóxicas ajudam a combater o vírus da gripe. A razão pela qual a maioria das pessoas necessita de 7 a 10 dias para recuperar da gripe deriva de ser esse o tempo que demora a gerar células T citotóxicas especialmente concebidas para combater o vírus que causa a referida doença.

Quando o vírus é fagocitado pelo macrófago é processado em vesículas fagocíticas. Os peptídeos, fragmentos do vírus, se ligam ao MHC de classe II e são apresentados para linfócitos Th CD4.

O primeiro anticorpo produzido é a da classe IgM, que aparece no início da infecção. Aparece no início da infecção e tem função de neutralizar o vírus causador da infecção. A IgM percorre a circulação para ligar-se ao vírus específico. Assim, procura impedir a disseminação da infecção.

O segundo anticorpo que aparece é a IgG, ainda mais específico, menor que a IgM passa do vaso sanguíneo para o tecido infectado para neutralizar o vírus no foco inflamatório, porém não consegue atuar nas mucosas. Aparece cerca de 12 dias após o início da infecção.



5 VIROLOGIA MÉDICA VETERINÁRIA

5.1 PARVOVÍRUS

96

Os membros desta família Parvoviridae têm simetria icosaédrica, material genético composto por fita simples de DNA e não são envelopados. Esta família contém duas subfamílias: Parvovirinae (vírus de vertebrados) e Densovirinae (vírus de artrópodes). Dentro da subfamília Parvovirinae apenas o gênero parvovírus tem importância veterinária.

Os parvovírus podem infectar vários animais domésticos e animais silvestres. Uma característica das doenças causadas pelos parvovírus é a aglutinação das hemácias. As doenças têm caráter sistêmico agudo e outras, significado patogênico incerto.

A enterite do visom, descrita em 1940 como uma infecção persistente, afeta filhotes de gatos e assemelha-se clinicamente a panleucopenia felina.

A infecção de caninos por parvovírus emergiu em 1970 como uma doença de abrangência mundial, com alta mortalidade e morbidade. Em cães os parvovírus causam falência cardíaca aguda e subaguda em filhotes infectados “in utero” durante ou durante o período perinatal.

A parvovirose é uma doença importante entre suínos, afeta a reprodução, por descrever falência reprodutiva, na qual ocorrem natimortos, fetos mumificados, morte embrionária precoce e infertilidade.

5.2 HERPESVÍRUS



Os micro-organismos desta família Herpesviridae têm a forma icosaédrica, envelopados e o DNA é composto por fita dupla. Este vírus permanece por longos períodos de tempo no organismo, frequentemente latentes e depois podem ser reativados, proporcionando infecções vitalícias. São de ampla ocorrência, pois infectam peixes, anfíbios, aves e mamíferos (inclusive o homem).

Os herpesvírus podem causar doenças respiratórias, genitais, mamárias e no sistema nervoso central em bovinos. A doença de Aujeszky é a principal doença em suínos, mas pode também afetar outras espécies domésticas. Em equinos, os herpesvírus podem causar doenças respiratórias, neurológicas e venéreas, bem como abortos junto de infecções neonatais.

A infecção de cães domésticos e silvestres é comum em todo mundo, e leva a alta mortalidade por causa da infecção generalizada. Em cães recém-nascidos é rara a doença.

5.3 ADENOVÍRUS

Os membros desta família Adenoviridae, o material genético é composto por fita dupla de DNA e a simetria é icosaédrica e não são envelopados.

Em humanos a infecção com adenovírus são subclínicas ou moderadas, enquanto que as infecções nos animais resultam em infecções graves.

Particularmente cães e aves são acometidos por infecções graves por adenovírus. A infecção pelo adenovírus canino tipo 1 causa uma hepatite infecciosa severa, o adenovírus canino tipo 2 causa uma doença respiratória. As infecções por adenovírus também estão associadas com problemas entéricos.

A infecção por adenovírus equino é invariavelmente fatal em potros árabes por estar associada com imunodeficiência combinada.



O adenovírus aviário está distribuído em todo mundo, representando assim uma infecção comum. A maioria das aves não apresenta sintomas (subclínica). Quando as aves apresentam os sintomas, eles vêm associados à síndrome da queda da postura, bronquite, mortalidade embrionária e enterite hemorrágica.

5.4 POXVÍRUS

Estes são os maiores vírus, dermatófilos e causam pústulas na pele. Os membros da família Poxviridae possuem forma ovoide ou retangular e o nucleocapsídeo tem uma estrutura complexa. Algumas espécies são envelopadas. O genoma é composto por fita dupla de DNA.

Estes vírus são encontrados em microscopia eletrônica de biopsias ou fragmentos das lesões cutâneas. E a transmissão ocorre pelo contato com a lesão contaminada. E é considerado de caráter zoonótico.

Em bovinos os poxvírus causam pseudovariola bovina, estomatite papular bovina e ectima contagiosa bovina. Estes vírus podem ser transmitidos para humanos, e produzem infecções semelhantes.

Em caprinos os poxvírus produzem infecções generalizadas com significativa mortalidade. Em ovinos causam doenças nodulares cutâneas.

5.5 PICORNAVÍRUS



Os membros desta família Picornaviridae, o material genético é composto por fita simples de RNA (sentido positivo), a simetria é icosaédrica e não são envelopados.

Com exceção do vírus da febre aftosa e do vírus da encefalomiocardite, os picornavírus infectam tipicamente apenas um tipo de hospedeiro ou um número limitado de hospedeiro.

O vírus da febre aftosa (aftovírus) e o da doença vesicular dos suínos produzem infecções persistentes, com grande variação antigênica.

5.6. ORTHOMYXOVÍRUS

Os membros desta família Orthomyxoviridae, o material genético é composto por fita simples de RNA (oito segmentos lineares com sentido negativo). Os representantes desta família são encapsulados, a forma é esférica (ou pleomórfica) e o nucleocapsídeo é helicoidal.

A família possui quatro gêneros, Influenzavírus A, Influenzavírus B, Influenzavírus C e Thogotovirus. Apenas os Influenzavírus A e os Thogotovirus têm importância veterinária. Os Thogotovirus são transmitidos por picadas de carrapatos e já foram isolados em camelos e bovinos. Os Influenzavírus A já foram isolados de equinos, suínos e aves (peste aviária).

5.7. RETROVÍRUS



Os representantes da família Retroviridae apresentam fita simples de RNA (sentido positivo). Estes vírus possuem envelope e tem forma esférica com nucleocapsídeo icosaédrico.

Os retrovírus podem ser classificados como endógenos e exógenos. Os retrovírus endógenos ocorrem amplamente entre os vertebrados e resultam em infecções de células germinativas. Os genomas virais endógenos contribuem para produzir a leucemia felina recombinante e a leucose aviária. Os retrovírus endógenos de suínos são perigosos para os humanos.

100

Os vírus exógenos dividem-se em retrovírus de transformação lenta e de transformação rápida. Os vírus de transformação lenta são responsáveis por tumores em células B ou T. E os vírus de transformação rápida estão relacionados com tumores em outros tipos celulares.

5.8 RHABDOVÍRUS

Os membros da família Rhabdoviridae são envelopados com formato de bala e nucleocapsídeo helicoidal. A fita de RNA é simples (sentido negativo). Os micro-organismos desta família são os causadores da raiva.

A transmissão ocorre após a mordida de cães, gatos e morcegos, principalmente. Após a replicação viral no local da mordida, ascende através dos axônios para o sistema nervoso central onde se dissemina e então desce por meio dos nervos periféricos para a pele e glândulas salivares.

O diagnóstico ocorre por intermédio da autópsia do tecido cerebral e fragmentos de pele ou córnea que contenham pelos para pesquisa de antígenos ou inclusões.



5.9 ARENAVÍRUS

Esta família Arenaviridae é composta por vírions pleomórficos, contendo dois segmentos de RNA fita simples. São também envelopados de forma esférica e nucleocapsídeo helicoidal.

101

Estes vírus são transmitidos por excretas de roedores que causa a doença febril (Febre Lassa), às vezes, complicada por meningite asséptica ou doença hemorrágica grave em vertebrados.

5.10 REOVÍRUS

As espécies que representam a família dos Reoviridae são os agentes causadores da doença diarreica (rotavírus). São vírus de simetria icosaédrica com nucleocapsídeo de camada dupla ou tripla icosaédrica. Seu genoma é composto por fita dupla de RNA.

Dentro desta família, o gênero ortoreovírus tem sido isolado de diversos animais (mamíferos e aves). Em ovinos, caprinos, bovinos e equinos (cultura intensiva), os reovírus causam diarreia aguda, e a contaminação ocorre pelo contato com as fezes. Em aves as infecções com rotavírus têm implicado em artrite, tenossinovite, doença respiratória crônica e enterite.

5.11 CORONAVÍRUS



A família Coronaviridae possui indivíduos RNA fita simples (sentido positivo), é envelopada com a forma esférica (coroa) e o nucleocapsídeo é helicoidal.

Os coronavírus de importância médico-veterinária são os torovírus que acometem suínos, caprinos, ovinos, aves, cães e gatos. As infecções são brandas ou inaparentes em animais adultos, mas são graves em animais jovens. Os coronavírus exibem tropismo pelos epitélios intestinal e respiratório.

5.12 PRÍONS

Não são considerados vírus, o agente infectante replica-se inexoravelmente nos tecidos linfóides, e então nas células cerebrais onde produz vacúolos intracelulares. As doenças causadas são: encefalite espongiforme bovina, encefalite espongiforme felina e scrapie em ovinos.

Por muito tempo as doenças causadas por príons cujo protótipo é o scrapie de carneiros foram classificadas como vírus lentos em razão ao longo período de incubação. Isto porque são doenças infecciosas, esporádicas ou genéticas.

5.13 PAPILOMAVÍRUS

A família Papillomaviridae compreende vírus com DNA, dupla fita (circular) com forma icosaédrica e não envelopados. Estes vírus podem persistir latentes no ambiente e serem



reativados. As espécies incluídas nesta família estão o papilomavírus, o poliomavírus e o vírus símios vacuolizante.

O papilomavírus causa verrugas na pele de mamíferos e aves. A transmissão é sexual. Embora as infecções ocorram em muitas espécies de animais, apenas nos bovinos, equinos e caninos tem importância clínica.

5.14 PARAMYXOVÍRUS

As espécies que representam a família dos Paramyxoviridae são vírus encapsulados com forma pleomórfica e nucleocapsídeo helicoidal. O genoma é composto por uma fita simples de RNA (sentido negativo).

Infectam, sobretudo, mamíferos e aves. As doenças graves causadas por paramyxovírus incluem peste bovina, peste dos pequenos ruminantes, cinomose canina e doença de Newcastle.



6 INTRODUÇÃO À MICOLOGIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

Os fungos (do latim fungus = cogumelo) têm sido tradicionalmente considerados como "semelhantes a plantas". A maioria das espécies cresce por extensão contínua e ramificação de estruturas filiformes. Em adição, eles são imóveis em sua maioria e suas paredes celulares assemelham-se as de plantas, em espessura e, até certo ponto, em composição química e em estrutura ultramicroscópica. São seres heterotróficos, essencialmente aeróbicos; e com limitada capacidade anaeróbica. O material de reserva é o glicogênio.

104

Os fungos crescem como células únicas, as leveduras, ou como colônias filamentosas multicelulares, os bolores e cogumelos. As formas multicelulares não possuem folhas, caules ou raízes e são menos diferenciadas do que as plantas superiores, porém são muito mais diferenciadas do que as bactérias.

Contudo, os fungos não possuem pigmentos fotossintéticos e, assim, eles estão restritos a uma existência saprofítica ou parasita.

Os fungos são abundantes no solo, nos vegetais e em massas de água, onde vivem em folhas mortas ou em madeira (Figura 3). Seus esporos ubíquos, transportados pelo ar, são frequentemente incômodos contaminadores de culturas de bactérias e de células de mamíferos. De fato, foi um desses contaminadores numa cultura de estafilococos que eventualmente levou a descoberta da penicilina.

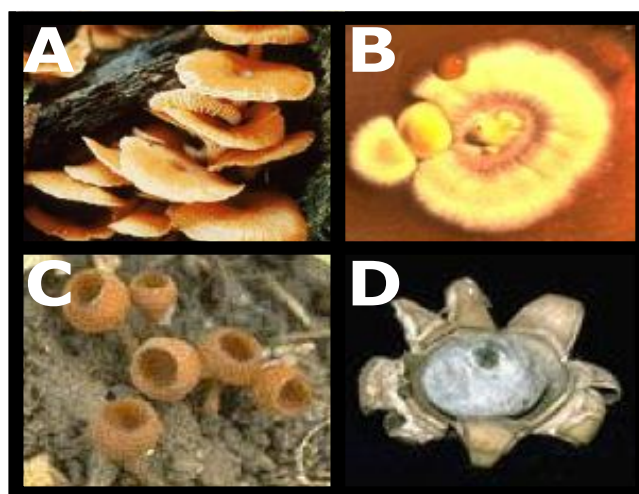


Fig . 3. Localização do fungos . **(A)** crescimento em madeira **(B)** crescimento em massa de água **(C)** crescimento em solo **(D)** crescimento em restos de vegetais .

6.1 ESTRUTURA E CRESCIMENTO

6.1.1 Bolores

O principal elemento da forma vegetativa ou de crescimento de um bolor é a hifa (do grego hyphe= teia), uma estrutura tubular ramificada com cerca de 2 a 10 μm de diâmetro, isto é, muito maior do que as bactérias. À medida que uma colônia, ou talo, cresce, suas hifas formam uma massa de filamentos enovelados, chamadas micélio (do grego mykes= cogumelo).

As hifas crescem pelo alongamento de suas pontas (crescimento apical) e pela produção de ramificações laterais (Figura 4). As hifas que penetram no meio, onde absorvem

nutrientes, são coletivamente conhecidas como o micélio vegetativo, enquanto que aquelas que se projetam acima da superfície do meio constituem o micélio aéreo; como esse último, normalmente tem células reprodutivas ou esporos, é também chamado micélio reprodutivo.

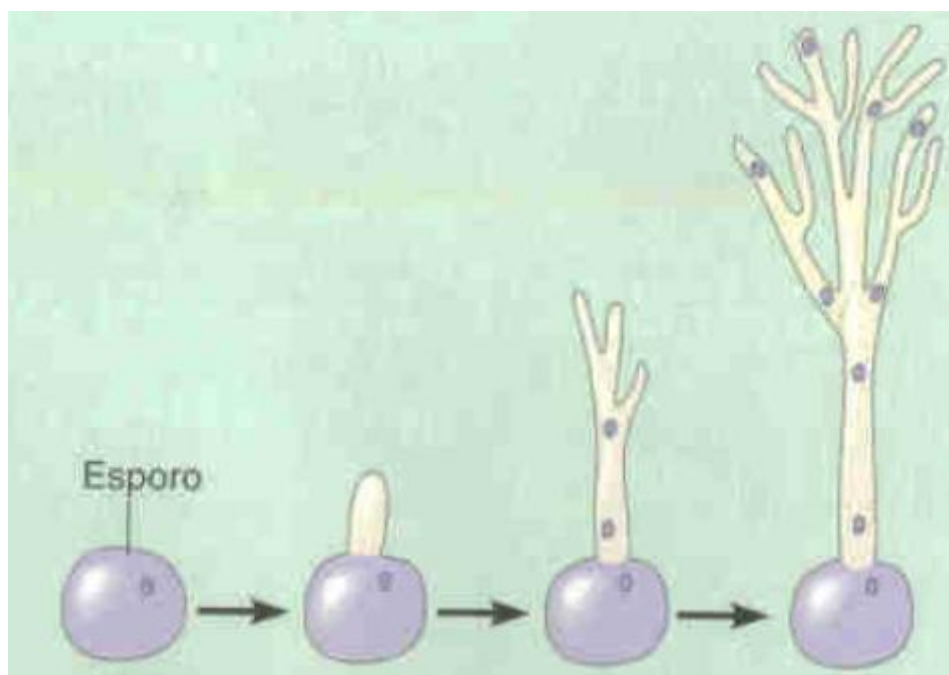


Fig . 4. Crescimento da hifa a partir de um esporo

A maioria das colônias cresce na superfície de meios líquidos ou sólidos como lençóis irregulares, secos e filamentosos. Em consequência ao enovelamento das hifas filamentosas, as colônias são mais resistentes do que as de bactérias. No centro das colônias micelianas as hifas são frequentemente necróticas em razão à falta de suprimento de nutrientes e de oxigênio e talvez ao acúmulo de ácidos orgânicos.

Na maioria das espécies as hifas são divididas por paredes transversas, chamados septos (do latim septum = cerca, divisão). Contudo, os septos possuem finos poros centrais (Figura 5).

6.1.2 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares ovais ou esféricos, geralmente de 3 a 4 μ de diâmetro. Às vezes, as leveduras e sua progênie aderem entre si e formam cadeias ou "pseudohifas".

107

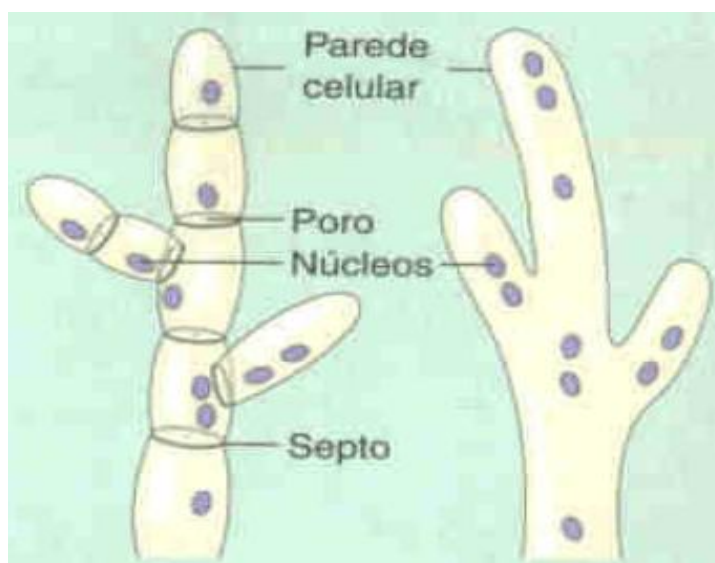


Fig . 5. A figura a esquerda representa uma espécie de hifa com paredes transversas chamadas septos, hifas septadas . E a figura a direita representa uma hifa cenocíticas com múltiplos núcleos .

6.2 CITOLOGIA



Tanto as leveduras e como os bolores assemelham-se a plantas superiores e a animais na complexidade anatômica de suas células. São eucarióticos, com vários cromossomos diferentes e uma membrana nuclear bem definida, possuindo mitocôndrias e um retículo endoplasmático. Ainda mais, suas membranas contêm esteróis, assemelhando-se, assim, a formas superiores e não a bactérias.

6.3 PAREDE CELULAR

A parede celular de um fungo, como a de bactérias, fica do lado imediatamente externo da membrana limitante do citoplasma e, em algumas leveduras, está envolvida por um polissacarídeo capsular externo. Contudo, ao contrário das bactérias, cujas paredes celulares frequentemente contêm unidades estruturais como se fossem tijolos, as paredes celulares dos fungos parecem ser entrelaçadas.

Do mesmo modo que nas bactérias, os polissacarídeos da parede celular dos fungos são sintetizados de vários nucleotídeos de açúcares. A quitina-sintetase está ligada a membrana celular. In vitro, ela necessita de um iniciador, que deve conter pelo menos seis ou sete resíduos conectados, como acontece na quitina. Um antibiótico nucleotídico a poloxina D é um inibidor seletivo da quitina-sintetase.

As paredes de várias leveduras contêm complexos de polissacarídeos com proteínas ricas em resíduos de cistina e a redução reversível de ligações tem sido implicada na formação de brotos. Em algumas leveduras, lipídios contendo fósforo e nitrogênio também são abundantes na parede (até 10% do peso seco).

6.4 REPRODUÇÃO



Além de crescerem por extensão apical e por ramificação, os fungos reproduzem-se por meio de ciclos sexuais e assexuais e também por um processo parassexual. A grande maioria dos fungos patogênicos para o homem não possui sexualidade.

6.5 ESTUDO VISUAL DOS FUNGOS

Os fungos podem ser observados como colônias em placas ou ao microscópio.

6.5.1 Estudo macroscópico

O estudo macroscópico deve ser baseado nas seguintes características:

- a) Velocidade de crescimento (lento, médio ou rápido).
- b) Aspecto cotonoso, algodinoso, lanoso, penugento, cremoso, céreas, membranosas, coriáceas, gomosas, aveludadas, granulosa ou terrosa.
- c) Cor.
- d) Verso e anverso.
- e) Pigmento da colônia.
- f) Pigmento difusível
- g) Consistência (duras, moles, friáveis e pastosas).
- h) Contorno arredondado, amebóide, rizóide e festonada.
- i) Bordos limitados ou não, elevados, franjados, adentram no meio.
- j) Topografia da superfície (dobras, sulcos elevados e, plana estriada).
- k) Presença de micélio aéreo ou profundo.



- l) Topografia do reverso.

6.5.2 Estudo microscópico

O estudo microscópico deve ser baseado nas seguintes características:

110

- a) Hifas tubulares, simples ou ramificadas, constituindo em seu conjunto o micélio.
- b) Hifas não septadas.
- c) Hifas septadas parciais, completas ou perfuradas.
- d) Hifas vegetativas e aéreas.
- e) Leveduras redondas ou ovais.



7 MICOLOGIA ESPECIAL E CLÍNICA

7.1 AGENTES DE MICOSES SUPERFICIAIS: MICROSPORUM SP., TRICHOPHYTON SP., EPIDERMOPHYTON SP.

111

Os fungos agentes de micoses superficiais são classificados como dermatófitos. Estes grupos de fungos são filamentosos e septados os quais invadem superfícies queratinizadas como, pele, pelos e unhas. São classificadas em três gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Esta doença fúngica é de caráter zoonótico.

A maioria das infecções em gatos é causada por *Microsporum*. As características clínicas da doença incluem lesão circular, dermatite miliar, pseudomicetomas, onicomiose e, raramente, lesões generalizadas (animais suprimidos).

Em cães geralmente as infecções fúngicas dermatófitas apresentam-se como áreas de alopecia, escamação e pelos quebrados rodeados por zonas inflamatórias. Menos frequente aparecem foliculite e onicomiose.

Em bovinos, o *Trichophyton* é o principal agente causador das dermatofitoses. As lesões comuns ocorrem na face, ao redor dos olhos, no pescoço e nos membros. As áreas afetadas ficam alopécicas, com crostas branco-acinzentadas.

Os equinos são acometidos pelos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, embora sejam relativamente raras as infecções. As lesões estão limitadas à região de encilhar ou à sela. A contaminação está distribuída aos utensílios contaminados de montaria.

Em suínos a dermatofitose é rara, mas quando acontece traz prejuízos econômicos.



7.2 AGENTES DE MICOSES SUBCUTÂNEAS: SPOROTHRIX SCHENCKII, HISTOPLASMA CAPSULATUM

112

As micoses subcutâneas resultam da invasão fúngica localizada na derme e no tecido subcutâneo, frequentemente associado à penetração de um corpo estranho. Os agentes causadores deste tipo de micose são fungos dimórficos. No ambiente estes fungos se comportam como filamentosos e no tecido animal se comporta como leveduriformes. No solo apresentam comportamento saprofítico e nos tecidos animais e no homem causam infecções oportunistas.

Sporothrix schenckii está amplamente distribuído no ambiente, sendo mais frequentes em regiões tropicais e subtropicais. As infecções são esporádicas e ocorrem em equinos, gatos e cães. Em equinos a doença mais comum é a esporotricose linfocutânea. Em gatos a esporotricose causa lesões nodulares na pele frequentemente nas extremidades dos membros, na cabeça e cauda. E, em cães a esporotricose manifestam-se como lesões cutâneas múltiplas, ulceradas e crostosas, com alopecias sobre a cabeça e tronco.

Outra espécie fúngica de importância veterinária é o *Histoplasma capsulatum*. Existem três variantes desta espécie que podem causar histoplasmose em equinos, cães e gatos. A linfangite epizoótica é uma doença contagiosa entre os equinos e a prevalência é alta quando os animais estão em contato direto.

Na histoplasmose canina e felina a maioria das infecções são assintomáticas. Lesões granulomatosas podem ser encontradas nos pulmões após inalação dos microconídeos, tanto em cães como nos gatos.

7.3 AGENTES DE MICOSES SISTÊMICAS: COCCIDIOIDES IMMITIS, CRIPTOCOCCUS NEOFORMANS, ASPERGILLUS SPP.

As micoses sistêmicas geralmente originam-se no trato respiratório, ou no trato digestivo. Normalmente ocorre após fixação e disseminação de fungos saprofíticos. Os fatores que predispõem a infecção incluem alterações na microbiota natural (após tratamento prolongado com antimicrobiano, imunossupressão, infecção viral e altas doses de esporos infectantes).

O fungo geofílico *Coccidioides immitis* pode infectar muitas espécies de animais, inclusive o homem. A ocorrência de *Coccidioides immitis* está limitada a regiões áridas. A espécie mais afetada é o cão, mas a doença já foi descrita em equinos. Em cães a coccidioidomicose pulmonar é moderada com sinais inespecíficos, incluindo tosse, febre e inapetência (podem se curar espontaneamente). Em equinos a coccidioidomicose não é inespecífica e inclui febre intermitente, dor abdominal, perda de peso, evidência de envolvimento pulmonar e musculoesquelético. A tosse ocorre em 60% dos casos, na qual pode ser o único sinal presente.

Embora o gênero *Cryptococcus* contenha mais de 37 espécies, apenas a espécie *Cryptococcus neoformans* é causa de doenças oportunistas. É um fungo leveduriforme que causa infecções em animais domésticos. *Cryptococcus neoformans* já foi isolado de excrementos de pombos e outras aves.

Em cães a doença é disseminada com sinais neurológicos e oculares. Em gatos surgem complicações respiratórias, cutâneas, nervosas e oculares. Em bovinos há quadros de mastite e granuloma nasal. E, em equinos os sinais de infecção com *Cryptococcus neoformans* são: granuloma nasal, sinusite, lesões cutâneas, pneumonia e meningite.

As espécies de *Aspergillus* estão amplamente distribuídas entre os fungos filamentosos saprofíticos. Embora haja mais de 190 espécies, somente um número limitado tem sido implicado com infecções oportunistas. *Aspergillus fumigatus* é a espécie mais envolvida em invasão tecidual. Outras espécies como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus deflexus*, *Aspergillus nidulus*, *Aspergillus flavipes* estão envolvidas com infecções invasivas.

A aspergilose pode ocorrer em aves adultas e os sinais são variáveis, incluindo dispneia e emagrecimento. Em cães jovens ocorre a aspergilose nasal canina, que inclui



descarga nasal sanguinolenta profunda e persistente, com espirros e epistaxe. Em bovinos a aspergilose pode causar aborto em vacas.

7.4 MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES

114

As micotoxinas são metabólitos secundários de certas espécies de fungos. As micotoxicoses constituem um grupo importante de doenças resultantes da ingestão de toxinas fúngicas (micotoxinas) pré-formadas em alimentos ou em grãos estocados.

Embora as reações de hipersensibilidade às infecções fúngicas sejam raras em animais domésticos, podem estar associadas às doenças pulmonares crônicas em bovinos e equinos.



8 REQUISITOS BÁSICOS PARA INSTALAÇÃO E FUNCIONAMENTO DE UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

115

Os requisitos básicos para um laboratório de microbiologia visam elaborar e viabilizar boas práticas, normas para coleta, conservação e transporte de material de interesse clínico. Além de estabelecer e executar rotinas microbiológicas, dentro dos padrões técnico-científicos vigentes, que permitam o isolamento e identificação dos principais agentes infecciosos de importância clínica, por gênero e, se possível, por espécie.

O laboratório ainda precisa determinar a sensibilidade às drogas antimicrobianas, efetuar o controle de qualidade de suas atividades e dos processos de esterilização. E ainda divulgar e implementar normas de biossegurança.

Os equipamentos mínimos para funcionamento de um laboratório de microbiologia consistem em: estufa bacteriológica, forno de Pasteur, autoclave, microscópio binocular, centrífuga de baixa rotação, homogeneizador, banho-maria de pequena dimensão, destilador para água, balança para tarar tubos, balança comum com uma ou duas casas decimais, bico de Bunsen, geladeira e capela de fluxo laminar.

Além desses equipamentos o laboratório poderá contar com outros aparelhos, como: microscópio estereoscópico, congelador (-20°C ou -70°C), bomba de vácuo para filtração com membranas, potenciômetro e balança analítica.

O trabalho laboratorial executado de forma adequada e bem-planejado previne a exposição indevida a agentes considerados de risco à saúde e sem dúvida evita acidentes. Manipulação de agentes considerados contaminantes é regida por leis federais, estaduais e municipais. A manipulação, armazenamento e transporte de agentes de risco requerem licenças especiais que são controladas por órgãos federais. O Regulamento Técnico de Funcionamento do Laboratório Clínico foi elaborado a partir de trabalho conjunto de técnicos da ANVISA, com o grupo de trabalho instituído pela Portaria nº. 864, de 30 de setembro 2003. Este grupo de trabalho foi composto por técnicos da ANVISA, secretaria de atenção à saúde (SAS/MS), secretaria de vigilância a saúde (SVS/MS), vigilâncias sanitárias estaduais,



laboratório de saúde pública, sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial, sociedade brasileira de análises clínicas, provedores de ensaio de proficiência e um consultor técnico com experiência na área.

A proposta de Regulamento Técnico elaborado pelo grupo de trabalho foi publicada como consulta pública nº. 50 em 6 de agosto de 2004. As sugestões recebidas foram consolidadas pelos técnicos da gerência geral de tecnologia em serviços de saúde (GGTES/ANVISA), pelos componentes do grupo de trabalho juntamente com o consultor.

116

Há necessidade que os profissionais sejam previamente conscientizados sobre os riscos, assim como das medidas de controle e proteção adotadas para a manutenção e respeito das normas de segurança. E o cuidado tomado pelos administradores deve ser maior e mais rigoroso, para prevenir ou reduzir o risco de desenvolver alguma doença profissional por exposição. A organização das atividades e o respeito às normas de segurança é um aspecto fundamental para segurança de todos os usuários e para a garantia dos resultados precisos e da qualidade. As medidas de controle e proteção laboratorial são divididas em: medidas coletivas (descarte e remoção de lixo, extintores de incêndio, lavador de olhos e sinalização). E medidas individuais que se referem ao emprego de equipamentos de proteção individual - EPIs (luvas, máscara, avental de manga comprida, pró-pés e óculos de proteção). É difícil quantificar o risco no trabalho em laboratórios, com relação aos agentes infecciosos. Tem-se por base, porém, que o risco individual aumenta com a frequência e com os níveis de contato com o agente infeccioso.

O primeiro cuidado a ser tomado no laboratório que trabalha com espécimes clínicos é com o risco de exposição à infecção. Por outro lado, deve-se considerar que os riscos são influenciados por uma relação variável entre o agente infectante, o hospedeiro e a atividade desempenhada. Fatores aplicáveis ao agente incluem a virulência, a carga infectante, o ciclo e a toxigenicidade. As principais variáveis que influem no risco do hospedeiro são: idade, sexo, raça, gravidez, uso de antimicrobianos, imunidade (vacinação prévia), e o uso de drogas imunossupressoras.

Finalmente, a natureza da atividade laboratorial (por exemplo: diagnóstico, produção e pesquisa) pode afetar significativamente o risco pessoal em razão ao tipo, quantidade e concentração dos agentes empregados, a manipulação dos agentes e a eficácia primária e secundária dos equipamentos de proteção e práticas de laboratório.



As regras básicas de segurança em laboratório serão descritas na Figura 1 abaixo. Estes itens são inegociáveis e devem ser respeitados rigorosamente sem exceção.

Uma organização de gerenciamento das boas práticas, ou melhor, a garantia da qualidade dentro do laboratório se faz necessário para ajudar a manter a ordem minimizando os riscos de contaminação, além de elaborar planos de gerenciamento de rejeitos químicos. Esta organização deve estar ligada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), segundo a Lei 8.974 de 05 e janeiro de 1995.

117

A CTNBio regulamenta os procedimentos de segurança por meio de instruções normativas, conforme o grau de periculosidade, bem como estabelece os níveis de concentração e de tratamento dos resíduos, a liberação planejada para o ambiente, transporte, importação, comercialização de organismos geneticamente modificados e intervenções genéticas em humanos e animais.

As práticas de biossegurança baseiam-se na necessidade de proteção ao operador, seus auxiliares e a comunidade local contra riscos que possam prejudicar a saúde. Embasado nestes itens a CTNBio se responsabiliza por todos procedimentos institucionais, em que inspecionará e fornecerá licenças para áreas de nível 1. E as solicitações de licenças para nível 2, 3 e 4 serão encaminhadas pela Comissão Interna de Biossegurança para CTNBio e serão sujeitas as inspeções da CTNBio. As áreas de nível de laboratório estão classificadas no sistema de grupo de risco dos micro-organismos, e está baseada na potência do micro-organismo de causar doença em seres humanos e contaminar o ambiente. Os micro-organismos se dividem em grupos quanto a patogenicidade para o homem, a virulência, o modo de transmissão, a endemicidade e a existência de profilaxia e/ou de terapêutica eficazes. Segundo a Resolução n. 1 de 1998 do Conselho Nacional de Saúde, Cap. X art. 64, os micro-organismos podem então ser classificados em classes de risco de 1 a 4 por ordem crescente:

Lave sempre as mãos, antes de colocar as luvas e após sua retirada.	
Use sempre calçados fechados. Não use sandálias nem chinelos.	
Mantenha as unhas cortadas.	
Não use anéis, pulseiras, relógios e cordões longos.	
Não fume.	
Não coloque objetos na boca.	
Não penteie cabelos e nem aplique cosméticos. Cabelos compridos devem estar presos durante o trabalho.	
Use sempre luvas quando estiver manuseando produtos químicos, radioativos ou biológicos.	
Não pipete com a boca. Use pipetadores automáticos ou pêras de borracha.	
Não utilize geladeira, freezer, estufa ou microondas do laboratório para guardar e/ou esquentar alimentos.	
Não coma. Não beba. Não mastigue chicletes.	
Não toque em maçanetas, interruptores ou telefones usando luvas.	
Use sempre avental de mangas compridas, devidamente abotoado. O uso do avental deve ser restrito ao laboratório.	

Fig . 1. Boas práticas em laboratório .
Fonte :[www .upload .wikimedia .org/](http://www.upload.wikimedia.org/)

a) Classe 1 - onde se classificam os agentes que não apresentam riscos para o manipulador, nem para a comunidade. Ex.: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, vírus adenoassociados.



b) Classe 2 – onde se classifica os agentes que apresentam risco moderado para o manipulador, fraco para a comunidade e há sempre um tratamento preventivo. Ex.: Clostridium tetani, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus; Epstein-Barr Vírus - EBV, Plasmodium sp, Schistosoma sp.

c) Classe 3 – onde se classificam os agentes que apresentam risco grave para o manipulador e moderado para a comunidade, sendo as lesões ou sinais clínicos graves e nem sempre há tratamento. Ex.: Bacillus anthracis, Brucella sp, Chlamydia psittaci, Mycobacterium tuberculosis; flavivírus; Blastomyces dermatitidis, Histoplasma; Echinococcus sp, Leishmania sp, Toxoplasma gondii, Trypanosoma SP.

d) Classe 4 - onde se classificam os agentes que apresentam risco grave para o manipulador e para a comunidade, não existe tratamento e os riscos em caso de propagação são bastante graves. Ex.: arenavírus, certos arbovírus, príons, e Coxiella burnetii.

As normas de segurança são embasadas nos perigos e riscos que os usuários podem sofrer durante o trabalho. Os perigos são divididos em risco físico, químico, biológico, ambiental e ergonômico.

Consideram-se agentes de riscos físicos equipamentos que geram: ruídos, vibrações, pressões anormais, radiações ionizantes, radiações não-ionizantes, ultrassom, materiais cortantes, materiais pontiagudos, calor, frio, chamas, umidade, ultravioleta, infravermelha, raios laser, ondas de rádio e campo elétrico.

São considerados agentes de risco químico todos os produtos, que possam penetrar no organismo pela via respiratória nas formas de poeiras, fumaças (incluindo cigarro), névoas, neblinas, gases e vapores, ou que possam penetrar no organismo por contato ou por absorção. Por meio da pele ou ingestão nas formas de substâncias tóxicas, substâncias explosivas, irritantes, oxidantes, corrosivas, voláteis, inflamáveis e cancerígenas.

Os agentes de risco biológico incluem as bactérias, fungos, parasitos, vírus, entre outros. Os agentes biológicos apresentam um risco real ou potencial para o homem e para o meio ambiente. Por essa razão, é fundamental que se prepare uma estrutura adequada para prevenção dos riscos encontrados nos laboratórios.



Consideram-se agentes de risco ambiental os equipamentos de vidro, instrumentos perfurantes, equipamentos com gás comprimido, equipamentos de trituração, incêndio, explosão, eletricidade. E os agentes de risco ergonômicos são os assentos, a altura das bancadas entre outros que possam provocar lesões por má postura.

Todos os perigos e riscos devem ser conhecidos pelo manipulador, bem como o respeito das regras gerais de biossegurança. Todo trabalho executado dentro ou fora do expediente, que não tiver o acompanhamento do interessado, deverá ter uma ficha ao lado, com nome, horário, reagentes envolvidos e medidas a serem adotadas em casos de acidentes.

Durante o período de trabalho, que envolve certo grau de periculosidade, exige a obrigatoriedade de utilização de indumentária adequada (luvas, óculos, máscaras, pinças e aventais). E ainda o laboratório deverá possuir os seguintes equipamentos - máscara contra gases, um chuveiro em funcionamento normal e caixas de primeiros socorros.

Todo e qualquer material que venha a prejudicar ou colocar em perigo a vida, ou saúde dos usuários do ambiente, ou que venha causar incômodo deverão ser discutidos ou comunicado ao responsável do laboratório, o qual sugerirá e/ou autorizará o evento sob certas condições como avisos, precauções e horário que deve ser feito.

O manuseio de produtos não deve ser feito sem estar usando o equipamento de segurança adequado, não faça improvisações. E todo e qualquer acidente ou irregularidade deve ser comunicado ao seu superior e a segurança.

Todo profissional deve ser e deve estar bem-informado no que se refere à maneira como a contaminação pode ocorrer, o que implica no conhecimento amplo do micro-organismo ou vetor com o qual se trabalha.

Os equipamentos de segurança relacionados a seguir devem estar ao alcance de todos os funcionários, como: extintores de incêndio (pó químico e CO₂), chuveiros de emergência, lavador de olhos, aventais e luvas de PVC contra produtos corrosivos, máscaras e óculos de segurança, luvas de amianto ou raspa de couro, máscaras contra gases e máscara contra pó.

Agora, serão relacionadas às rotinas que auxiliam na otimização do serviço dos usuários:

- a) Manter as bancadas sempre limpas e livres de materiais estranhos ao trabalho.



- b) Fazer uma limpeza prévia, com o solvente adequado, ao esvaziar um frasco de reagente antes de colocá-lo para lavagem.
- c) Rotular imediatamente qualquer reagente ou solução preparada, utilizando etiquetas adequadas.
- d) Retirar da bancada os materiais, as amostras e os reagentes após o término do trabalho.
- e) Jogar em lixos específicos papéis e outros materiais dispensáveis que não ofereçam riscos.
- f) Usar pinças e materiais de tamanho adequado e em perfeito estado de conservação.
- g) Limpar, imediatamente qualquer derramamento de produtos e reagentes protegendo-se se necessário.
- h) Tomar as seguintes providências em caso de derramamento de líquidos inflamáveis, produtos tóxicos, biológicos, tóxicos e/ou corrosivos - interromper o trabalho, advertir as pessoas próximas sobre o ocorrido, solicitar ou efetuar a limpeza imediata, verificar e corrigir a causa do problema.

O processo de desinfecção é definido como a eliminação parcial dos micro-organismos presentes em um determinado ambiente. Os métodos de desinfecção visam principalmente destruir as formas microbianas patogênicas ao homem, por meio da utilização de um agente químico.

O grau de eficiência de cada um dos agentes químicos é dependente da concentração ou intensidade, das condições do ambiente e do estado das células.

A esterilização é um processo de eliminação completa de todas as formas vivas de um material ou ambiente. Por meio da esterilização dos meios de cultura e do instrumental usado nos trabalhos, o isolamento e a manutenção das culturas puras de micro-organismos se tornou possível.

A esterilização pode ser feita por diferentes processos que emprega agentes físicos e/ou agentes químicos. Normalmente são utilizadas embalagens para acondicionar os materiais durante a esterilização para evitar contaminação posterior.

A eficácia da esterilização é monitorada por intermédio do emprego de indicadores. A maioria dos protocolos requer treinamento especial para adequada preparação dos instrumentos



com remoção de toda matéria orgânica, o correto preenchimento da câmara e operação do ciclo de esterilização.

Os métodos mais utilizados são: calor úmido, que provoca a inativação ou coagulação das proteínas dos micro-organismos (autoclavagem e tindalização) e o calor seco, que provoca a eliminação dos micro-organismos pela oxidação e queima das proteínas (forno de esterilização - forno Pasteur - e chama).

Em microbiologia a autoclavagem é utilizada na esterilização de material usado na preparação de meios de cultura e esterilização em geral. O vapor d'água sob pressão e uma temperatura superior a 100°C destroem os micro-organismos e seus esporos, quando produzidos, em um curto espaço de tempo.

A tindalização é um processo de esterilização fracionada, para substâncias que não podem ser aquecidas acima de 100°C. O processo consiste em aquecer o material, três vezes consecutivas, em intervalos de 24 horas.

O forno Pasteur é um processo que requer temperatura elevada por longos períodos.

Outros métodos de esterilização são utilizados, tais como:

a) Radiação, pela luz ultravioleta (<330nm de comprimento de onda). Este método é utilizado em câmaras de segurança microbiológica em laboratórios. Ou também, pela radiação ionizante, por elétrons do cobalto-60 e ainda por um acelerador linear para a esterilização de artigos plásticos descartáveis sensíveis ao calor.

b) Filtração, pela utilização de diferentes tipos de filtros, incluindo asbesto, cerâmica e vidro prensado. Atualmente são mais utilizados os filtros de membrana de nitrocelulose que são utilizadas para a esterilização de líquidos sensíveis ao calor, incluindo soro e antibióticos.

c) Substâncias Químicas, o gás formaldeído, a formalina líquida, o glutaraldeído e o óxido de etileno que são esporicidas e viricidas e, por isto, conseguem esterilizar materiais. No entanto, estas substâncias são tóxicas e irritantes e seu uso é restrito.

A Figura 2 mostra algumas sinalizações de segurança



Fig . 2. Sinalizações importantes para orientação



9 COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAIS CLÍNICOS

É possível que a coleta apropriada de uma amostra para cultivo seja a etapa mais importante na confirmação final de que um micro-organismo é responsável pelo processo de enfermidade infecciosa. Assim, todo resultado liberado pelo laboratório de microbiologia é consequência da qualidade da amostra recebida.

124

O material colhido deve ser representativo do processo infeccioso investigado, devendo ser eleito o melhor sítio da lesão, evitando contaminação com as áreas adjacentes. Deve estabelecer-se o momento ótimo para a coleta de amostras com o objetivo de contar com a melhor possibilidade de isolar micro-organismo em questão. Deve obter-se quantidade suficiente de material para permitir uma completa análise microbiológica. Caso a quantidade seja pequena, priorizar os exames.

Portanto, coleta inadequada pode ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o desenvolvimento da flora contaminante, induzindo a um tratamento não apropriado. Quem colhe o material deve ser devidamente treinado e periodicamente reciclado nesta atividade. Deve saber que o material deverá ser destinado, o mais brevemente possível, ao laboratório para conhecer ou obter instruções sobre conservação e/ou transporte do material, caso este não possa ser realizado imediatamente.

Algumas considerações são fundamentais na coleta de amostras, como: colher amostras antes da antibioticoterapia (sempre que possível), instruir claramente o paciente sobre o procedimento, observar a assepsia na coleta de todos os materiais clínicos. O pedido do exame deve conter, além da identificação do paciente, dados como idade, doença de base, indicação de antibióticos, data e hora da coleta e as amostras devem ser coletadas em recipientes esterilizados.

Os regulamentos sobre o transporte de agentes biológicos são definidos de forma a assegurar proteção ao público e aos trabalhadores da rede de transporte à exposição a qualquer agente que possa estar presente na embalagem.

As substâncias infecciosas e materiais orgânicos para diagnóstico precisam estar



embalados num recipiente impermeável à água (recipiente primário), dentro do qual se encontra a amostra. Este recipiente primário deverá estar dentro de um segundo recipiente impermeável, de preferência de metal, contendo quantidade suficiente de material absorvente entre suas paredes. Os recipientes primários e secundários deverão conter uma etiqueta ou rótulo com a identificação da amostra e deverão ser introduzidos em uma embalagem externa de envio que tem a finalidade de proteção contra fatores externos. A embalagem externa deve estar rotulada adequadamente, com o símbolo de risco biológico e outro rótulo com o endereço da instituição.

Para evitar possíveis acidentes durante o transporte de amostra biológica dentro dos setores do laboratório é necessário transportar em recipiente impermeável, resistente à queda e o transporte de vidraria deve ser feito com o uso de carrinhos para frascos de grande porte e bandejas para frascos de pequeno porte.

O objetivo primário no transporte de amostras para diagnóstico seja dentro de um hospital ou clínica, ou externamente, por correio, para um laboratório de referência distante consiste em manter a amostra o mais próximo possível de seu estado original (Tabela 1), ou seja, com deterioração mínima, e minimizar os riscos para os transportadores das amostras. As amostras devem estar acondicionadas de forma que resistam as condições ambientais.

Se for previsto um atraso prolongado antes que a amostra possa ser processada, é preferível congelar a amostra a 70°C negativos. No entanto, se o período de estocagem for breve pode ser utilizado um congelador à 20°C negativos.

Para a maioria das amostras pode ser utilizado um meio de manutenção ou transporte, que consiste essencialmente de uma solução tampão isento de carboidratos, peptonas e outros nutrientes e fatores de crescimento, formulado para conservar a viabilidade das bactérias, durante o transporte sem permitir a multiplicação das mesmas.

Tab. 1. Tempo crítico para entrega da amostra ao laboratório e meios de transporte

AMOSTRA	TEMPO CRÍTICO	FRASCOS E MEIOS DE TRANSPORTE
Liquor	Imediatamente (não refrigerar)	Tubo seco estéril
Líquido pleural	Imediatamente (não refrigerar)	Tubo seco estéril
Swab	Imediatamente (não refrigerar)	Tubo seco estéril ou meio semisólido (Stuart, Amies)
Suspeita de Anaeróbios	30 minutos	Meio de transporte apropriado. Evitar o transporte em seringa com agulha.
Feridas e tecidos	30 minutos ou até 12 horas (meio de transporte)	Meio de transporte apropriado
Hemocultura	30 minutos (não refrigerar)	Frascos com meios de cultura (rotina manual ou automatizada).
Trato respiratório	30 minutos	Tubo seco estéril
Trato gastrointestinal	1 hora	Tubo seco estéril
Urina	1 hora ou refrigerada até 24 horas	Pote estéril
Fezes	12 horas se em meio de transporte	Cary Blair, meio modificado para transporte de fezes, com pH 8,4



10 RECEPÇÃO DE AMOSTRAS E OBSERVAÇÕES PRELIMINARES

Os laboratórios de microbiologia precisam ter uma área específica destinada e reservada para a recepção de amostras para cultivo. E o manipulador deve usar os equipamentos de proteção individual apropriado para manipulação da amostra.

127

O processamento das amostras inclui: o ingresso dos dados em um livro de registro e/ou terminal de computador, exame visual e determinação de todos os critérios para aceitação da amostra e exame microscópico de montagens úmidas ou de esfregaços corados para o diagnóstico presuntivo.

Em todos os laboratórios devem ser estabelecidos critérios para a rejeição de amostras não adequadas para o cultivo. Devem ser controlados: formulário do pedido, etiqueta da amostra (nome, número de identificação, idade, sexo, domicílio, nome do médico, data e hora), origem da amostra e procedimentos solicitados. A história clínica do paciente também é útil, para saber se o exame solicitado é compatível com o diagnóstico.

Sempre que uma amostra for rejeitada, a pessoa que o enviou precisa ser comunicada para explicar a natureza do problema. Como regra empírica, deve-se fazer o possível para não recusar amostras de difícil coleta (lavados brônquicos, líquidos cefalorraquidianos, entre outros).



11 PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

O estudo dos micro-organismos, sua identificação e avaliação de suas populações nos diferentes materiais e ambientes requerem seu cultivo nas condições do laboratório.

128

Para preparar um meio de cultura é necessário conhecer as exigências nutricionais dos micro-organismos. São considerados componentes essenciais do meio de cultura: fonte de energia, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fatores de crescimento, fonte de minerais e água.

Além dos nutrientes o meio de cultura deve suprir algumas condições ambientais, como: pH, atmosfera (presença de O_2 , CO_2), pressão osmótica.

O meio de cultura pode ser classificado quanto à origem (naturais e artificiais), quanto à composição (complexos e sintéticos), quanto ao estado físico (sólido, semissólido e líquidos) e quanto à finalidade (enriquecidos, seletivos, indicadores ou diferenciais, dosagem, transporte, estocagem ou manutenção).

A obtenção de culturas puras (ou axênicas) a partir de culturas mistas, também denominadas isolamento é o primeiro passo para que se possa realizar o diagnóstico dos micro-organismos. Esta técnica também é necessária na indústria para a fabricação de antibióticos.

O procedimento mais prático para a obtenção de colônias isoladas consiste na semeadura em superfície, no meio de cultura até o esgotamento do inócuo. Desta forma, o inócuo é diluído progressivamente de modo que se obtêm ao final, células isoladas que darão origem a colônias puras (Figura 3).



Fig . 3. Isolamento de colônias de bactérias em meio sólido . Fonte : [www .windows .ucar .edu/](http://www.windows.ucar.edu/)



12 EXAMES MICROSCÓPICOS

O microscópio rotineiramente utilizado em laboratórios de microbiologia é o microscópio óptico composto. Seu princípio de funcionamento baseia-se no aumento da imagem por um conjunto de lentes convergente, associado a uma forte iluminação do campo de observação, isto fornece uma imagem translúcida dos micro-organismos.

Com o passar dos anos a microscopia sofreu algumas modificações, tanto no microscópio como nas técnicas de preparo das lâminas, como por exemplo: microscopia de campo escuro, microscopia de luz ultravioleta (fluorescência e imunofluorescência), microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica.



13 COLORAÇÃO

A perfeita visualização dos micro-organismos e/ou das suas estruturas só é possível se, além da escolha do tipo mais eficiente de microscopia, a preparação estiver adequada. A escolha do tipo de preparação depende da informação desejada e do micro-organismo a ser avaliado. Duas técnicas são empregadas: a fresco direto (sem coloração) e fixado (corado).

De maneira geral, as bactérias têm afinidade por um grande número de corantes, principalmente aqueles do grupo dos derivados básicos da anilina (azul de metileno, cristal violeta e fucsina básica). Dentre todos os métodos existentes, aqueles que têm mais importância dentro do laboratório de microbiologia são os métodos de Gram e de Ziehl-Neelsen.

131

13.1A FRESCO

As preparações deste tipo permitem o exame dos micro-organismos nas condições normais de vida e são perfeitamente utilizadas nas seguintes situações: quando a morfologia fica distorcida em razão aos processos de fixação e coloração, durante a verificação da motilidade, durante os processos fisiológicos (divisão celular, produção de esporos) e durante a observação de corpúsculos (vacúolos e material graxo).

13.1.1 Entre lâmina e lamínula

13.1.1.1 Salina

Esta técnica pode ser usada para avaliar bactérias cultivadas em meio líquido e fungos. A técnica consiste em gotear com o auxílio de uma alça de platina, esterilizada, no



centro da lâmina, uma gotícula da cultura a ser investigada. Ou um fragmento da cultura em meio sólido do fungo a ser analisado. Em seguida cobrir com lamínula e examinar ao microscópio.

13.1.1.2 Hidróxido de Potássio (KOH)

132

Esta técnica é usada para pesquisa de fungos, proveniente de material biológico como muco, restos celulares, pêlos e unhas. A técnica consiste em colocar uma pequena amostra do material biológico a ser pesquisado no centro da lâmina; suspender o material com uma ou duas gotas de KOH, cobrir com uma lamínula e aguardar 30 minutos ou aquecer ligeiramente a lâmina para acelerar o clareamento.

13.1.1.3 Exame de campo escuro

Esta técnica é empregada para observar a motilidade de bactérias dificilmente observadas em microscopia a fresco com salina. A técnica consiste em atritar as bordas da lesão suspeita com um swab ou alça bacteriológica, colher o exsudato com a própria alça ou fazer um imprint com a lâmina e cobrir com a lamínula (utilizar uma gota de salina). Realizar a pesquisa rapidamente. Ou, se o material for líquido (urina recém-emitida), centrifugar e examinar o sedimento. A microscopia em campo escuro é realizada colocando-se óleo de imersão.

13.1.1.4 Tinta da china (nanquim)

Esta técnica é empregada para pesquisa de fungos em líquido cefalorraquidiano e outros materiais, permitindo destacar a cápsula deste fungo contra um fundo negro. A técnica consiste em pegar o líquido cefalorraquidiano sedimentado ou uma amostra do meio de cultura



líquido e ressuspender em uma gota de tinta da china, fazendo um filme bem delgado entre lâmina e lamínula.

13.2 FIXADOS E CORADOS

133

As preparações fixadas e coradas são usadas para verificar as características morfológicas, sendo bastante utilizadas na identificação das bactérias, pois tornam mais fácil a visualização das formas e permitem a verificação do comportamento tintorial do micro-organismo em relação às colorações diferenciais.

13.2.1 Coloração azul de metileno de loeffler

Esta técnica é utilizada principalmente na avaliação da morfologia de bactérias em esfregaços de líquido cefalorraquidiano, pois os danos causados as células são menores em consequência ao menor número de manipulações. Esta técnica consiste em colocar o corante sobre o esfregaço previamente fixado, deixando-se corar por 3 a 5 minutos. Em seguida escorre-se o corante, lava-se em água corrente e deixa-se secar para posterior observação ao microscópio.

13.2.2 Coloração de wright giemsa

Esta técnica é utilizada para corar os elementos celulares em esfregaços sanguíneos, para demonstração de micro-organismos intracelulares e também para demonstrar inclusões intracelulares em esfregaços diretos, de pele ou mucosas. Esta técnica consiste em colocar o corante sobre o esfregaço previamente fixado, deixando-se corar por 3 a 5 minutos. Em seguida escorre-se o corante, lava-se em água corrente e deixa-se secar para posterior observação ao



microscópio.

13.2.3 Coloração de gram

134

A coloração de Gram, descoberta a pouco mais de 100 anos por Hans Christian Joaquim Gram é utilizada com muita frequência para o exame microscópico direto de amostras e subcultivos, para demonstrar as propriedades tintoriais de todos os tipos de bactérias.

As bactérias coradas por esta técnica pertencem a duas categorias distintas: Gram-positivas e Gram-negativas. A diferença básica entre os dois grupos é resultado da estrutura de suas paredes celulares. A técnica consiste na aplicação de um corante básico, o cristal violeta e uma solução de iodo e iodeto de potássio (lugol), em um esfregaço previamente fixado na chama. A preparação é, então, tratada com um solvente orgânico (álcool ou acetona), com o objetivo de descolorir as células.

As bactérias Gram-positivas retêm o corante ou o complexo cristal violeta e iodo após a descoloração e aparecem em azul escuro. As bactérias Gram-negativas não são capazes de reter o complexo cristal violeta e iodo após a descoloração e são contra coradas com um segundo corante (fucsina ou safranina), chamado corante de contraste e adquirem a coloração vermelha.

13.2.4 Coloração de Ziehl-Neelsen

Esta técnica é utilizada para corar bacilos álcool-ácido resistente (BAAR). Estes bacilos são assim denominados porque possui um envoltório céreo que é resistente a coloração. Para o corante penetrar na célula é necessário calor ou detergente. Uma vez coradas as bactérias álcool-ácido resistentes resistem à descoloração, enquanto outras bactérias descoram com o álcool-ácido. A técnica consiste em corar o esfregaço previamente fixado com carbolfucsina (aquecer três vezes), descorar com álcool-ácido a 3% e contra corar com o azul de metileno.



14 CONTROLE DE QUALIDADE

Em sentido estrito, o controle de qualidade consistia em uma avaliação contínua e sistemática do trabalho em andamento, para assegurar que o produto final se encontrava em grau aceitável. Hoje, o controle de qualidade deve continuar como antes, garantindo a qualidade do trabalho realizado. No entanto, os diretores e supervisores do laboratório devem compreender que o controle de qualidade é apenas uma das muitas facetas das certificações de qualidade do manejo de risco.



15 BIOSSEGURANÇA

136

Biossegurança pode ser definida como o conjunto de medidas voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

A segurança é antes de tudo um direito e uma obrigação individual. A Biossegurança laboratorial deve ser sustentada pelos planejamentos prévios das atividades, avaliação dos riscos e adequação das instalações.

A utilização de normas de segurança requer atitude, bom senso e boa conduta do profissional. Desta forma a prevenção contra acidentes assegura os resultados e a integridade das pessoas, instalações e equipamentos.

Em um laboratório todos fazem parte de uma equipe, e a segurança depende da ação dessa equipe, para avaliar os prováveis riscos e determinar as condições de segurança necessárias para o trabalho.

Os ambientes voltados à prática de atividades relacionadas à saúde podem não parecer, para muitos, mas também é um local de trabalho que não está livre de acidentes.

O profissional de saúde, como também, pacientes, visitantes, pessoal de apoio (limpeza e manutenção) e administração, estão inseridos num grupo, que diariamente está em contato direto com elementos geradores de riscos em potencial, tais como equipamentos e substâncias variadas, utilizadas em processos de limpeza e esterilização.

Quando não são orientados devidamente, no tocante à segurança, tornam-se presas fáceis desses elementos, que causam danos aos seus corpos, muitas vezes de forma irreversível.



REFERÊNCIAS

BIER, O. **Morfologia Bacteriana**. In: Microbiologia e Imunologia. V. 1, 30 ed, p. 17-42. São Paulo, Comp. Melhoramentos de São Paulo, 1994.

BURNETT, G. e cols. **Fisiologia**. In: Microbiologia oral e doenças infecciosas. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 1978. Cap.7, p.74-86.

DE DAVIS, B., et al. **Estrutura e classificação das bactérias**. In: Microbiologia: fisiologia bacteriana. V. 1, 1. ed., c. 2, p. 21-54. São Paulo, EDART – São Paulo, 1973.

FROBISHER, M. et al. **Cultyvo y crecimiento de las bactérias**. In: - Microbiologia. 5. ed. Bcelona, Salvat Editores S.A., 1978. Cap. 10, p. 126-149.

Guanabara-Koogan, 1997, 395p.

HENDRIX, C. M. 2006. Procedimentos laboratoriais para médicos veterinários. Ed. Roca. 2. ed. São Paulo. Pág. 555.

HIRSH, D. C. & ZEE, Y. C. 2003. **Microbiologia veterinária**. Ed. Guanabara Koogan. 2 ed. Rio de Janeiro. Pág. 446.

JAWETS, E., et al. **Estrutura da célula In: Microbiologia Médica**. V. 1, 13. ed., p. 5-28. São Paulo, Editora Guanabara Koogan S.A., 1980.



KONEMAN, E W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed, 2001.

LARPENT, J. P. & LARPENT-GOURGAUD, M., 1970. **Microbiologia Prática**. Ed. Edgard Blücher.

MILLER, J. M. A **Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C.1996.

MIMS, C. A. et al. **Microbiologia Médica**. Editora Manole Ltda. 1. ed. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. **Manual de condutas em exposição ocupacional a material biológico**. Brasília, 1999.

NISENGARD, R.J. & NEWMAN, M.G. **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2 ed.

PELCZAR, M. J., et al. 1996. **Estrutura das células procarióticas e eucarióticas**. In: Microbiologia – conceitos e aplicações. V. 1, 2. ed., c. 4, p. 100-43, São Paulo, Makron Books.

QUINN, P.J., et al. 2005. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Ed. Artmed. Porto Alegre. Pág. 512.

SPICER, J. W. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínicas**. Ed. Guanabara &

TRABULSI, L. R., et al. **Morfologia e estrutura da célula bacteriana**. In: Microbiologia. V. 1, 2. ed., p. 3-11. Livraria Atheneu Editora, São Paulo – Rio de Janeiro, 1991.



TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. Atheneu, 1999, 586p.