

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

META

Conhecer os métodos empregados na identificação de microrganismos provenientes de fontes diversas

OBJETIVOS

o final desta aula o aluno deverá
definir método de diagnóstico microbiológico
reconhecer a importância do método diagnóstico a ser empregado para identificação do microrganismo
conhecer os métodos de diagnóstico bacteriológico, micológico e virológico e molecular

PRÉ-REQUISITOS

para acompanhar esta aula o aluno deverá ter noções de morfologia, fisiologia, controle e de população microbiana, mecanismos de virulência e patogenicidade de microrganismos



Interpretação de exames microbiológicos.
(Fontes: <http://4.bp.blogspot.com/>)

INTRODUÇÃO

O diagnóstico microbiológico é o conjunto de procedimentos e técnicas complementares empregadas para estabelecer a etiologia do agente responsável de uma doença infecciosa.

Muitos testes microbiológicos objetivam o isolamento de microrganismos viáveis, os quais devem ser levados rapidamente ao laboratório em transportes adequados e inoculados em meios de cultura para o crescimento dos patógenos mais prováveis. Além disso, deve-se ter muito cuidado para que a amostra não seja contaminada com microrganismos do ambiente ou das mucosas do paciente.

Os métodos de diagnóstico podem ser diretos, que demonstram o agente, seus metabólitos ou componentes antigênicos nos fluidos orgânicos e, indiretos, que consistem na demonstração do efeito que o agente causou em seu contato com o sistema imunocompetente do hospedeiro.

Os laboratórios de Bacteriologia que, a partir das amostras coletadas, isolam e identificam bactérias, atualmente estão comprometidos com a caracterização fenotípica e genotípica das cepas visando contribuir com a epidemiologia das mesmas.

A Micologia, área da microbiologia que estuda os fungos microscópicos está avançando e ganhando muita importância na medicina. Atualmente, Micologia médica está passando por um período de rápido crescimento. Os fungos estão sendo utilizados para o esclarecimento de muitos processos moleculares, genéticos e biológicos comuns a todos os seres vivos; servindo como modelo para estudar diferenciação e adaptação hospedeiro-parasita.

A necessidade da rápida identificação dos fungos em material clínico foi parcialmente incrementada com o desenvolvimento de sondas moleculares específicas, e atualmente há uma ênfase na descoberta de novos agentes antifúngicos e de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de um número cada vez maior de infecções fúngicas.

Os laboratórios de Virologia objetivam identificar o vírus responsável pela infecção, definir o processo patológico, monitorar a doença do ponto de vista epidemiológico e, orientar médicos e pacientes.

A preparação do material de laboratório para utilização em análises microbiológicas envolve todas as atividades necessárias para garantir que os frascos, utensílios, instrumentos e vidraria, destinados ao contato com as amostras de alimentos, encontrem-se totalmente limpos, estéreis e isentos de resíduos químicos e orgânicos, no momento das análises. Esse trabalho envolve as atividades de descontaminação, descarte de resíduos contaminados, lavagem, acondicionamento e esterilização.

DIAGNÓSTICO BACTERIANO

O diagnóstico bacteriológico pode ser realizado por diversos procedimentos, sendo que o diagnóstico de certeza é realizado pelo isolamento e identificação do agente bacteriano a partir de materiais coletados adequadamente, conhecido normalmente como exame bacteriológico ou cultura. Outros métodos podem ser utilizados para o diagnóstico como a demonstração das bactérias por técnicas de coloração; de antígenos por métodos imunológicos; pesquisa de genes bacterianos específicos; pesquisa de anticorpos e resposta imunológica celular. Os procedimentos que utilizam métodos para a demonstração do agente, diretamente em material clínico, embora sejam presuntivos, apresentam grande interesse por serem geralmente rápidos e dispensarem técnicas de cultivo.

ISOLAMENTO

O processamento inicial da amostra clínica para o exame bacteriológico é um procedimento que envolve várias considerações. Deve-se primeiro avaliar a amostra e a sua origem anatômica. Esses dados determinarão qual o melhor tratamento da amostra antes da inoculação como, por exemplo, centrifugação ou homogeneização, conservação, entre outras. A segunda etapa é a seleção do meio de cultura a ser empregado para cada amostra e, por final, a escolha da temperatura e atmosfera de incubação.

Os procedimentos realizados para o processamento das amostras devem ser realizados dentro de uma capela de fluxo-laminar com nível de segurança biológica. A preservação da amostra quanto à manutenção da umidade e do pH é imprescindível para manter a viabilidade dos microrganismos. Vários meios de transporte estão disponíveis para o uso. A escolha dependerá do tipo da amostra clínica e do provável agente microbiano.

A temperatura e atmosfera (atm) de incubação são dois fatores importantes a serem considerados para que se tenha sucesso no isolamento e identificação do microrganismo. Geralmente a temperatura de incubação utilizada para a maioria dos microrganismos patogênicos ao homem gira em torno de 35 a 37°C. Quanto à atm, as bactérias podem ser aeróbias estritas, aeróbias facultativas, microaerófilas ou anaeróbias estritas. Para a escolha da atmosfera a ser empregada é, portanto, fundamental o conhecimento dos microrganismos que provavelmente poderão estar numa dada amostra clínica. Alguns são bastante sensíveis a variações de temperatura e atm, por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*. Algumas bactérias podem ser enriquecidas a 4°C, como *Listeria monocitogenes* e *Yersinia enterocolitica*. A temperatura pode também ser um fator seletivo; por exemplo, para o isolamento de *Campylobacter jejuni* das fezes, utiliza-se 42°C como temperatura de incubação, inibindo assim outras espécies de *Campylobacter* que não são

termofílicas. Para a obtenção de atm de microaerofilia (menos que 6% de O₂) ou anaerobiose, vários procedimentos podem ser utilizados. No laboratório clínico, o mais prático é o uso de jarras de anaerobiose, utilizando-se envelopes que possuem geradores de CO₂ e H₂ na concentração necessária para uma ou outra atm. É importante salientar que o uso de jarra de vela fornece uma concentração de 3% CO₂, apenas.

DEMONSTRAÇÃO DIRETA

MICROSCOPIA

MICROSCOPIA ÓTICA COM ILUMINAÇÃO DIRETA

A identificação do patógeno a partir de material clínico deve ser iniciada pelo exame microscópico da amostra clínica. A demonstração direta do agente tem como objetivo verificar as características morfológicas e enumerar microrganismos e células eucarióticas; pode auxiliar o microbiologista na escolha dos meios de cultura mais indicados e ao médico, a melhor terapia empírica a ser ministrada. Observações importantes como a qualidade da amostra clínica e a intensidade da resposta inflamatória, verificada pela presença de um infiltrado de polimorfonucleares, podem ser visualizadas.

Para visualização do material celular e microrganismo torna-se necessário o emprego de corantes, uma vez que os mesmos são frequentemente transparentes. A observação direta das amostras clínicas em diversas montagens a fresco, entre lâminas e lamínulas, dá informações quanto à composição celular, morfologia do microrganismo e motilidade. As amostras podem ser observadas por microscópio óptico de luz direta, de contraste de fase ou de campo escuro. As características morfo-tintoriais, a disposição e a quantidade de microrganismos dão informações preliminares quanto à identificação e importância deles na amostra.

EXAME A FRESCO

O exame a fresco de espécimes clínicas pouco espessas é possível por meio de montagem com solução fisiológica, como no exame de secreções vaginais para a identificação de fungos, leucócitos e células indicadoras. Solução de KOH a 10% é empregada para clarificação de fungos em amostras clínicas. A pesquisa de microrganismos capsulados, como *Cryptococcus neoformans* em líquido cefalor-raquidiano, é realizada por coloração com tinta da china. Corantes como azul-de-metileno podem ser utilizados em amostras de fezes para detecção de leucócitos, identificação

de grânulos metacromáticos de *Corynebacterium diphtheriae* e verificação da presença de microrganismos fusiformes e espiroquetas a partir de material de infecções orais.

COLORAÇÃO DE GRAM

É o método de coloração diferencial mais utilizado em exames diretos ao microscópio de amostras clínicas e a partir de colônias bacterianas, devido ao seu largo espectro de coloração, que inclui a maioria das bactérias, muitos fungos e parasitas, tais como *Trichomonas*, *Strongyloides* e cistos de vários protozoários. As exceções significantes incluem *Treponema*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Rickettsia*, por serem pequenos demais para a visualização em microscopia óptica de luz direta ou por não terem parede.

A coloração de Gram permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Os Gram-positivos são aqueles que retêm o corante cristal violeta devido ao aumento na quantidade de ácido teicóico e a diminuição da permeabilidade da parede celular aos solventes orgânicos, por conterem menos lipídios na parede celular. Ao contrário, a parede das bactérias Gram-negativas apresenta grande quantidade de lipídios, o que aumenta a permeabilidade aos solventes orgânicos permitindo a descoloração. Após perdem, portanto, o cristal violeta, coram-se com o corante de fundo, fuccina.

COLORAÇÃO DE BACILOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES (BAAR)

Algumas bactérias possuem ácidos graxos de cadeia longa (ácido micólico) na sua parede, que conferem impermeabilidade ao cristal violeta e outros corantes básicos. Para permitir a entrada de corantes primários nestas devem ser empregados calor ou detergentes. Uma vez dentro da célula bacteriana, o corante não é eliminado mesmo com solvente álcool-ácido. A coloração álcool-ácido diferencia bactérias dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei* e cora oocistos de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* e *Cyclospora*.

O método de coloração de BAAR, conhecido por coloração de Ziehl-Neelsen constitui-se em um método de grande valor diagnóstico para a pesquisa de micobactérias em diferentes materiais clínicos como o escarro, onde a presença de BAAR é fortemente sugestiva de tuberculose pulmonar. Tal método é o único recurso disponível para o diagnóstico microbiológico da hanseníase ou lepra.

MICROSCOPIA ÓTICA COM ILUMINAÇÃO DE CAMPO ESCURO

A microscopia em campo escuro é uma das técnicas mais usadas para o diagnóstico da sífilis primária. Devido ao pequeno tamanho da célula bacteriana de *Treponema pallidum* não é possível observá-la utilizando-se colorações usuais, a não ser pela coloração da prata após fixação do esfregaço. Um resultado positivo em exame microscópico é definitivo para sífilis se a infecção por outros treponemas patogênicos puder ser excluída. Isso é possível pela observação da morfologia e motilidade da célula bacteriana. A visualização do treponema vivo torna-se possível já que a iluminação obtida pelo campo escuro aumenta a resolução do microscópio.

DETECÇÃO DE ANTÍGENOS (AGS)

A pesquisa de Ags diretamente na amostra clínica ou após o agente ter sido isolado em cultura constitui-se em importante método imunológico de diagnóstico de doenças infecciosas, com a vantagem de ser permitir um diagnóstico rápido, além de serem específicos e sensíveis.

O teste de aglutinação mais comum é o que utiliza partículas de látex absorvidas com anticorpos específicos contra Ags bacterianos de superfície. Esse método tem sido utilizado na detecção de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* e *C. neoformans*, principalmente em casos de meningites, onde o diagnóstico rápido é fundamental para o sucesso do tratamento.

O teste imunológico mais utilizado que emprega suporte sólido é o ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Para a detecção de Ags, utiliza-se com maior frequência um dos três métodos de ELISA de captura: competitivo, direto ou indireto. No método competitivo, Ag marcado com enzima ou com iodo radioativo é misturado à amostra clínica, onde haverá uma competição entre o Ag adicionado e o presente na amostra por uma quantidade limitada de anticorpos (Ac) ligados a uma fase sólida, como numa placa de poliestireno. Deve-se adicionar sempre um controle negativo que será uma amostra negativa contendo somente Ag marcado. Ags que não se ligaram são tirados do teste por lavagens sucessivas. O resultado é dado pela diferença entre a leitura do controle negativo e da amostra clínica.

O método de captura direto para a pesquisa de Ags envolve a adição da amostra clínica a Acs específicos aderidos a uma superfície sólida. Antígenos que não se ligaram são retirados por lavagens antes da adição de um segundo Ac marcado (conjugado), geralmente com uma enzima. Ensaios que utilizam a associação de Acs monoclonais com policlonais frequentemente apresentam melhor desempenho. O método indireto é

similar ao direto, porém o segundo Ac não é marcado e é adicionado um terceiro Ac marcado, que é um Ac antiimunoglobulina. Esse teste tem-se tornado popular, pois diferentes antígenos podem ser pesquisados com um mesmo conjugado. O teste indireto amplifica o sinal, por isso é mais sensível. Contudo, reações inespecíficas podem ocorrer. Esses testes têm sido empregados para detectar a presença de diversos patógenos tais como *Chlamydia trachomatis*, Rota-vírus, citomegalovírus, *L. pneumophila*.

Há ainda uma outra técnica que utiliza anticorpos específicos marcados com isotiocianato de fluoresceína. Atualmente, os laboratórios clínicos substituíram essa técnica imunológica por outras como ELISA e aglutinação, devido principalmente ao alto custo da manutenção do microscópio e dos conjugados. Os métodos de imunofluorescência direta (IFD) ou indireta (IFI) são ainda empregados por alguns laboratórios no diagnóstico, entre outras, da sífilis primária, legionelose, tracoma, linfogranuloma venéreo, uretrites e cervicites por *C. trachomatis*.

DETECÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Durante o processo metabólico algumas bactérias produzem substâncias, geralmente ácidos graxos, que podem ser detectadas por cromatografia a gás e, portanto, caracterizar a bactéria em espécie ou gênero. Durante os anos 70, vários métodos foram propostos com base nessa propriedade utilizando cromatografia a gás para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e diversos gêneros de bactérias anaeróbias estritas. O método tem sido utilizado com sucesso no diagnóstico de septicemias (estafilococos e estreptococos), meningites (*M. tuberculosis*) e de artrites sépticas. O alto custo do aparelho limitou seu emprego em tais diagnósticos.

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

A identificação bioquímica emprega testes que detectam a presença de enzimas estruturais importantes no metabolismo do microorganismo, como catalase, fenilalanina desaminase, descarboxilases, citocromo C oxidase; a produção de metabólicos e catabólicos, como indol, acetoina, ácidos orgânicos e, a susceptibilidade a substâncias antimicrobianas como a novobiocina, bacitracina, optoquina, novobiocina.

Em laboratórios com grande demanda de análises, têm sido empregados métodos automatizados, que apresentam vantagens como a miniaturização das provas bioquímicas e diminuição no tempo de incubação e, desvantagens, como índice de probabilidade de acerto de 95%, qualidade e quantidade do inóculo. Na maioria dos sistemas automatizados, diferentes

conjuntos são oferecidos para se identificar diferentes microrganismos, que são agrupados por características semelhantes, como cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos não fermentadores, espécies da família Enterobacteriaceae, entre outros.

PESQUISA DE DNA

O diagnóstico microbiológico convencional das infecções bacterianas envolve o isolamento do microrganismo e sua caracterização fenotípica e bioquímica. Porém, em alguns casos, estas etapas consomem tempo, são caras, e muitas vezes inviáveis, como, por exemplo, o diagnóstico de *Mycobacterium leprae* e *Chlamydia* sp, uma vez que estas bactérias não crescem in vitro.

Com o advento da biologia molecular, várias técnicas genéticas de identificação bacteriana têm surgido ao longo das últimas décadas, permitindo um diagnóstico mais rápido, preciso e seguro.

As técnicas moleculares de identificação bacteriana envolvem a pesquisa de ácidos nucleicos através de hibridação com sondas genéticas, amplificação de fragmentos de ácidos nucleicos a partir de um oligonucleotídeo com seqüência conhecida ou tipagem molecular.

SONDAS GENÉTICAS

Sondas genéticas são fragmentos de fita simples de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), com seqüências conhecidas, que são marcadas com enzimas, substratos antigênicos, radioisótopos, marcadores de afinidade ou moléculas quimioluminescentes. As sondas genéticas reconhecem e se ligam com uma alta especificidade a uma seqüência complementar do material genético do microrganismo a ser identificado. Para que isso ocorra, as condições da reação de hibridação devem ter elevada estringência, com altas temperaturas e baixas concentrações de sais, permitindo, desta forma, que a sonda se ligue a uma seqüência perfeitamente complementar a ela.

O uso de moléculas radioativas para a marcação de sondas tem sido substituído ao longo dos últimos anos por outros marcadores, visando, desta forma, a uma maior segurança para o laboratório. Os marcadores de afinidade são os mais comumente utilizados, como a biotina e a digoxigenina, que são incorporadas ao fragmento genético através de reações enzimáticas, conhecidas por nick translation e random-priming. Vários métodos para a marcação de sondas genéticas já estão disponíveis comercialmente sob a forma de kits.

As reações de hibridação podem ocorrer sobre um suporte sólido, in situ ou em fase líquida. Nas reações em suporte sólido, as bactérias são inoculadas em placas de meio de cultura. O suporte sólido, por exemplo,

filtro de nitrocelulose, é colocado sobre a superfície do ágar. Esses filtros contendo as colônias bacterianas são submetidos a um tratamento para lisar as bactérias, expondo e desnaturando o DNA. Então, sob condições de alta estrigência, o filtro é incubado com uma solução contendo sonda genética para um fator que se queira pesquisar. Esta técnica pode ser realizada diretamente com o ácido nucléico do microrganismo estudado. Neste caso, o DNA ou RNA é transferido para a membrana de nitrocelulose, a partir de gel de agarose. Estas reações recebem o nome de Southern-blot e Northern-blot, respectivamente.

A hibridação *in situ* é uma variação do método de hibridação em fase sólida. Nesta técnica, a sonda é incubada com fragmentos de tecido ou células íntegras, fixados em lâminas microscópicas. A reação de hibridação é realizada pelo mesmo método de fase sólida. Geralmente, o tecido a ser pesquisado é embebido em parafina ou formalina, permitindo uma maior fixação da amostra. Este teste é amplamente utilizado em laboratórios clínicos na detecção e tipagem do Papilomavírus humano (HPV).

Para as reações em fase líquida, é importante que o fragmento de sonda genética não se auto-anele. O ácido nucléico a ser pesquisado é incubado em solução com a sonda, seguindo as mesmas condições de estrigência descritas acima. Uma pequena quantidade de ácido nucléico pode ser detectada, embora ótimos resultados sejam obtidos quando se faz a extração e purificação prévia do mesmo.

Após o final da reação de hibridação, quando a sonda se liga ao ácido nucléico alvo, as moléculas marcadoras incorporadas à sonda devem ser detectadas. Para isso, utilizam-se substâncias marcadas com afinidade às moléculas da sonda e, para a revelação, substratos colorimétricos ou quimioluminescentes são adicionados à reação. A técnica de sondas genéticas é utilizada em estudos epidemiológicos para se pesquisar genes de virulência bacterianos, como, por exemplo, genes que codificam toxinas, fímbrias, ilhas de patogenicidade, plasmídios e adesinas. O uso de sondas pode ser empregado, também, para detecção direta do microrganismo da amostra clínica, como o Papilomavírus humano, além de *C. trachomatis*, *G. vaginalis*, *Streptococcus* do grupo A, *N. gonorrhoeae*, *L. pneumophila* e *T. vaginalis*, entre outros. Além disso, esta técnica permite a confirmação do diagnóstico da infecção envolvendo uma variedade de microrganismos, como por exemplo: *Campylobacter* sp, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* do grupo B, *Mycobacterium* sp, *Listeria monocytogenes*, entre outros.

PCR

A reação da polimerase em cadeia (Polimerase Chain Reaction - PCR) é um método que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA. Esta técnica foi primeiramente descrita em 1985, e, desde então, tem sido

amplamente utilizada na biologia molecular.

Para que a reação ocorra, é necessária a utilização de dois iniciadores que se anelam diferentes, a saber: temperatura de desnaturação, geralmente 94°C, permitindo que a molécula de DNA se abra; temperatura de anelamento, variando para cada par de iniciadores utilizados, permitindo que os iniciadores se anelem à seqüência complementar da molécula de DNA alvo; e, finalmente, a temperatura de alongação, permitindo que a enzima DNA polimerase estenda o fragmento. Este ciclo é repetido por 25 a 40 vezes, conforme a necessidade de cada reação; a visualização do resultado da reação é feita em gel de agarose.

Ao longo dos últimos anos, uma série de variações desta técnica foi padronizada, permitindo sua ampla utilização em pesquisa e diagnóstico laboratorial, como, por exemplo, na detecção de genes de virulência, análise do genoma de microorganismos isolados em estudos epidemiológicos ou surtos e pesquisa de genes de resistência a antibióticos.

Alguns exemplos de variações da técnica de PCR estão listados a seguir:

Multiplex PCR. Neste caso, são utilizados vários pares de iniciadores, específicos para diferentes seqüências-alvo, numa mesma reação de amplificação. Este procedimento permite que várias seqüências de uma mesma molécula de DNA sejam lidas, ou, ainda, que múltiplos fatores de virulência de um mesmo patógeno seja pesquisado. No laboratório clínico, esta metodologia pode ser empregada para pesquisa de *Mycoplasma* sp, *Chlamydia* sp, *Neisseria* sp e alguns vírus, como Herpes simplex tipos I e II.

Nested PCR. Nesta técnica, duas amplificações são realizadas: a primeira etapa de amplificação é realizada com um par de iniciadores, por 20 a 30 ciclos, e o produto desta reação é transferido para outro tubo, onde uma segunda amplificação será realizada, tendo como molde o DNA amplificado na primeira. Porém, na segunda amplificação, os iniciadores utilizados irão anelar-se em uma região mais interna do fragmento amplificado na primeira reação, permitindo, desta forma, uma maior especificidade da reação.

RT-PCR. A técnica de RT-PCR oferece uma maneira rápida, versátil e extremamente sensível de se analisar a expressão de um gene-alvo, podendo oferecer também informações semiquantitativas da expressão. Através desta técnica, o RNAm é utilizado como molde para a síntese de cDNA, transcrição pela enzima transcriptase reversa. O próximo passo envolve a amplificação do cDNA através de uma reação de PCR-padrão. RT-PCR pode ser utilizado também para a detecção e diagnóstico de RNA vírus.

PCR em tempo real. Este procedimento compreende uma amplificação convencional de DNA, porém a detecção do resultado é feita ao longo dos ciclos de amplificações. Para que isso ocorra, é adicionada na reação brometo de etídio ou alguma outra molécula fluorescente (SYBR Green, por exemplo), que, à medida que o DNA vai sendo amplificado, vai-se intercalando na dupla fita, resultando num aumento de fluorescência, a

qual é detectada por uma luz UV acoplada ao termociclador. a uso desta metodologia permite que o tempo para o diagnóstico seja menor, além de diminuir, também. os custos do teste, uma vez que a etapa de visualização em gel de agarose é dispensável. A sua aplicação envolve o diagnóstico direto da amostra clínica ou ainda a pesquisa de genes de virulência ou resistência do microrganismo isolado.

MÉTODOS MOLECULARES DE TIPAGEM

Outros métodos moleculares têm sido amplamente utilizados nos dias atuais, porém não com o objetivo direto de diagnóstico, mas de caracterização bacteriana, permitindo a análise de diferenças e similaridades entre amostras bacterianas envolvidas numa mesma patologia, ou, ainda, para se verificar a origem de cepas bacterianas envolvidas em surtos ou epidemias. Com os dados obtidos, pode-se construir dendogramas que mostram a similaridade existente entre amostras filogeneticamente próximas.

Análise do perfil plasmidial. Além do DNA cromossomal, algumas bactérias possuem um ou mais fragmentos circulares de DNA chamados plasmídios. Estes plasmídios, muitas vezes, contêm informações importantes para a patogenicidade bacteriana, como, por exemplo, genes que codificam fatores de virulência ou genes responsáveis pela resistência a antibióticos. A extração dos plasmídios de uma amostra bacteriana é realizada com soluções que rompem a parede bacteriana e degradam as proteínas, permitindo que as moléculas de DNA circulares sejam recuperadas em soluções. A análise é, então, realizada em gel de agarose, permitindo que diferentes amostras sejam comparadas quanto ao seu perfil plasmidial, quanto à presença de plasmídios envolvidos na patogenicidade bacteriana, ou simplesmente para se investigar a distribuição das cepas em estudos epidemiológicos.

Polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP). O DNA cromossomal e o plasmidial podem ser digeridos com endonucleases de restrição, enzimas que cortam o DNA em posições constantes dentro de um sítio específico, geralmente de quatro a seis bases nucleotídicas. Este corte é altamente específico, permitindo que os fragmentos de DNA resultantes sejam obtidos com reprodutibilidade, quando usada a mesma enzima. A variação dos fragmentos gerados por uma enzima de restrição específica é denominada polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFPL). A visualização do perfil de restrição é observada em gel de agarose. Esta metodologia permite, ainda, a realização da tipagem molecular de fatores de virulência entre uma amostragem grande de bactérias.

PCR-RFLP. A técnica de RFLP descrita acima também pode ser realizada utilizando-se o fragmento de DNA amplificado após reação de polimerase em cadeia (PCR), possibilitando, desta forma, que o perfil de

restrição de um único gene com sequência conhecida possa ser analisado e comparado com o perfil de outras cepas ou sorogrupos bacterianos. Esta metodologia permite a análise de diversos genes bacterianos, por exemplo, genes de virulência, da flagelina, da pilina, de toxinas, operons ribossômicos, entre outros.

RAPD-PCR. Esta técnica é também conhecida por amplificação randômica de DNA polimórfico (Random amplification of Polimorphic DNA - RAPD-PCR), e sua metodologia consiste na amplificação de DNA utilizando um par de iniciadores com baixa relação de complementaridade ao DNA alvo, gerando, assim, anelamentos imperfeitos ao longo da molécula de DNA. A reação ocorre em condições de baixa estringência e é possível se obter mais de 50 fragmentos amplificados do DNA. Esta técnica de tipagem molecular permite a análise do genoma de microrganismos, possibilitando sua comparação entre isolados de amostras clínicas.

Ribotipagem. Os RNA ribossômicos encontram-se associados ao longo de todo o DNA bacteriano. Desta forma, é possível obter padrões de bandamento quando o cromossomo é clivado com enzimas de restrição. A detecção deste polimorfismo é feita com a hibridação dos fragmentos obtidos com uma sonda de RNAr. Esta técnica é conhecida por ribotipagem, e pode ser considerada uma variação da técnica de RFLP, utilizando, neste caso, sondas específicas para RNAr. Há algumas vantagens em se usar este método, quando comparado com a tipagem de DNA, como, por exemplo, os genes de RNAr aparecem em várias cópias diferentes em sítios diferentes no genoma com diferentes regiões de flanqueamento, há uma grande variabilidade entre os genes do RNAr 16S e 23S, além da variabilidade das regiões entre os genes 16S e 23S. A ribotipagem permite que padrões de bandamento resultantes possam ser comparados com espécies conhecidas de microrganismos para determinar sua relação genética e evolucionária.

Eletroforese de campo pulsado (PFGE). Fragmentos de DNA maiores de 40kb não são eficientemente resolvidos em géis de agarose, submetidos a um único campo elétrico. Desta forma, o método de eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Eletrophoresis - PFGE) é utilizado quando se pretende analisar fragmentos de DNA cromossomais digeridos, com alto peso molecular. Nesta técnica, as moléculas de DNA são submetidas a campos elétricos aplicados em duas direções alternadas, permitindo que as moléculas sejam reorientadas antes de ocorrer a migração. Porém, para que o método seja reprodutível, é necessário que a molécula de DNA esteja intacta antes de ser clivada pelas enzimas de restrição. Então, a extração do DNA é feita após serem imobilizadas pela fixação da bactéria numa matriz de agarose antes de ser rompida. A escolha das enzimas de restrição é uma etapa importante, pois devem originar poucos fragmentos de alto peso molecular, permitindo que todo o DNA cromossomal da bactéria possa ser analisado. Esta metodologia é utilizada para tipagem de várias

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, entre outros.

Eletroforese de isoenzimas (MLEE). A técnica de eletroforese de enzima multilocos (Multilocus Enzyme Electrophoresis - MLEE) é uma metodologia-padrão para a análise genética em populações eucarióticas, porém, nos últimos anos, ela vem sendo utilizada para estimar a diversidade genética e a estrutura em populações naturais de diversas espécies bacterianas. MLEE estabeleceu base genética para a análise de variações em sorotipos e em outras características fenotípicas, além de fornecer muitos dados para a sistemática e para sistemas de marcadores epidemiológicos de doenças infecciosas. O princípio da técnica se baseia na detecção de eletromorfos (variação da mobilidade) de uma enzima que pode ser igualada com alelos dos genes estruturais correspondentes. O perfil de eletromorfos pode ser equiparado aos genótipos de multilocos cromossômicos. MLEE mede a variação alélica de 20 a 40 genes de enzimas estruturais selecionados aleatoriamente do genoma cromossômico. Variações na mobilidade de uma enzima constitutiva para diferentes cepas de uma espécie podem ser atribuídas a isoenzimas ou a aloenzimas. Essa variação é determinada pela detecção das mudanças causadas por substituições de um ou mais aminoácidos, que afetam a carga eletrostática da configuração de polipeptídeos, originando diferentes perfis de migração das enzimas numa dada condição de eletroforese.

DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

O diagnóstico das infecções fúngicas causadas por patógenos primários pode ser feito microscopicamente para a identificação da fase parasitária em amostras clínicas ou por meio de cultura a partir de amostras de tecidos colhidos da lesão. O diagnóstico é mais difícil quando as infecções são causadas por agentes oportunistas ubíquos. Nesse caso, o microrganismo deve ser cultivado várias vezes a partir de amostras coletadas em diferentes intervalos.

Os métodos utilizados para coletar e manipular os espécimes clínicos são muito importantes no isolamento e identificação de fungos. É eminente usar técnicas estéreis, especialmente com a superfície da pele, unhas e pêlos, que podem estar contaminados com fungos saprófitas, bactérias, poeira e restos epiteliais.

Quando o material clínico é a pele, a superfície dessa deve ser limpa com etanol a 70% e deixada secar antes da coleta, e a seguir, raspada para remover escamas cutâneas ou pêlos que contenham fungos; o espécime é tratado com hidróxido de potássio a 10% para destruir os elementos teciduais. Uma parte da amostra deve ser levada ao microscópio para se observar a presença de hifas.

Quando se suspeita de uma etiologia infecciosa, um fragmento do tecido doente deve ser levado ao patologista para um exame microscópico. Para identificação definitiva do organismo, deve-se cultivar o fungo em meios apropriados e encubá-lo de 25°C a 30°C. Amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano e de biopsia cirúrgica devem ser examinadas ao microscópio e cultivadas rapidamente para evitar desidratação, processos autolíticos e contaminação bacteriana.

O ágar glicose de Sabouraud (4% de glicose, 1% de peptona, 2% de ágar, em pH 5,5) é o meio de cultura mais utilizado para fungos nos laboratórios. Pode-se também adicionar cloranfenicol para inibir a maioria das bactérias e a ciclo-heximida para os fungos sapróbicos.

Em geral, as técnicas para identificação de leveduras são as mesmas para bactérias. Tais técnicas se baseiam nas propriedades bioquímicas e fisiológicas do organismo. As leveduras são unicelulares, crescem rapidamente e podem ser uniformemente suspensas no caldo de cultura. Entretanto, os bolores são filamentosos, produzem conídios especializados e crescem vagarosamente; são identificados microscopicamente pelo tamanho e forma dos conídios e pela maneira como se desenvolvem. A identificação de fungos requer uma compreensão básica e o conhecimento de suas características morfológicas.

DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES VIRAIS

Nas últimas décadas o diagnóstico das infecções virais emergiu como uma importante ferramenta na medicina, contribuindo de forma efetiva na identificação do patógeno, possibilitando o tratamento da infecção. Até recentemente o diagnóstico das viroses não era realizado em laboratórios clínicos ou hospitais, pois as técnicas utilizadas eram muito lentas e caras, os reagentes não estavam disponíveis e não se tinha ainda tratamento para as infecções virais, limitando a utilidade dos testes diagnósticos.

A amplitude do uso dos métodos diagnósticos tem várias explicações. Primeiro, a epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o sucesso dos transplantes de medula óssea e de órgãos sólidos aumentaram o número de pacientes sujeitos a infecções virais oportunistas. Segundo, o uso dos agentes antivirais depende da detecção precisa do patógeno. Terceiro, o desenvolvimento tecnológico (anticorpos monoclonais e ensaios de detecção de ácido nucléico) tornou o diagnóstico virológico rápido e preciso. Além disso, o desenvolvimento da PCR em tempo real permitiu a aplicação de um método quantitativo no diagnóstico laboratorial das infecções virais.

O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS VIROSES É DIVIDIDO EM

A. DIAGNÓSTICO CLÁSSICO, QUE INCLUI AS TÉCNICAS

- de isolamento e identificação do vírus por meio de sistemas vivos como ovos embrionados, culturas de células e em animais de laboratório nos quais os vírus são propagados. A colheita deve ser feita na fase aguda da doença e o material deve ser transportado imediatamente para o laboratório, mantido em temperatura baixa (gelo), sem congelar uma vez que as partículas virais apresentam instabilidade a fatores ambientais; quando remetido para locais distantes, deve ser acondicionado em gelo seco.
- sorológicas, por métodos de detecção de anticorpos específicos, produzidos pelo hospedeiro em resposta à infecção viral.

DIAGNÓSTICO RÁPIDO, POR DETECÇÃO DIRETA DO VÍRUS, ANTÍGENOS E GENOMAS VIRAIS.

Em laboratórios virais objetiva-se identificar o vírus responsável pela infecção, definir o processo patológico, monitorar a doença do ponto de vista epidemiológico e orientar médicos e pacientes.

Para confirmar o diagnóstico, empregam-se os métodos laboratoriais descritos que se seguem.

CITOLOGIA

O exame citológico das amostras fornece o diagnóstico inicial rápido das infecções virais que produzem efeitos citopáticos como alterações morfológicas, lise celular, vacuolização, formação de sincício (fusão de células induzida por vírus, as quais se tornam multinucleadas) e corpúsculos de inclusão (alterações histológicas nas células, causadas por vírus).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A microscopia eletrônica pode ser utilizada para detectar e identificar alguns vírus em quantidade suficiente. A adição de anticorpo vírus-específico à amostra ocasiona a agregação das partículas virais, facilitando a detecção e identificação do vírus.

ISOLAMENTO E REPLICAÇÃO VIRAIS

Os procedimentos de isolamento e crescimento do agente infectante são muito importantes para provar a etiologia viral. Os sintomas do paciente e a história de viagem, a estação do ano e o diagnóstico presuntivo ajudam a determinar os procedimentos adequados a serem utilizados para o isolamento do agente viral. A seleção da amostra apropriada para a cultura viral é frequentemente complicada, pois vários vírus podem causar a mesma doença clínica. Logo, podem ser necessários vários tipos de amostras para identificação do vírus causal. As amostras devem ser coletas inicialmente na fase aguda da infecção, antes da interrupção da eliminação do vírus.

Quanto menor o tempo entre a coleta da amostra e seu envio ao laboratório, maior a possibilidade de isolamento do vírus. Isso ocorre porque muitos vírus são lábeis, e as amostras também são suscetíveis ao crescimento de bactérias e fungos. O gelo e os meios de cultura especiais contendo antibióticos e proteínas, como a albumina sérica, são as melhores maneiras de transportar e armazenar os vírus.

Os vírus podem crescer em cultura de tecido, ovos embrionados ou em animais embrionados. Para o crescimento dos vírus são utilizados diferentes tipos de células em cultura tecidual. As culturas de células primárias são obtidas por dissociação de órgãos animais específicos com tripsina ou colágeno e cultivadas em monocamadas ou suspensão. Essas podem ser transferidas para se tornarem células secundárias. As linhagens de células diplóides são culturas de um único tipo celular capazes de serem transferidas várias vezes antes de sua senescência. As linhagens de células tumorais e as linhagens de células imortalizadas, que são respectivamente obtidas de tumor de paciente e por mudanças causadas por vírus ou substâncias químicas, são um único tipo de célula que podem ser transferidas continuamente sem haver senescência.

DETECÇÃO DOS VÍRUS

Alguns vírus crescem lentamente ou não crescem em laboratório, ou não causam efeitos citopáticos imediatos em linhagens celulares tipicamente utilizadas. Alguns exigem condições perigosas ao laboratorista. Esses vírus são mais frequentemente diagnosticados com base em achados sorológicos.

Propriedades virais características também podem ser usadas para identificar vírus que não induzem efeito citopático clássico. Um exemplo disso ocorre na interferência heteróloga, na qual um vírus impede a replicação de outro tipo de vírus.

Pode-se identificar um vírus com base na determinação dos seguintes títulos:

- Dose de cultura tecidual: título de vírus que causa efeito citopático em cultura de tecido.

- Dose letal: título de vírus que mata 50% de um grupo de animais de teste.
- Dose infecciosa: título de vírus que inicia um sintoma, produção de anticorpo ou outra resposta detectável em 50% de um grupo de animais de teste.

Certos vírus podem ser eliminados intermitentemente sem que a pessoa afetada apresente sintomas por longos períodos. O vírus também pode não ser isolado de uma amostra por essa não ter sido manipulada adequadamente, conter anticorpos neutralizantes ou ter sido obtida antes ou após a eliminação de vírus.

As enzimas e outras proteínas podem ser detectadas através de meios bioquímicos, imunológicos e de biologia molecular. Elas podem ser separadas por eletroforese, e seus padrões são utilizados para identificar e distinguir os vírus.

A detecção e o estudo de enzimas ou de suas atividades podem identificar e quantificar vírus específicos. Os anticorpos podem ser utilizados como instrumentos específicos e sensíveis. Os anticorpos monoclonais ou monoespecíficos servem para distinção entre cepas virais e mutantes. Os antígenos podem ser detectados através da imunofluorescência e ensaio imunoenzimático (EIA). Os vírus ou antígenos virais liberados de células infectadas podem ser detectados pelo ensaio do imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e aglutinação do látex (LA).

A estrutura do genoma e a sequência genética constituem importantes características que distinguem a família, o tipo e a cepa de um vírus. Os padrões eletroforéticos gerados por endonuclease de restrição são como impressões genéticas.

As sondas de DNA com sequências complementares a regiões específicas de um genoma viral podem ser utilizadas como instrumentos específicos e sensíveis na detecção até de mesmo de vírus que não se replicam. As sequências genéticas virais específicas podem ser detectadas através de hibridização *in situ*.

A reação em cadeia da polimerase (PCR), a PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) e os ensaios de cadeia ramificada de DNA estão se tornando muito importantes na detecção viral. A utilização de primers (iniciadores) apropriados para PCR pode amplificar milhões de vezes uma sequência alvo em poucas horas. Essa técnica é especialmente útil para detectar vírus latentes e integrados. A RT-PCR utiliza a transcriptase reversa de retrovírus para converter RNA-viral em DNA e permitir a amplificação por PCR das sequências de ácidos nucleicos virais.

SOROLOGIA ANTIVIRAL

A sorologia pode ser usada para identificar o vírus e a sua cepa ou sorotipo, avaliar a evolução de uma infecção e se ela é primária ou uma reinfecção, e se é aguda ou crônica. Os dados são fornecidos pelo tipo e

título do anticorpo e pela natureza dos antígenos. Estudos sorológicos são importantes para vírus de difíceis crescimento e isolamento em cultura celular ou os que causam doenças de longa duração.

A detecção de imunoglobulinas M (IgM) vírus-específicas, as quais estão presentes durante as duas ou três primeiras semanas, indica infecção primária. Em uma fase posterior de infecção, quando as células foram lisadas pelo vírus infectante ou pela resposta imunológica celular, são detectados anticorpos direcionados contra as proteínas e enzimas virais intracelulares.

Os testes de neutralização determinam os anticorpos com base no seu reconhecimento e ligação ao vírus. O revestimento do vírus pelo anticorpo bloqueia sua ligação às células indicadoras. A resposta do anticorpo de neutralização é vírus e cepa-específica.

A presença do anticorpo antiviral não é o suficiente para indicar quando a infecção ocorreu. Os resultados falso-positivos e falso-negativos podem confundir o diagnóstico. Além disso, as reações sorológicas cruzadas podem entre diferentes vírus podem confundir a identidade do agente infeccioso. O anticorpo utilizado no teste pode ser excessivamente específico e pode ser incapaz de reconhecer outros vírus da mesma família, dando um resultado falso negativo. Um bom entendimento dos sintomas clínicos e o reconhecimento das limitações e dos potenciais problemas dos ensaios sorológicos ajudam no diagnóstico.

ATIVIDADES



1. Defina métodos de diagnóstico microbiológico.
2. Descreva as vantagens e desvantagens entre duas técnicas/métodos de diagnóstico microbiológico.
3. Descreva, sucintamente, os métodos de diagnóstico bacteriológico, micológico, virológico e molecular.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. É importante estabelecer exatamente o significado de “Diagnóstico Microbiológico” e o que seriam os métodos utilizados para este fim. Os acadêmicos devem pesquisar métodos e/ou técnicas utilizadas com o objetivo de identificação de agentes microbianos (bactérias, fungos e vírus).
2. O acadêmico deverá escolher duas técnicas/métodos e inicialmente descrever (caracteriza-las). Após esta descrição traçar parâmetros de comparação, como por exemplo: especificidade, sensibilidade, rapidez, custo, necessidades especiais de suporte técnico, equipamentos

necessários, qualificação do pessoal responsável, importância clínica (conduta terapêutica) e outras.

3. Se você entendeu a aula agora fica fácil fazer um resumo dos métodos empregados no diagnóstico de bactérias, fungos e vírus.

CONCLUSÃO

Não existe nenhum teste laboratorial perfeito. Existem muitas técnicas diferentes para estabelecer a presença de um microrganismo patogênico em um paciente doente. Todos os métodos estão sujeitos a falta de precisão por não detectarem um patógeno ou uma resposta imune quando presentes ou por indicarem a sua presença quando na verdade o patógeno ou a resposta imune estão ausentes. Alguns testes são mais sensíveis ou mais específicos do que outros, e as medidas de seu desempenho determinam como e quando devem ser utilizados. Entretanto, mesmo quando um teste analisa com precisão uma determinada amostra, a simples presença de um microrganismo na amostra ou de anticorpos contra um patógeno no soro do paciente nem sempre indica uma infecção ativa e nem estabelece necessariamente a causa da doença. Por esses motivos, existe sempre a necessidade de se interpretar qualquer teste microbiológico, independentemente das características de seu desempenho técnico. Na análise final, não há substituto para a capacidade de interpretação do médico em situar os resultados dos testes microbiológicos dentro do contexto da doença do paciente.

RESUMO

O diagnóstico de microrganismos é fundamental para o estabelecimento de parâmetros de qualidade, sanidade e conduta terapêutica. Os dados obtidos fornecem informações epidemiológicas que são observadas para o estabelecimento das políticas de saúde pública, saneamento básico e de educação, nas escolas. Amostras coletadas são utilizadas para o isolamento e identificação de bactérias, vírus e fungos. Os microrganismos identificados são caracterizados em seus fenótipos e genótipos. Tais caracterizações visam contribuir com o monitoramento de amostras emergentes e/ou resurgentes de virulência diferenciada. A necessidade da rápida identificação dos microrganismos em material clínico foi parcialmente incrementada com o desenvolvimento de técnicas moleculares como: amplificação de DNA *in vitro* e sondas moleculares. Atualmente há uma ênfase na descoberta de novos agentes infecciosos, e conseqüentemente de novas drogas e estratégias terapêuticas para o tratamento. O sucesso do diagnóstico microbiológico depende de diversos fatores como: escolha do material clínico adequado, coleta apropriada, acondicionamento, armazenamento e transporte ad-



equado, pessoal técnico treinado para a realização do exame, estrutura laboratorial própria, interpretação dos resultados obtidos e elaboração de laudo técnico/científico. Os exames laboratoriais devem estar de acordo com os achados clínicos. É fundamental uma boa comunicação entre o laboratório de realização dos exames e o profissional solicitante. Não existe um método diagnóstico definitivo. Procura-se um método mais sensível, rápido, seguro e barato, que atenda as necessidades de cada problema.

REFERÊNCIAS

- BLACK, J. G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4^a. Ed. Guanabara Koogan, 2002.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PAKER, J. Microbiologia de Brock. 10^a ed. São Paulo: Printece Hall do Brasil, 2004.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. PFALLER, M.A. Microbiologia Médica. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8^a ed. São Paulo: Artmed, 2005.