

Todos os organismos têm um nome composto por duas partes: o gênero seguido pelo epíteto específico (i.e., *Homo sapiens*). As bactérias foram inicialmente agrupadas e nomeadas com base em suas diferenças morfológicas e bioquímicas/metabólicas. Contudo, as bactérias são também classificadas agora de acordo com suas características genéticas e imunológicas. Este capítulo tem como foco a coloração de Gram, a morfologia bacteriana e as características metabólicas, que permitem ao clínico determinar com rapidez o organismo que está causando a infecção no paciente.

COLORAÇÃO DE GRAM

Como as bactérias são incolores e normalmente invisíveis à microscopia óptica, foram desenvolvidas colorações de forma a auxiliar sua visualização. A mais útil delas é a coloração de Gram, que separa os organismos em dois grupos: micro-organismos gram-positivos e micro-organismos gram-negativos. Essa coloração também permite ao clínico determinar se o organismo tem forma redonda ou de bastonete.

Para qualquer coloração, deve-se inicialmente espalhar a amostra a ser corada (escarro, pus, etc.) em uma lâmina e aquecê-la para nela fixar as bactérias.

Existem quatro etapas a serem seguidas na coloração de Gram:

1. Verta o corante cristal de violeta (um corante azulado) e aguarde 60 segundos.
2. Lave com água e cubra com uma solução de iodo. Aguarde 60 segundos.
3. Lave com água e então “descore” com álcool 95%.
4. Finalmente, faça a contracoloração com safranina (um corante vermelho). Aguarde 30 segundos e lave com água.

Quando a lâmina é estudada microscopicamente, as células que absorvem o cristal de violeta e o mantêm irão aparecer azuis. Esses organismos são denominados **gram-positivos**. Porém, se o cristal de violeta é lavado com o álcool, essas células irão absorver a safranina e aparecerão vermelhas. Esses organismos são denominados **gram-negativos**.

Gram-positivo = AZUL

O céu está positivamente AZUL hoje!!

Gram-negativo = VERMELHO

Não (negativo) aos comunistas VERMELHOS!!

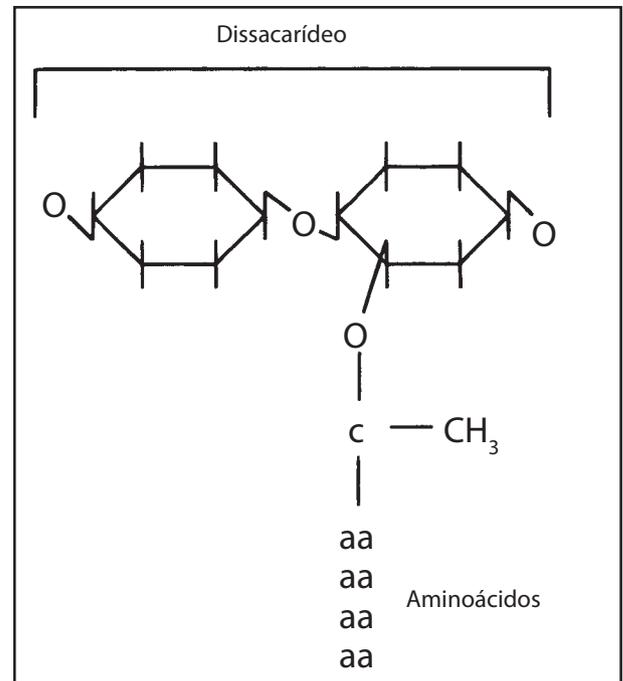


FIGURA 1-1

As diferentes colorações são resultado de diferenças nas paredes celulares das bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Tanto os organismos gram-positivos quanto os gram-negativos têm mais de uma camada protegendo o citoplasma e o núcleo* do ambiente extracelular, ao contrário das células animais, que possuem apenas uma única membrana citoplasmática composta de uma bicamada fosfolipídica. A camada logo após a membrana citoplasmática é a **camada de peptidoglicano** ou parede celular. Ela está presente tanto nos organismos gram-positivos quanto nos gram-negativos.

Fig. 1-1 A camada de peptidoglicano ou parede celular é composta de dissacarídeos repetidos com quatro aminoácidos em uma cadeia lateral que se estende de cada dissacarídeo.

* As bactérias não têm um núcleo verdadeiro, circundado por membrana nuclear. O material genético fica localizado em uma região do citoplasma denominada nucleóide ou área nuclear.

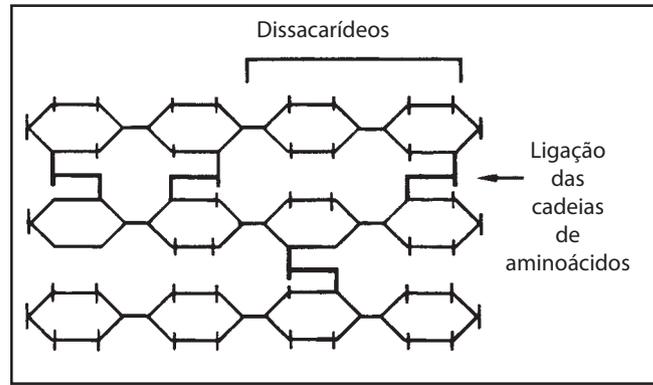


FIGURA 1-2

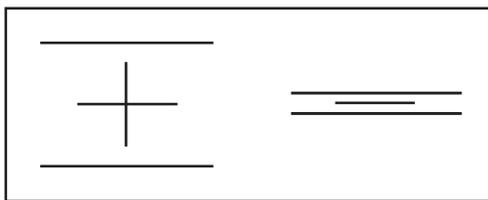


FIGURA 1-3

Fig. 1-2 As cadeias de aminoácidos do peptidoglicano ligam-se covalentemente a outros aminoácidos de cadeias vizinhas. Isso resulta em uma estrutura estável, ligada de forma cruzada. A enzima que catalisa a formação dessa ligação é denominada **transpeptidase** e está localizada na membrana citoplasmática interna. O antibiótico penicilina liga-se a essa enzima e a inibe. Por essa razão, a enzima é também denominada **proteína de ligação à penicilina** (ver página 154).

Fig. 1-3 A parede celular gram-positiva é bastante espessa e tem muitas ligações cruzadas das cadeias laterais de aminoácidos. Em contraste, a parede celular gram-negati-

va é muito fina, com um padrão bastante simples de ligações cruzadas.

Fig. 1-4 O envelope celular gram-positivo tem uma parede celular externa complexa composta de peptidoglicano com ligações cruzadas, ácidos teicoicos, polissacarídeos e outras proteínas. A face interna da parede celular toca a membrana citoplasmática. A membrana citoplasmática contém proteínas que atravessam a bicamada lipídica. A membrana citoplasmática bacteriana (ao contrário da membrana dos animais) não tem colesterol ou outros esteróis.

Um polissacarídeo importante presente na parede gram-positiva é o ácido teicoico. Ele age como um determinante antigênico, portanto, é importante para a identificação sorológica de muitas espécies gram-positivas.

Fig. 1-5 O envelope celular gram-negativo tem três camadas, sem incluir o espaço periplasmático. Assim como nas bactérias gram-positivas, ele tem 1) uma membrana citoplasmática circundada por 2) uma camada de peptidoglicano. 3) Adicionalmente, a célula gram-negativa tem uma membrana celular externa com características especiais.

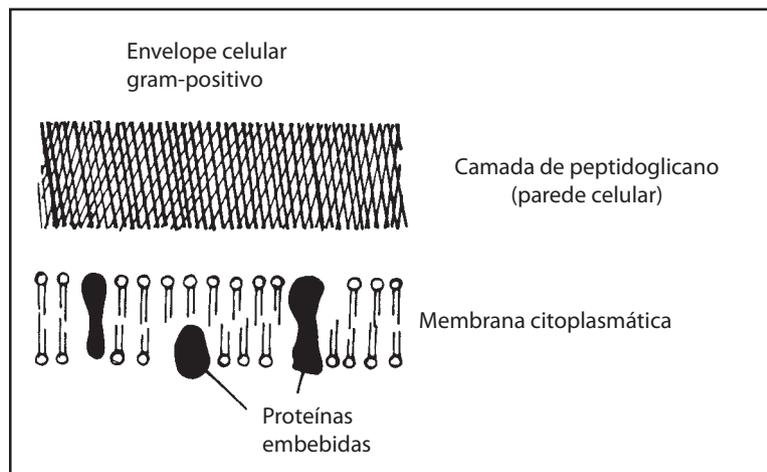


FIGURA 1-4

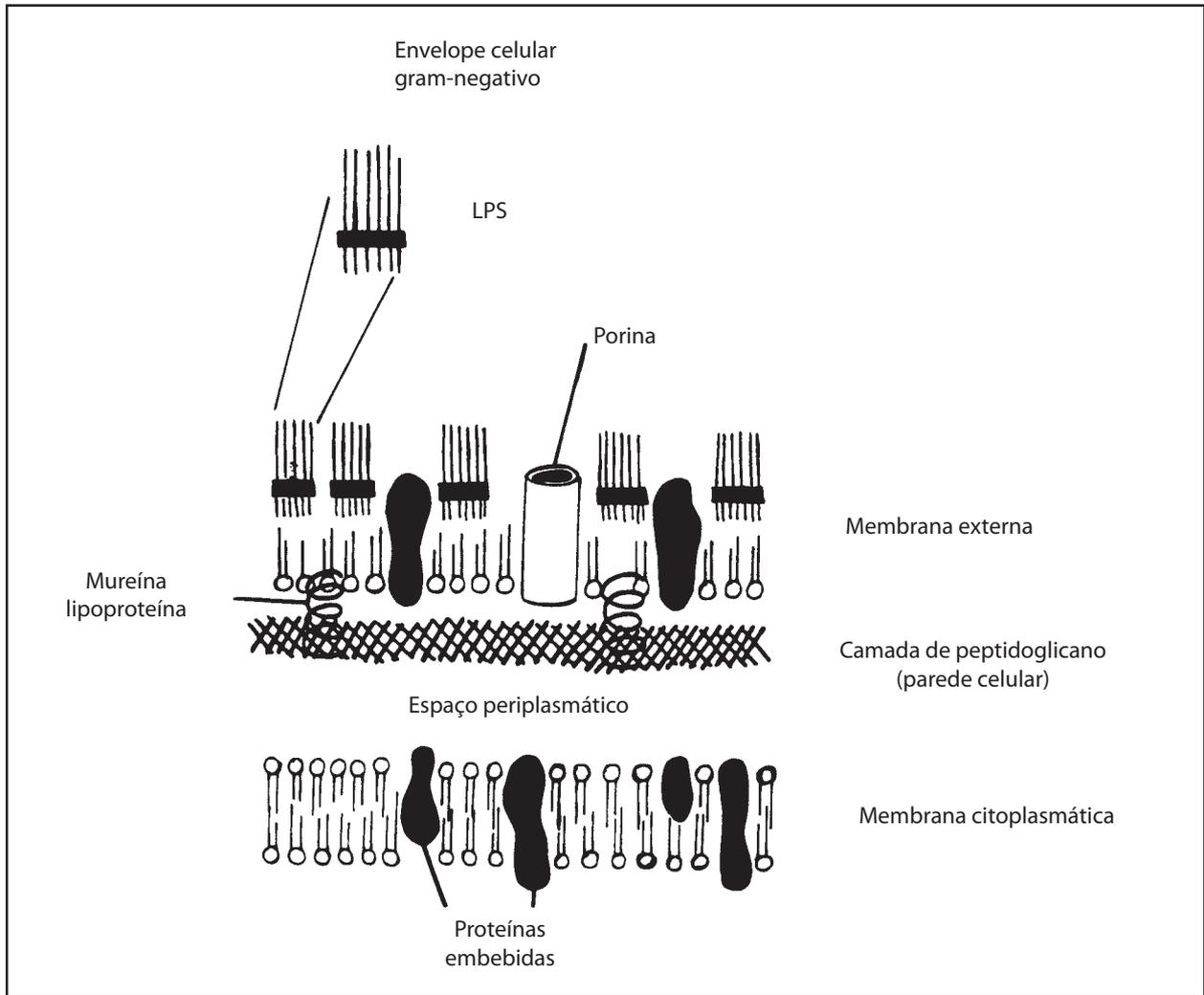


FIGURA 1-5

A membrana citoplasmática interna (assim como nas bactérias gram-positivas) contém uma bicamada fosfolipídica com proteínas embebidas. Bactérias gram-negativas têm um espaço periplasmático entre a membrana

citoplasmática e a camada extremamente fina de peptidoglicano. Esse espaço periplasmático é preenchido com um gel que contém proteínas e enzimas. A fina camada de peptidoglicano não contém ácidos teicoicos, apesar de conter uma lipoproteína helicoidal denominada **lipoproteína da mureína**. Essa lipoproteína é importante porque origina-se da camada de peptidoglicano e estende-se para fora para se ligar à membrana externa. Essa última membrana é similar às outras membranas celulares no sentido de que é composta de duas camadas de fosfolípidos (bicamada) com as caudas hidrofóbicas no centro. O que a torna especial é que a porção mais externa da bicamada contém lipopolissacarídeos (LPS).

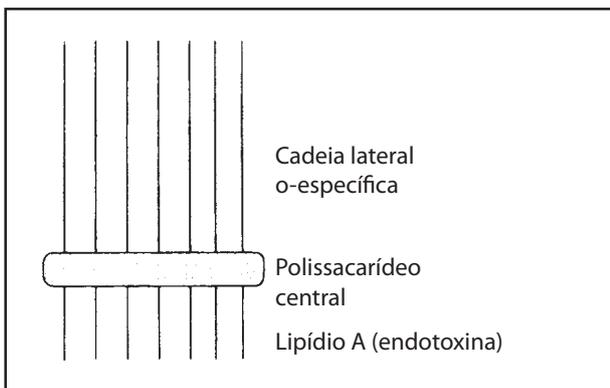


FIGURA 1-6

Fig. 1-6 O lipopolissacarídeo (LPS) é composto de três componentes ligados covalentemente:

1. Cadeias de carboidratos externas de 1-50 unidades de oligossacarídeos que se estendem para fora. Elas diferem de um organismo para o outro e são determinantes antigênicos. Essa parte é denominada **cadeia la-**

CÉLULAS GRAM-POSITIVAS	CÉLULAS GRAM-NEGATIVAS
2 camadas: 1. Membrana citoplasmática interna 2. Camada externa espessa de peptidoglicano (60-100% de peptidoglicano)	3 camadas: 1. Membrana citoplasmática interna 2. Camada fina de peptidoglicano (5-10% de peptidoglicano) 3. Membrana externa com lipopolissacarídeos (LPS)
Baixo conteúdo de lipídeos	Alto conteúdo de lipídeos
SEM endotoxinas	Endotoxina (LPS) – lipídeo A
SEM espaço periplasmático	Espaço periplasmático
SEM canais de porinas	Canais de porinas
Vulnerável ao ataque pela lisozima e penicilina	Resistente ao ataque pela lisozima e penicilina

FIGURA 1-7 Diferenças entre organismos gram-positivos e gram-negativos.

teral O-específica ou **antígeno O**. Pense em **O** como Objeto Externo para ajudar a lembrar disso.

2. A segunda parte é um **polissacarídeo central** solúvel em água.
3. Mais internamente ao polissacarídeo central está o terceiro componente, **lipídeo A**, um dissacarídeo com múltiplas caudas de ácidos graxos atingindo a membrana. O lipídeo A é tóxico para humanos e conhecido como **endotoxina** gram-negativa. Quando as células bacterianas são lisadas pelo nosso sistema imunológico funcional, fragmentos da membrana contendo o lipídeo A são liberados na circulação, causando febre, diarreia e possível choque endotóxico (também conhecido por choque séptico).

Imersas na membrana externa gram-negativa estão as proteínas **porinas**, que permitem a passagem de nutrientes. Elas também são exclusivas de organismos gram-negativos.

O que isso significa clinicamente?

As diferenças entre os organismos gram-positivos e gram-negativos resultam em interações variadas com o ambiente. A camada espessa de peptidoglicano das gram-positivas não bloqueia a difusão de compostos de baixo peso molecular; assim, substâncias que danificam a membrana citoplasmática (como antibióticos, corantes e detergentes) podem passar. Porém, a membrana externa das gram-negativas, que contém os lipopolissacarídeos, bloqueia a passagem dessas substâncias para a camada de peptidoglicano e para a sensível membrana citoplasmática interna. Portanto, os antibióticos e produtos químicos que tentam atacar a parede celular de peptidoglicano (como as penicilinas e a lisozima) não conseguem atravessar essa membrana externa.

Curiosamente, o corante cristal de violeta usado na coloração de Gram é um complexo corante grande capturado

na espessa parede gram-positiva rica em ligações cruzadas, resultando na coloração azul das bactérias gram-positivas. A membrana externa dos organismos gram-negativos, rica em lipídeos, é parcialmente dissolvida pelo álcool, lavando, portanto, o cristal de violeta e permitindo que o contratorante safranina penetre.

Fig. 1-7 Resumo das diferenças entre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

MORFOLOGIA BACTERIANA

As bactérias possuem quatro formas principais:

1. **Cocos:** Esféricos.
2. **Bacilos:** Bastonetes. Bacilos curtos são denominados cocobacilos.
3. **Formas espiraladas:** Forma de vírgula, de S ou de espiral.
4. **Pleomórficas:** Sem forma distinta (como gelatina).

As criaturas com diferentes formas se organizam juntas em padrões mais complexos, como em pares (diplococos), grumos, fitas e bactérias isoladas com flagelos.

Fig. 1-8 Morfologia bacteriana.

ENTÃO, O QUE SÃO OS NOMES?!!!!

Gram-positivos

Comece lembrando que existem seis micro-organismos gram-positivos clássicos que causam doenças em seres humanos e basicamente qualquer outro organismo é gram-negativo.

Dos gram-positivos, dois são cocos e os outros quatro possuem a forma de bastonetes (bacilos).

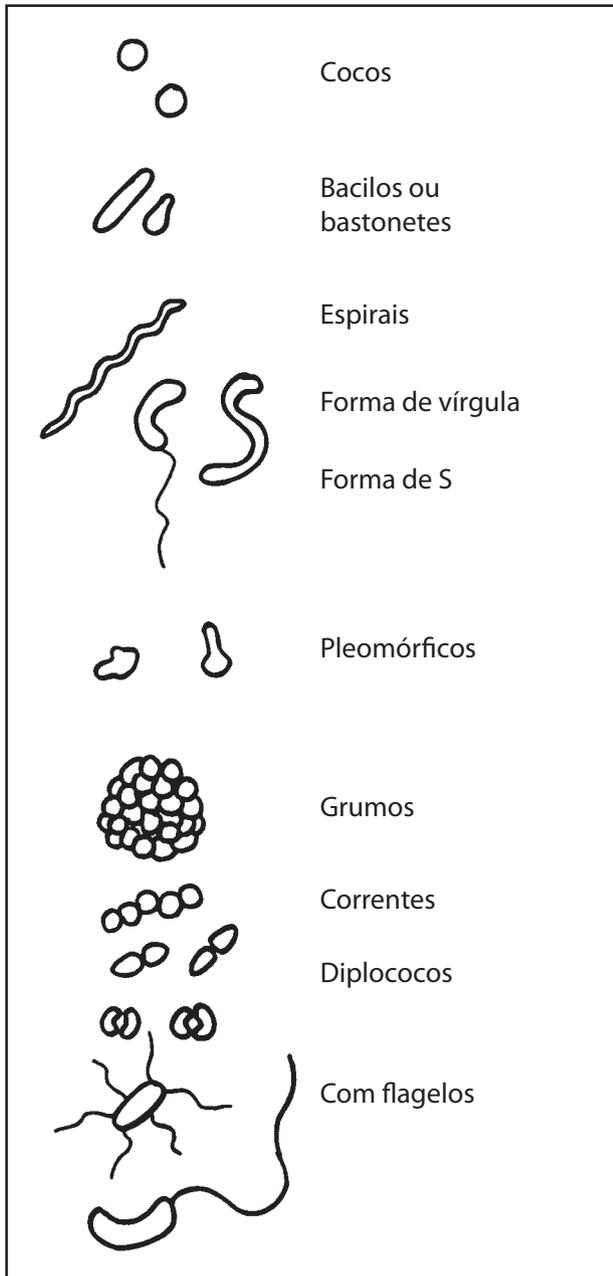


FIGURA 1-8

Os dois cocos gram-positivos possuem a palavra **coccus** em seus nomes:

1. *Streptococcus* forma correntes de cocos.
2. *Staphylococcus* forma grumos de cocos.

Dois dos quatro bacilos gram-positivos produzem **esporos** (esferas que protegem uma bactéria dormente do ambiente adverso). São eles:

3. *Bacillus*
4. *Clostridium*

Os últimos dois bacilos gram-positivos não formam esporos:

5. *Corynebacterium*
6. *Listeria*

Gram-negativos

Dos organismos gram-negativos, existe apenas um grupo de cocos gram-negativos. Na verdade, é um diplococo (parece dois grãos de café beijando um ao outro): *Neisseria*.

Existe também apenas um grupo de organismos espiralados: os espiroquetas. Esse grupo inclui a bactéria *Treponema pallidum*, causadora da sífilis.

O resto são bacilos gram-negativos ou pleomórficos.

Exceções

1. **Micobactérias** são fracamente gram-positivas, mas são mais bem coradas com uma coloração especial denominada coloração de resistência ao álcool-ácido (ver Capítulo 14). Esse grupo inclui organismos que causam tuberculose e lepra.
2. **Espiroquetas** possuem parede celular gram-negativa, mas são muito pequenas para serem vistas com a microscopia óptica, portanto devem ser visualizadas com um **microscópio especial de campo escuro**. As espiroquetas são também muito finas e com espirais apertadas. De dentro para fora, elas têm um citoplasma circundado por uma membrana citoplasmática interna. Como todas as bactérias gram-negativas, possuem uma fina camada de peptidoglicano (parede celular) circundada pela membrana lipoproteica externa contendo LPS. Contudo, são circundadas por uma membrana externa adicional rica em fosfolípidos e pobre em proteínas expostas (bainha externa); acredita-se que isso proteja as espiroquetas do reconhecimento pelo sistema imune (organismos “furtivos”). Flagelos axiais surgem da extremidade da parede celular das espiroquetas, mas em vez de atravessar a membrana externa (como nas outras bactérias mostradas na **Figura 2-1**), os flagelos permanecem circundando a espiroqueta sob a membrana da bainha externa. Esses flagelos especializados são denominados **flagelos periplasmáticos**.* Sua rotação gira a espiroqueta e gera um impulso, movendo-a para frente.
3. **Micoplasmas** não possuem parede celular. Eles têm apenas uma membrana celular simples, portanto não são gram-positivos nem gram-negativos.

Fig. 1-9 Resumo das diferenças morfológicas entre as bactérias.

* Os flagelos periplasmáticos são também conhecidos como filamentos axiais.

MORFOLOGIA	GRAM-POSITIVOS	GRAM-NEGATIVOS
Circular (coco)	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Neisseria</i>
Bastonete (bacilo)	<i>Corynebacterium</i> <i>Listeria</i> <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> <i>Mycobacterium</i> (álcool-acidorresistentes)	Entéricos (vivem no trato GI) <ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Shigella</i> • <i>Salmonella</i> • <i>Yersinia</i> • <i>Klebsiella</i> • <i>Proteus</i> • <i>Enterobacter</i> • <i>Serratia</i> • <i>Vibrio</i> • <i>Campylobacter</i> • <i>Helicobacter</i> • <i>Pseudomonas</i> • <i>Bacteroides</i> (anaeróbio) <i>Haemophilus</i> <i>Bordetella</i> <i>Legionella</i> <i>Yersinia</i> <i>Francisella</i> <i>Brucella</i> <i>Pasteurella</i> <i>Gardnerella</i>
Espiral		Espiroquetas: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Treponema</i> • <i>Borrelia</i> • <i>Leptospira</i>
Crescimento filamentosso ramificado (como os fungos)	<i>Actinomyces</i> (anaeróbio) <i>Nocardia</i> (parcialmente álcool-acidorresistentes)	
Pleomórfico		<i>Chlamydia</i> <i>Rickettsiae</i>
Sem parede celular	<i>Mycoplasma</i>	

FIGURA 1-9 Diferenças morfológicas entre as bactérias.

ESTRUTURAS CITOPLASMÁTICAS

O DNA bacteriano normalmente consiste em uma única molécula circular de DNA fita dupla. Moléculas circulares menores de DNA fita dupla são denominadas plasmídeos; elas com frequência contêm genes de resistência a antibióticos. Os ribossomos são compostos de proteínas e RNA e estão envolvidos no processo de tradução durante a síntese de proteínas. As bactérias, **procariontes**, têm ribossomos menores (70S) que os animais (80S), **eucariontes**. Os ribossomos bacterianos consistem em duas subunidades, uma subunidade maior (50S) e uma menor (30S). Esses números são relacionados à taxa de sedimentação. Antibióticos, como a eritromicina e a tetraciclina, foram desenvolvidos para atacar como projéteis mágicos. Eles

inibem a síntese proteica preferencialmente nas subunidades do ribossomo bacteriano, deixando os ribossomos animais em paz. A eritromicina trabalha na subunidade 50S, enquanto a tetraciclina bloqueia a síntese de proteínas na subunidade 30S.

CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

As bactérias podem ser divididas em grupos com base nas suas propriedades metabólicas. Duas importantes propriedades incluem: 1) como o organismo lida com o oxigênio e 2) o que o organismo usa como fonte de carbono e energia. Outras propriedades incluem os diferentes produtos finais do metabolismo que as bactérias produzem, como ácido e gás.

	AERÓBIOS OBRIGATÓRIOS	ANAERÓBIOS FACULTATIVOS	MICROAERÓFILOS	ANAERÓBIOS OBRIGATÓRIOS
Gram-positivas	<i>Nocardia</i> (fracamente álcool-acidorresistente) <i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Listeria</i> <i>Actinomyces</i>	<i>Streptococcus</i> Algumas espécies de <i>Streptococcus</i> são anaeróbios facultativos	<i>Clostridium</i>
Gram-negativas	<i>Neisseria</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Bordetella</i> <i>Legionella</i> <i>Brucella</i>	Maioria dos outros bacilos gram-negativos	Espiroquetas • <i>Treponema</i> • <i>Borrelia</i> • <i>Leptospira</i> <i>Campylobacter</i>	<i>Bacteroides</i>
Álcool-ácido resistentes	<i>Mycobacterium</i> <i>Nocardia</i>			
Sem parede celular		<i>Mycoplasma</i>		

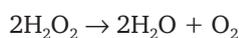
* *Chlamydia* e *Rickettsia* não têm a maquinaria metabólica para utilizar o oxigênio. Eles são parasitas energéticos e roubam o ATP dos seus hospedeiros.

FIGURA 1-10 Espectro de oxigênio.

Oxigênio

A maneira como as bactérias lidam com o oxigênio é o fator principal na sua classificação. O oxigênio molecular é muito reativo e, quando ele captura elétrons, pode formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais superóxidos (O_2^-) e radical hidroxila ($OH\bullet$). Todos eles são tóxicos, a menos que sejam quebrados. Na verdade, nossos próprios macrófagos produzem esses radicais de oxigênio para derramar sobre as bactérias. Existem três enzimas que algumas bactérias possuem para quebrar esses produtos do oxigênio:

1. **Catalase** quebra o peróxido de hidrogênio conforme a seguinte reação:



2. **Peroxidase** também quebra o peróxido de hidrogênio.
3. **Superóxido dismutase** quebra o radical superóxido segundo a seguinte reação:



Bactérias são classificadas em uma faixa contínua. De um lado existem as que amam o oxigênio, possuem todas as enzimas protetoras citadas e não podem viver sem ele. No lado oposto, estão as bactérias sem enzimas que, muito provavelmente, “batem as botas” na presença de oxigênio:

1. **Aeróbios obrigatórios:** Essas criaturas são como nós, no sentido de que usam a glicólise, o ciclo TCA de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons com o oxigênio comoceptor final. Esses caras possuem todas as enzimas citadas anteriormente.

2. **Anaeróbios facultativos:** Não deixe esse nome enganar você! Essas bactérias são aeróbias. Elas usam oxigênio comoceptor de elétrons na cadeia de transporte de elétrons e possuem catalase e superóxido dismutase. A única diferença é que elas **podem** crescer na ausência de oxigênio usando a fermentação para obter energia. Portanto, elas têm a **capacidade de serem anaeróbias**, mas preferem condições aeróbias. Isso é similar à mudança para a glicólise anaeróbia que as células musculares humanas sofrem durante a corrida de curta distância.

3. **Bactérias microaerófilas (também denominadas anaeróbias aerotolerantes):** Essas bactérias usam a fermentação e não têm sistemas de transporte de elétrons. Elas podem tolerar pequenas quantidades de oxigênio porque possuem superóxido dismutase (mas não possuem catalase).

4. **Anaeróbios obrigatórios:** Esses caras odeiam o oxigênio e não possuem enzimas para defender-se dele. Quando você estiver trabalhando na enfermagem do hospital, com frequência coletará sangue para cultura. Você armazenará o sangue em duas garrafas para crescimento. Uma delas é um meio de cultura anaeróbio, sem oxigênio!

Fig. 1-10 O espectro de oxigênio dos principais grupos bacterianos.

Fonte de carbono e de energia

Alguns organismos usam a luz como fonte de energia (fototróficos) e outros usam compostos químicos (quimiotróficos). Dos organismos que usam fontes químicas, aqueles que usam fontes inorgânicas, como amônia e sulfetos, são

denominados **autotróficos**.^{*} Outros usam fontes de carbono orgânicas e são denominados **heterotróficos**. Todas as bactérias clinicamente importantes são **químio-heterotróficas**, já que usam compostos químicos orgânicos como a glicose como fonte de energia.

A fermentação^{**} (glicólise) é usada por muitas bactérias para o metabolismo do oxigênio. Na fermentação, a glicose é degradada até ácido pirúvico, gerando ATP diretamente. Existem vias diferentes para a quebra da glicose até piruvato, mas a mais comum é a **via de Embden-Meyerhof**. Essa é a via de glicólise que todos nós estudamos na bioquímica. Após a fermentação, o piruvato deve ser quebrado ainda mais e os diferentes produtos finais formados nesse processo podem ser usados para classificar as bactérias. Ácido láctico, etanol, ácido propiônico, ácido butírico, acetona e outros ácidos mistos podem ser formados.

A **respiração** é usada pelos organismos aeróbios e anaeróbios facultativos. A respiração inclui a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons acoplada com a fosforilação oxidativa. Essas vias combinam-se para produzir ATP.

Organismos intracelulares obrigatórios não possuem as vias metabólicas para síntese de ATP e, portanto, devem retirar o ATP dos seus hospedeiros. Essas bactérias vivem na sua célula hospedeira e não podem sobreviver sem ele. Exemplos de organismos intracelulares obrigatórios são *Chlamydia* e *Rickettsia*. Eles são parasitas energéticos porque precisam do ATP dos seus hospedeiros como fonte de energia. Possuem um sistema de transporte de membrana celular especial para roubar o ATP.

Diferenças metabólicas adicionais (como fonte de açúcar, produtos finais e necessidade específica por certos nutrientes) são usadas na classificação das bactérias e serão discutidas nos capítulos referentes aos organismos específicos.

* Organismos autotróficos são aqueles capazes de utilizar fontes de carbono inorgânicas para a síntese de compostos orgânicos. Um exemplo é a fixação de CO₂ atmosférico em compostos orgânicos carbonados, realizada pelas plantas e por algumas bactérias.

** As vias glicolíticas são realizadas tanto na fermentação quanto na respiração. Após a formação do ácido pirúvico na via glicolítica, o metabolismo é direcionado para a fermentação ou para a respiração, dependendo das condições ambientais e da capacidade genética do micro-organismo. A fermentação é a transformação do ácido pirúvico em um ou mais produtos finais sem a utilização de um aceptor externo de elétrons, como, por exemplo, o oxigênio.