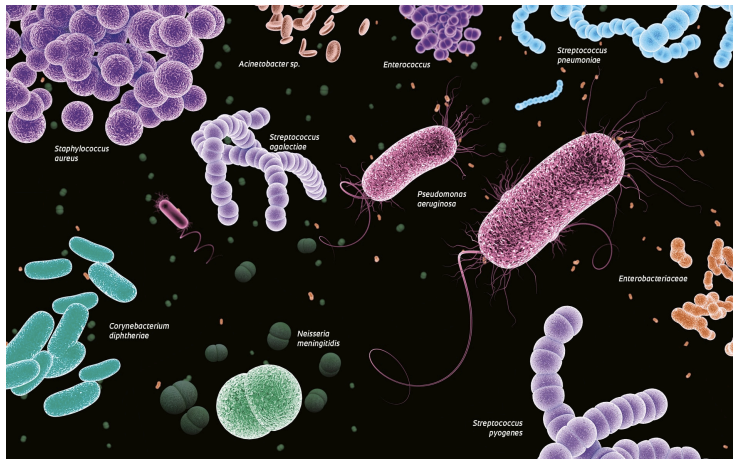


# IMT 2001 – Organismos patogênicos de importância em Saúde Pública

- Profa. Maria Tereza Pepe Razzolini



- razzolini@usp.br



## COCOS G(+) e G(-)

Estafilococos e Streptococos – G(+)

Neisseria – (G-)

# COCOS G (+)

Algumas características:

Estão amplamente distribuídos no ambiente;

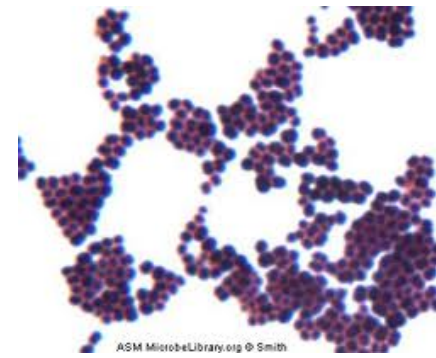
Podem ser isolados do ambiente assim como de pele e mucosas de humanos e animais;

São agentes etiológicos de doenças;

A proposta é estudar dois representantes desses cocos G(+): **Estafilococos e Enterococos**

# O gênero *Staphylococcus*

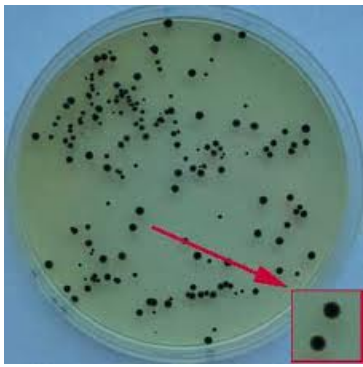
Família: *Micrococcaceae*



Definição do Gênero: Estafilococos (gr. staphyle, uva)

O gênero *Staphylococcus* compreende cocos **Gram-positivos**, de **0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$**  de diâmetro, **imóveis**, **não formadores de esporos** e **capsulados que fermentam glucose** e crescem em condições **aeróbias e anaeróbias**. Ocorrem isolados e em pares, tétrades, em cadeias curtas e cachos de uva irregulares.

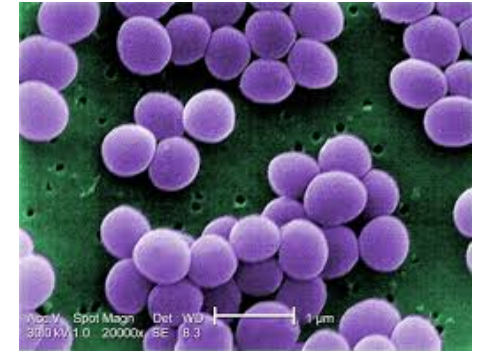




## Estafilococos – *Staphylococcus sp*

O gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies.

Alguns exemplos :



| Espécie                 | Comentários   |
|-------------------------|---|
| <i>S. aureus</i>        | Infecções humanas (MeticiclinaRSA e VancomicinaRSA) |
| <i>S. epidermidis</i>   | Infecções humanas                                   |
| <i>S. saprophyticus</i> | Infecções humanas                                   |
| <i>S. capitis</i>       | MHN da pele e glândulas sebáceas                    |
| <i>S. hyicus</i>        | Dermatite infecciosa em suínos                      |
| <i>S. auricularis</i>   | MHN do conduto auditivo externo                     |
| <i>S. haemolyticus</i>  | Infecções humanas                                   |

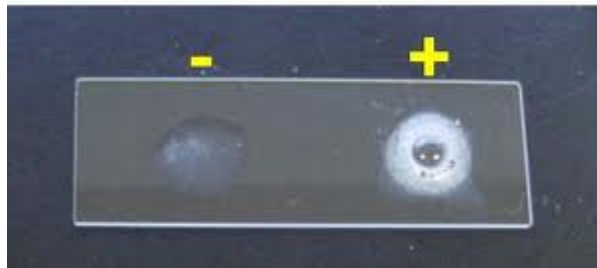
## Diferenciação das espécies de *Staphylococcus* mais frequentes em infecções humanas

| Espécies                | Testes fisiológicos |             |      |
|-------------------------|---------------------|-------------|------|
|                         | Coagulase           | Novobiocina | PYR* |
| <i>S. aureus</i>        | +                   | Sensível    | -    |
| <i>S. epidermidis</i>   | -                   | Sensível    | -    |
| <i>S. saprophyticus</i> | -                   | Resistente  | -    |
| <i>S. haemolyticus</i>  | -                   | Sensível    | +    |

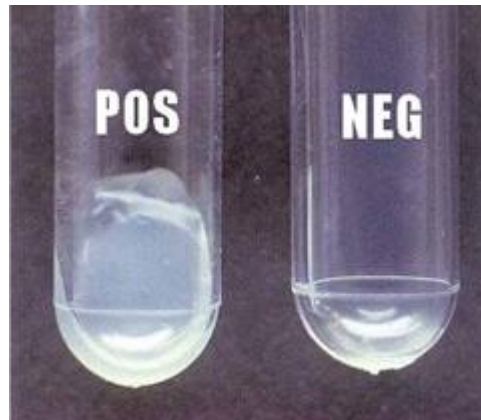
\*Pyrrolidonyl-arylamidase

# Testes fisiológicos utilizados na diferenciação das espécies de *Staphylococcus*

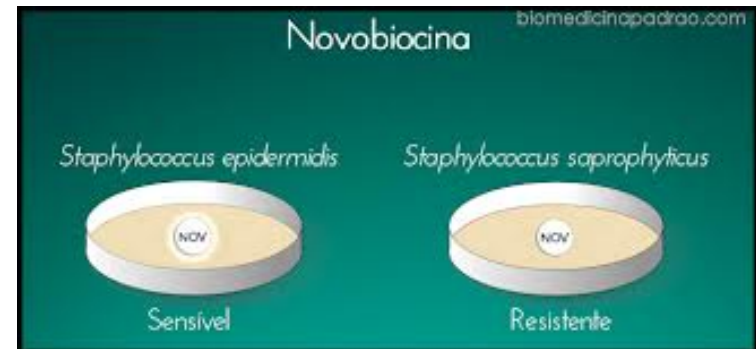
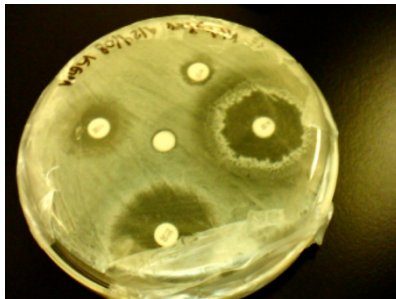
**COAGULASE:** É uma enzima que apresenta ação similar à protrombina (conversão do fibrinogênio em fibrina) resultando na formação de um coágulo visível. Acredita-se que, *in vivo*, essa enzima produza uma barreira no local da infecção estafilocócica. É uma prova usada na identificação de *S. aureus*.



Teste de coagulase

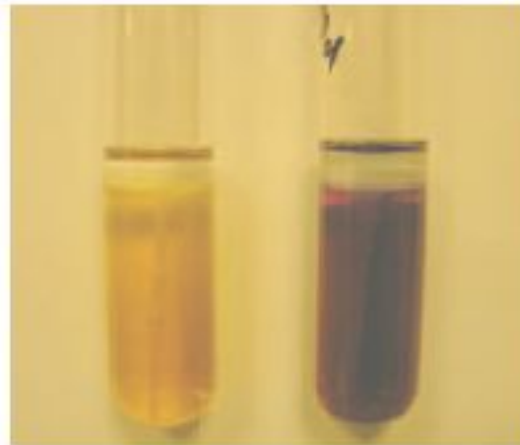


**NOVOBIOCINA:** Os estafilococos coagulase-negativos podem ser divididos em espécies sensíveis e resistentes à novobiocina.



# Testes fisiológicos utilizados na diferenciação das espécies de *Staphylococcus*

**PYR:** Baseia-se na atividade da enzima pyrrolidonyl-arylamidase (PYR). O reagente PYR é impregnado em discos ou tiras de papel onde a amostra é semeada. Observa-se a hidrólise do substrato pela produção de coloração vermelho-cereja escura. Esse teste é utilizado na diferenciação de espécies coagulase-negativa de *Staphylococcus* e de alguns gêneros da família Enterobacteriaceae.



Prova PYR



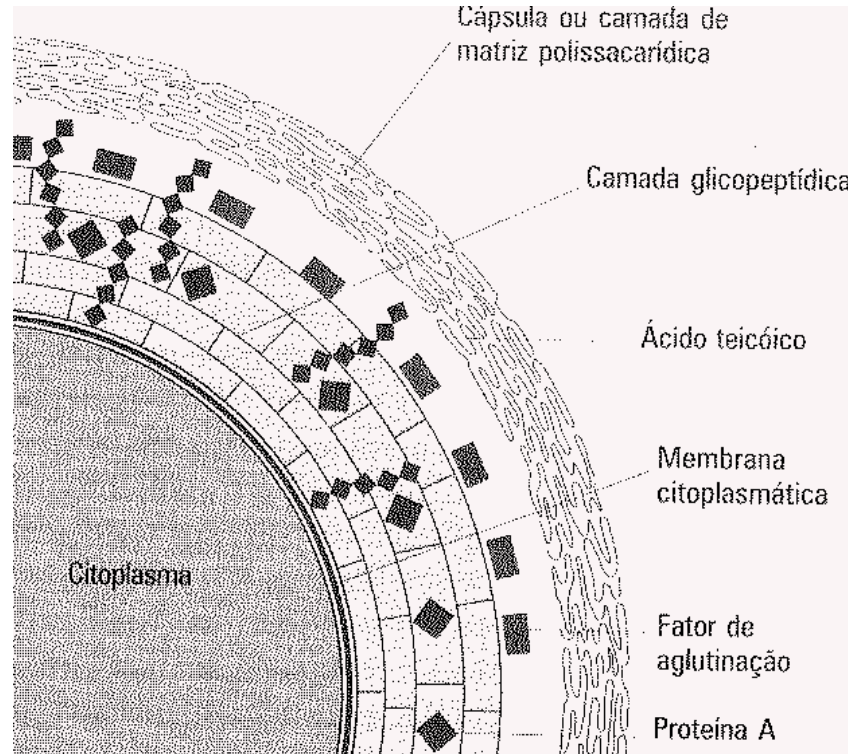
# *Staphylococcus aureus*

- ✓ Faz parte da microbiota humana
- ✓ Em condições apropriadas pode causar infecções oportunistas
- ✓ Processo infeccioso que varia desde infecções cutâneas benignas até infecções sistêmicas potencialmente fatais
- ✓ Responsáveis por intoxicações (alimentares e síndrome do choque tóxico - SCT)
- ✓ Cepas de *S. aureus* contêm plasmídeos que codificam  $\beta$ -lactamase

Que potencial em causar doenças!!! Mas quais as características são relacionadas a esse potencial???

# FATORES DE VIRULÊNCIA

*Staphylococcus aureus* apresenta componentes superficiais capazes de produzir substâncias extracelulares que contribuem para a sua virulência.



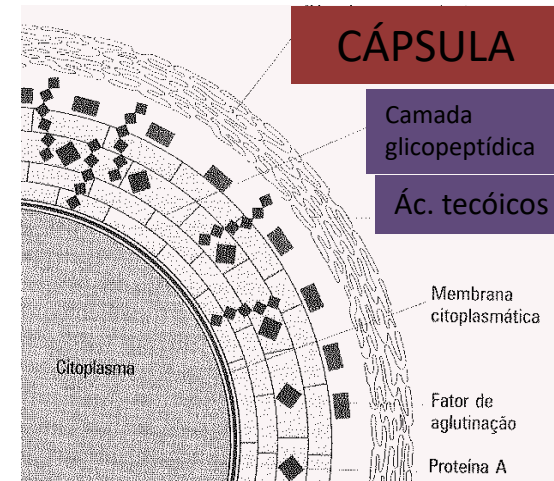
# FATORES DE VIRULÊNCIA

## CÁPSULA OU CAMADA DE MATRIZ POLISACARÍDICA

- ❖ Algumas cepas de *S. aureus* produzem um exopolissacarídeo que impede ou dificulta o processo de fagocitose da bactéria pelos leucócitos;
- ❖ Essas substâncias podem facilitar a aderência da bactéria à célula do hospedeiro ou a dispositivos como marcapassos, cateteres.

## CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR

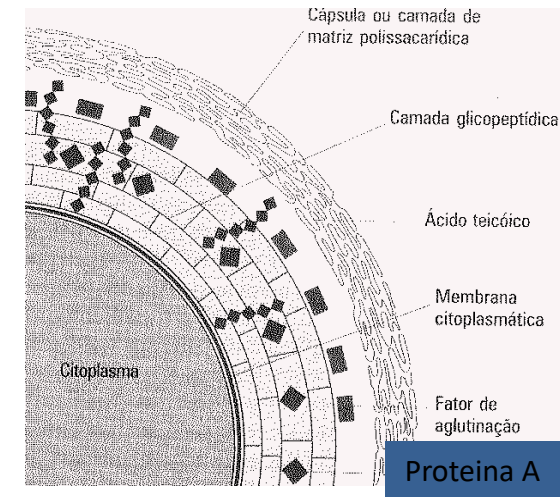
- ❖ A parede celular de *S. aureus* contém NAG (N-acetilglicosamina) e NAM (N-acetilmurâmico) como em outros G(+) que tem como uma das funções a ligação com o epitélio do hospedeiro;
- ❖ Os ácidos tecoicos atuam na aderência específica à superfície das mucosas;



# FATORES DE VIRULÊNCIA

## PROTEÍNA A

- ❖ Encontrada na superfície ligada ao glicopeptídeo ;
- ❖ Impede que anticorpos interajam com as células fagocitárias (proteção contra a fagocitose juntamente com a cápsula).
- ❖ Associada aos processos inflamatórios ;



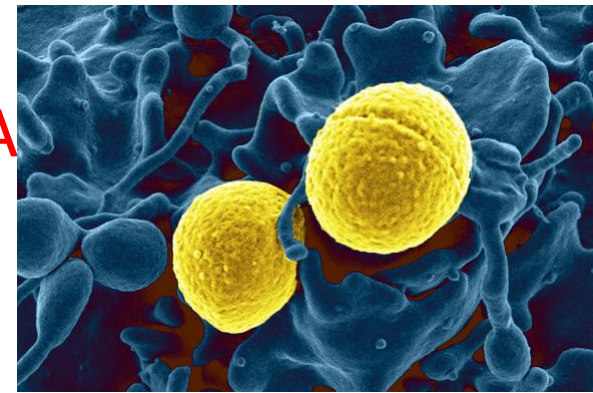
A indução da proliferação de linfócitos envolve duas fases: a primeira fase, designada ativação celular, é iniciada pela interação do TCR (receptor de células T) com o complexo antígeno-molécula do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) sobre as APC (células apresentadoras de antígenos do inglês: *antigen presenting cell*) disparando a transição de G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub> bem como a indução da secreção de IL-2 (interleucina-2) e a expressão do seu receptor IL-2R (receptor de interleucina-2). A segunda fase envolve a progressão da fase G<sub>1</sub> para S e mitose, sendo controlada pela interação de IL-2 com IL-2R (Roitt *et al.*, 1999; Stites e Terr, 2000).

# FATORES DE VIRULÊNCIA

## ENZIMAS

A produção de enzimas pode contribuir com a virulência:

- ✓ **Coagulase** : capaz de recobrir a célula bacteriana com a fibrina e torná-la resistente à fagocitose.
- ✓ **Hialuronidase**: hidrolisa a matriz intercelular de mucopolissacarídeos nos tecidos facilitando a disseminação da bactéria a outras áreas.
- ✓ **Lipases**: pode contribuir para a disseminação da bactéria nos tecidos cutâneos e subcutâneos
- ✓ **Fosfolipase C** : tecidos afetados por essa enzima tornam-se mais sensíveis ao dano e destruição causados pela bactéria
- ✓ **Beta-lactamases**: a produção dessas enzimas configuram resistência a antibióticos como a penicilina e ampicilina.



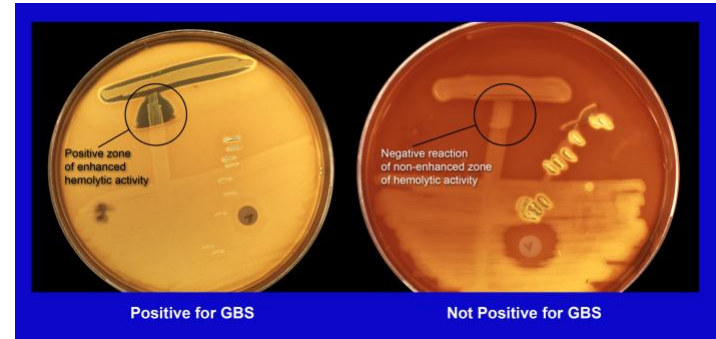
*Staphylococcus aureus* (MRSA)

# FATORES DE VIRULÊNCIA

## HEMOLISINAS

❖  $\alpha$ -hemolisina e  $\beta$ -hemolisina: tóxica para células do sangue humanas e de outros animais.

Essa atividade enzimática pode ser observada na diarreia observada em certas enfermidades estafilocócicas como a síndrome do choque térmico e intoxicação alimentar estafilocócica.



## LEUCOCIDINA

❖ Toxina capaz de desgranular os neutrófilos e macrófagos com a formação de poros que alteraram a permeabilidade celular dessas células de defesa.

## ADESINA

❖ Proteína que se liga a receptores da célula dos hospedeiro facilitando sua aderência

## Enterotoxinas A a E

❖ São toxinas termoestáveis, responsáveis pelas características clínicas da intoxicação alimentar.

## Toxina da Síndrome do Choque Tóxico 1 (TSST-1)

❖ Responsável pela SCT caracterizada por febre alta, vômito, diarreia, cefaleia, calafrios...

# Diagnóstico laboratorial

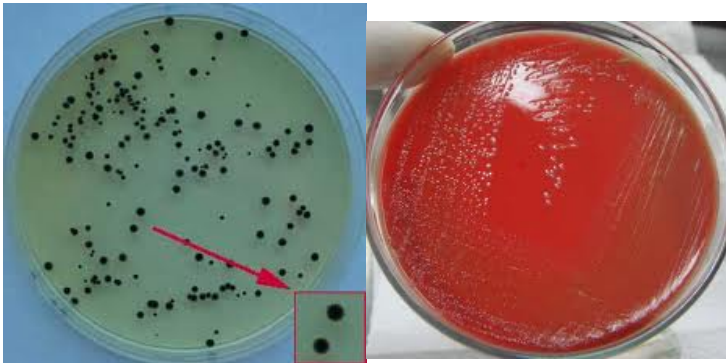
O diagnóstico das infecções estafilocócicas é realizado pelo isolamento e identificação da bactéria.

Crescem bem nos meios de culturas mais comuns, como o caldo simples ou ágar simples, pH 7, à temperatura ótima de 37 ° C.

Ágar simples - após 24 horas na estufa a 37° C, produzem colônias de cerca de 1-3mm de diâmetro, convexas, da superfície livre e bordos circulares, opacas e brilhantes. Deixando as placas um ou dois dias à temperatura ambiente, as culturas de estafilococos patogênicos, recém isolados, geralmente desenvolvem um pigmento amarelo, ao passo que os estafilococos saprófitas, formam colônias brancas.

O diagnóstico da intoxicação alimentar é realizado pela pesquisa das enterotoxinas nos alimentos e nas amostras do paciente.

Normalmente, *S. aureus* é encontrado em grandes quantidades ( $10^5$  células/g) no alimento



<http://www.youtube.com/watch?v=SnUedsuTiVQ>

# *Staphylococcus epidermidis*

- ✓ Habitante da pele e mucosa
- ✓ Coagulase negativo
- ✓ Em condições apropriadas pode causar infecções oportunistas
- ✓ Processo infeccioso que varia desde infecções cutâneas benignas até infecções sistêmicas potencialmente fatais
  
- ✓ **Fatores de virulência**
  - Adesina
  - Substância limosa extracelular (ESS) – formação de biofilme



# *Staphylococcus saprophyticus*

- ✓ Habitante da periuretral e pele
- ✓ Coagulase negativo
- ✓ Em condições apropriadas pode causar infecções oportunistas
- ✓ Frequentemente associado a infecções urinárias
  
- ✓ **Fatores de virulência**
  - ❑ Aderência às células uroepiteliais, uretrais e periuretrais e não aderem a outros tipos celulares
  - ❑ Hemaglutinina - associada à adesão



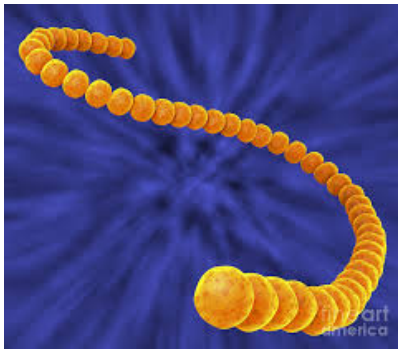
## Família: Streptococcaceae



Três gêneros : ***Streptococcus*** , ***Enterococcus*** e ***Lactococcus***

Compreendem cocos **Gram-positivos**, de **0,75 a 1,25  $\mu\text{m}$**  de **diâmetro**, **imóveis**, **não formadores de esporos e capsulados** e **homofermentadores**.

Crescem em condições **anaeróbios facultativos**.



## Diferenciação das espécies da família Streptococcaceae

| Espécies             | Testes fisiológicos |               |           |
|----------------------|---------------------|---------------|-----------|
|                      | Vancomicina         | Gás (glicose) | NaCl 6,5% |
| <i>Streptococcus</i> | Sensível            | -             | -         |
| <i>Enterococcus</i>  | Sensível            | -             | +         |
| <i>Lactococcus</i>   | Sensível            | -             | v         |
| <i>Aerococcus</i>    | Sensível            | -             | +         |

# Gênero *Streptococcus*

São classificados de acordo com sua capacidade de causar a lise em células vermelhas do sangue – eritrócitos.

Classificação:

$\alpha$ -hemolítico – destruição parcial das hemácias

**$\beta$ -hemolítico** – destruição das hemácias

$\gamma$ -hemolítico – não causa hemólise



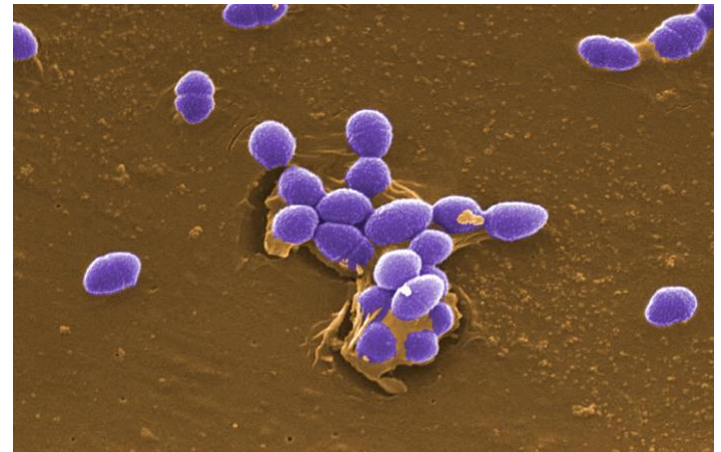
# Gênero *Streptococcus*

Estudo de Rebecca Lancefield – Sistema de agrupamento de Lancefield

Algumas espécies de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos de origem humana podem ser classificados com base em antígenos que são polissacarídeos superficiais (presentes na parede celular). Esses antígenos foram designados por letras (A,B, C,D...) ou ácidos lipoteicóicos de parede celular (estreptococos do grupo D e espécies de enterococos).

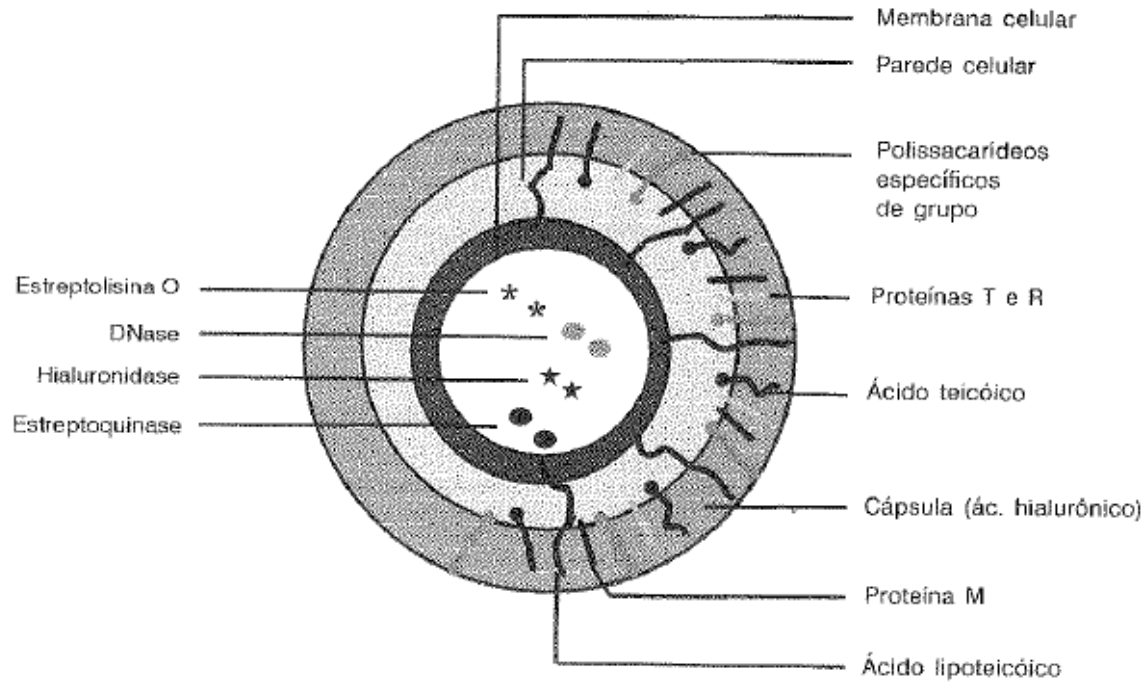
# Gênero *Enterococcus*

- Esse gênero inclui os enterococos clássicos classificados previamente como estreptococos do grupo D,
- Habitantes naturais do trato gastrointestinal do homem e de outros animais,
- Patógenos oportunistas,
- Resistência a antimicrobianos inclusive a alguns que os estreptococos são sensíveis,
- Enterococcus faecalis* é a espécie mais frequente e está associados a 80 a 90% das infecções enterocócicas humanas,
- E.faecium* é o segundo isolado mais frequente (10 a 15%) em infecções humanas,



*Enterococcus faecalis*

# FATORES DE VIRULÊNCIA



Trabulsi et al 1999

# FATORES DE VIRULÊNCIA

As espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* apresentam componentes superficiais capazes de produzir substâncias extracelulares que contribuem para a sua virulência.

Os estreptococos de importância médica são divididos em : estreptococos beta-hemolíticos ( ou estreptococos piogênicos), pneumococos, estreptococos do grupo D e estreptococos viridans.

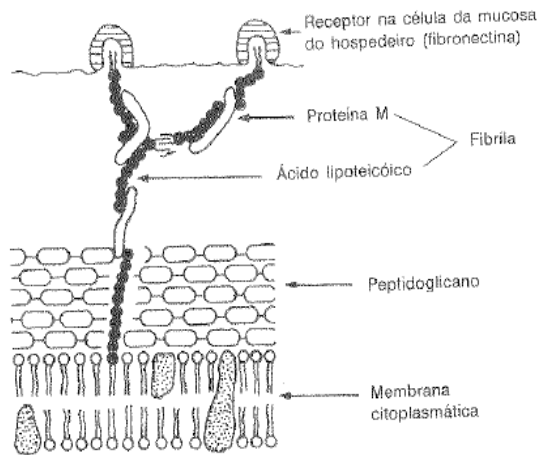
- ❖ **Antígeno de parede** – polissacarídeo complexo que depende do grupo a que a espécie pertence.
- ❖ **Fímbria**: possibilita a fixação da bactéria à mucosa faringoamigdalina
- ❖ **Ác. Hialurônico** – impede a ação fagocitária pelas células brancas do sangue.
- ❖ **Proteína M** - associado à parede celular, as células ricas em proteína M são resistentes à fagocitose.
- ❖ **Fator de opacidade (FO)** – antígeno de superfície celular associado à proteína M
- ❖ **Hemolisinas** – estreptolisina O e estreptolisina S
- ❖ **Exotoxinas estreptocócicas piogênicos (SPE)** – responsáveis pela formação do *rash* da escarlatina;
- ❖ **Adesina** - proteína que se liga a receptores da célula do hospedeiro facilitando sua aderência
- ❖ **Pneumolisina** – proteína que se liga a células do hospedeiro inibindo algumas de suas funções
- ❖ **Proteína pneumocócica de superfície (PspA)** – proteína presente apenas em cepas virulentas
- ❖ **Toxina eritrogênica** - responsável pelo eritema da escarlatina;
- ❖ **Ácidos lipoteicóicos** - importantes componentes da superfície dos estreptococos do grupo A, formando fímbrias juntamente com a proteína M; - peptideoglicano: é tóxico para células animais in vitro e in situ;



# Gênero *Streptococcus*

## *Streptococcus pyogenes*

- ✓  $\beta$ -hemolítico do grupo A
- ✓ Identificados até 60 sorotipos;
- ✓ Infecções das faringe e amígdalas (faringoamigdalites);
- ✓ Infecções na pele (piodermites e erisipela);
- ✓ Pode ocorrer sequelas – febre reumática e glomerulonefrite



Fonte: Trabulsi et al 1999

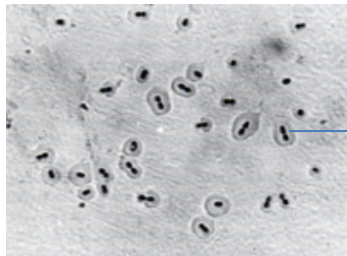
A fixação da bactéria é mediada por uma fibrila (Proteína M e ácido lipoteicoico). A fixação decorre de interações entre a fibrila e moléculas de fibronectina presente na superfície das células da mucosa.

# Gênero *Streptococcus*

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococo)

- ✓  $\alpha$ -hemolítico;
- ✓ Identificados até 84 sorotipos ( dependendo das proteínas imunologicamente distintas presentes na superfície da célula);
- ✓ Pneumonias, meningite, septicemias e otite média;
- ✓ Pode ocorrer complicações – artrite, endocardites e meningite;
- ✓ Afeta especialmente os indivíduos imunodeprimidos;
- ✓ Presença da protease IgA : enzima capaz de degradar a IgA

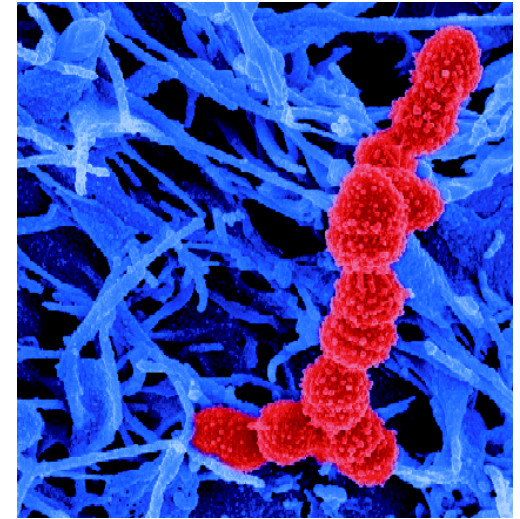
**Serotipificação quellung (intumescimento) reação** : reação que é usada para demonstrar a presença de antígeno capsular em *S. pneumoniae*



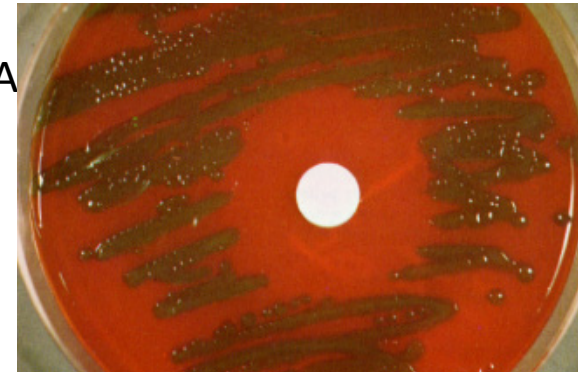
Reação positiva de quellung

*Streptococcus viridans*

- ✓ Algumas cepas são  $\alpha$ -hemolíticas e outras não são hemolíticas;
- ✓ Maior parte faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior e do trato genital;
- ✓ São observados em 30 a 40% dos casos de endocardite.



*Streptococcus pneumoniae*



$\alpha$ -hemólise

## Gênero *Enterococcus*

| Espécie              | Comentários  |
|----------------------|--|
| <i>E. faecalis</i>   | Isolado mais frequentemente de amostras biológicas humanas e do trato intestinal humano; também isolado de TGI de aves, bovinos, caprinos e suínos             |
| <i>E. faecium</i>    | Encontrado nas amostras biológicas humanas, em geral mais resistente a agentes antimicrobianos do que <i>E. faecalis</i> . Encontrado no TGI de outros animais |
| <i>E. durans</i>     | Isolado clínico raro   |
| <i>E. gallinarum</i> | Espécie móvel de <i>Enterococcus</i> . Raro em amostras clínicas de humanos.   |
| <i>E. avium</i>      | Isolado do TGI de aves, cães e humanos. Algumas cepas podem apresentar antígenos do grupo D e Q de Lancerfield.  |

# Gênero *Enterococcus*



Tem sido observado aumento na frequência de infecções causadas por *Enterococcus*,

Os mecanismos de que determinam sua patogenicidade ainda não são bem conhecidos.

- ✓ *E. faecalis* e *E. faecium* produzem uma citolisina que atua como uma hemolisina e, portanto, alguns são hemolíticos;
- ✓ Substância de agregação: capacidade de produzir uma proteína que favorece à agregação às células do possível hospedeiro;
- ✓ *E. faecalis* : algumas cepas são capazes de produzir uma proteína denominada **bacteriocina** que possui atividade lítica;
- ✓ São resistentes a uma gama de antimicrobianos –
  - ✓ Vancomicina
  - ✓ Penicilina

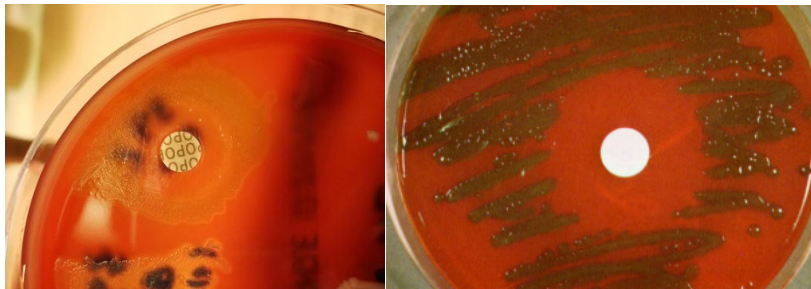


# Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico das infecções estreptococos e enterococos é realizado pelo isolamento e identificação da bactéria.

Crescem bem nos meios de culturas mais comuns, como o caldo simples ou ágar sangue, por ensaios de resistência a antimicrobianos.

- Diagnóstico sorológico;
- Reação de quellung (intumescimento) – *S.pneumoniae*;
- Sensibilidade a optoquinona (cloridrato de etil hidropreína) – inibe o crescimento de pneumococos mas não de outros estreptococos;



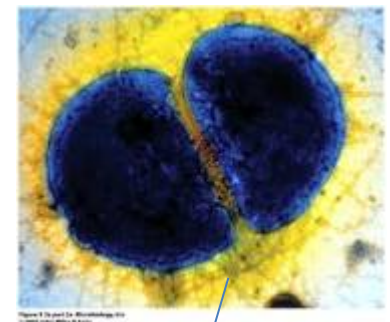
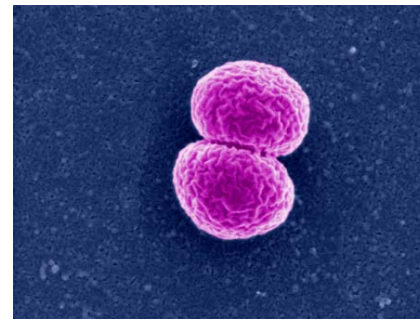
- Sensibilidade à bacitracina – *S. pyogenes* é sensível a esse antimicrobiano diferentemente de outros estreptococos

# O gênero *Neisseria*

Família: *Neisseriaceae*

Definição do Gênero: *Neisseria*

(*Neisseria meningitidis* ou meningococo, *Neisseria gonorrhoeae* ou gonococo)



Fímbrias

O gênero *Neisseria* compreende cocos **Gram-negativos, imóveis, não formadores de esporos, catalase positivas** e crescem em condições **aeróbias e anaeróbias**. Crescem otimamente a 35 a 37°C.

Resistentes à vancomicina e polimixina.

Exigentes nutricionalmente.

São diplococos semelhantes a grãos de café quando vistos ao microscópio.

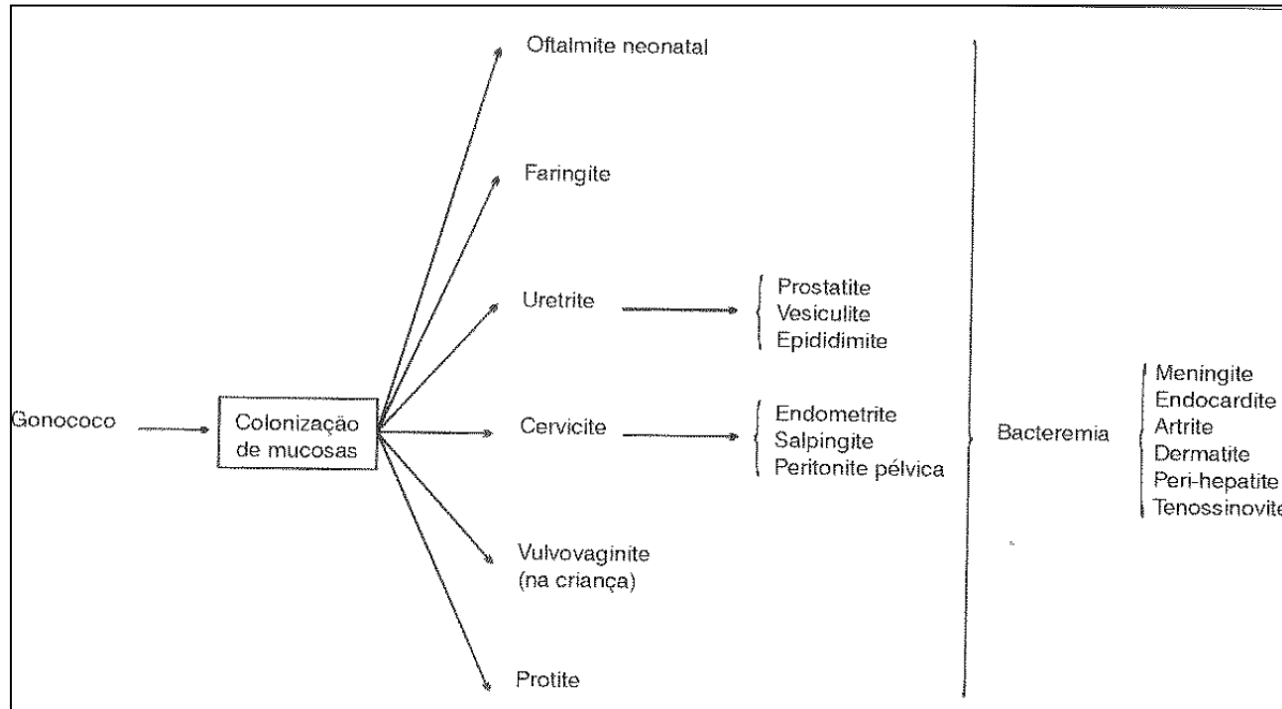
# Diferenciação das espécies de *Neisseria*

| Espécies               | Testes fisiológicos |         |         |       |                  |                    |                            |
|------------------------|---------------------|---------|---------|-------|------------------|--------------------|----------------------------|
|                        | Glicose             | Maltose | Lactose | Amido | H <sub>2</sub> S | Crescimento a 35°C | Crescimento em T-M* a 35°C |
| <i>N. gonorrhoeae</i>  | +                   | -       | -       | -     | -                | -                  | +                          |
| <i>N. meningitidis</i> | +                   | +       | -       | -     | -                | -                  | +                          |
| <i>N. lactamica</i>    | +                   | +       | +       | -     | -                | +/-                | +                          |
| <i>N. sicca</i>        | +                   | +       | -       | +/-   | +                | +/-                | -                          |

\*Thayer-Martin: meio de cultura suplementado com vancomicina e polimixina

# Neisseria gonorrhoeae (gonococo)

- ❖ Agente causal da gonorreia;
- ❖ Atinge, principalmente, população jovem;
- ❖ Elevado número de assintomáticos;
- ❖ Sensível a condições ambientais adversas – dessecação e temperatura
- ❖ Sobrevive com dificuldades fora do hospedeiro

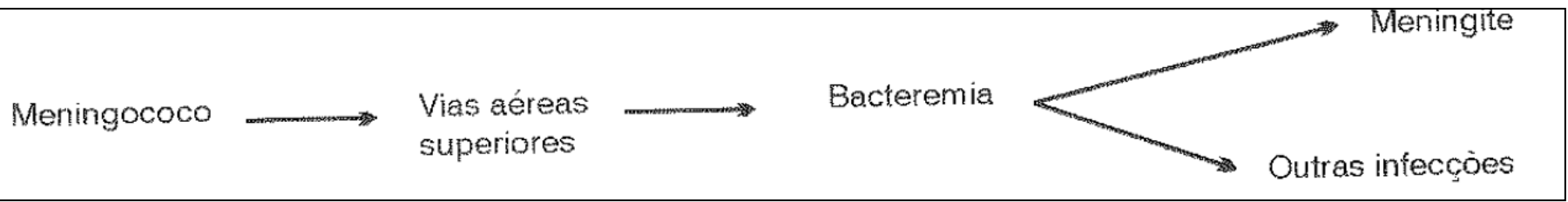


Possíveis infecções gonocócicas



# *Neisseria meningitidis* (meningococo)

- ❖ Agente causal da meningite, septicemia;
- ❖ Número elevado de assintomáticos;



Possíveis infecções meningocócicas

# FATORES DE VIRULÊNCIA

❖ **Cápsula** : evita a fagocitose

❖ **Fímbria**: possibilita a fixação da bactéria às células da mucosa

❖ **Varição de fase**: apenas os gonococos providos de *pili* são capazes de colonizar as células do hospedeiro. Há um fenômeno chamado de variação de fase em que o gene que expressa as proteínas dos *pili* não são produzidas ou então são produzidas de forma exacerbada

❖ **Por ou proteína PORINA**: proteína termoestável associada à membrana externa da bactéria e está associada à resposta antigênica

❖ **Opa ou proteínas de opacidade**: bloqueia a ação a ligação do anticorpo ao antígeno

❖ **Proteína III ou Rmp** (proteína redutora modificável): ação na ligação do anticorpo e antígeno

❖ **Protease IgA** : enzima capaz de degradar a IgA

# Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico das infecções por *Neisseria* é realizado pelo isolamento e identificação da bactéria a partir das amostras clínicas.

**Transporte** : Por sua sensibilidade as amostras devem ser transportadas em meio de transporte apropriado ( com carvão).

**Meios de cultura** : Há a suplementação de antimicrobianos nesses meios

Meio Thayer-Martin modificado (MTM)

Meio de Martin-Lewis (ML)

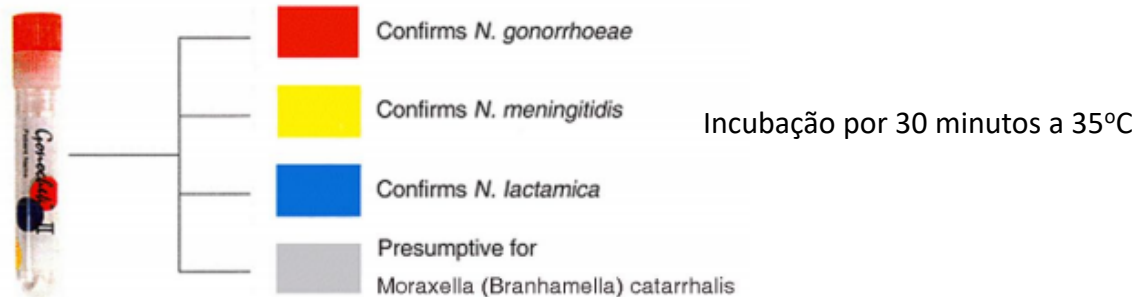
Meio de New York City (NYC)

Meio de GC-Lect (BD Microbiology System)

| Antimicrobiano (ug/mL) | MTM  | ML  | NYC | GC-LECT |
|------------------------|------|-----|-----|---------|
| Vancomicina            | 3    | 4   | 2   | 2       |
| Lincomicina            | -    | -   | -   | 1       |
| Nistatina              | 12,5 | -   | -   | -       |
| Colistina              | 7,5  | 7,5 | 5,5 | 7,5     |

# Diagnóstico laboratorial

Há kits comerciais para testes de identificação de *Neisseria*  
Gonocheck II (DuPont) – três substratos cromogênicos desidratados.



BactiCard *Neisseria* (Remel Laboratories) – quatro substratos impregnados em cartela

