

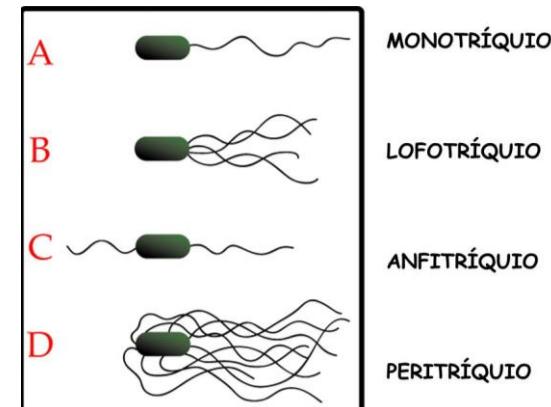
Enterobactérias

Profa Alessandra Barone
Prof. Archangelo Fernandes

Características gerais

- Família: ***Enterobacteriaceae***

- Anaeróbios facultativos;
- Gram negativos;
- Movimentação flagelo (peritríquo);
 - Maioria móveis. Exceções: *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia*
- Reduzem nitrato a nitrito (exceção Yersínia).
- Fermentam glicose;
- Catalase positivos e Oxidase negativos;
- Classificação sorológica: O (séricos), K (capsulares) e H (flagelares)
- Podem causar infecções intestinais e extraintestinais



Family Enterobacteriaceae



Primary Pathogens

Organisms capable of causing disease in anyone

Shigella

Salmonella

Yersinia

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Opportunistic Pathogens

Organisms that can only cause disease under certain conditions or in certain hosts

Providencia

Morganella

Enterobacter

Serratia

Normalmente
não fazem parte
da microbiota

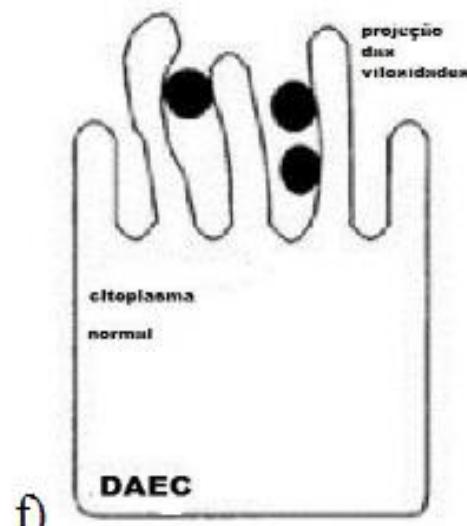
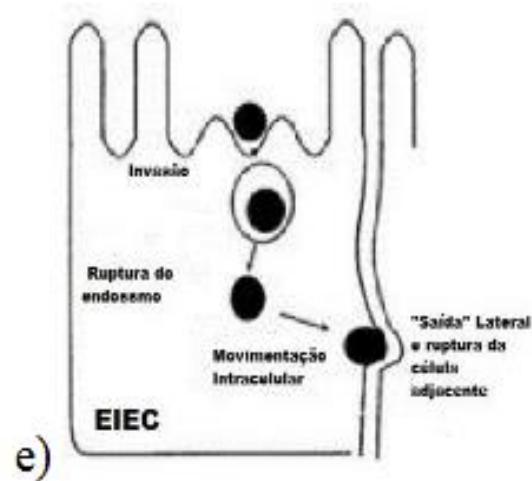
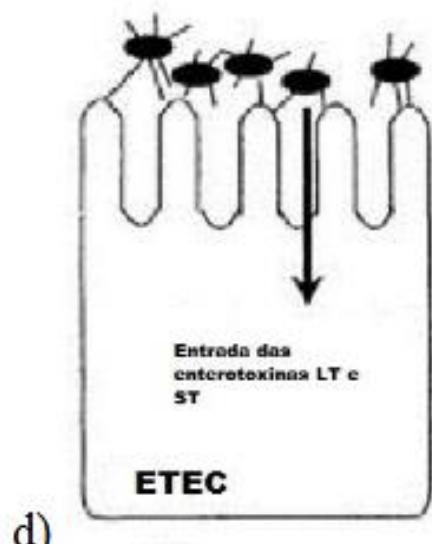
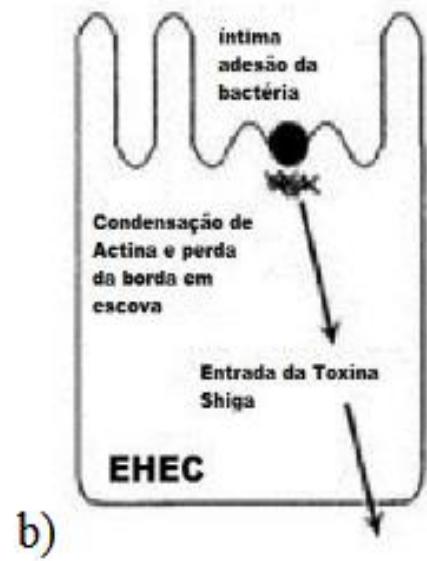
Presentes onde normalmente
não ocorrem;
Colonizam indivíduos
imunocomprometidos e/ou em
idades extremas.

Escherichia coli

- Bacilo gram-negativo que habita normalmente no trato gastrointestinal inferior de humanos e diversos animais.
- A maioria das espécies não são patogênicas, mas alguns sorotipos podem causar graves intoxicações alimentares, gastroenterite com intensa diarreia com muco e infecção urinária.

Escherichia coli

- EPEC – enteropatogênica;
- EHEC ou STEC – enterohemorrágica;
- EAEC – enteroaggregativa;
- ETEC – enterotoxigênica;
- EIEC – enteroinvasiva.
- DAEC - difusamente aderente



Citrobacter spp.

- O gênero *Citrobacter* possui 11 espécies
- Encontradas nas fezes de humanos e animais além de amostras ambientais como solo, água, alimentos e esgoto.
- Complexo *C. freundii* é a espécie mais identificada em infecções gastrointestinais com quadros de diarreia, febre e distensão abdominal
- Podem ocasionar infecções urinárias.
- Espécie *C. koseri* é a mais frequente em casos de meningite esporádica e abcessos cerebrais em RN e lactentes.

Proteus spp.

- Gênero encontrado em solo, água e alimentos contaminados
- *P. mirabilis*: espécie mais isolada em seres humanos
- Agentes causadores de infecções no trato urinário e feridas
- Promovem alcalinidade da urina propiciando a formação de cristais
- *P. vulgaris*: hospedeiros imunossuprimidos

Klebsiella spp.

- Amplamente distribuídas na natureza e trato gastrointestinal de humanos e de animais
- *Klebsiella pneumoniae* é uma das espécies mais isoladas em amostras clínicas
- Raramente encontrada na orofaringe
- Causam infeções pulmonares em pacientes hospitalizados
- Podem causar uma forma de pneumonia que tende a ser destrutiva com intensa necrose e hemorragia
- KPC : multirresistência

Serratia spp.

- Gênero apresenta 10 espécies reconhecidas
- *Serratia marcescens* é a espécie mais importante e está associada a varias infecções , inclusive pneumonia e septicemia em pacientes com neoplasias reticuendoteliais
- Oportunista hospitalar e causador de infecções urinárias
- Dotado de propriedades invasores e com tendência a resistência a vários antibióticos
- Em condições quentes e úmidas formam colónias vermelhas distintivas

Shigella spp.

- Bacilo gram-negativo;
- A dose infecciosa é baixa (a ingestão de poucas dezenas de células é suficiente para causar a infecção) – 200 microorganismos.
- 4 espécies:
 - *S. dysenteriae* (A)
 - *S. flexneri* (B)
 - *S. boydii* (C)
 - *S. sonnei* (D)
- *Diarréia*

Salmonella spp.

- Bacilo gram-negativo
- Não fermenta lactose
 - *Salmonella typhi* – febre tifoide (único reservatório – humanos);
 - *Salmonella paratyphi* – febre paratifoide e gastroenterite
 - *Salmonella typhimurium* – gastroenterite e meningite infantil

Yersinia spp.

- *Yersinia enterocolitica* (alimentos) – gastroenterite
 - Mais comum, febre, dores abdominais semelhante à apendicite e diarreia.
 - Leite não pasteurizado, água não tratada, carne de porco contaminada, crua ou mal cozida.
 - **Dose infectante: baixa (10 a 200 células)**
 - Crianças através de contato com pessoas infetadas;

Meios de cultura

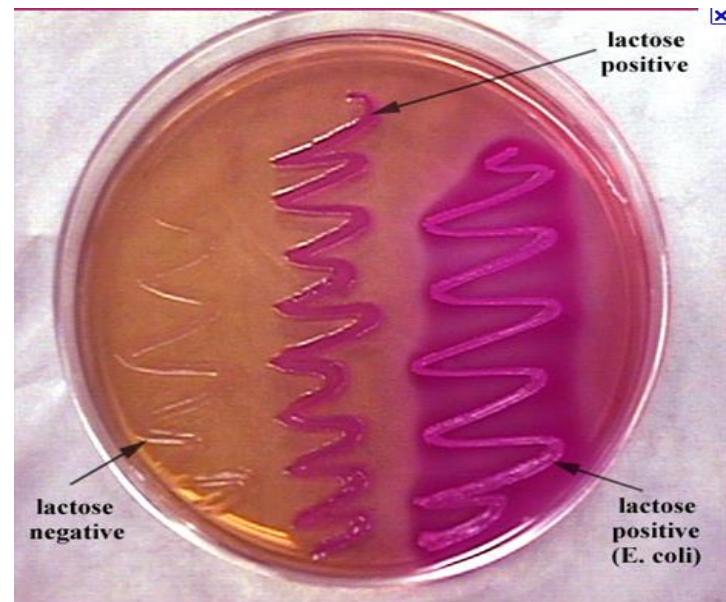
- Ágar sangue ou chocolate: não seletivo
- Ágar MacConkey : meio seletivo
 - Inibidores: sais biliares e cristal violeta, inibem o crescimento de gram positivas
 - Lactose como único carboidrato
 - Lac positiva: colônias vermelhas ou “pink”
 - Lac negativas: colônias incolores, transparentes

Colônias de *E. coli* em ágar MacConkey



E. coli

Proteus



- As bactérias fermentadoras de lactose desenvolvem uma coloração vermelha no meio Mac Conkey.

E. coli em ágar MacConkey



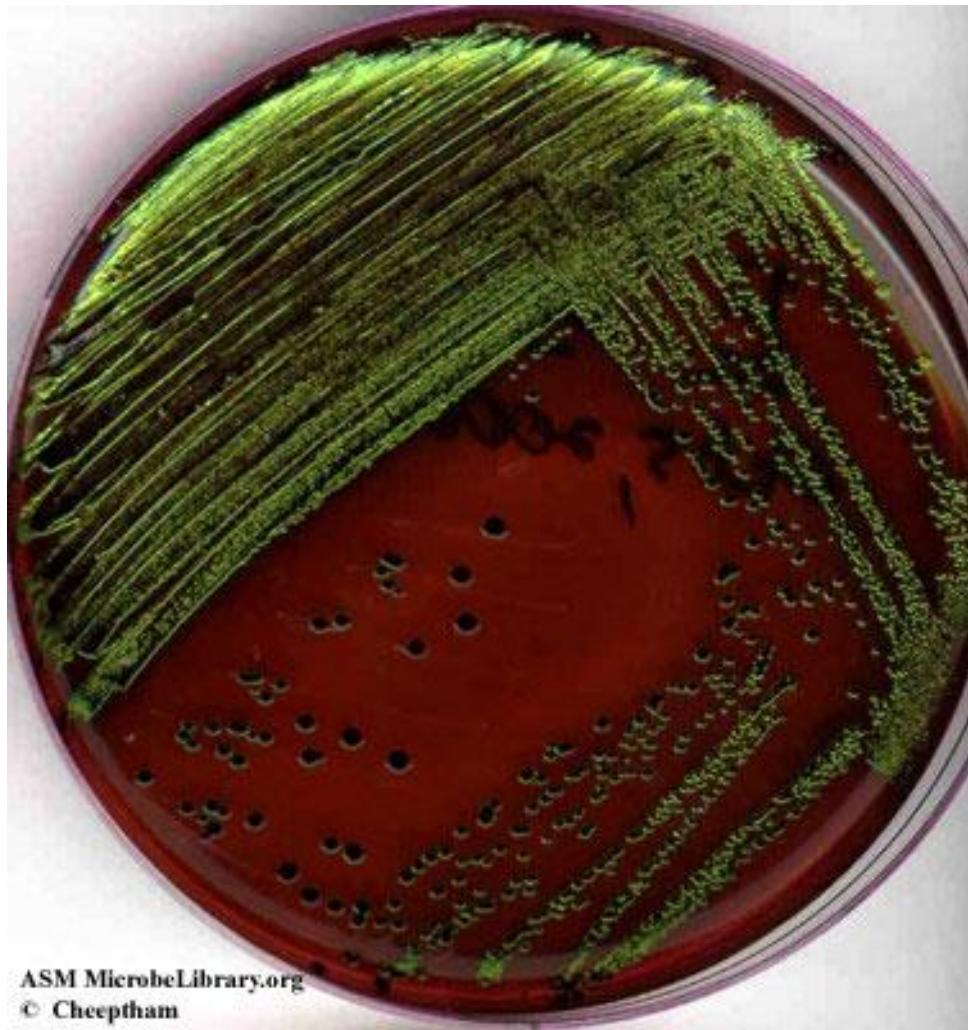
ASM MicrobeLibrary.org © Bu

Hidrolisado pancreático de gelatina	17,0 g
Hidrolisado pancreático de caseína	1,5
Hidrolisado péptico de tecido animal	1,5
Lactose	10,0
Sais biliares	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Ágar	13,5

Meios de cultura

- Ágar Eosina azul de metíleno (EMB)
 - Presuntivo para *Escherichia coli*
 - Inibidores e indicadores de fermentação: eosina e azul de metíleno, inibem o crescimento de Gram positivas
 - Fermentadores de lactose / sacarose formam colônias verdes metálica – *E.coli*
 - Fermentadores fracos produzem colônias de cor púrpura. Ex. *Klebsiella*
 - Não fermentadoras formam colônias transparentes. Ex *Proteus, Salmonella e Shigella*.

Ágar EMB



Lactose positiva

Meios de cultura

- **Ágar SS :**
 - Específicos para *Salmonella* , *Shigella* e *Yersínia enterocolítica*
 - Enriquecimento em caldo selenito antes da cultura em SS
 - Possui componentes (sais de bile, verde brilhante e citrato de sódio) que inibem o crescimento de Gram positivos e coliformes.

Meios de cultura

- Ágar SS :
 - A incorporação de lactose ao meio permite diferenciar se o microrganismo é lactose positiva (resultando na formação de colônias de cor rosa) e lactose negativa.
 - Indicador de pH: vermelho neutro
 - Tissulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção de H_2S evidenciado por formação de colônias de cor negra no centro específico de *Salmonella* spp.

Ágar SS



Lactose positiva

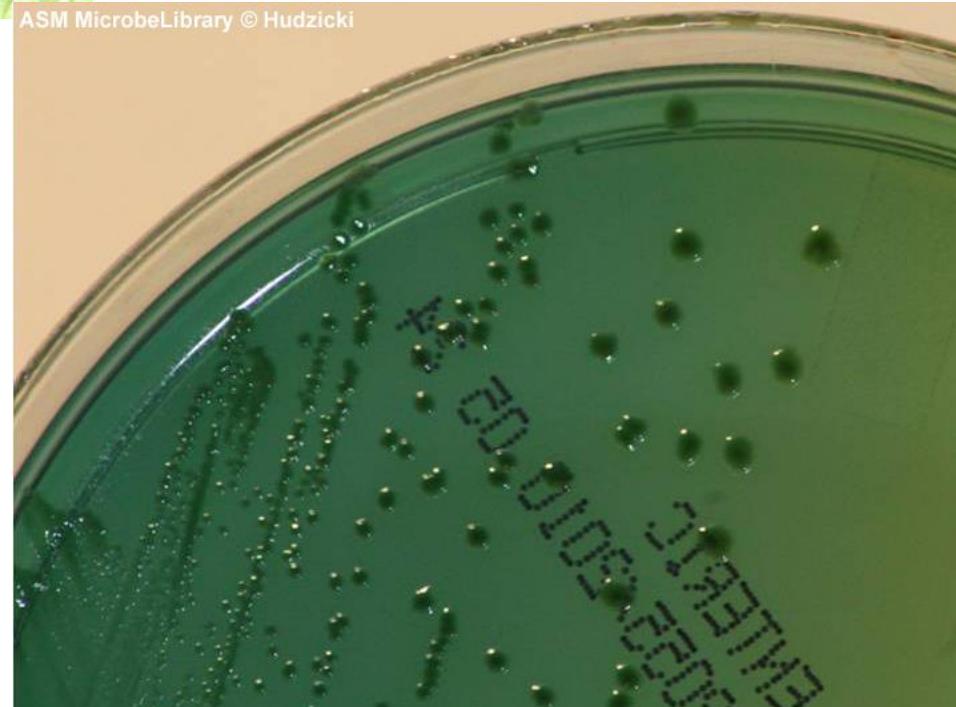
Meios de cultura

- Ágar Hektoen
 - Isolamento de *Salmonella* e *Shigella*
 - Possui elevada concentração de sais biliares que inibem o crescimento de bactérias gram + e retarda crescimento de outros coliformes
 - Alteração de cor pela mudança de pH pela fermentação de carboidratos
 - Tiossulfato de sódio e citrato de amônio férrego para detecção de produção de H₂S



Salmonella spp.

Ágar Hektoen



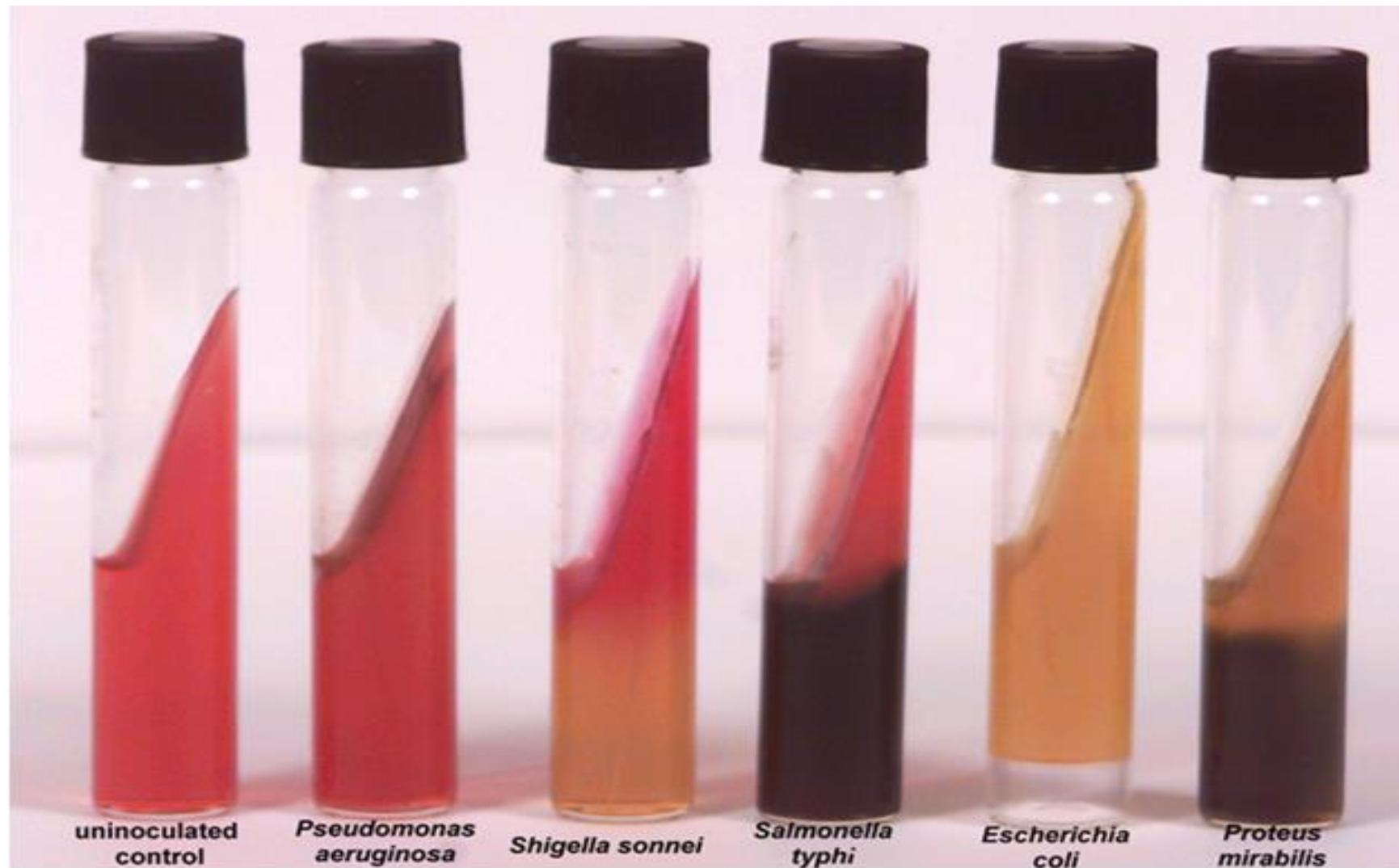
Shigella spp.

Provas bioquímicas

- Após a realização da cultura, o exame macroscópico e a confirmação da pureza da cultura, uma colônia pode ser identificada com a ajuda de **meios presuntivos de identificação**, tais como:
 - Meio de *Triple Sugar Iron* (TSI),
 - EPM
 - MILi
 - Rugai ou Rugai modificado por Pessoa e Silva (Meio de IAL).
 - Prova de Citrato de Simmons

TSI

Para diferenciar os bastonetes gram negativos, utilizando para isso a fermentação de carboidratos e produção de sulfeto de hidrogênio



Meio de cultura

- Tríplice açúcar e ferro (TSI)
 - Fermentação de glicose(0,1%), lactose e sacarose(1%)
 - Tiosulfato de sódio (substrato para a produção de H_2S)
 - Sulfato de ferro para a verificação do produto final.
 - Produção de gás
 - Indicador de pH: vermelho de fenol
 - Ph neutro – vermelho
 - Ph ácido - amarelo

Meio de cultura

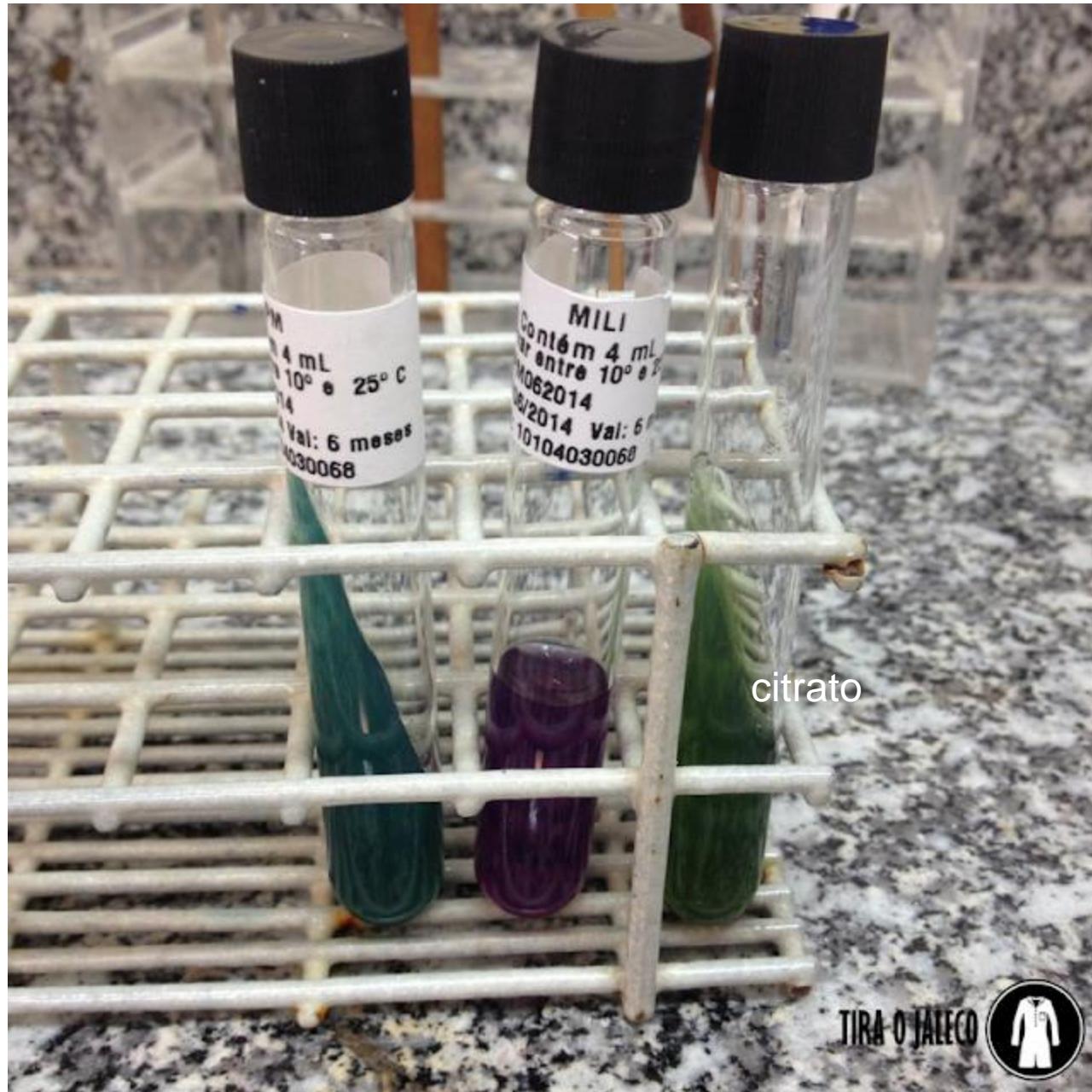
- **Tubo amarelo e superfície vermelha:** só a glicose foi fermentada
- **Tubo amarelo e superfície amarela:** Ocorreu a fermentação da lactose e/ou da sacarose, superior a da glicose.
- **Produção de gás:** Nota-se pela ocorrência de rachaduras no meio de cultura.
- **Produção de H_2S :** Ocorre enegrecimento, principalmente na zona intermédia do cilindro.
- **Tubo vermelho e superfície vermelha ou inalterada:** Não ocorreu fermentação dos hidratos de carbono presentes no meio, nem produção de gás ou de H_2S .

TSI

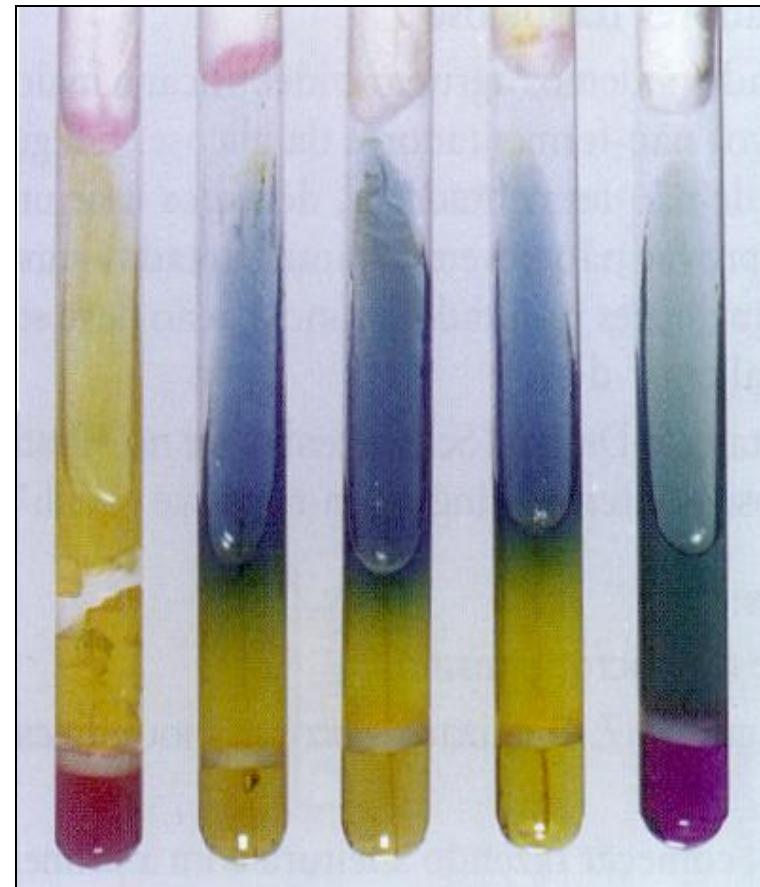
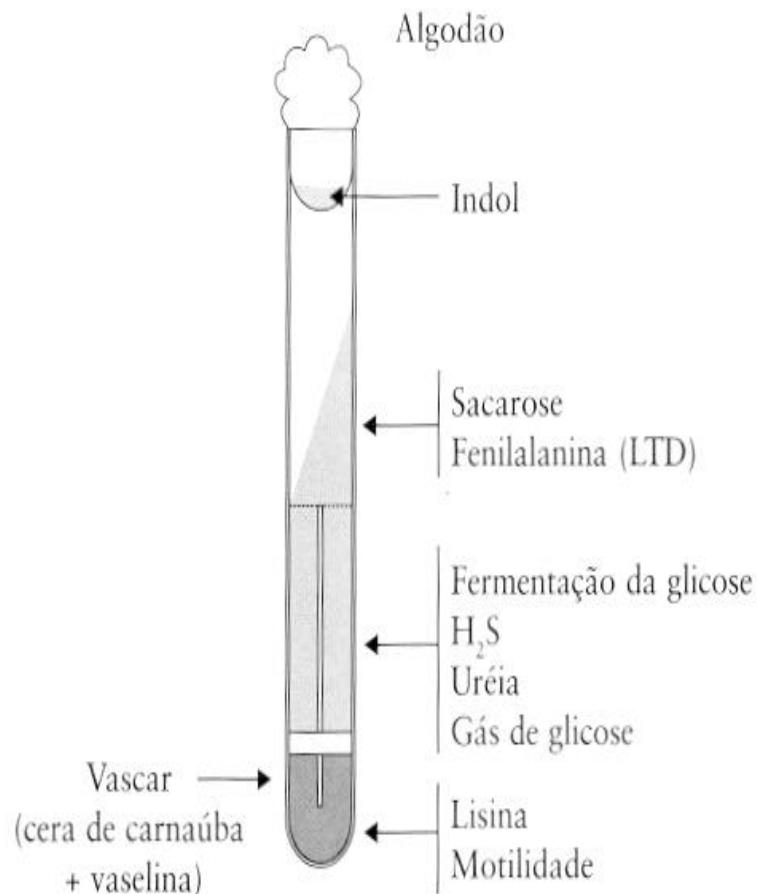


Provas bioquímicas

- Meio MILi (motilidade, Indol e Lisina)
 - Motilidade
 - crescimento apenas na linha de picada = motilidade negativa
 - Descarboxilação da lisina:
 - Produção do indol
- Meio EPM (Escola Paulista de Medicina)
 - Glicose
 - Produção de gás
 - Produção de H_2S
 - Hidrólise da uréia
 - Fenilalanina



RUGAI MODIFICADO (IAL)



Motilidade



Motilidade + Motilidade -

Se a bactéria possuir flagelos, ocorrerá turvação do meio

Descarboxilases

- Enzimas capazes de reagir com a porção carboxílica (COOH) dos aminoácidos
- Cada enzima decarbolixase é específica para um aminoácido.
- Aminoácidos testados rotineiramente na identificação de *Enterobacteriaceae*:
 - Lisina → cadaverina
 - Ornitina → putrescina
 - Arginina → citrulina . A citrulina é em seguida convertida em ornitina, que, a seguir, sofre decarboxilação formando putrescina.

Teste de descarboxilação da lisina

- Verifica a capacidade de um microorganismo em descarboxilar o aminoácido lisina com consequente alcalinização do meio de cultivo.
- Positividade para coloração do meio púrpura e turvo

Lisina $\xrightarrow{\text{LDÇ}}$



Cadaverina + CO₂

Púrpura de
bromocresol



Roxo

Ornитина

omnitina
descarboxilase

gás carbônico e putrecina

ROXO
Indicador de pH
púrpura de
bromocresol

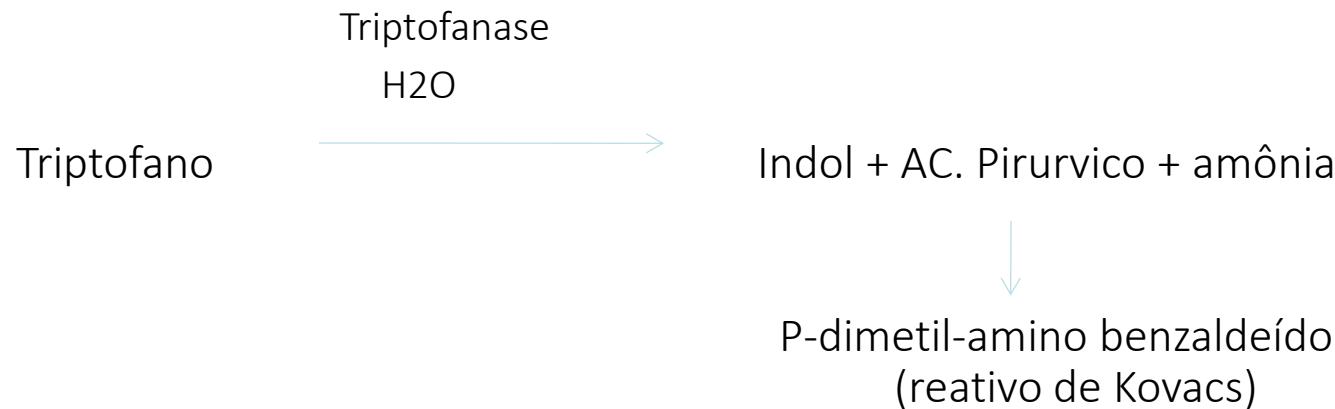


Produção de Indol

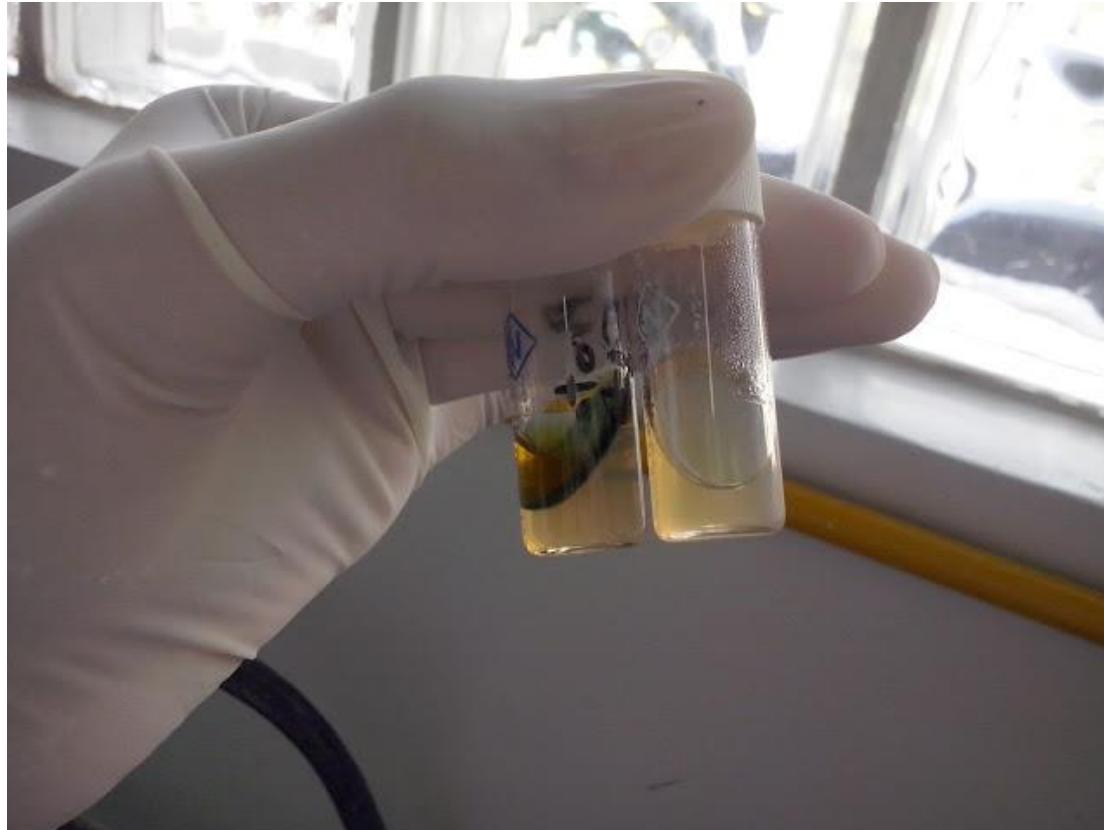
► Produção de Indol

Descarboxilação do triptofano

- Determina a habilidade de um determinado microorganismo em produzir o indol a partir da molécula de triptofano.

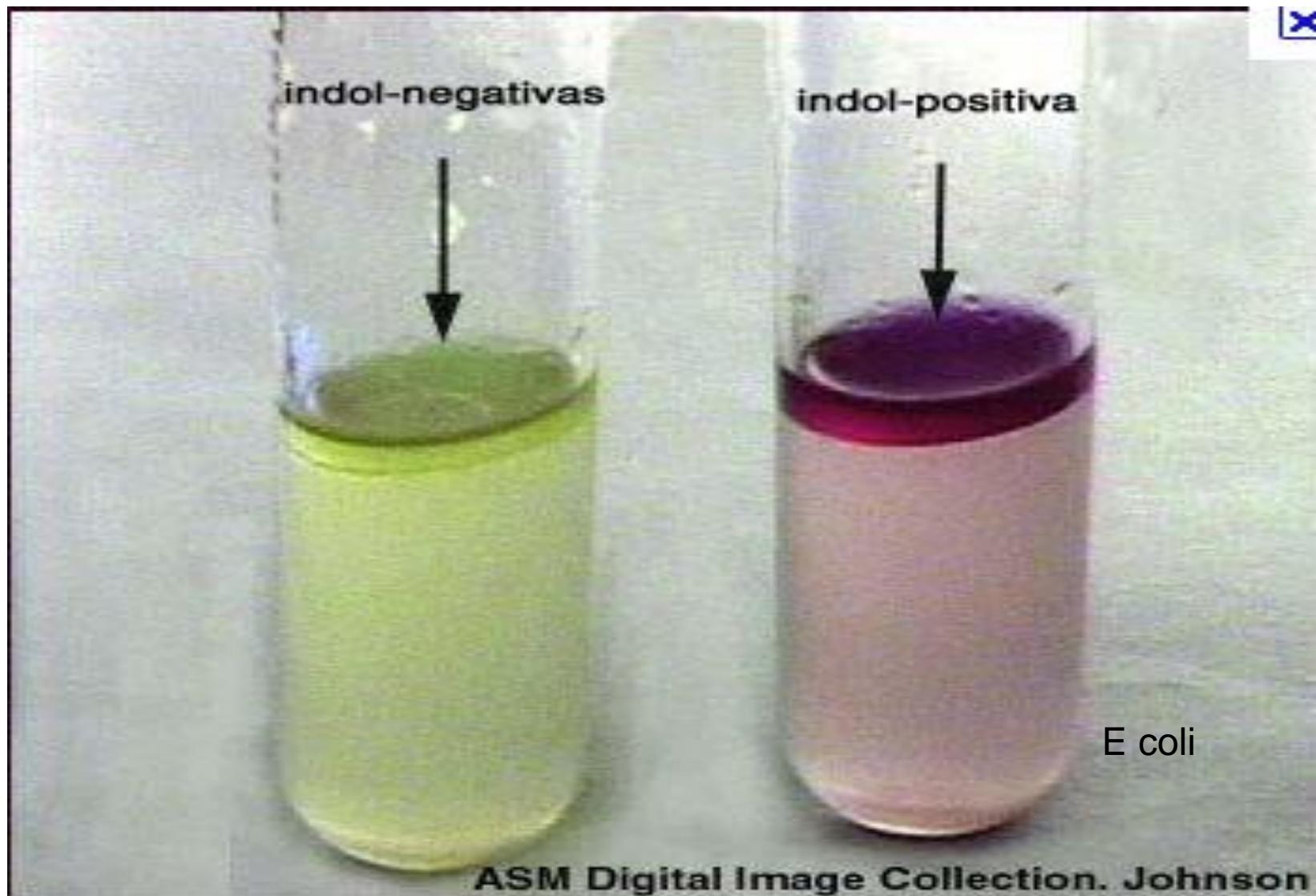


Desaminação da Fenilalanina



Desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina-desaminase, com formação de ácido fenil-pirúvico, cuja presença é revelada pela adição de cloreto férrico à cultura.

Produção de Indol



Teste de produção do sulfeto de hidrogênio (H_2S)

- As bactérias podem metabolizar aminoácidos que tem enxofre ou degradar o tiossulfato de sódio (substrato) em um ambiente ácido com produção de gás H_2S , que é incolor.
- O H_2S reage com componentes do meio produzem coloração negra

tiossulfato de sódio

tiossulfato
redutase

H_2S

+

sulfato
ferroso



precipitado preto de
sulfeto ferroso



Urease

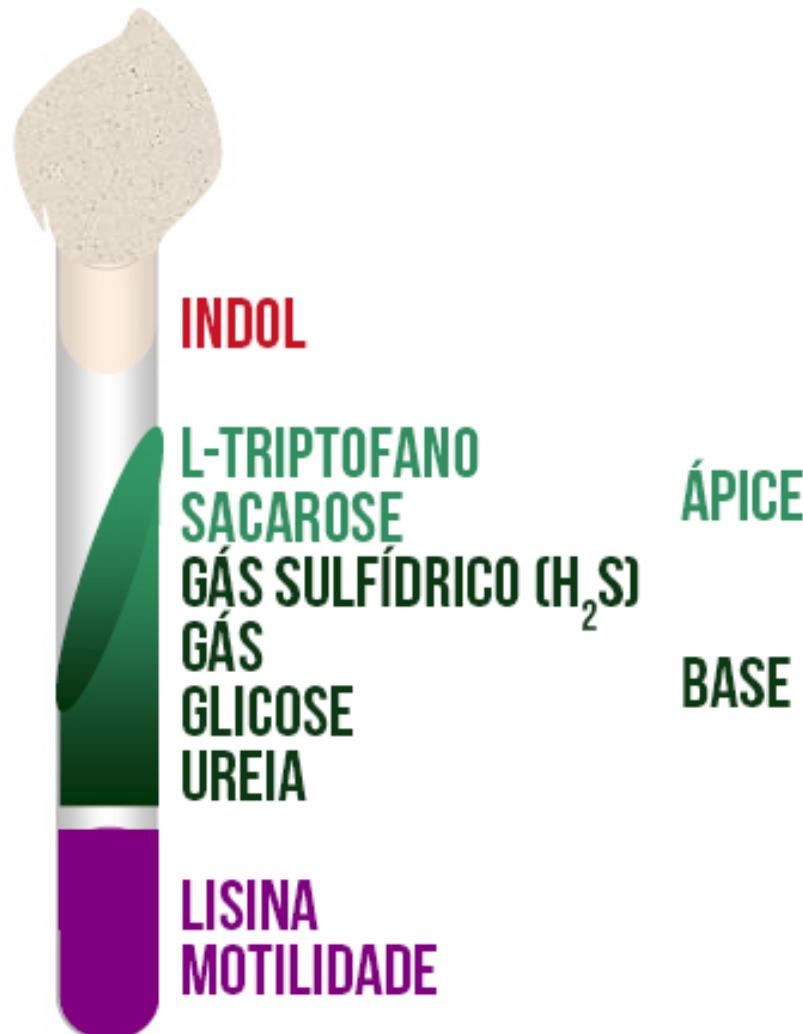
- Urease
 - Determina a habilidade de um determinado microorganismo em degradar enzimaticamente a uréia pela urease, com formação de duas moléculas de amônia.
 - A amônia alcaliniza o meio e virando o indicador de pH (azul de bromotimol) de verde para azul

COMPOSIÇÃO DO MEIO IAL/RUGAI

FASE SUPERIOR

VASCAR

FASE INFERIOR



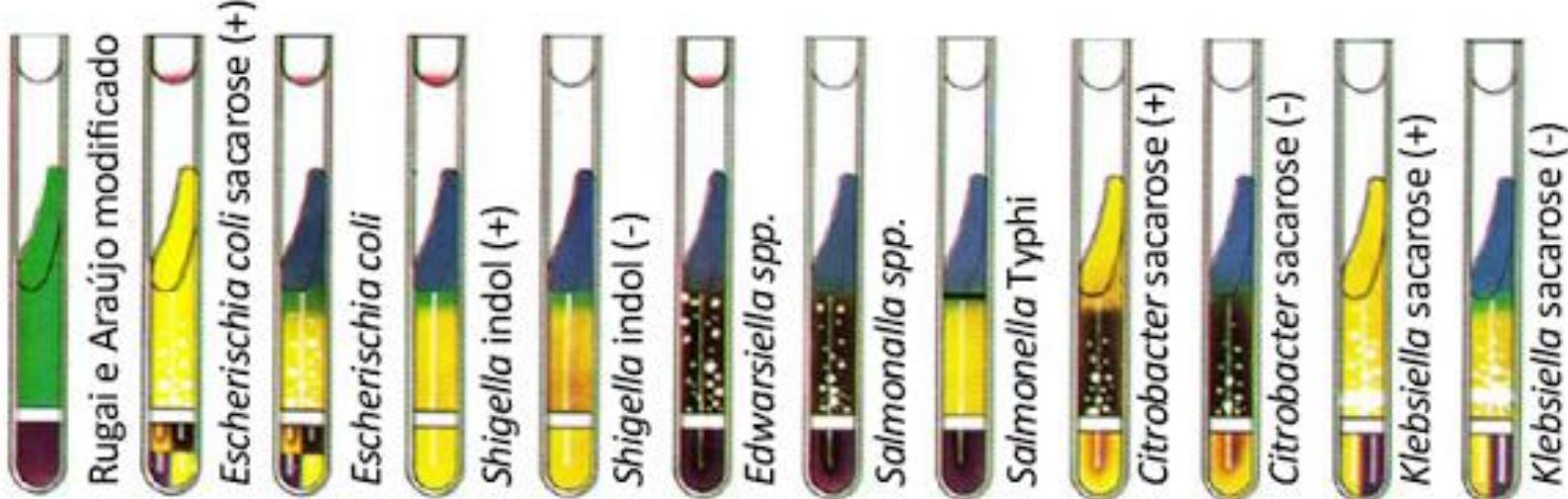
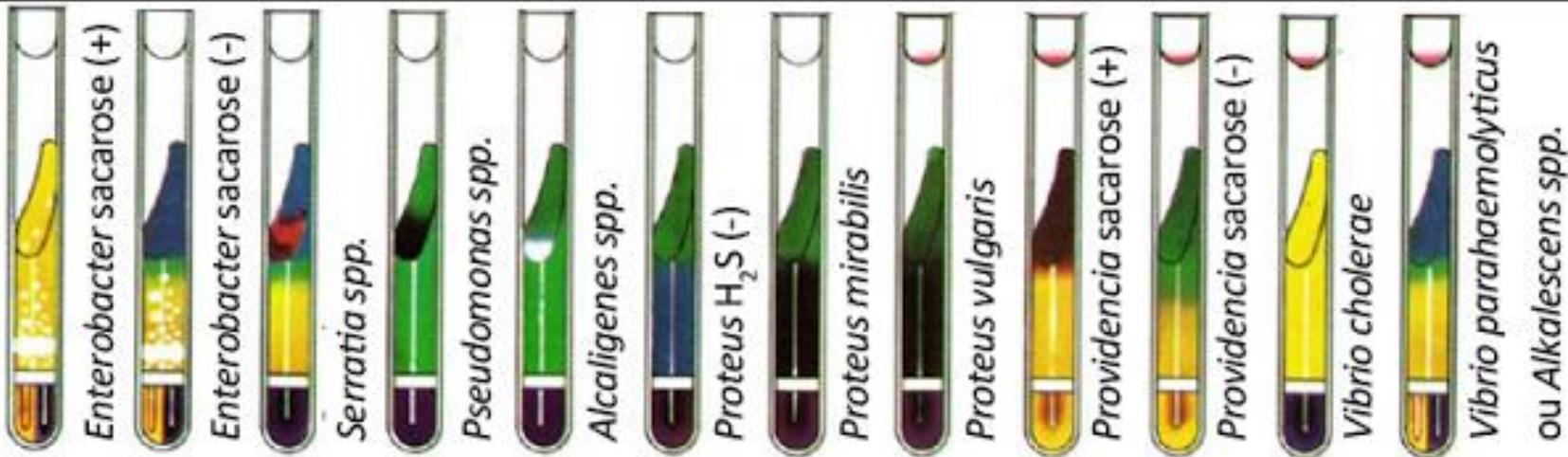


TABELA DE INTERPRETAÇÃO DO MEIO IAL / RUGAI - Biomedicina Brasil



LEGENDA

GLICOSE (+) / GÁS (+)	SACAROSE (-)	LTD (+)	MEIO INALTERADO
GLICOSE (+) / H ₂ S (+)	SACAROSE (+)	LTD (+) / SACAROSE (+)	GLICOSE (+)
INDOL (-)	UREASE (+)	LISINA (+) / MOTILIDADE (+)	LISINA (+) / MOTILIDADE (-)
INDOL (+)	UREASE (+) / H ₂ S (+)	LISINA (-) / MOTILIDADE (+)	LISINA (-) / MOTILIDADE (-)

Tampão de Algodão	
Reação	Interpretação
Rosa	Produção de indol
Inalterado	Ausência de indol
Parte Inclinada	
Reação	Interpretação
Amarelo	Sacarose fermentada
Azul	Sacarose não fermentada
Bisel castanho	Produção de LTD e sacarose fermentada
Base	
Reação	Interpretação
Amarelo	Sacarose fermentada
Amarelo com bolhas	Glicose fermentada c/ produção de gás
Negra	Produção de ácido sulfídrico
Azul	Produção de urease
Parte Inferior	
Reação	Interpretação
Violeta	Produção de lisina
Amarela	Ausência de lisina
Meio Turvo	Presença de Motilidade
Sem turvação	Ausência de motilidade

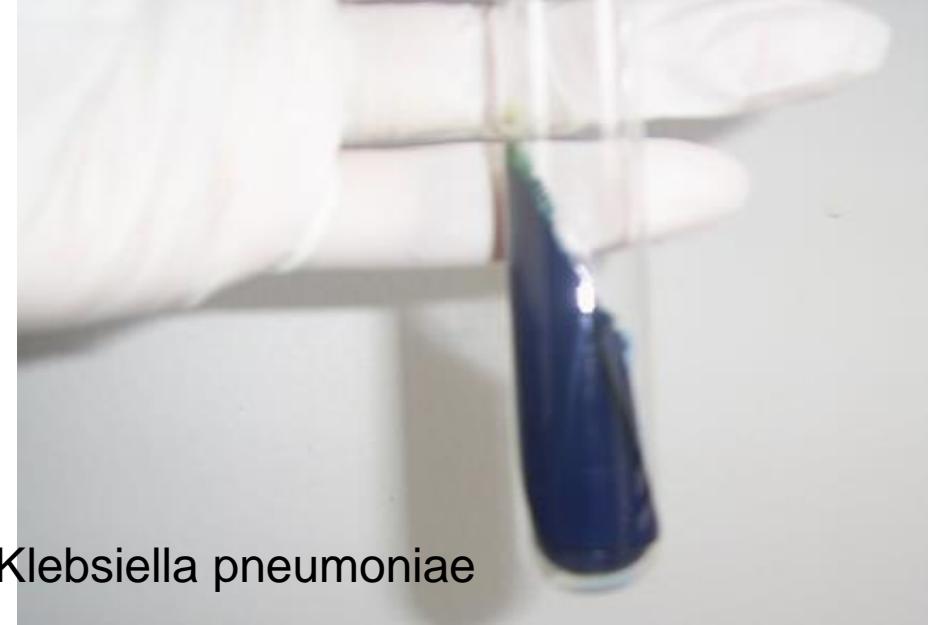
Prova do Citrato de Simmons

- Serve para saber se a bactéria é capaz de utilizar o Citrato de sódio como única fonte de carbono;
- **Deve ser semeado em primeiro lugar**
- Cor verde : citrato negativo
- Cor púrpura: citrato positivo
- Citrato de sódio → hidróxido de amônia
 - (aumenta o pH)
 - (muda a cor do meio)

Prova do Citrato de Simmons



Prova negativa



Prova positiva

Quando as bactérias metabolizam o citrato, alcalinizam o meio. O pH básico faz o meio, que antes apresentava-se verde, ficar azul, devido ao indicador azul de bromotimol.

Inocular na superfície

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *E.coli*
 - Crescimento em ágar MacConkey
 - Produzem gás a partir da glicose
 - Lactose e sacarose positivas
 - Indol positivas
 - Motilidade positiva
 - Lisina positiva
 - H2S negativas
 - Citrato negativas
 - Urease negativas
 - Móveis (exceto EIEC)

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Citrobacter freundii*.
 - Produzem gás a partir da glicose
 - Lactose, sacarose e manitol positivas
 - Podem apresentar prova de Indol **positiva** ou negativa
 - Motilidade positiva
 - Lisina negativas
 - H2S positivas
 - Citrato positivas
 - Hidrólise de uréia positivas/negativas



Citrobacter freundii em ágar sangue

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Proteus mirabilis*
 - Produzem gás a partir da glicose
 - Não fermentadoras de lactose e sacarose
 - Indol negativo. *Proteus vulgaris*: Indol positivo
 - Motilidade positivo
 - Lisina negativa
 - H₂S positivo
 - Citrato positivo
 - Urease positivo

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Serratia marcescens*
 - Podem produzir pouco gás a partir da glicose (50%)
 - Lactose negativa e sacarose positiva
 - Indol negativas
 - Motilidade positiva
 - Lisina positiva
 - H₂S negativo
 - Citrato positivo
 - Urease negativa
 - A DNase é um teste fundamental para a identificação de *Serratia*, e recomenda-se a utilização rotineiramente.

Serratia marcescens

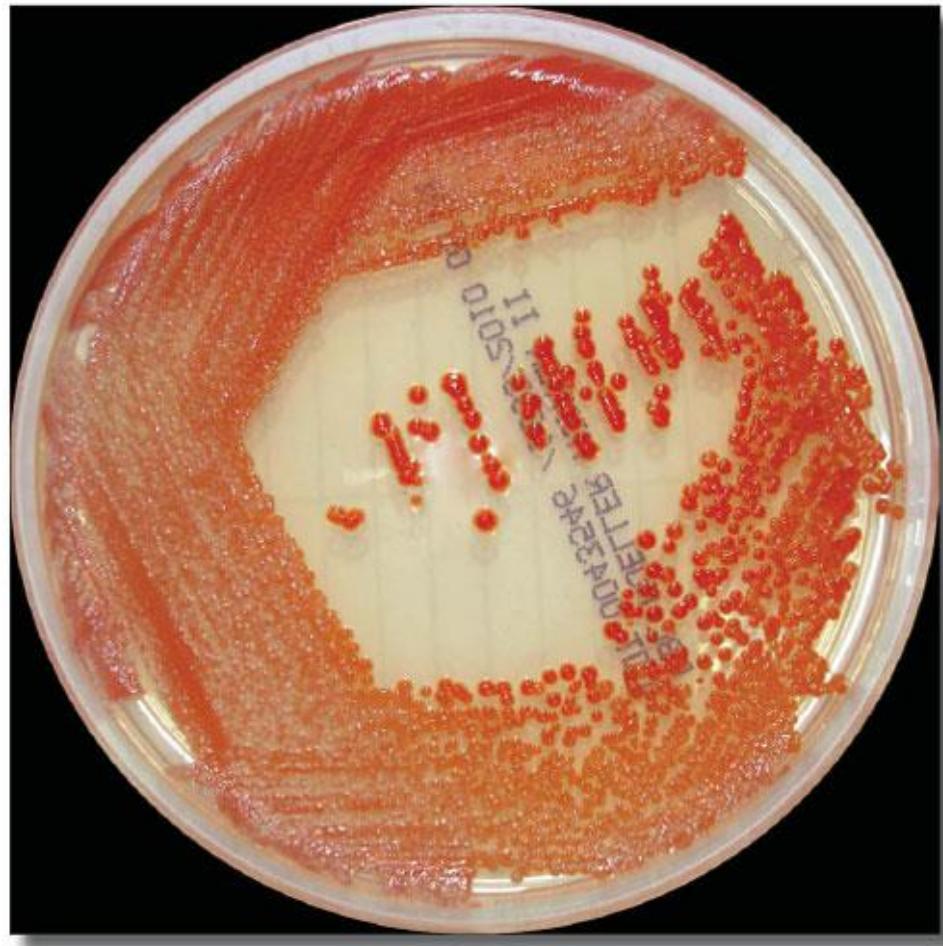


Figura 1. Aislado clínico de *S. marcescens* en agar MH luego de 48 horas de incubación a 35 °C. En general las cepas clínicas no presentan pigmento a diferencia de las cepas ambientales que en su mayoría lo poseen.

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Klebsiella pneumoniae*.
 - Cepas de *Klebsiella* possuem um metabolismo muito ativo.
 - Produzem colônias mucóides,
 - Produzem gás a partir da glicose
 - Fermentam a maioria dos carboidratos
 - Lactose e sacarose positivas
 - Indol negativas
 - Mobilidade negativa
 - Lisina positiva
 - H₂S negativo
 - Citrato positivo
 - Urease positivo

Klebsiella pneumoniae



Klebsiella pneumoniae em ágar sangue e Mac Conkey

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Shigella spp.*
 - Crescimento em ágar SS e Hektoen
 - Não produzem gás a partir da fermentação de glicose
 - Não fermentadoras de lactose e sacarose. Fermentam manose
 - Podem apresentar prova de Indol positiva ou negativa
 - Motilidade negativa
 - Lisina negativas
 - H₂S negativo
 - Citrato negativas
 - Urease negativas

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Salmonella spp.*
 - Crescimento em meio SS e Hektoen (coração preta)
 - Produzem pouco gás a partir da fermentação da glicose
 - São em geral lactose e sacarose negativas,
 - Indol negativas,
 - Motilidade positiva
 - Lisina positiva.
 - H2S positiva
 - Citrato positivas
 - Urease negativas

Agar SS



MB-S1394 **Salmonella Shigella (SS) Agar**
Cultivated *Shigella flexneri* (L)
/ *Salmonella typhimurium* (R)

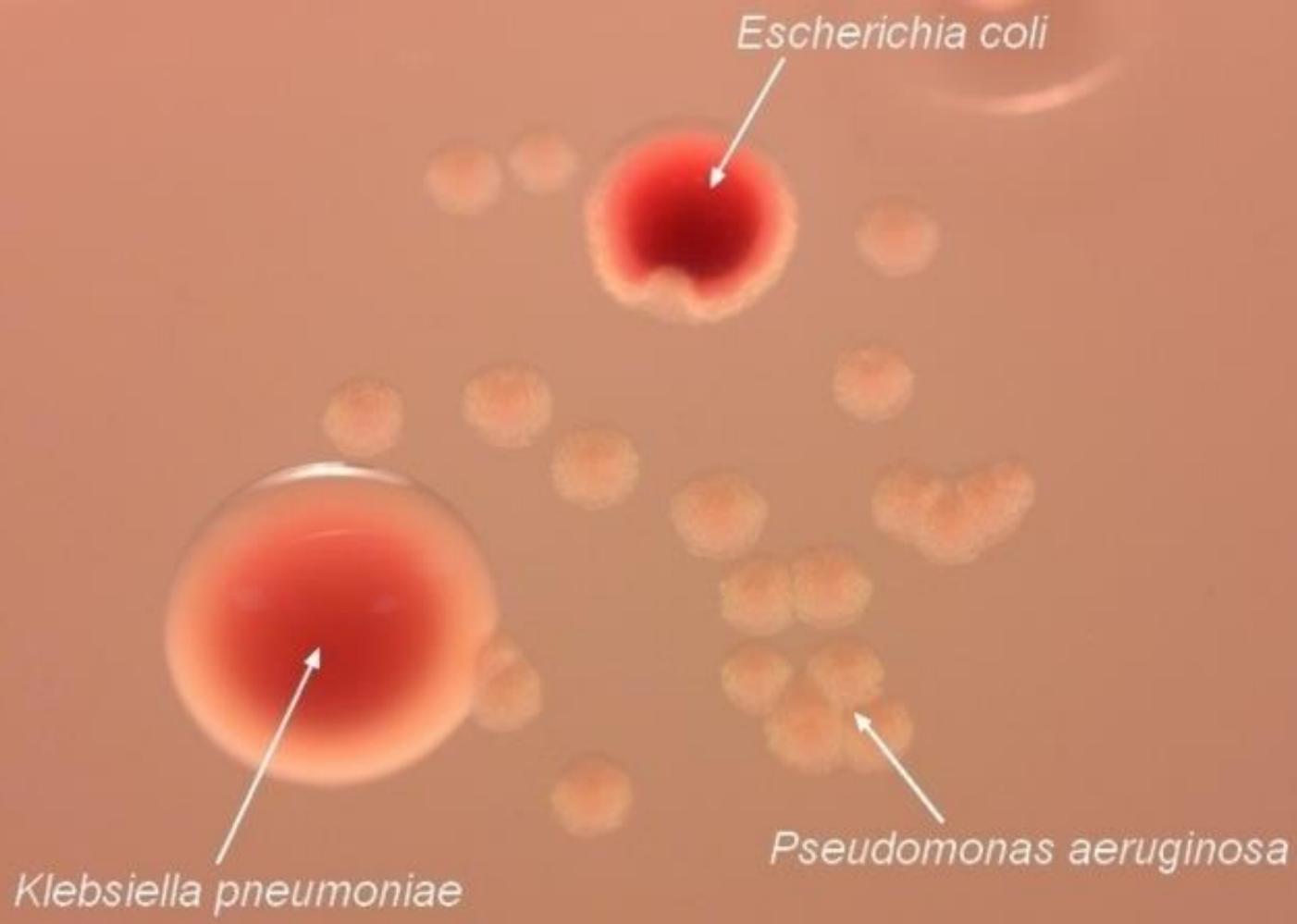
- O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção da produção de **sulfureto de hidrogénio** como se pode verificar pelas colónias com centros pretos;
- Este meio é utilizado para o **isolamento primário de *Salmonella*** proveniente de amostras de fezes humanas.

Diagnóstico

- Principais formas de diagnóstico para *Yersinia enterocolitica*
 - Não produz gás a partir da glicose
 - Sacarose positiva
 - Indol +/-
 - Móvel a 22ºC; imóvel a 35ºC
 - Lisina negativa
 - Não produz H2S
 - Citrato negativa
 - Urease +/-



Yersinia enterocolitica em Ágar Mac Conkey



Provas bioquímicas



Fonte: IAL

Salmonella spp



Fonte: IAL

Shigella



Fonte: IAL

Escherichia. coli

Provas bioquímicas



Klebsiella spp.

Proteus spp.

Serratia spp.

Citrobacter spp.

Diagnóstico diferencial

- Para o diagnóstico das diferentes cepas de *E.coli*, pode-se utilizar soros monovalentes ou polivalentes específicos contra determinados抗ígenos expressos pela bactéria.
 - Ex: Soro anti *E.coli* enteroinvasiva, enteropatogênica clássica, etc.

SOROS ANTI E. COLI ENTEROINVASORA

Indicações:

Soros polivalentes e monovalentes preparados em coelhos para identificação dos sorogrupo de *E. coli* enteroinvadora (EIEC). Todos os soros contêm anticorpos contra antígenos O e antígenos superficiais do tipo K, aglutinando bem culturas homólogas vivas e aquecidas, resultando em reações rápidas e, de modo geral, completas.

. **Polivalente A:** contém anticorpos contra as *E. coli* 028ac, 029, 0136, O144 e 0152.

. **Polivalente B:** contém anticorpos contra as *E. coli* 0112ac, 0124, 0143 e 0164 e O167.

. **Monovalentes:** contêm anticorpos contra cada um dos sorotipos anteriores, separadamente.

Composição:

Soro de coelho hiperimunizado.....	0,3 mL
Solução salina	2,7 mL
Conservante.....	0,015 mL

Procedimento:

Deve ser utilizada a técnica de aglutinação em lâmina (vide verso).

Leitura:

São positivas as reações de aglutinação que ocorrem dentro de 2 minutos e que são completas.

Reações mais demoradas e parciais devem ser consideradas negativas.

TÉCNICA DE AGLUTINAÇÃO EM LÂMINA

A técnica é simples e funciona bem quando as seguintes recomendações são observadas rigorosamente:

1. Placa ou lâmina de aglutinação: deve ser bem limpa e desengordurada com álcool.
2. Suspensão bacteriana: deve ser bastante espessa. Por exemplo, obtém-se uma suspensão suficientemente espessa quando se suspende o crescimento da superfície do meio EPM em 0,2 - 0,3 mL de salina.
3. Proporção suspensão/antisoro: para uma gota liberada pelo conta-gotas dos soros PROBAC, deve-se usar uma gota da suspensão bacteriana (item 2) menor que a gota do soro (aproximadamente metade).
4. Mistura suspensão/antisoro: deve ser totalmente homogênea e deve ocupar uma área de 1,5 cm de diâmetro.
5. Movimentação da placa: movimentar a placa de modo que a mistura suspensão/soro se desloque fácil e continuamente. Manter a movimentação pelo menos por 1 a 2 minutos.
6. Aquecimento da suspensão: os soros anti-*Shigella*, anti-*Salmonella* e anti-*Yersinia enterocolitica* são soros anti-O e, portanto podem não aglutinar culturas ricas em antígenos superficiais. Este fenômeno é mais frequente com *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii* e *Y. enterocolitica*. Assim sendo, quando os testes bioquímicos indicam tratar-se de uma das bactérias acima e a aglutinação for negativa ou fraca, aquecer a suspensão bacteriana em banho-maria fervente por 10 minutos, deixar esfriar e repetir a aglutinação.