

# Identificação de cocos gram positivos

Profa Alessandra Barone

Prof. Archangelo Fernandes

# Identificação de cocos Gram+

## *Staphylococcus*

*S. aureus*

*S. epidermidis*

*S. saprophiticus*

*S. haemolyticus*

*S. lugdunensis*

## *Streptococcus*

*S. pyogenes*

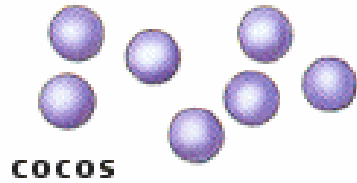
*S. agalactiae*

*S. pneumoniae*

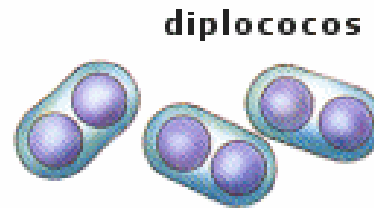
*S. bovis*

*S. viridans*

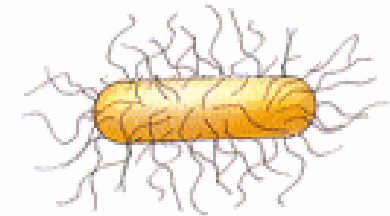
## *Enterococcus*



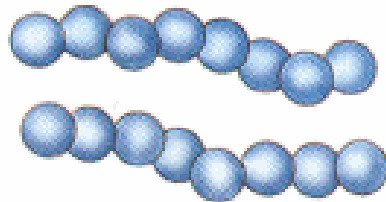
**esporos bacterianos**



**diplococos**



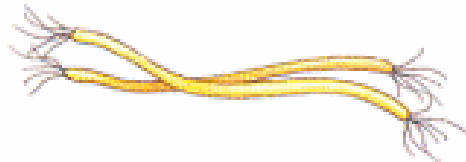
**bactéria flagelada**



**estreptococos**



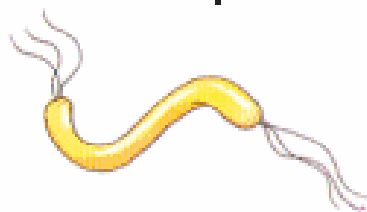
**estafilococos**



**espirilos**



**vibriões**



**bacilos**



# *Staphylococcus aureus*

- Uma das espécies patogênicas mais comuns, sendo a mais virulenta espécie do seu gênero.
- **Cresce bem em ambientes salinos.**
- Cerca de 15% dos indivíduos são portadores de *S.aureus*, na pele ou nasofaringe. A infecção é frequentemente causada por pequenos cortes na pele.
- As toxinas são proteínas produzidas e secretadas ou expostas à superfície pela bactéria cuja atividade é destrutiva para as células humanas.

# Doenças causadas pelo *S.aureus*

- Síndrome de choque tóxico
- **Gastroenterite estafilocócica**
- Síndrome de pele escaldada estafilocócica
- Impetigo
- Foliculite e celulite
- Endocardite
- Osteomielite: infecção da medula óssea após bacteremia.
- Pneumonia: pode ocorrer por aspiração de comida semi-digerida (vômito, por exemplo).



## Celulite

Infecção bacteriana que envolvem as camadas interiores da pele que afeta especificamente a derme e tecido adiposo

## Síndrome da pele escaldada

Doença epidermolítica, mediada por **exotoxinas** que se caracteriza por eritema, desprendimento generalizado das camadas superficiais da epiderme, envolvendo, principalmente, crianças até os 5 anos de idade



## Impetigo

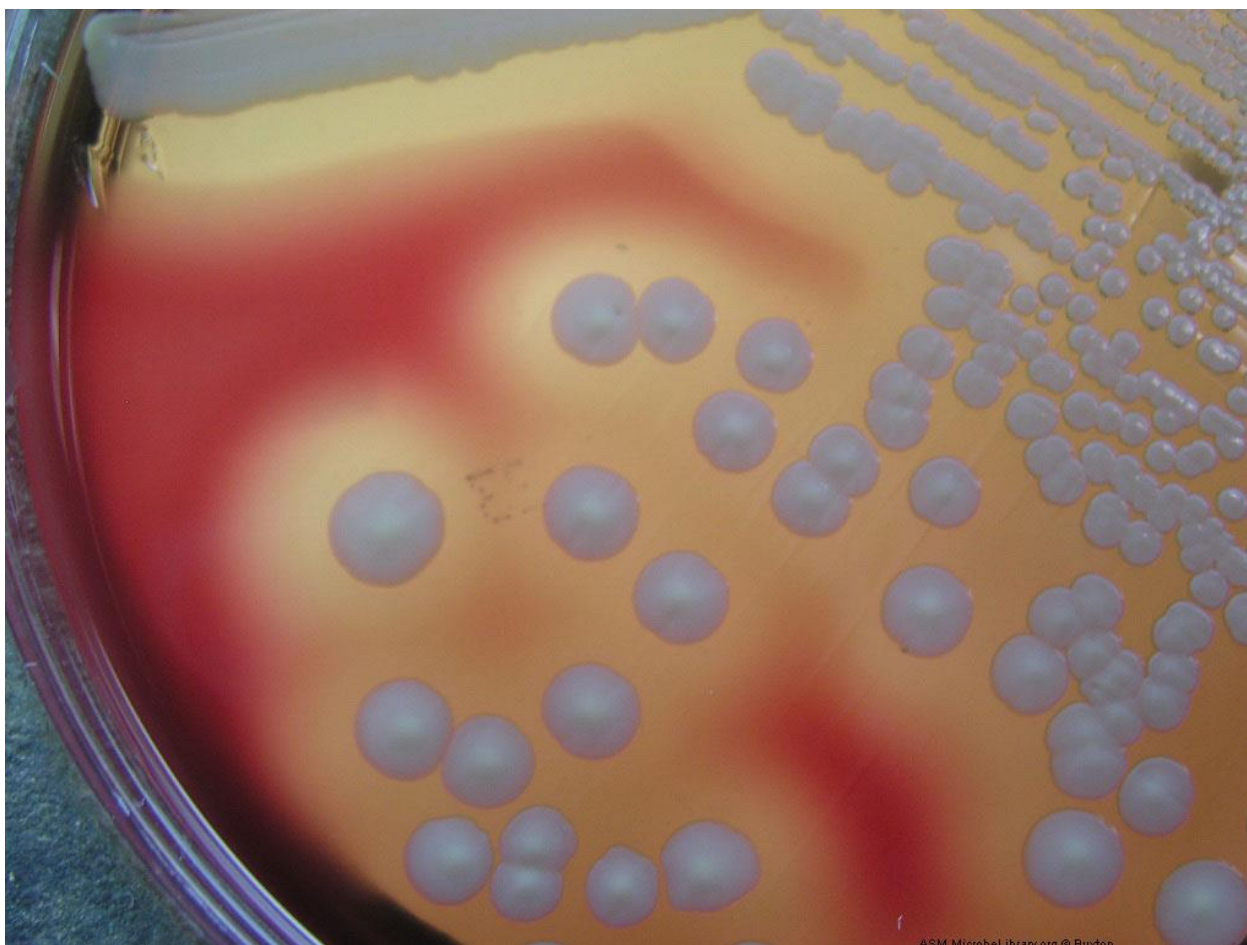
- Dermatose superficial, muito comum em crianças pequenas
- Pode afetar qualquer segmento da pele, sendo a face e as mãos os locais mais comuns.
- Um ferimento mal higienizado favorece o desenvolvimento de infecções bacterianas em geral.



## Choque tóxico

- Intoxicação multissistêmica caracterizada por febre, hipotensão e erupção eritematosa e difusa
- Apresenta alta mortalidade quando não tratada.





Cultura de *S.aureus* em ágar sangue

# *Staphylococcus epidermidis*

- Pertence a flora normal da pele e mucosas.
- Não produz toxinas.
- É considerado espécie de estafilococos coagulase negativo e catalase positiva de maior prevalência e persistência na pele humana.
- É identificado como agente de **bacteremia de origem hospitalar e infecções associadas a implantações de próteses (válvulas) cardíacas, articulares e de catéteres intravenosos e peritonias.**

# *Staphylococcus epidermidis*

- Possui uma capacidade de formar biofilmes, dificultando a chegada de drogas antibacterianas e células fagocíticas no foco de infecção.
- Mais comum a ocorrência de infecção no local da sutura.
- Identificação da espécie pode ser feito após prova de Catalase e Coagulase com um antibiograma evidenciando a sua **sensibilidade** a Novobiocina.

## Cultura de *S.epidermidis* em ágar sangue



# *Staphylococcus saprophyticus*

- Causam **infecções nas vias urinárias** em mulheres jovens sexualmente ativas.
- As mulheres infectadas apresentam disúria (dor ao urinar), piúria (pus na urina) e numerosos microrganismos na urina.
- Respondem rapidamente a antibióticos e é rara a ocorrência de re-infecção.

# *Staphylococcus saprophyticus*

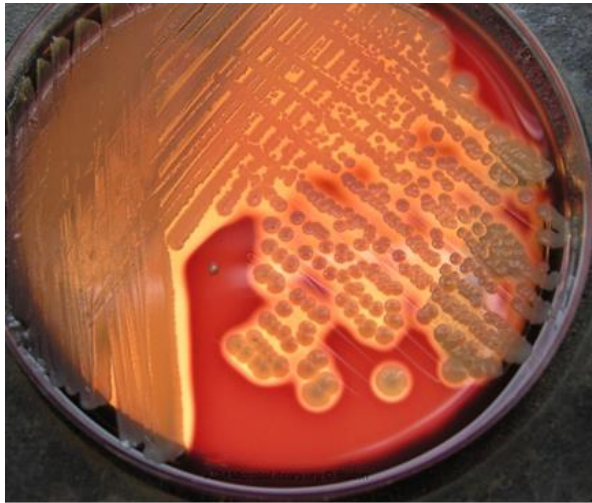
- Disposta em cachos, tétrades ou duplas. Apresenta-se como coagulase negativa e catalase positiva.
- É **resistente** à novobiocina ( $\beta$ -lactâmicos) sendo fator de pesquisa para identificação da espécie.

- ▶ Cultura de *S.saprophyticus* em ágar sangue



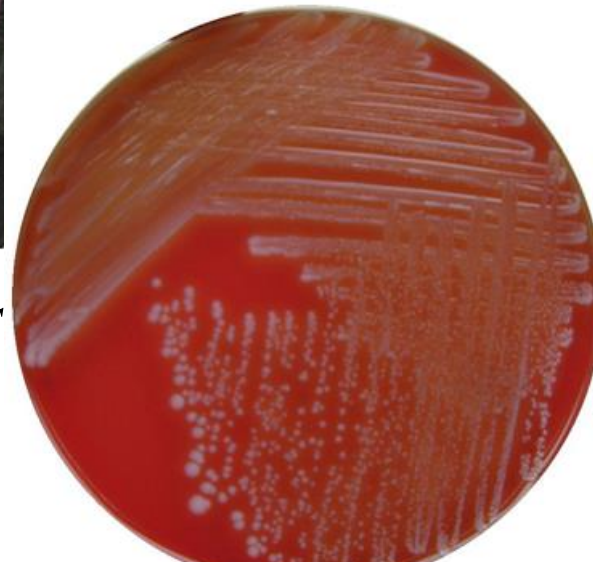


# Isolamento dos *Staphylococcus* spp.



*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus saprophyticus*



ASM MicrobeLibrary.org © Buxton

*Staphylococcus epidermidis*



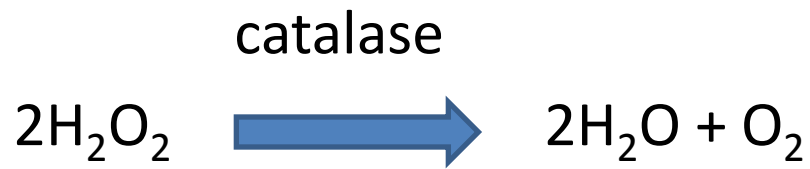
# Identificação de *Staphylococcus* spp.

- 1) Bacterioscopia
- 2) Prova da Catalase
- 3) Prova da Coagulase
- 4) Crescimento em ágar Manitol
- 5) Prova da DNase
- 6) Resistência à Novobiocina

# Provas de identificação:

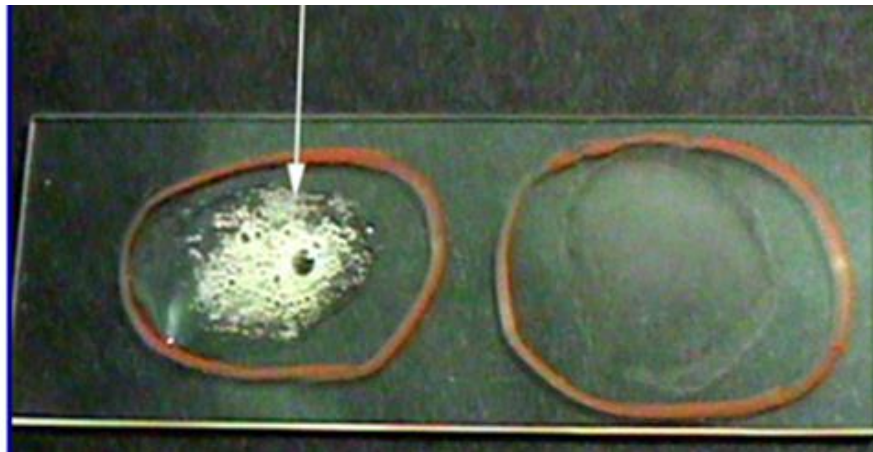
## Prova da catalase

- Utilização para diferenciação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.
- Diferenciadora de famílias e não de gêneros:
- Algumas bactérias possuem a enzima catalase, capaz de converter o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.



# Prova da catalase

- Em uma lâmina, colocar duas amostras da bactéria isolada.
- Pingar sobre a amostra uma gota de peróxido de hidrogênio 3%
- Observar a produção da liberação de  $O_2$  com a formação de bolhas.
- O teste é positivo para *Staphylococcus sp.*



*Staphylococcus spp*

*Streptococcus spp*

# Prova da coagulase

- As coagulases são enzimas com ação semelhante a protrombina.
- Agem sobre o plasma sanguíneo **transformando fibrinogênio em fibrina com a produção de coágulo.**
- Podem ser encontradas em duas formas: conjugada e livre.
- Coagulase positiva para *Staphylococcus aureus*

# Verificação da coagulase livre

- A coagulase livre é uma substância similar a trombina e está presente em filtrados e cultivos.
- **É secretada extracelularmente** e reage com uma substância presente no plasma – CRF (fator de reação com a coagulase) para formar um complexo que reage com o fibrinogênio, formando fibrina.

# Coagulase livre

- Com auxílio da agulha bacteriológica, suspender colônias em estudo em caldo BHI e colocar em estufa à 37°C até que turve;
- Em um tubo de ensaio estéril, colocar 0,5 ml de plasma reconstituído e 0,5 ml do caldo BHI com crescimento bacteriano recém turvado;
- Incubar em estufa à 35°C 4 horas;
- Verificar se há presença de coágulo de fibrina;
- Se não houver presença de coágulo, incubar o tubo em temperatura ambiente e repetir as leituras com 18 e 24 horas de incubação.

# Coagulase conjugada

- A maioria dos *S. aureus* possui uma coagulase ligada na superfície da parede celular que reage com o fibrinogênio plasmático causando a coagulação

# Coagulase conjugada

- Traçar dois círculos com lápis de cera em uma lâmina de vidro;
- Colocar duas gotas de água destilada ou solução fisiológica estéril dentro de cada círculo;
- Com auxílio de um fio bacteriológico agregar a colônia em estudo, homogeneizando delicadamente em cada círculo;
- Colocar uma gota de plasma para a prova de coagulase em um dos círculos;

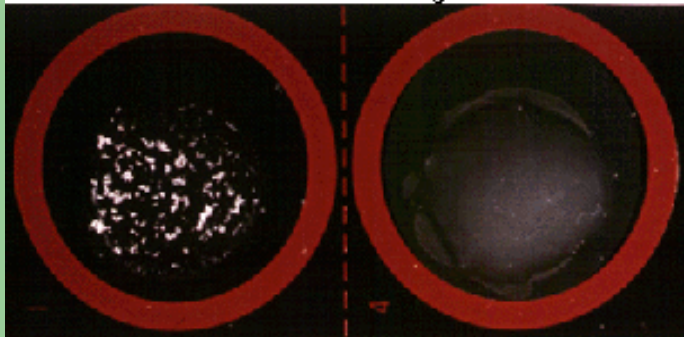


# Coagulase conjugada

- No outro círculo, adicionar outra gota de água destilada ou solução fisiológica estéril, como controle;
- Homogeneizar com palito de madeira;
- Inclinar a lâmina delicadamente, para frente e para trás;
- Observar presença de aglutinação.

# Prova da Coagulase

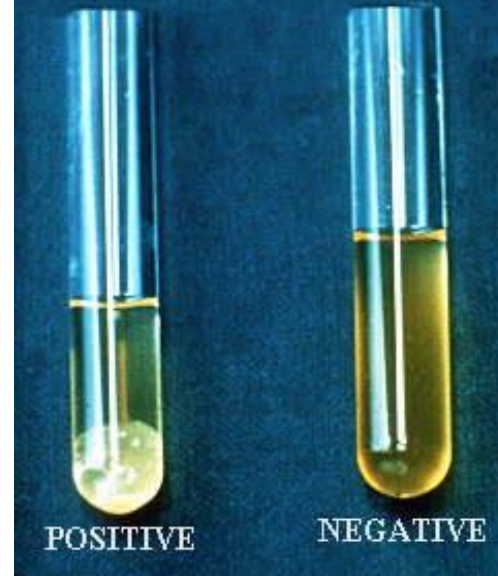
**Clumping Factor Test  
(correlates with coagulase)**



**Staphylococcus  
aureus**

**Staphylococcus  
epidermidis**

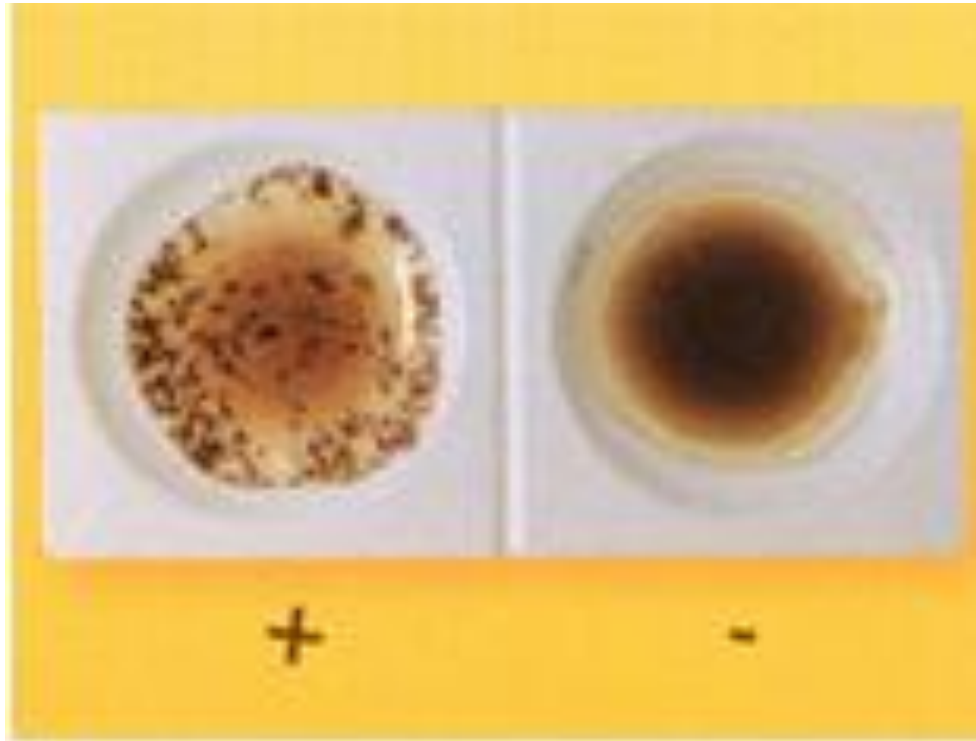
**COAGULASE  
TEST**



**POSITIVE**

**NEGATIVE**

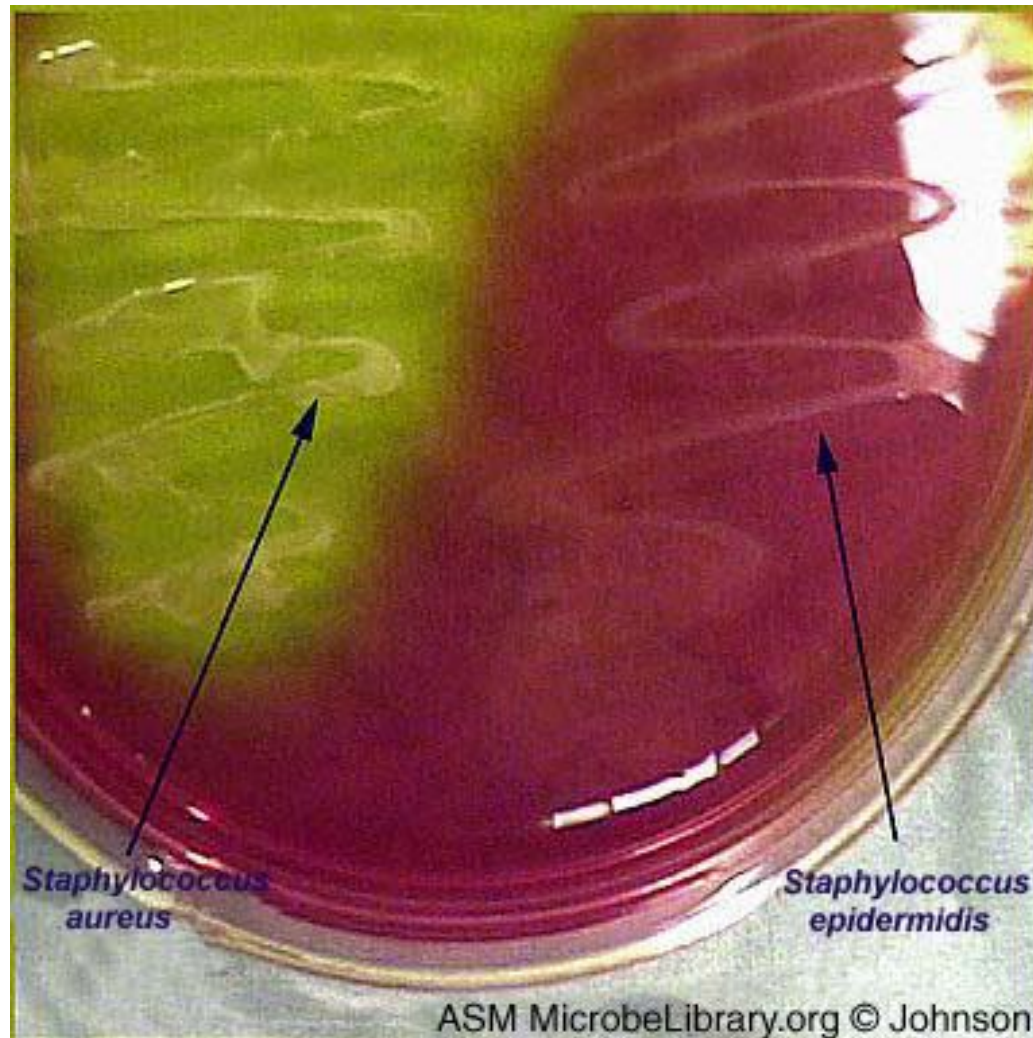
# Staphy test



O teste se baseia na capacidade do *Staphylococcus aureus* aglutinar hemácias de carneiro previamente sensibilizadas com hemolisina e fibrinogênio;

# Fermentação em ágar manitol (7,5 de NaCl)

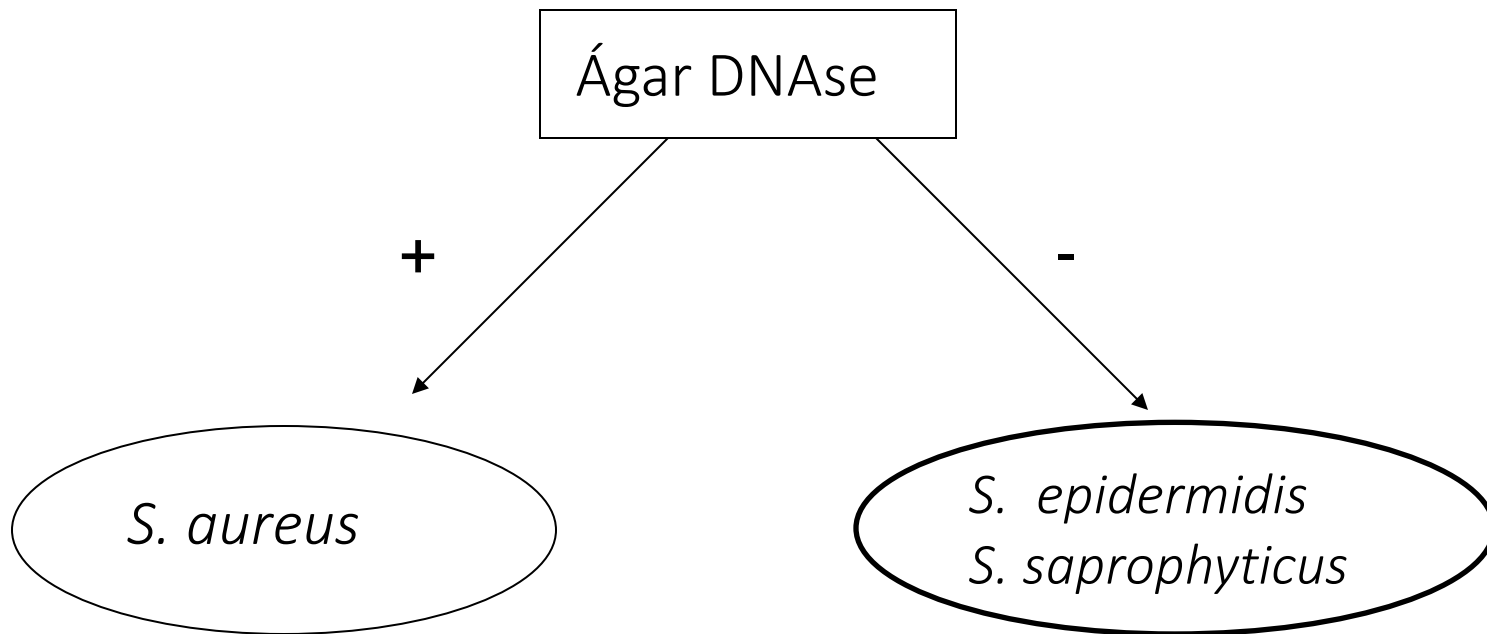
- O ágar manitol é um meio de cultura seletivo.
- Possui grande concentração de **NaCl** (6,5 a 7,5%) e **indicador de pH vermelho de fenol** - vermelho em pH alcalino e neutro; amarelo em pH ácido.
- A fermentação do manitol pelas bactérias, leva a produção de ácidos, o que determina a mudança de cor do vermelho para o amarelo.
- Positivo para *Staphylococcus aureus*. Algumas amostras podem positivar para *S.saprophyticus*.



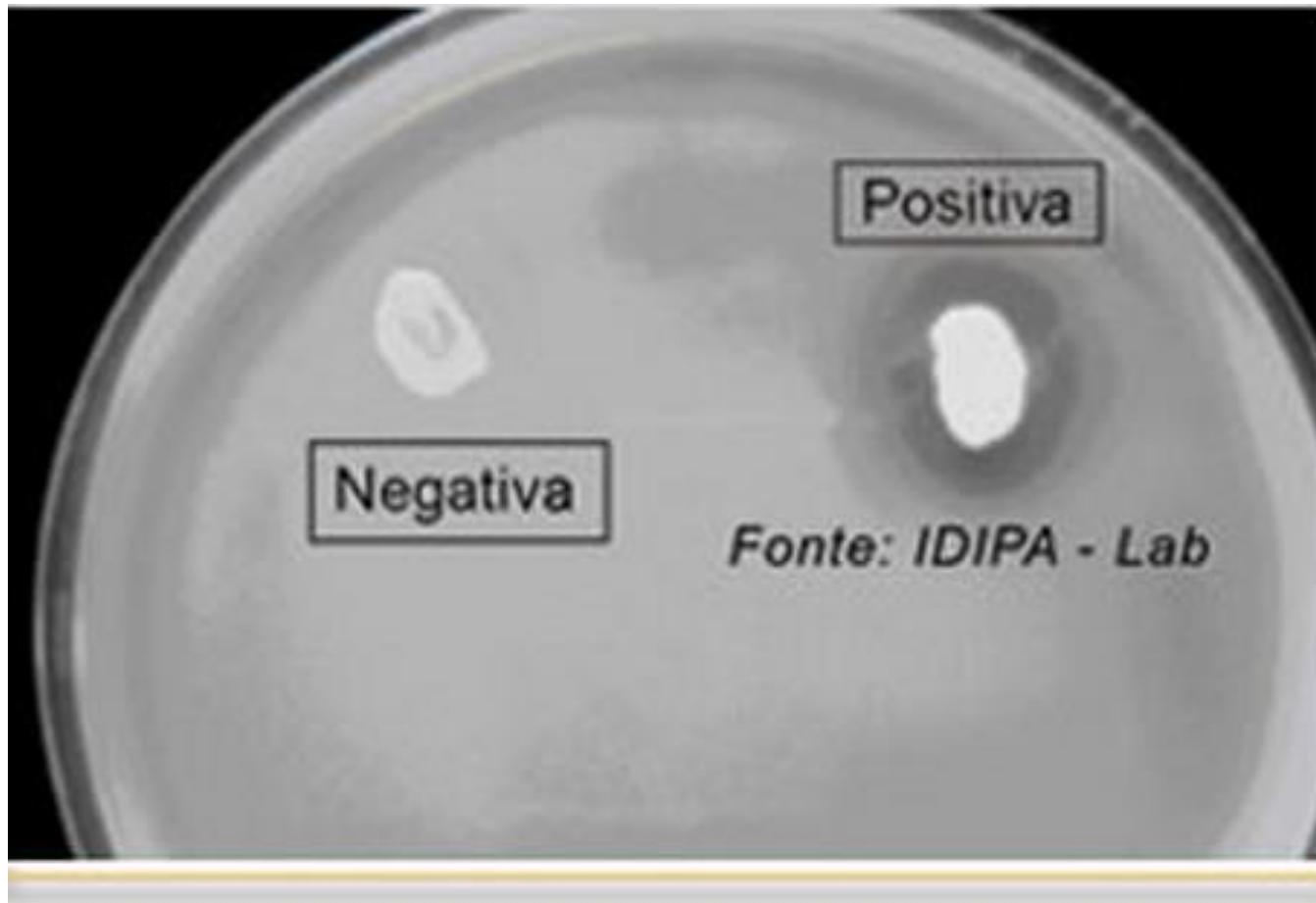
Ágar manitol

# Prova da DNase

- Semear uma colônia em ágar DNase e incubar a 35 graus por 24 horas.
- No momento da leitura adicionar HCl 1N sobre a placa, aguardar 30 segundos e observar a formação de um halo claro ao redor da colônia.



# Prova da DNase

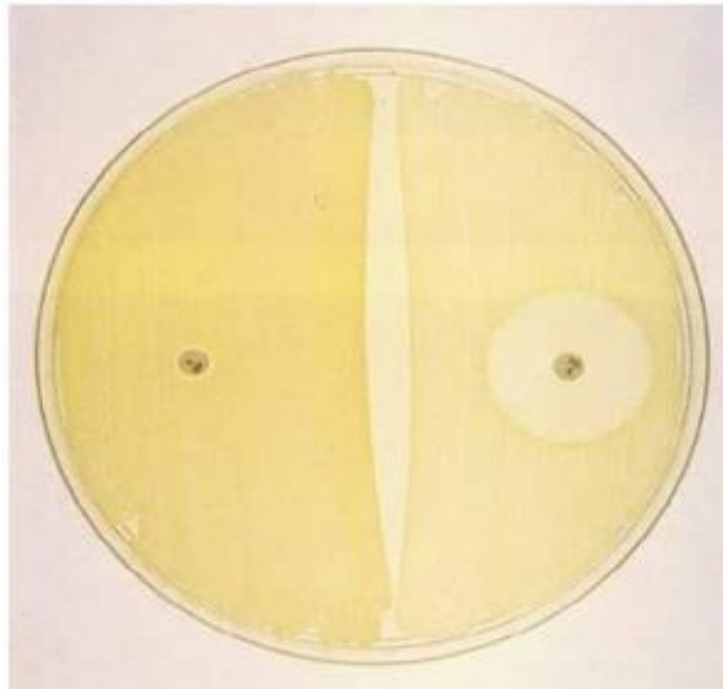


**Figura 3 - Teste de DNase com HCl 1N**

# Teste de sensibilização a Novobiocina

- Ágar Miller-Hinton com disco de novobiocina (5mg)
- Formação de halo de inibição para *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.
- Resistência conferida ao *Staphylococcus saprophyticus*.

*S. saprophyticus*



*S. epidermidis*



Tabela para identificação de cocos  
Gram + Catalase +  
(*Staphylococcus spp.*)

	Coagulase	Manitol	DNAse	Novobiocina
<i>S. aureus</i>	+	+	+	Sensível
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	Sensível
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	Resistente



Todos são Catalase +

*Streptococcus spp.*

# Importância clínica dos principais *Streptococcus spp.*

- Cocos Gram +
- Colônias lineares
- Catalase –
- Aeróbicos e anaeróbicos facultativos.
- Imóveis
- Não formam esporos
- Fazem parte da microbiota normal da boca, pele, intestinos e trato respiratório superior.

# Classificação quanto ao grau de hemólise

- **Total ou beta hemolíticas** : positiva para *Streptococcus pyogenes*. Forma um halo branco ao redor da bactéria;
- **Parcial ou alfa hemolíticas**: positiva para *Streptococcus pneumoniae*. Forma um halo esverdeado ao redor da bactéria
- **Não hemolíticas ou gama hemolíticas**: positiva para *Streptococcus viridans* ou *Enterococcus spp.* Sem halo.

# Classificação de Lancefield

- A classificação de Lancefield leva em conta o tipo de polissacarídeo presente na parede celular bacteriana, chamado de carboidrato C, detectado por técnicas de tipagem (aglutinação simples e reações colorimétricas), ou reações de precipitações com antisoros específicos

# Classificação de Lancefield

- Grupo A: ramnose n-acetilglicosamina
- Grupo B: ramnose glicosamina
- Grupo D : Acido teicóico glicerol com D-alanina e glicose
  
- Grupo A: *Streptococcus pyogenes*
- Grupo B : *Streptococcus agalactiae*
- Grupo D : *Streptococcus bovis* e *Enterococcus* s.p

# *Streptococcus pyogenes*

- Beta hemolíticos
- Encontrados no trato respiratório superior e lesões cutâneas.
- Doenças causadas:
  - Faringite estreptocócica
  - Erisipela e impetigo
  - Piodermite
  - Fasciíte necrosante
  - Febre reumática
  - Glomerulonefrite

# Erisipela



Diagnóstico clínico: presença de placa inflamatória associada a febre, linfangite, adenopatia e leucocitose;  
Os exames bacteriológicos têm baixa sensibilidade ou positividade tardia;  
A penicilina continua a ser o antibiótico de referência.



# Impetigo



É a mais comum das infecções da pele;  
Dissemina-se por auto inoculação, transmissão direta e indireta, por toalhas ou roupas;

# Faringite



# Fasciite necrotizante



- A infecção pode iniciar por pequenas rupturas na pele - os sintomas precoces com frequência são ignorados, o que atrasa o diagnóstico e o tratamento, gerando sérias consequências;
- A exotoxina A - age como um superantígeno, estimulando o sistema imune a contribuir para a extensão do dano.

# *Streptococcus agalactiae*

- Presentes nas mucosas do trato genito-urinário e intestinal
- Maioria das amostras são beta hemolíticos.
- Anaeróbicos facultativos
- Doenças causadas:
  - Endometrite
  - Sepses
  - Febre puerperal
  - Meningite neonatal

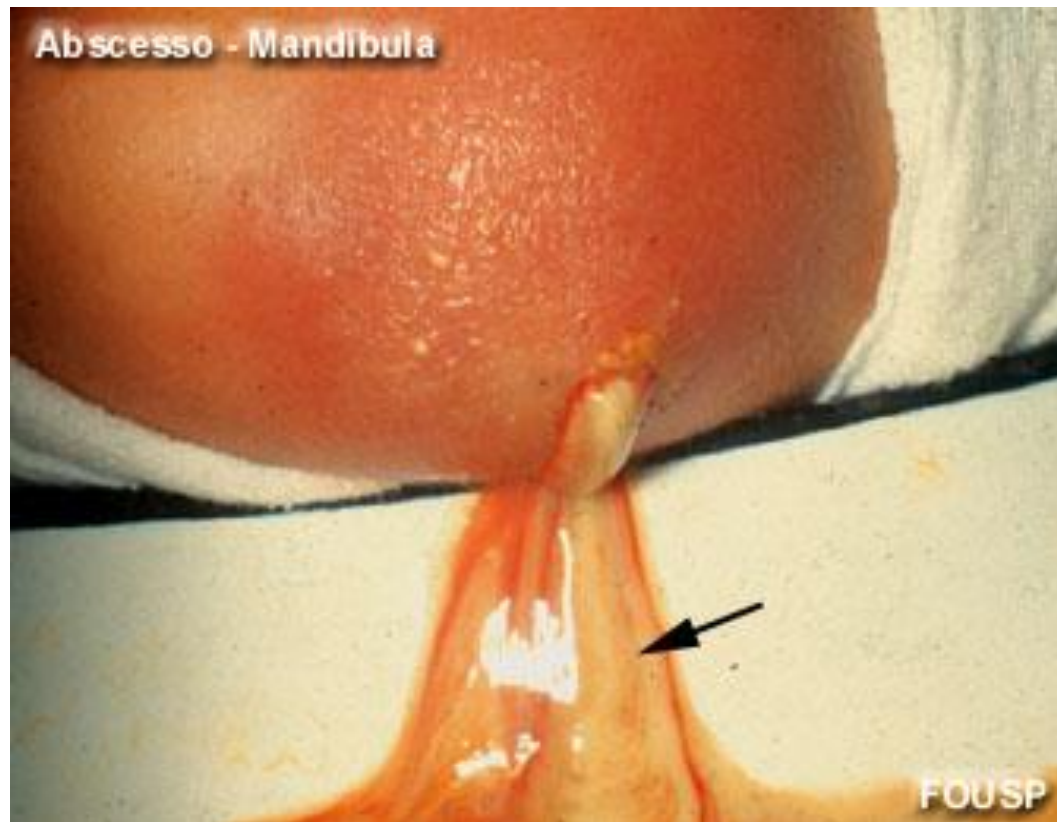
# *Streptococcus pneumoniae*

- Alfa hemolíticos em aerobiose e beta hemolíticos em anaerobiose
- Estão presentes na nasofaringe
- Doenças causadas:
  - pneumonia
  - meningite
  - septicemia
  - otite média
  - sinusites
  - infecções trato respiratório

# *Streptococcus bovis*

- Não hemolíticos, podendo apresentar atividades alfa ou beta hemolíticos
- Encontrados no trato gastrointestinal
- Doenças ocasionadas:
  - Endocardite
  - Abscessos
  - Infecções urinárias
  - Doença maligna do cólon

# Abcesso



# *Streptococcus viridans*

- Alfa hemolíticos e não hemolíticos
- Flora normal da boca, faringe e trato genito-urinário
- Doenças ocasionadas:
  - Endocardites
  - Abscessos
  - Infecções no trato genito-urinário
  - Infecções de feridas
  - Cáries



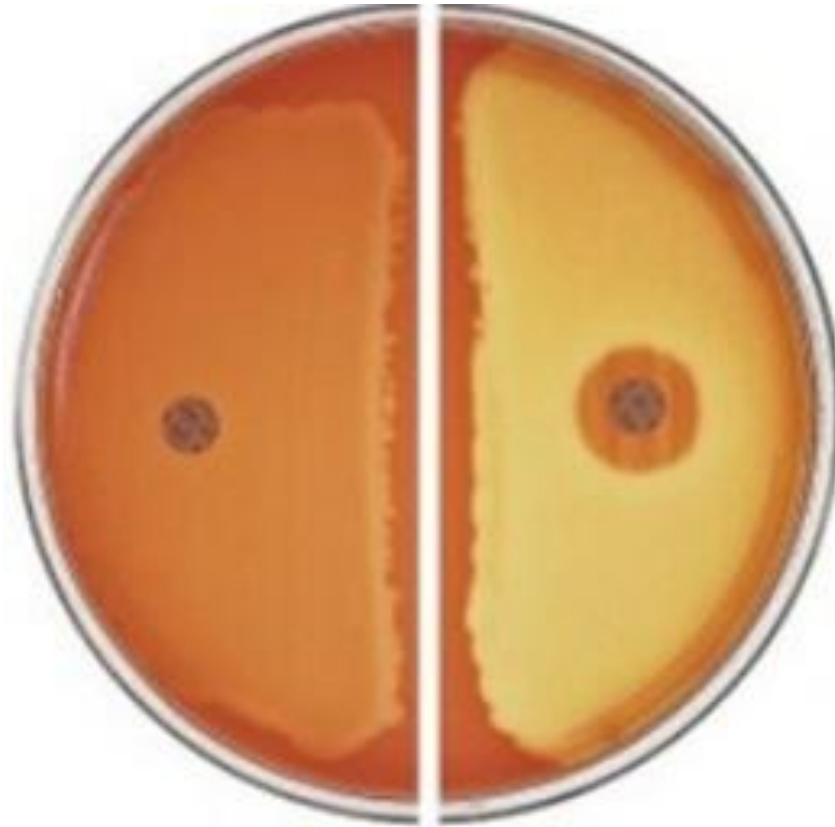
# *Enterococcus* sp

- Este gênero inclui o *E. faecalis*, *E. faecium*
- Habitualmente não hemolítico
- Oportunistas reconhecidos como causa importante de infecções hospitalares, destacando-se as endocardites e as infecções do trato urinário e de feridas cirúrgicas
- Resistência plasmidial à vários antibióticos
- Doenças causadas :
  - Infecções do trato biliar
  - Peritonite
  - Meningite
  - Bacteremia do RN

# Provas de identificação para diferenciação de *Streptococcus* spp.

- Prova da bacitracina
  - Utilizada para a identificação de *Streptococcus pyogenes*.
  - A partir do caldo de BHI ou TSB recém turvado, realizar a semeadura em meio de ágar sangue contendo disco de bacitracina
  - Incubar a 35°C por 24 horas sem tensão de CO<sub>2</sub>.
  - **Positivo para *S.pyogenes* com formação do halo de inibição ao redor do disco indicando sensibilidade**

# Teste de Bacitracina



*S. agalactiae*

*S. pyogenes*

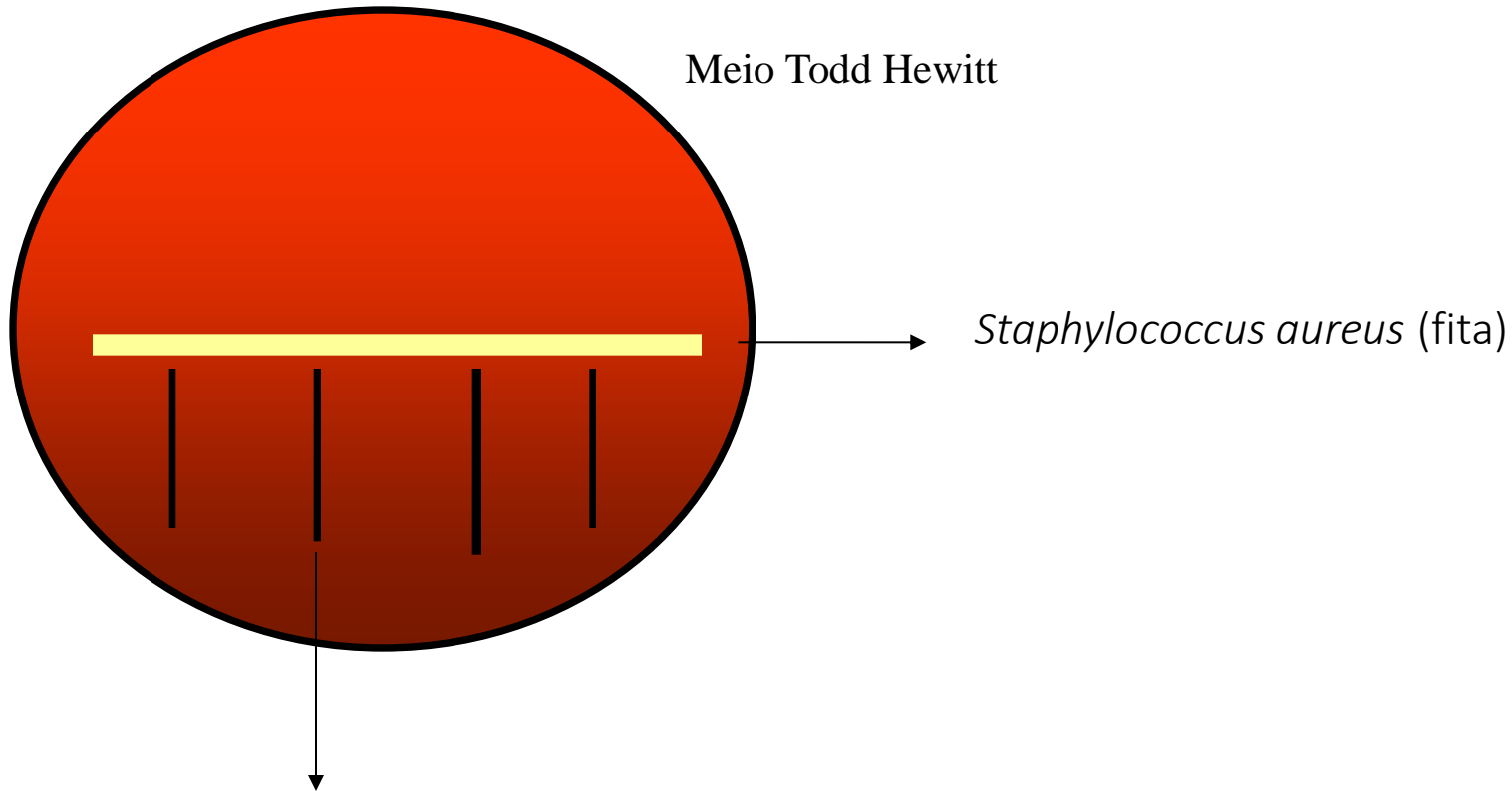
# Provas de identificação para diferenciação de *Streptococcus* spp.

- Camp Test
  - Na metade da placa de **ágar sangue**, semeia-se de ponta a ponta, uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtor de beta-hemolisina.
  - Semear perpendicularmente (90°) a bactéria a ser testada, sem que haja o contato com a estria de *Staphylococcus aureus*;

# Provas de identificação para diferenciação de *Streptococcus* spp.

- Teste de Camp – Camp test
  - Incubar em 37°C durante 24 horas.
  - A observação de uma hemólise em ponta de seta, indica a interação entre o fator CAMP produzido pelos *Streptococcus* com a beta hemolisina dos *Staphylococcus aureus*.
  - Teste positivo para *Streptococcus agalactiae*

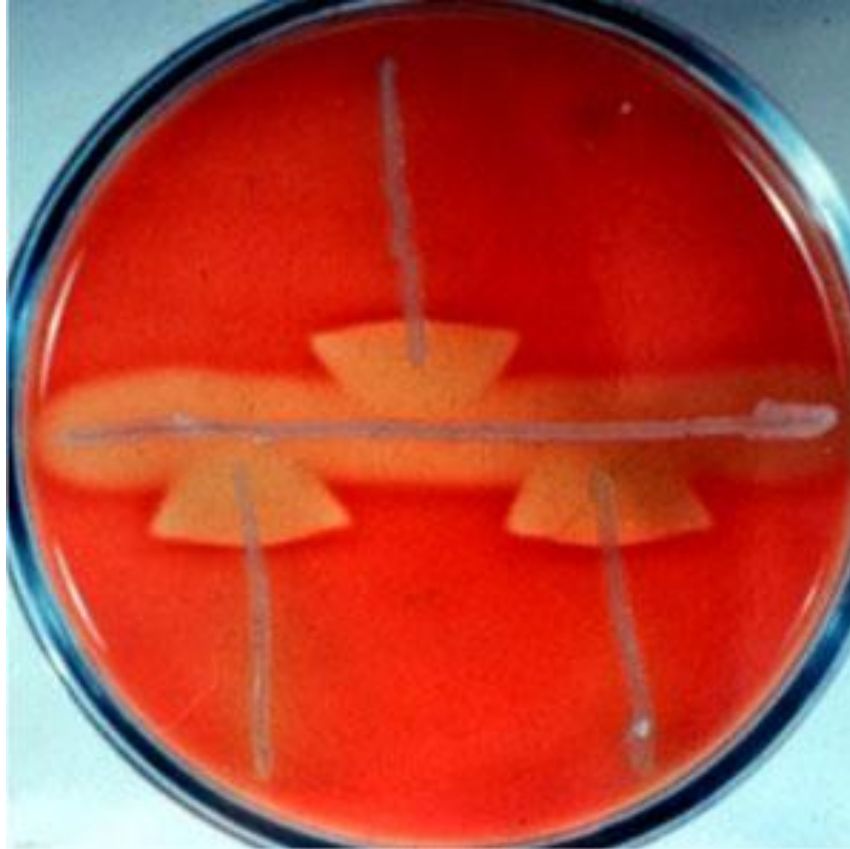
# Teste de Camp (Camp Test)



*Streptococcus* a ser identificado

Incubar a 37 °C por 24 horas e observar hemólise na região entre o *Staphylococcus* e o *Streptococcus* a ser identificado

# Teste de Camp



# Provas de identificação para diferenciação de *Streptococcus* spp.

- Teste de hidrólise de hipurato
  - Positivo para *Streptococcus agalactiae*
  - Apenas *S. agalactiae* produz a enzima que hidrolisa o hipurato, produzindo coloração púrpura no meio de cultura após adição de cloreto férrico.

*S agalactiae*

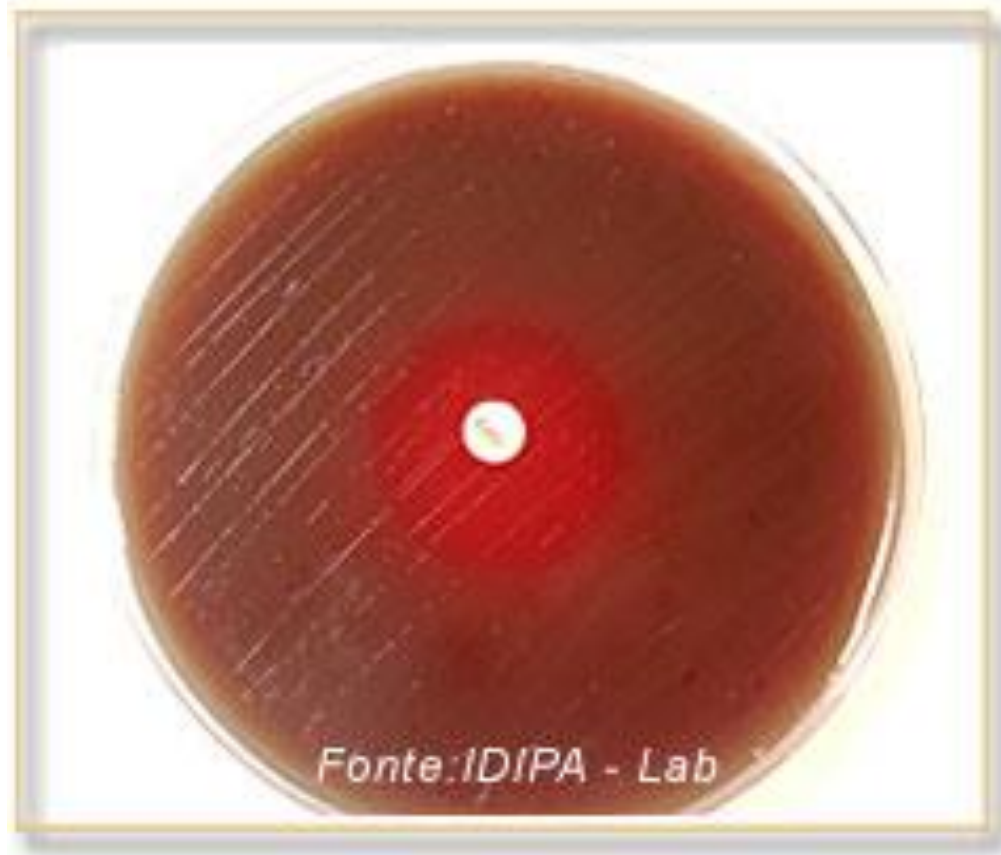




# Provas de identificação para diferenciação de *Streptococcus* spp.

- Teste de optoquina
  - Utilizada para identificação de *Streptococcus pneumoniae*.
  - A partir do caldo de BHI ou TSB recém turvado, semear em meio ágar sangue com o disco de optoquina de 5 mg.
  - Incubar a 35°C 24hrs
  - Positivo com formação de halo de inibição de 14mm ou mais para disco de 6 mm

# Teste de optoquina



# Teste de bile esculina



O Ágar bilie esculina é um meio seletivo para *Streptococcus bovis* e *Enterococcus sp.*

Semear uma colônia da bactéria a ser identificada em meio bile-esculina e incubar por 24 horas a 37 °C.

**Coloração marrom-escuro ou negra: teste é +**

# Provas de identificação para diferenciação de *Streptococcus* spp.

- Tolerância ao NaCl
  - A tolerância ao NaCl a 6,5% é uma prova utilizada para verificar a capacidade de alguns microrganismos crescerem em presença do sal.
  - Meio base utilizado é o **BHI caldo**.
  - Este meio normalmente contém 0,5 % de NaCl e aumenta-se a concentração para 6,5 %, tornando um meio semi-seletivo para o desenvolvimento de alguns microrganismos.
  - Crescimento bacteriano com turvação do meio.
  - Positividade para *Enterococcus spp.*

# Tabela para identificação de cocos G + catalase –

	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. bovis</i>	<i>Enterococos</i>
Resistência à Bacitracina	S	R	R	R	R
Teste Camp	-	+	-	-	-
Hidrólise do hipurato	-	+	-	-	-
Resistência à Optoquina	R	R	S	R	R
Bile-esculina	-	-	-	+	+
NaCl 6,5%	-	-	-	-	+

# Cocos gram negativos

## *Neisseria* spp.

*Neisseria gonorrhoea*

*Neisseria meningitidis*

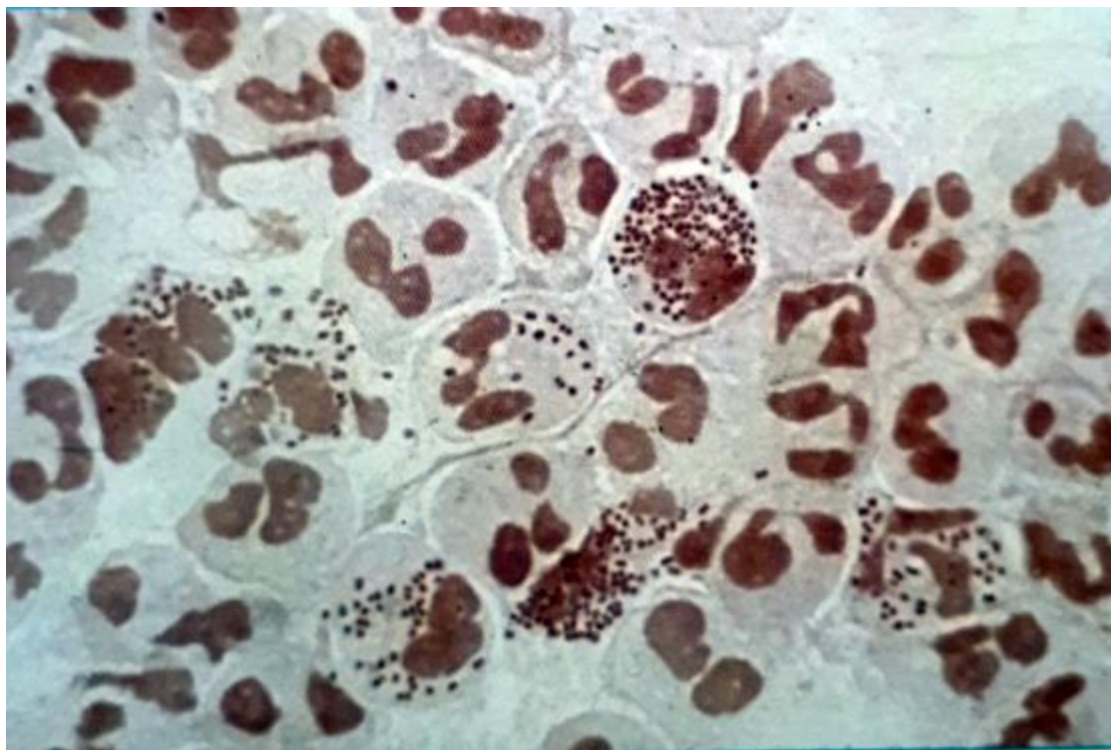
# Introdução

- Maioria das espécies humanas habitam o trato respiratório superior humano e não são patogênicas
- *Neisseria gonorrhoeae* é considerada como patógeno, independente do local onde é encontrado
- *Neisseria meningitidis*, pode colonizar a nasofaringe sem causar doença, mas pode ser extremamente patogênica em determinadas condições.
- São consideradas aeróbias, mas crescem em condições anaeróbias

# *Neisseria gonorrhoea*

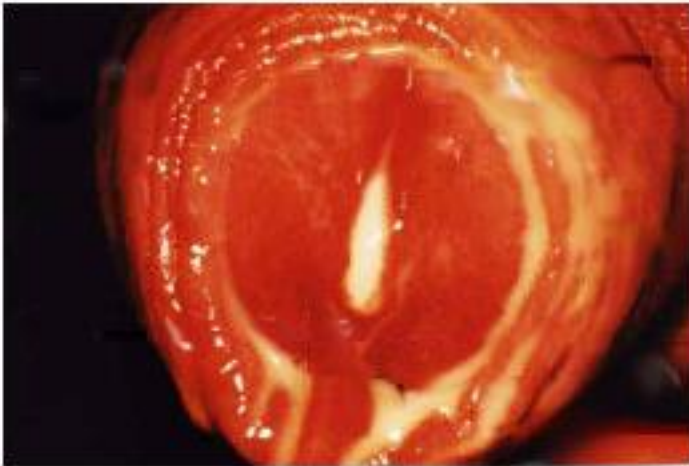
- Diplococos **Gram-negativos** com requerimento de crescimento fastidioso
- Intracelulares
- Não flagelado, não formador de esporos, encapsulado, anaeróbio facultativo
- Cresce melhor de 35º a 37ºC em atmosfera úmida suplementada com CO<sub>2</sub>
- Oxidase e catalase-positiva (oxidam glicose como fonte de energia)
- Sensíveis à penicilina





Esfregaço de secreção uretral de homem com  
uretrite gonocócica

# Gonorreia



*Figura 1 - Corrimento uretral abundante em paciente com gonorréia (Foto gentilmente cedida pelo Professor Sinésio Talhari).*



*Figura 2 - Corrimento uretral abundante em paciente com gonorréia (Foto gentilmente cedida pelo Professor Sinésio Talhari).*

Disponíveis em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822000000500007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000500007)

# Gonorreia



Manifestação da gonorreia do redor da boca



Secreção purulenta na região ocular

Disponível em <https://compendiomicrobiologia.wordpress.com/tag/gonococo/>

# Diagnóstico

- Homens
  - Esfregaço de secreção uretral e coloração de Gram. Análise de diplococos gram negativos associados a leucócitos polimorfonucleares
- Mulheres:
  - Esfregaço de amostra endocervicais e coloração por Gram

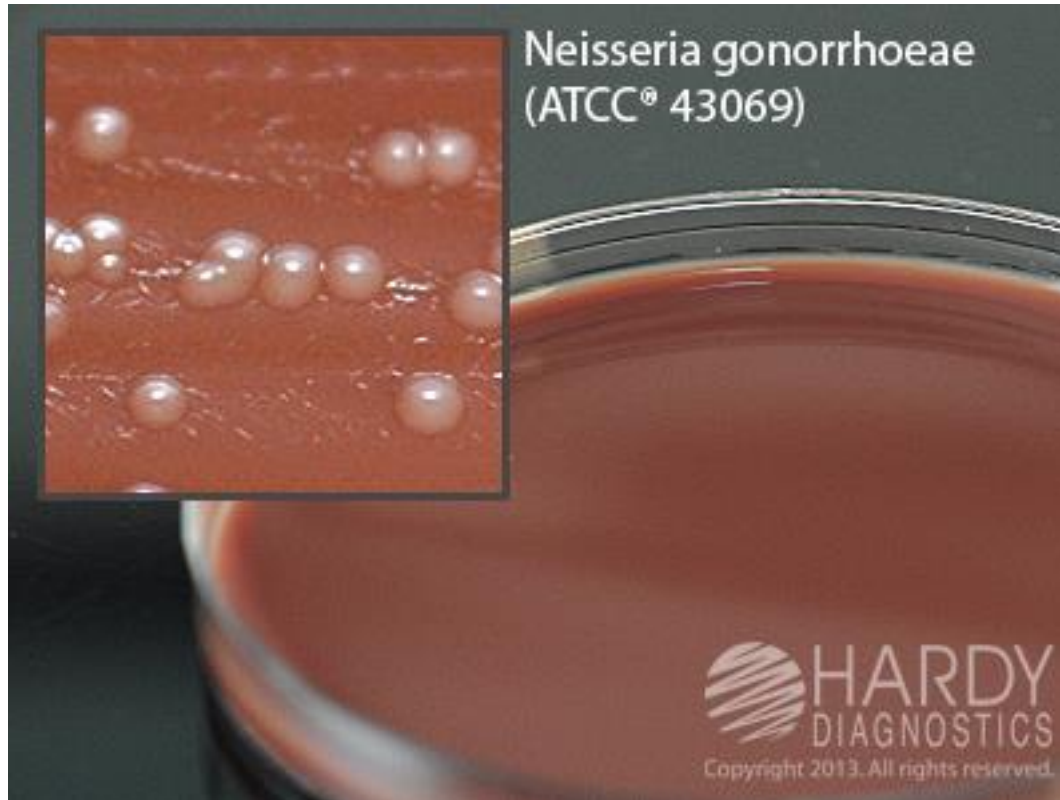
# Diagnóstico

- Utilização de meios de transporte quando necessários.
  - Não seletivos – Stuart ou Amies
  - Seletivos – meios Gono-Pak
- Inoculação em meio de cultura
  - Não seletivos
    - Ágar chocolate
  - Seletivos
    - Thayer Martin modificado
    - Martin Lewis
    - Meio GC-Lect, etc
- Os meios contêm agentes antimicrobianos para inibição de outros microrganismos

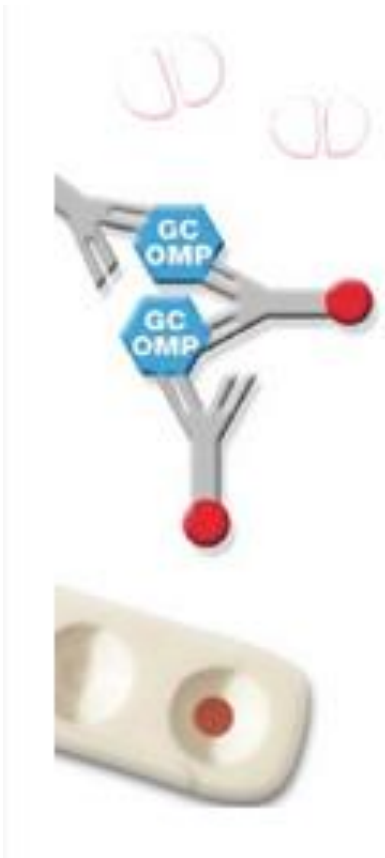
# Diagnóstico

- Incubação em estufa de CO<sub>2</sub> com nível de 3 a 7%
- Manter o ambiente úmido
- Analisar as placas em 24, 48 e 72 horas
- Submeter as colônias ao Teste de Gram, prova da catalase e prova de oxidase.
- Teste confirmatórios podem ser utilizados como teste de utilização de carboidratos, testes imunológicos, testes de aglutinação em látex e amplificação de ácidos nucleicos

# *Neisseria gonorrhoeae* em ágar Martin Lewis



Disponível em [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/product/e39-martin-lewis-with-lincomycin-for-neisseria-gonorrhoeaei-15x100mm-plate-order-by-the-package-of-10-by-hardy-diagnostics-media-prepared](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/product/e39-martin-lewis-with-lincomycin-for-neisseria-gonorrhoeaei-15x100mm-plate-order-by-the-package-of-10-by-hardy-diagnostics-media-prepared)



O GonoGen II usa uma solução para degradação da parede celular da bactéria, expondo as proteínas da membrana externa que contém antígenos específicos da espécie.

Um conjunto de anticorpos monoclonais ligados a um carreador é usado para detectar os antígenos específicos para *Neisseria gonorrhoeae*.

O teste utiliza a colônia bacteriana



# *Neisseria meningitidis*

- Microrganismo de nível 2
- Coleta de amostra de líquido cefalorraquidiano, sangue e ocasionalmente escarro e swab naso e orofaríngeo
- As amostras deverão ser inoculadas em meios não seletivos e seletivos
- Meios não seletivos (LCR e sangue)
  - Ágar chocolate
  - Ágar sangue de carneiro
- Meios seletivos
  - Thayer Martin modificado
  - Martin Lewis
  - NYC

# Diagnóstico

- Incubação em estufa de CO<sub>2</sub> com nível de 3 a 7%
- Manter o ambiente úmido
- Analisar as placas em 24, 48 e 72 horas
- Submeter as colônias ao Teste de Gram, prova da catalase e prova de oxidase.
- Teste confirmatórios podem ser utilizados como teste de utilização de carboidratos (oxidação de glicose e maltose), testes imunológicos, testes de aglutinação em látex e amplificação de ácidos nucleicos

**CHEGAAAAAA !!!!!!!**

