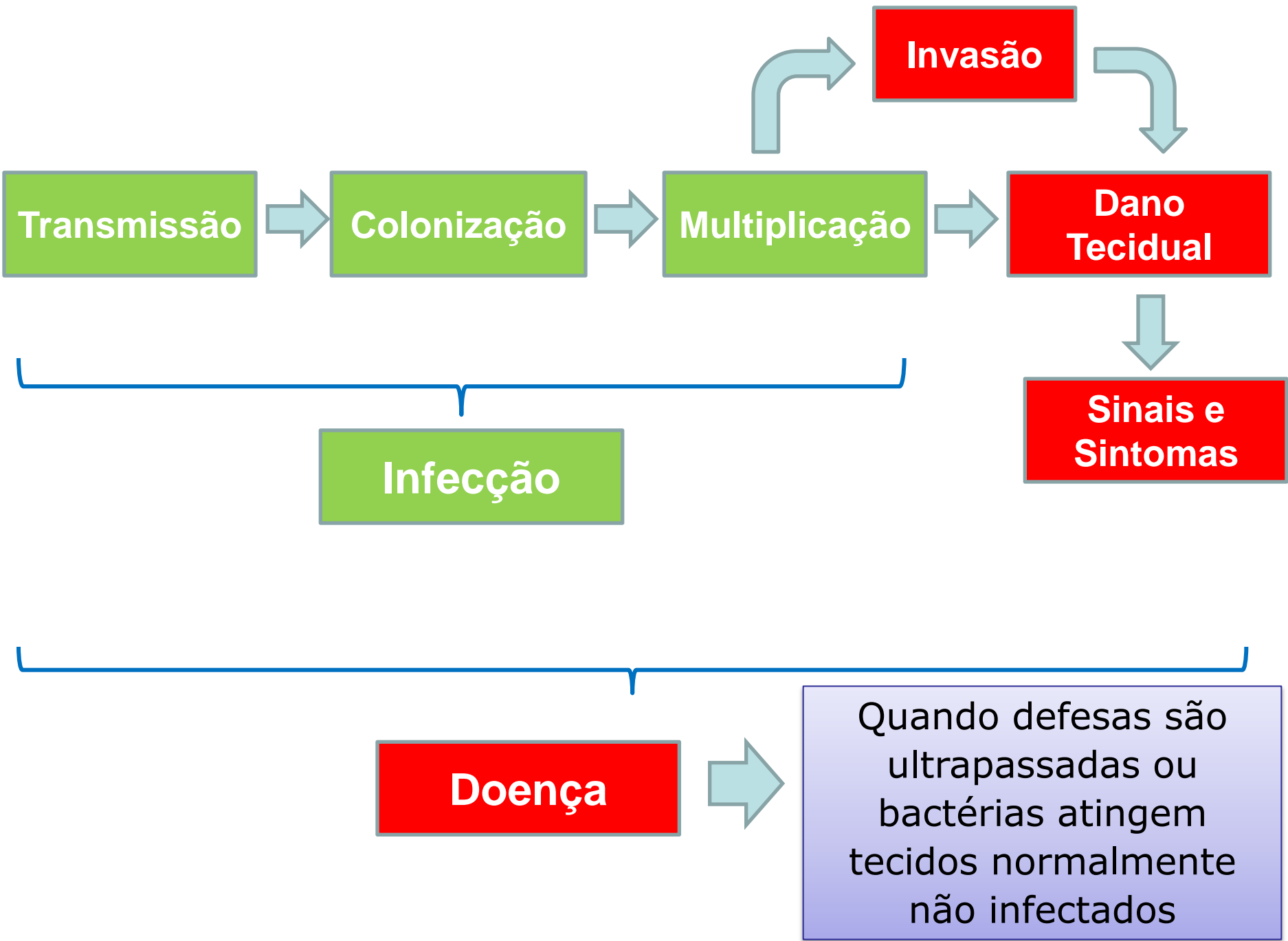


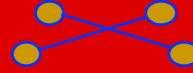
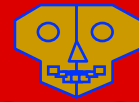
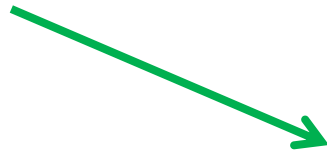
Mecanismos de Patogenicidade das Bactérias



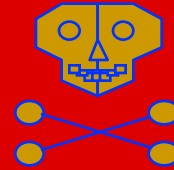
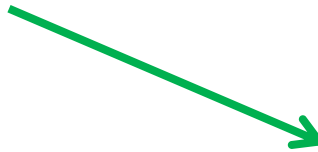
Prof. Ary Fernandes Junior
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências - UNESP
Distrito de Rubião Júnior s/n
CEP 18618-000/ Botucatu/ SP /Brasil
Tel. 14 3880. 0412/0413
ary@ibb.unesp.br



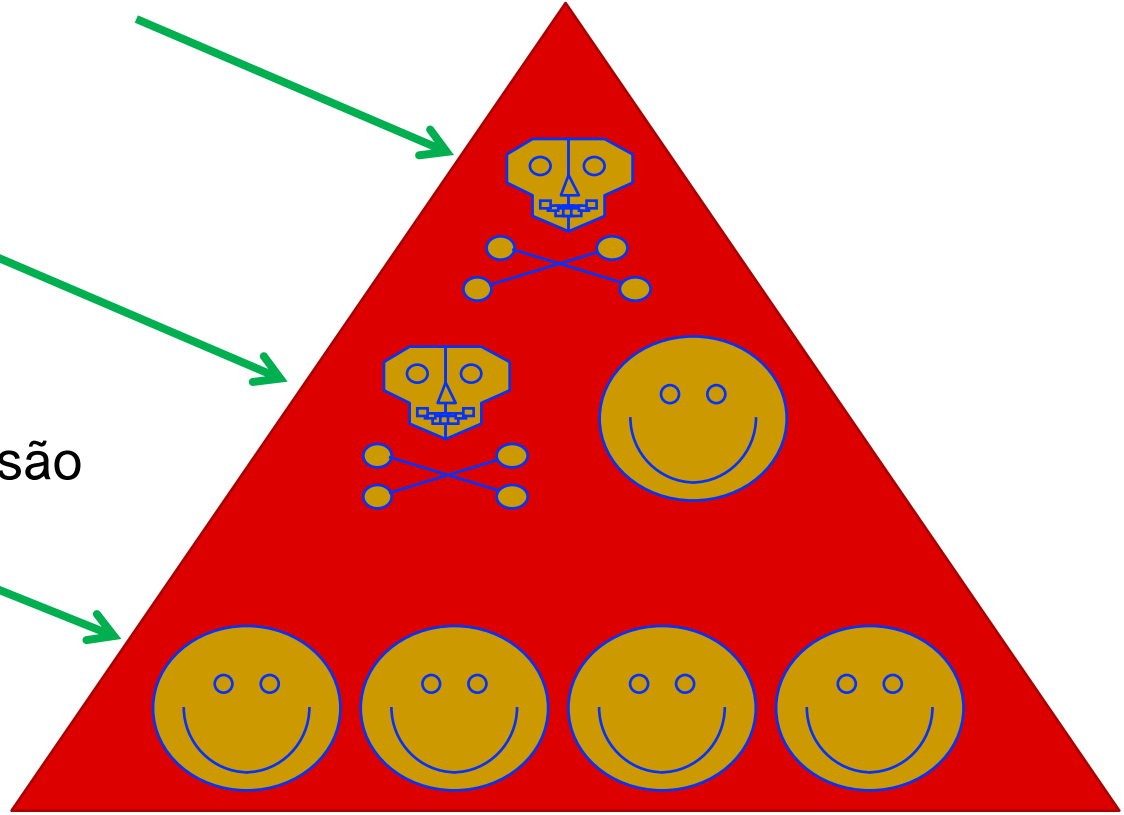
Pouquíssimos micro-organismos
são sempre patogênicos



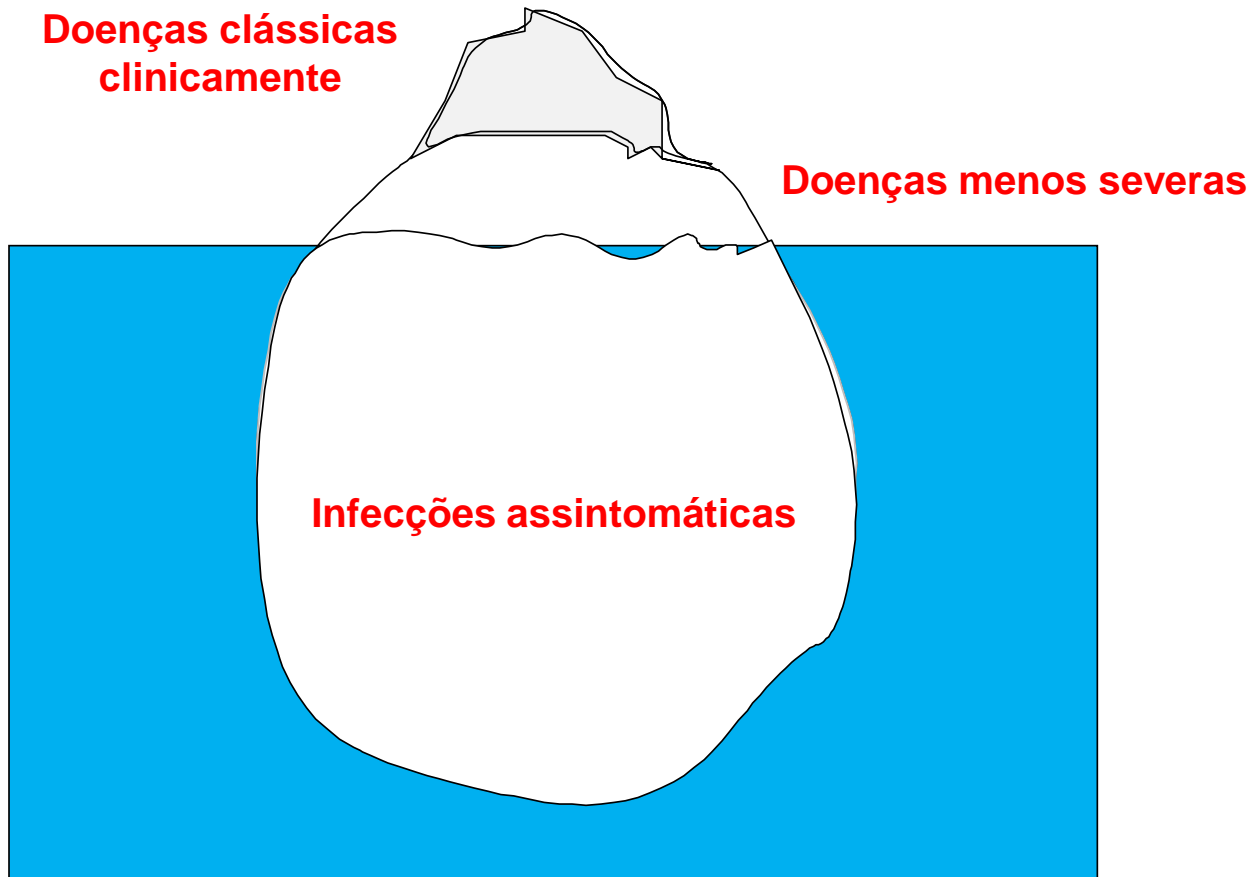
Alguns micro-organismos são
potencialmente patogênicos



Maioria dos micro-organismos são
não patogênicos



Conceito iceberg das doenças infecciosas



Infectados (=Colonizados)

(Quando há existência **Pacífica, Benéfica e Necessária**)

Tecidos possuem mecanismos naturais de defesa antimicrobiana

Presença de micro-organismos possível somente onde são tolerados (Harmonia)

Estima-se que o corpo humano que contém cerca de 10 trilhões de células seja rotineiramente portador de aproximadamente 100 trilhões de bactérias

Bactérias Patogênicas:

-Primárias (normalmente não fazem parte da microbiota)

-Oportunistas (presentes onde normalmente não ocorrem ou também quando coloniza indivíduos imunocomprometidos ou em idades extremas)

Existe imensa quantidade de agentes infecciosos e doenças que causam.....

Duas generalizações são possíveis!!

1ª → Eventos que ocorrem:

✓ **Confronto** (Agente encontra o hospedeiro)

✓ **Entrada** (Agente penetra no hospedeiro)

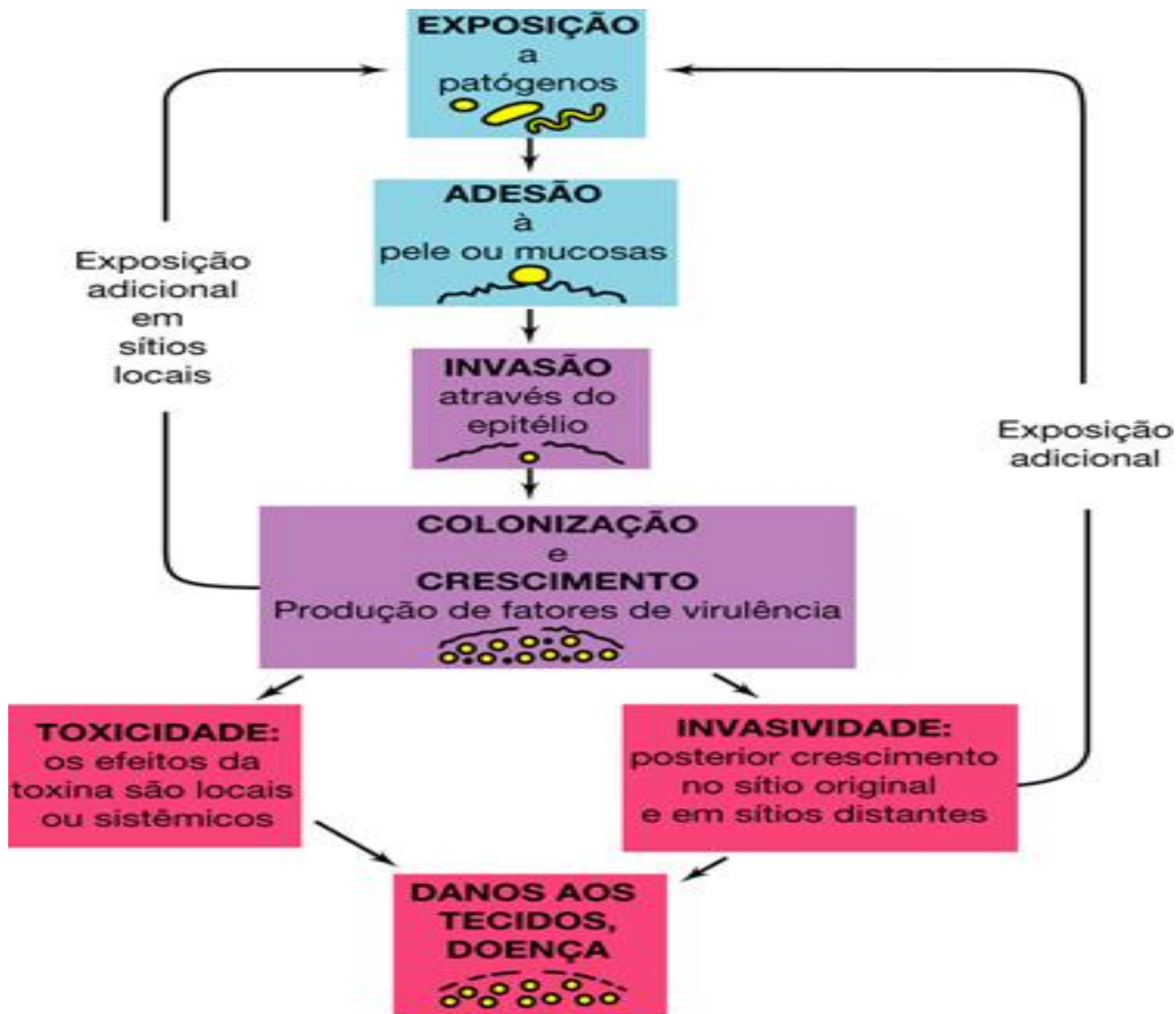
✓ **Disseminação** a partir do ponto de entrada

✓ **Multiplicação** (Aumento no número do microrganismos)

✓ **Lesão** (Dano Tecidual → Depende do Agente ou da resposta do hospedeiro)

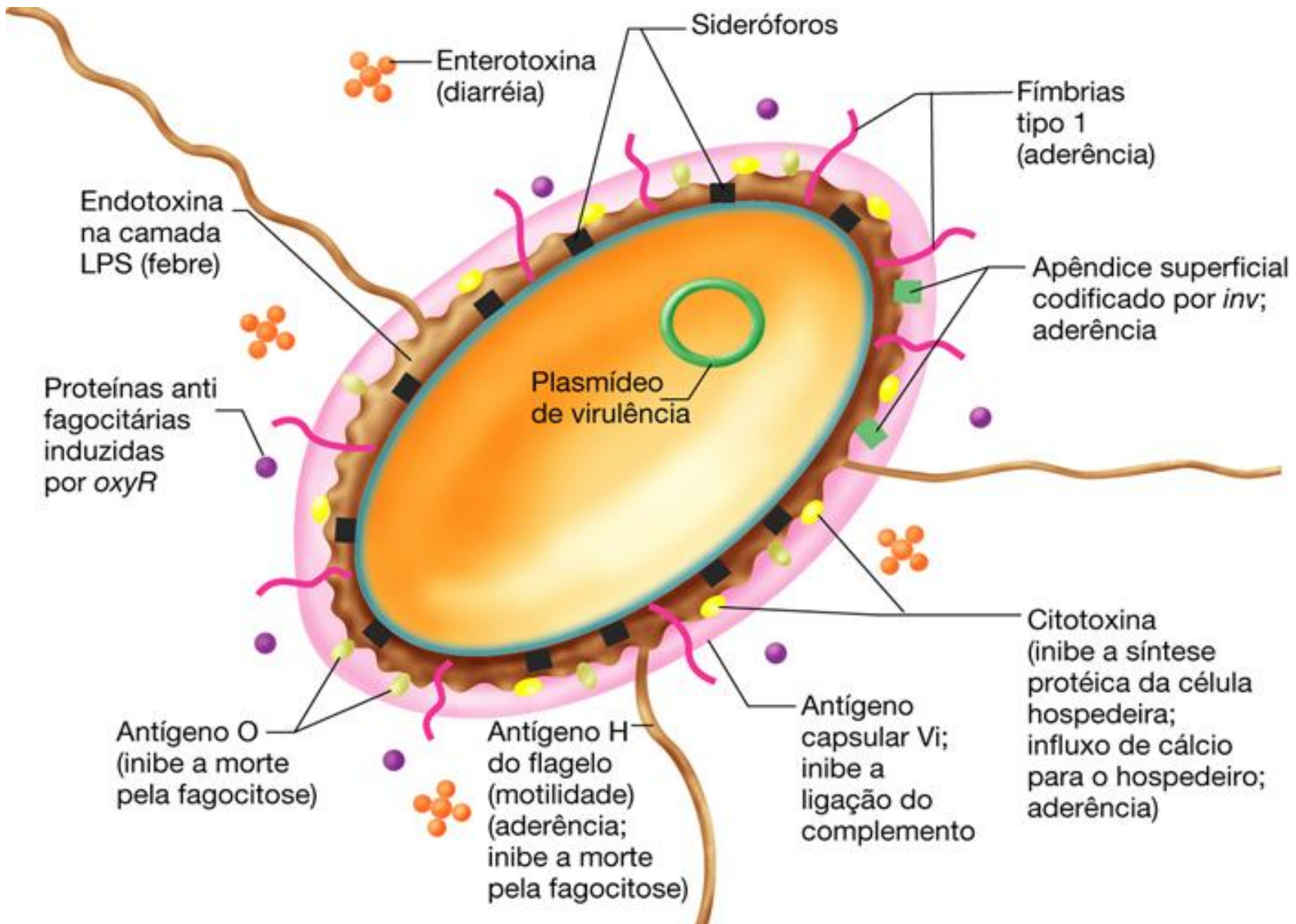
✓ **Resultado** (Vitória de um ou outro ou coexistência de ambos)

2ª → Cada evento requer quebra nas defesas do hospedeiro



Para ter sucesso no processo infeccioso

- ✓ Adquirir genes de virulência;
 - ✓ Sentir o ambiente
- ✓ Ligar e desligar (on/off) genes de virulência
 - ✓ Deslocar-se para o local da infecção
 - ✓ Fixar-se no local da infecção
- ✓ Conseguir nutrientes (especialmente o Ferro)
 - ✓ Sobreviver ao *stress* no local da infecção
 - ✓ Evitar sistema imune (fugir deste)
- ✓ Suportar as defesas do organismos e revidar a isto
 - ✓ Provocar lesões no tecido hospedeiro
- ✓ Interferir com sistema de sinalização e citoesqueleto da células do hospedeiro
 - ✓ Dispersão para células e órgãos

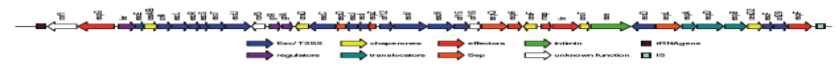


Fatores de virulência codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis

Gênero/espécie	Fator de virulência e doença
Codificados por plasmídeo	
<i>Escherichia coli</i>	Enterotoxinas termoestáveis e termolábeis que causam diarreia
<i>Escherichia coli</i>	Hemolisina (citotoxina) de doença invasiva e infecções do trato urinário
<i>Escherichia coli</i> e espécies de <i>Shigella</i>	Fatores de aderência e produtos gênicos envolvidos em invasão de mucosas
<i>Bacillus anthracis</i>	Cápsula, essencial para virulência (em um plasmídeo) Fator de edema, fator letal, antígeno protetor, todos essenciais para virulência (em outro plasmídeo)
Codificados por fago	
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina botulínica que causa paralisia
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina diftérica que inibe a síntese de proteínas humanas
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina do cólera, que pode causar diarreia aquosa grave

Alguns exemplos de ilhas de patogenicidade (PAI) em alguns patógenos

Gênero/espécie	Nome da PAI	Características de virulência
<i>Escherichia coli</i>	PAI _I ₅₃₆	Alfa hemolisina, fimbrias, aderências, em infecções do trato urinário
<i>Escherichia coli</i>	PAI _I _{J96}	Alfa hemolisina, <i>pilus P</i> , em infecções do trato urinário
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	O1#7	Toxina de macrófagos em <i>E. coli</i> êntero-hemorrágica (EHEC)
<i>Salmonella typhimurium</i>	SPI-1	Invasão e destruição das células hospedeiras, diarreia
<i>Yersinia pestis</i>	HPI/pgm	Genes que aumentam a captação de ferro
<i>Vibrio cholerae</i> El Tor O1	VPI-1	Neuraminidase, utilização de aminoaçúcares
<i>Staphylococcus aureus</i>	SCC mec	Resistência a meticilina e outros antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i>	SaPI1	Toxina 1 da síndrome do choque tóxico, enterotoxina
<i>Enterococcus faecalis</i>	NP ^m	Citolisina, formação de biofilme



Plasmídeos

Phage Stxφ

Ilhas de patogenicidade

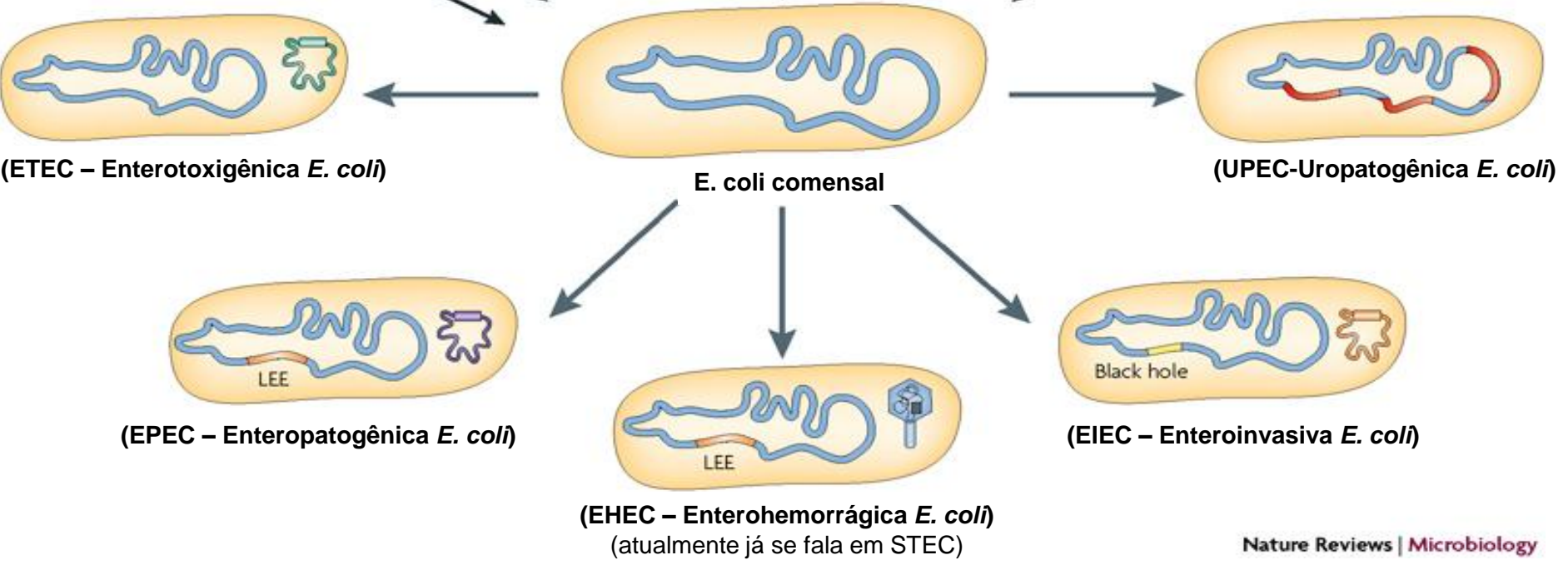
pENT

pEAF

Invasion plasmid

LEE

Outras *E. coli*
 -APEC
 -NMEC,
 -STEC, etc



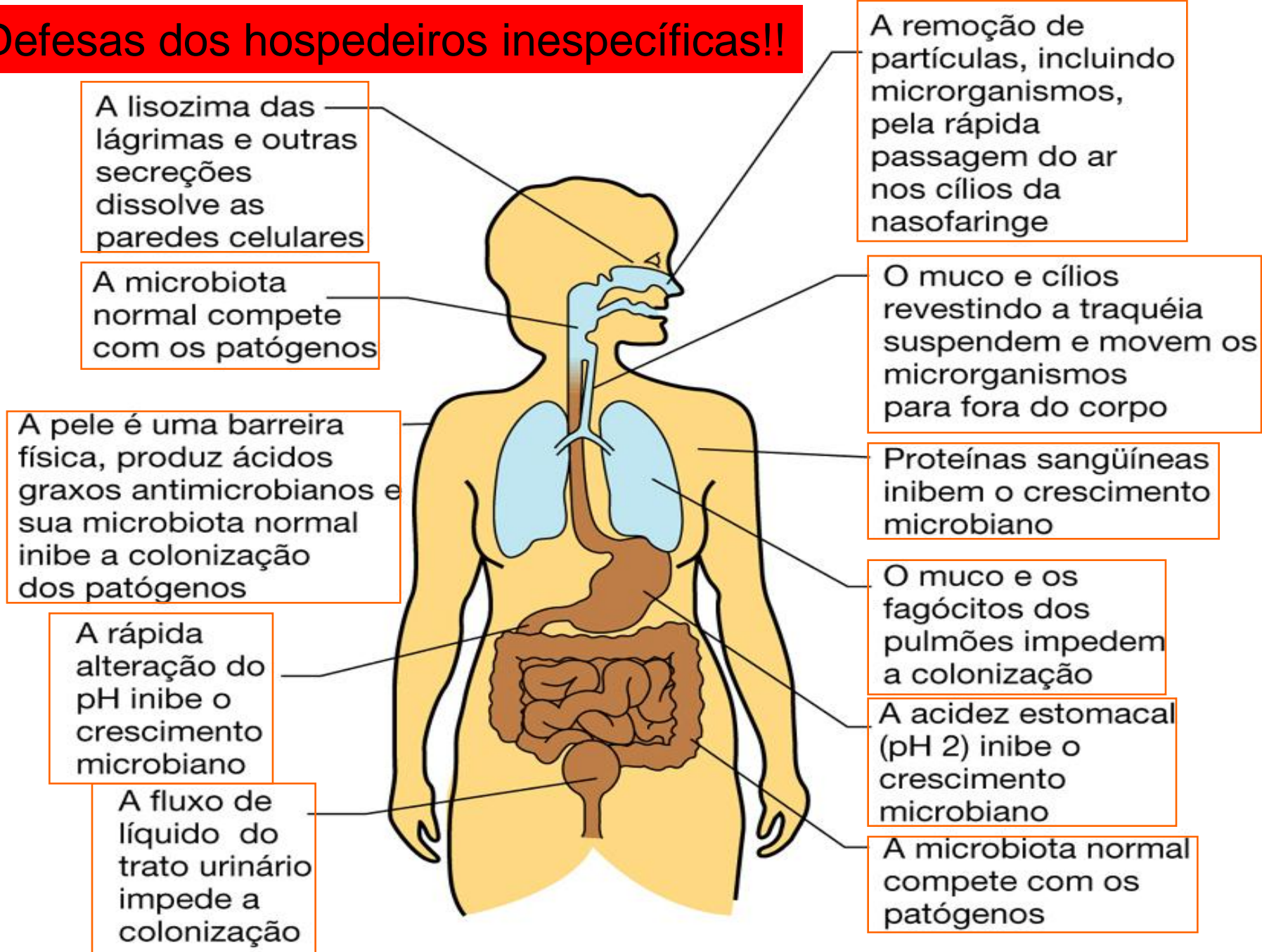
Ahmed ety al. *Nature Reviews Microbiology* 6, 387-394 (May 2008)

Nature Reviews | Microbiology

A absorção de elementos genéticos móveis (fagos, plasmídeos de virulência, ilhas de patogenicidade), e perda de porções de DNA-cromossômico em linhagens distintas de *E. coli*, possibilitou surgimento de clones de diferentes **patotipos** de *E. coli* associados a sintomas de doenças específicas.

LEE - locus of enterocyte effacement; **PAIs** - pathogenicity island; **pEAF** - enteropathogenic *E. coli* adhesion factor plasmid; **pENT**- enterotoxin-encoding plasmids; **Stx** - Shiga-toxin-encoding bacteriophage.

Defesas dos hospedeiros inespecíficas!!



Contato

Hospedeiro x Microrganismo

Exógenos (Ambiente)

Endógenos (Interior ou Superfície do Próprio Corpo)
(**Microbiota Normal**)



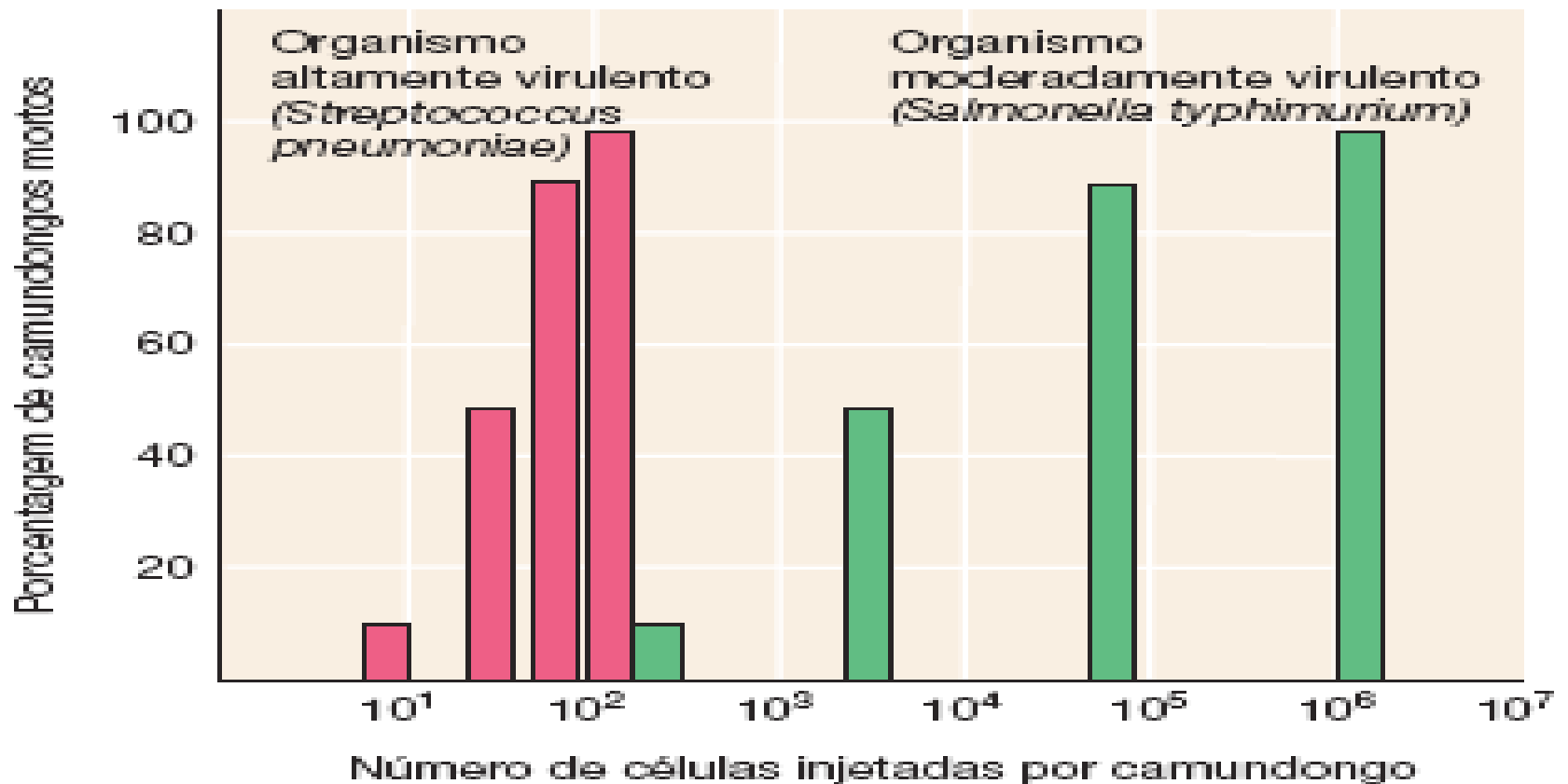
**Causa de Doenças, Estimulação Imune, Impede
Entrada de Invasores, Função na Nutrição e
Metabolismo do Hospedeiro**

Patogenicidade → Variável e mediada por vários fatores (**colonização e lesão**)

Virulência → “Mede” intensidade (ou grau) da patogenicidade

Depende da:

- Linhagem do microrganismo;**
- Condição em que patógeno e hospedeiro foram colocados em contato;**
- Linhagem do hospedeiro**



✓ Virulência expressa como **DI 50: Dose Infecciosa para 50% dos animais de um grupo teste.**

Ex. *Bacillus anthracis*

DI 50 pele = 10 a 50 esporos

DI 50 inalado = 10 a 20 mil esporos

DI 50 ingerido = 250 mil a 1 milhão de esporos

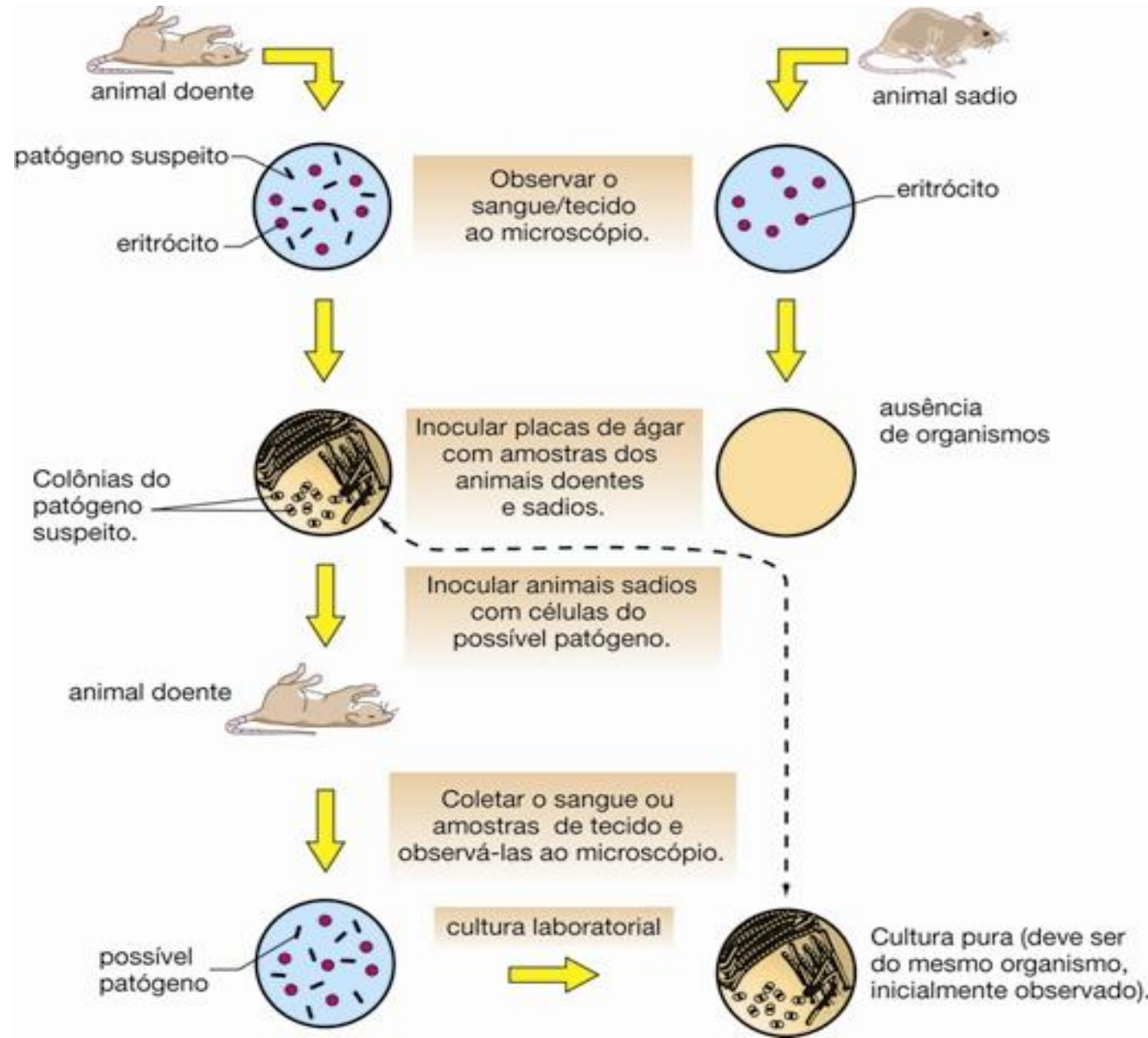
Postulados de Koch: A presença de um microrganismo em indivíduos doentes não prova seu significado patogênico

1 - O organismo patogênico suspeito deve estar presente em todos os casos da doença e ausente em animais saudios

2 - O organismo suspeito deve ser cultivado em cultura pura

3 - Células de uma cultura pura do organismo suspeito devem provocar a doença em um animal sadio

4 - O organismo deve ser isolado e caracterizado como o mesmo encontrado originalmente



Evidências para um patógeno potencial com clínica significância

- ✓ Isolado em abundância;
- ✓ Isolado em cultura pura;
- ✓ Isolado em mais de uma ocasião;
 - ✓ Isolado dos tecidos profundos;
 - ✓ Evidência de inflamação local;
- ✓ Evidência da resposta imune ao patógeno;
 - ✓ Encaixa-se com o quadro clínico;

Etapas para ocorrer a doença infecciosa

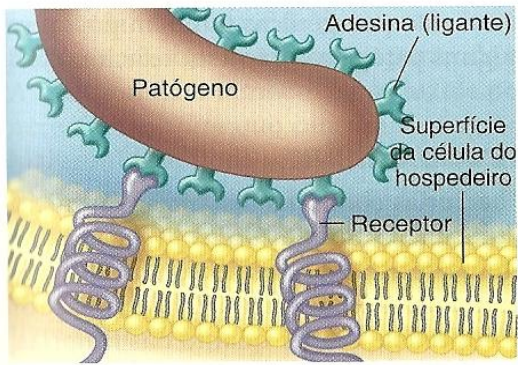
➤ Infectar Superfícies de Mucosas e Pele

Barreiras → Secreções, Muco, Enzimas Hidrolíticas, Acidez no Estômago, pH Ácido de Vagina, Lisozima, Microbiota Natural

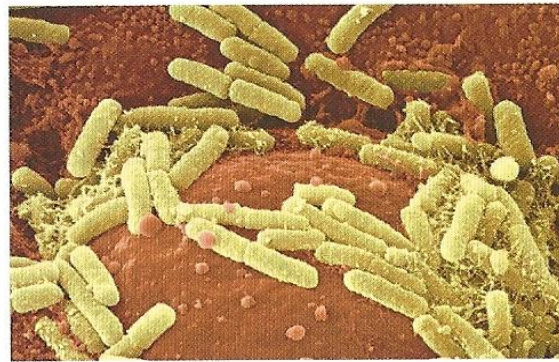
(Aderência da bactéria é fundamental)

Adesinas → Fímbrias, Fibrilas, Glicocálice, Cápsula

Receptores → Glicoproteínas e Glicolipídeos (ex. Fibronectina)

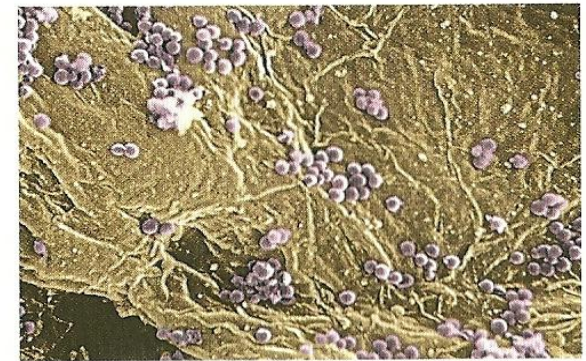


(a) As moléculas na superfície de um patógeno, chamadas de adesinas ou ligantes, se ligam especificamente a receptores de superfície complementares nas células de certos tipos de tecidos do hospedeiro.



(b) Bactérias *E. coli* (amarelo esverdeado) em células da bexiga urinária de seres humanos

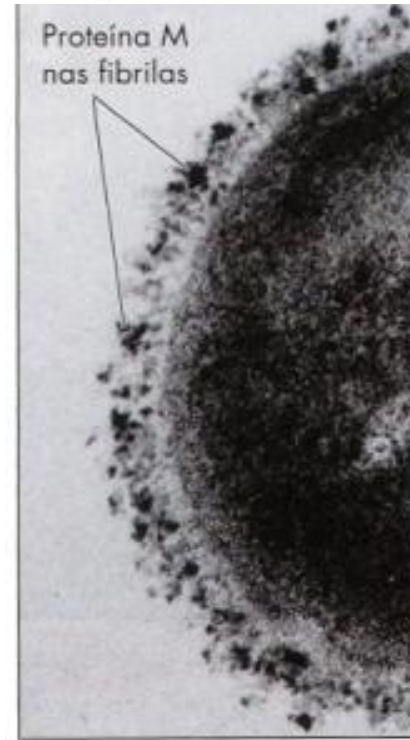
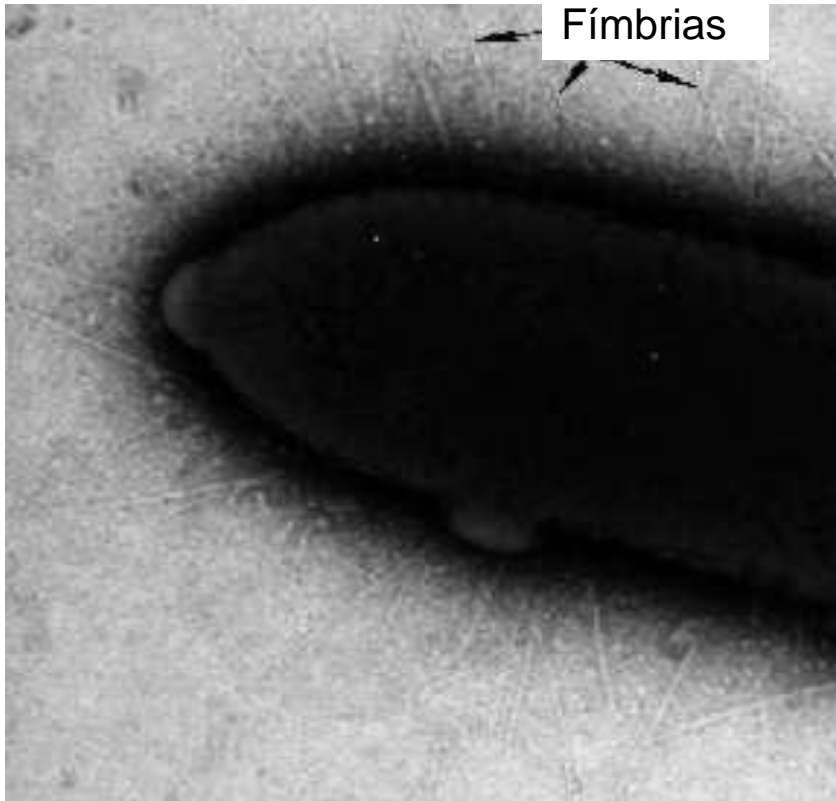
MEV 1 μm



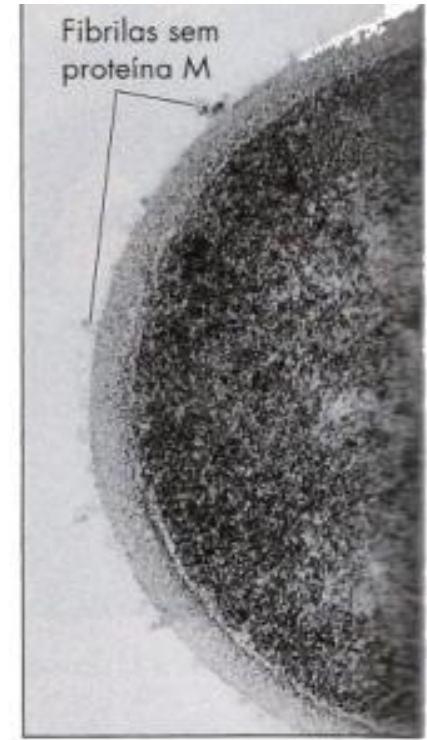
(c) Bactérias (roxo) se aderindo à pele humana.

MEV 9 μm

Figura 15.1 Aderência.



(a) MET 0,1 μm



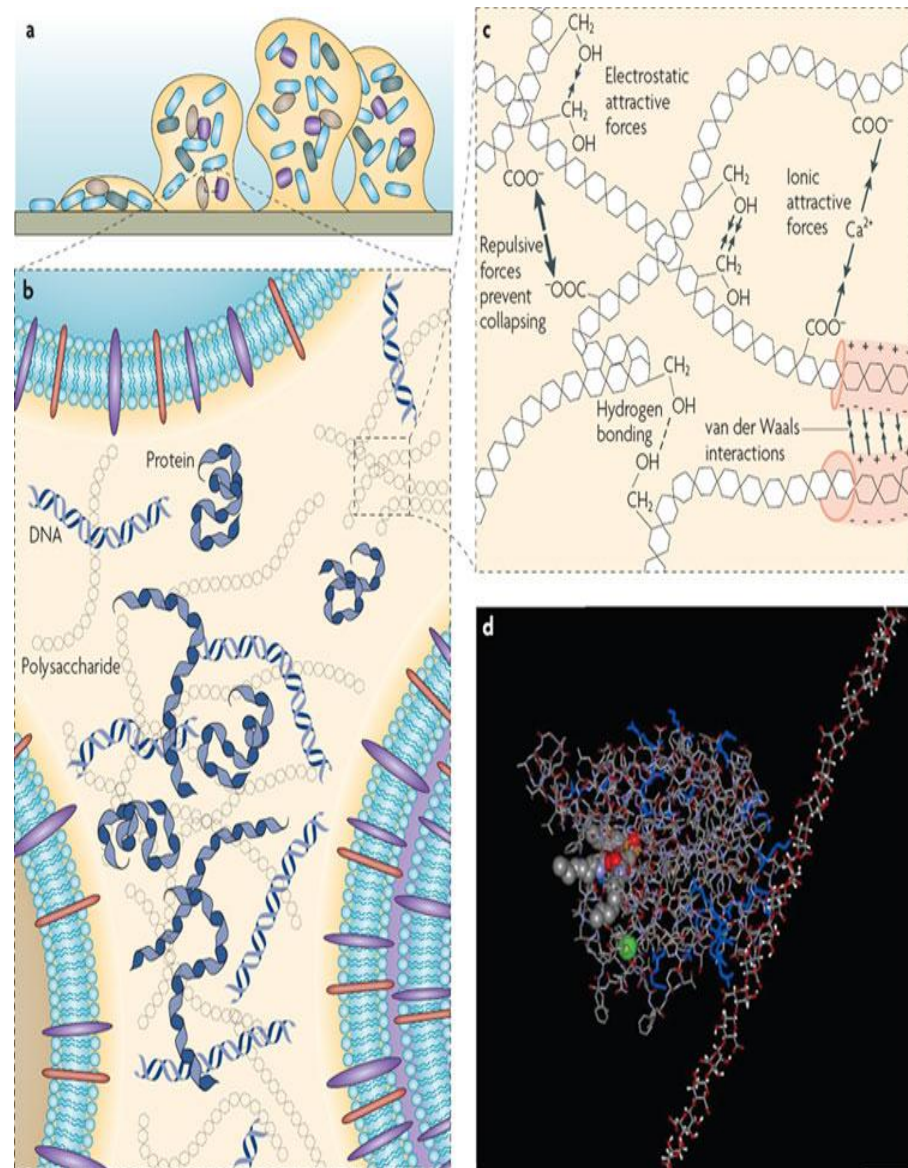
(b) MET 0,1 μm

Biofilmes

Function	Relevance for biofilms	EPS components involved
Adhesion	Allows the initial steps in the colonization of abiotic and biotic surfaces by planktonic cells, and the long-term attachment of whole biofilms to surfaces	Polysaccharides, proteins, DNA and amphiphilic molecules
Aggregation of bacterial cells	Enables bridging between cells, the temporary immobilization of bacterial populations, the development of high cell densities and cell-cell recognition	Polysaccharides, proteins and DNA
Cohesion of biofilms	Forms a hydrated polymer network (the biofilm matrix), mediating the mechanical stability of biofilms (often in conjunction with multivalent cations) and, through the EPS structure (capsule, slime or sheath), determining biofilm architecture, as well as allowing cell-cell communication	Neutral and charged polysaccharides, proteins (such as amyloids and lectins), and DNA
Retention of water	Maintains a highly hydrated microenvironment around biofilm organisms, leading to their tolerance of desiccation in water-deficient environments	Hydrophilic polysaccharides and, possibly, proteins
Protective barrier	Confers resistance to nonspecific and specific host defences during infection, and confers tolerance to various antimicrobial agents (for example, disinfectants and antibiotics), as well as protecting cyanobacterial nitrogenase from the harmful effects of oxygen and protecting against some grazing protozoa	Polysaccharides and proteins
Sorption of organic compounds	Allows the accumulation of nutrients from the environment and the sorption of xenobiotics (thus contributing to environmental detoxification)	Charged or hydrophobic polysaccharides and proteins
Sorption of inorganic ions	Promotes polysaccharide gel formation, ion exchange, mineral formation and the accumulation of toxic metal ions (thus contributing to environmental detoxification)	Charged polysaccharides and proteins, including inorganic substituents such as phosphate and sulphate
Enzymatic activity	Enables the digestion of exogenous macromolecules for nutrient acquisition and the degradation of structural EPS, allowing the release of cells from biofilms	Proteins
Nutrient source	Provides a source of carbon-, nitrogen- and phosphorus-containing compounds for utilization by the biofilm community	Potentially all EPS components
Exchange of genetic information	Facilitates horizontal gene transfer between biofilm cells	DNA
Electron donor or acceptor	Permits redox activity in the biofilm matrix	Proteins (for example, those forming pili and nanowires) and, possibly, humic substances
Export of cell components	Releases cellular material as a result of metabolic turnover	Membrane vesicles containing nucleic acids, enzymes, lipopolysaccharides and phospholipids
Sink for excess energy	Stores excess carbon under unbalanced carbon to nitrogen ratios	Polysaccharides
Binding of enzymes	Results in the accumulation, retention and stabilization of enzymes through their interaction with polysaccharides	Polysaccharides and enzymes

EPS, extracellular polymeric substances.

Hans-Curt Flemming & Jost Wingender



Nature Reviews Microbiology 8, 623-633 (September 2010)

a | A model of a bacterial biofilm attached to a solid surface. Biofilm formation starts with the attachment of a cell to a surface. A microcolony forms through division of the bacterium, and production of the biofilm matrix is initiated. Other bacteria can then be recruited as the biofilm expands owing to cell division and the further production of matrix components. b | The major matrix components — polysaccharides, proteins and DNA — are distributed between the cells in a non-homogeneous pattern, setting up differences between regions of the matrix. c | The classes of weak physicochemical interactions and the entanglement of biopolymers that dominate the stability of the EPS matrix⁴². d | A molecular modelling simulation of the interaction between the exopolysaccharide alginate (right) and the extracellular enzyme lipase (left) of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous solution. The starting structure for the simulation of the lipase protein was obtained from the [Protein Data Bank](#)¹⁷. The coloured spheres represent 1,2-dioctylcarbamoyl-glycerol-3-O-octylphosphonate in the lipase active site (which was present as part of the crystal structure), except for the green sphere, which represents a Ca²⁺ ion. The aggregate is stabilized by the interaction of the positively charged amino acids arginine and histidine (indicated in blue) with the polyanionic alginate. Water molecules are not shown. Image courtesy of H. Kuhn, CAM-D Technologies, Essen, Germany.

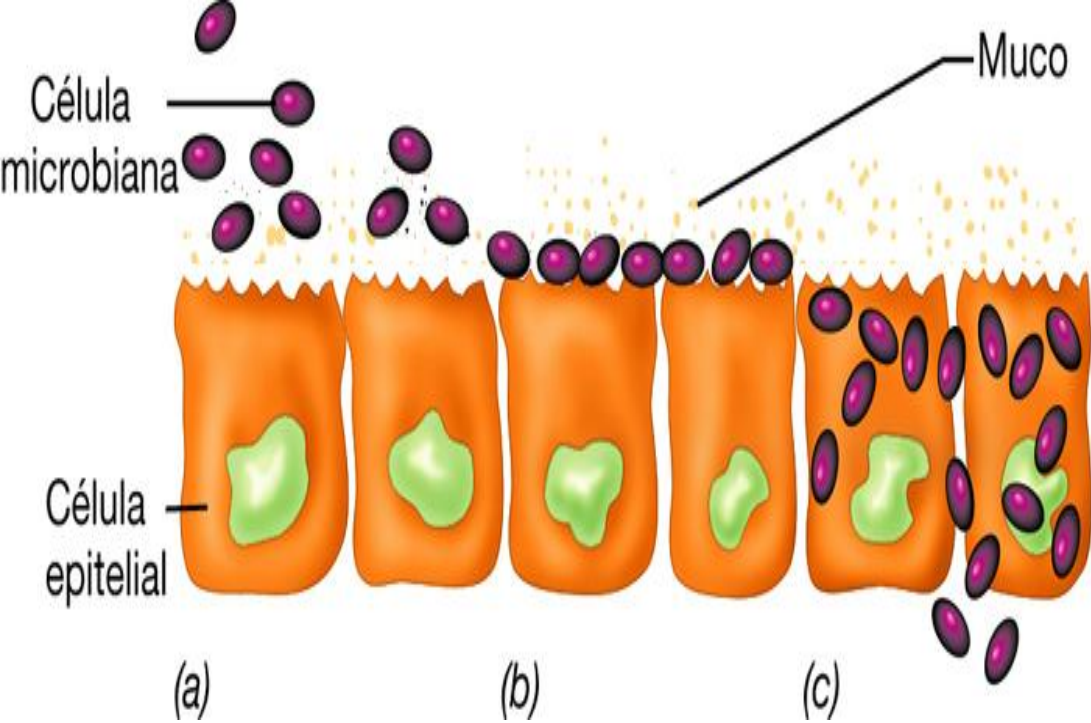
➤ **Penetração no Organismo Hospedeiro**

**Através das células epiteliais de superfícies
(mucosas e pele)**

ou

**Inoculados diretamente (vetores) ou injurias (Via
parenteral)**

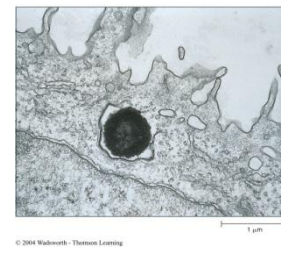
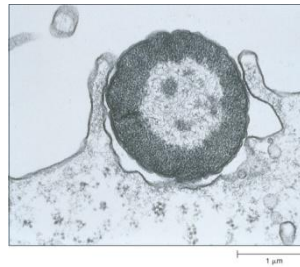
Mecanismos pouco conhecido → **Invasinas = fatores
de invasão (proteínas de superfície)**



Invasinas → provocam alterações no citoesqueleto de células não-fagocíticas que emitem uma projeção da membrana plasmática semelhante a um pseudópodo, fagocitando a bactéria

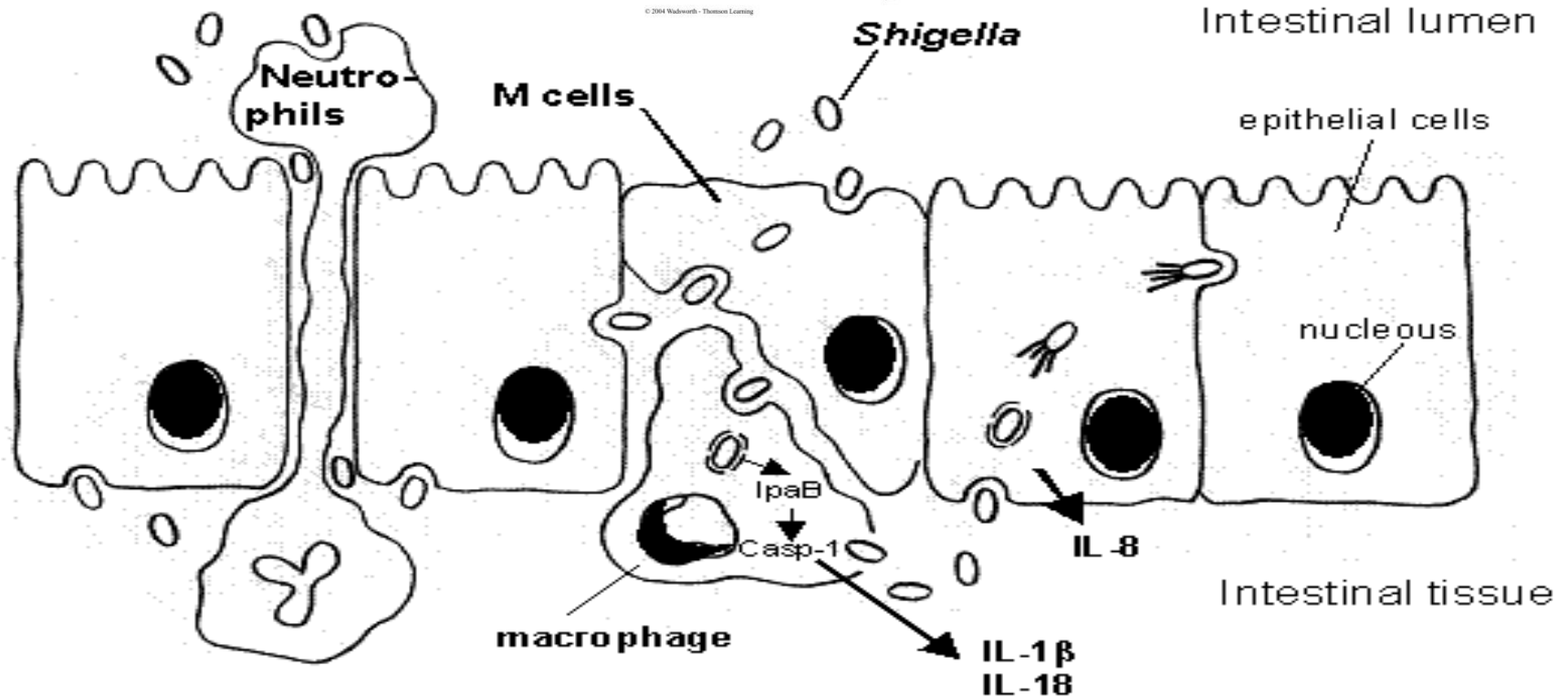
Microscopia Eletrônica de Varredura de cultura de células epiteliais formando “cestas” ao redor de *Salmonella*.



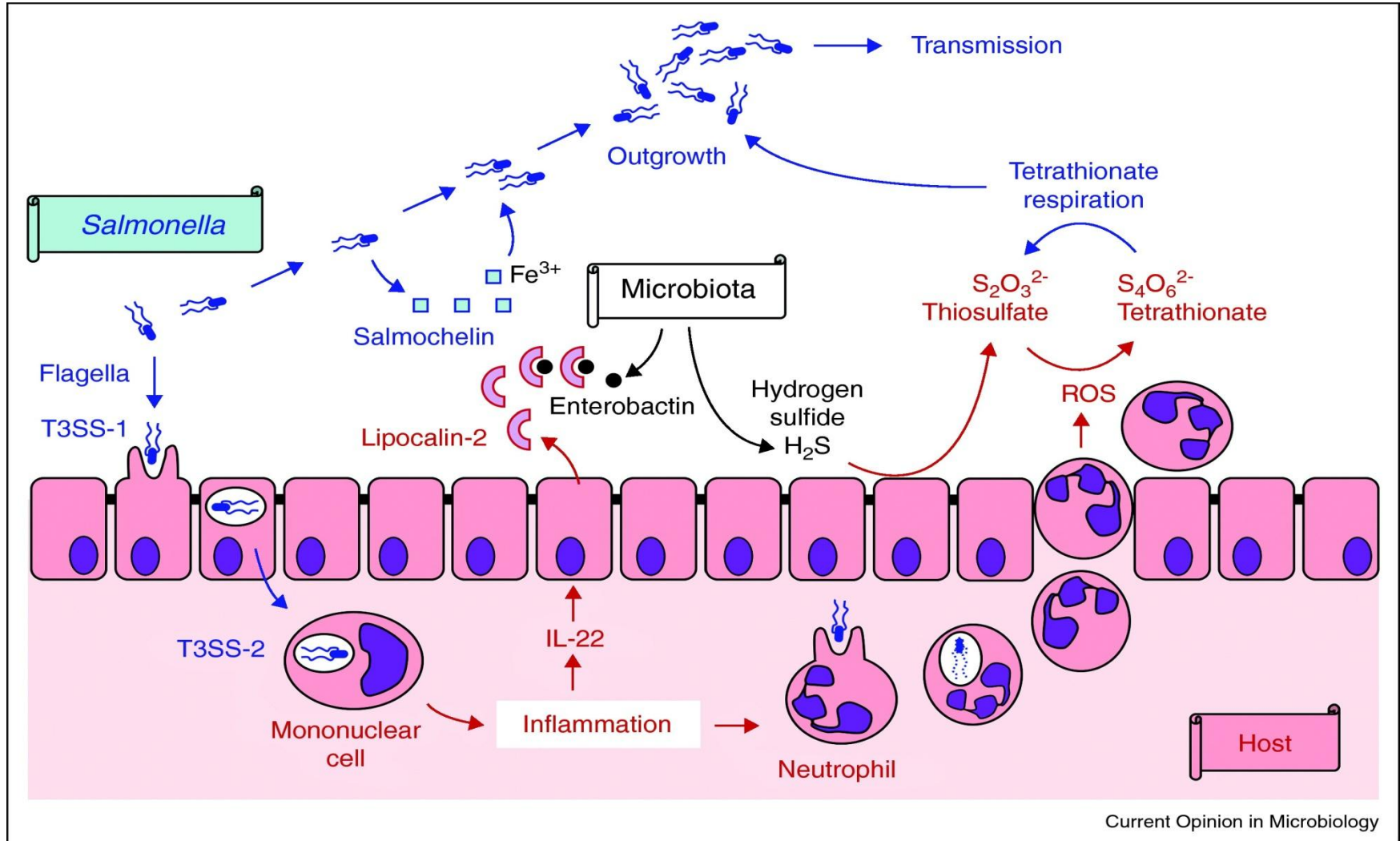


© 2004 Wadsworth - Thomson Learning

© 2004 Wadsworth - Thomson Learning



Shigella consegue invadir o epitélio do lúmen intestinal por meio de células-M. Após atingir o epitélio, invade células epiteliais e é fagocitado por macrófagos residentes. A bactéria escapa do fagossomo de ambas as células, mas enquanto replica dentro das células epiteliais induz a apoptose em macrófagos, provavelmente, por ativação de **caspase-1** (Casp-1). Os macrófagos sofrem lise e liberam as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Juntamente, as IL-8 liberadas pelas células epiteliais invadidas sinalizam para PMN (leucócitos polimorfonucleares ou neutrófilos). Estes PMN eventualmente resolvem o processo infeccioso.



Thiennimitr et al. *Salmonella*: the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, v.15, n.02, p.108-114, 2012.

S. Typhimurium utiliza seus fatores de virulência (flagelos, T3SS-1 e T3SS-2) para invadir o epitélio e sobreviver nas células mononucleares. A resposta inflamatória resulta na liberação de um antimicrobiano (**lipocalina-2**) que sequestra o agente quelantes de ferro **enterobactina**, produzido pela microbiota, mas não inibe o quelante **salmoquelina**, produzida pela *S. Typhimurium*. Os ROS gerados por neutrófilos chegam a luz intestinal provocando a oxidação do composto sulfurado endógeno (tiosulfato) para gerar um acceptor de elétrons (tetrionato) tornando possível a *S. Typhimurium* fugir dos efeitos da microbiota fermentadora e com isto possibilitar a transmissão do patógeno.

➤ **Multiplicação nos Tecidos do Hospedeiro**

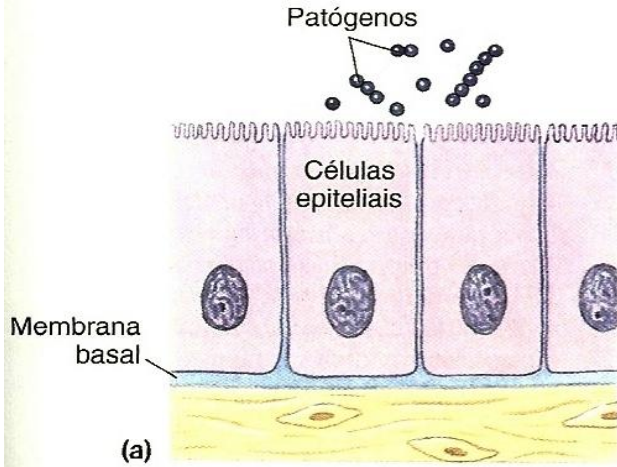
Normalmente a quantidade de células do agente que penetrou é pequena para produzir sintomas diretamente
(Período de Incubação)

Sobrevivência → Disponibilidade de **nutrientes** no tecido infectado do hospedeiro

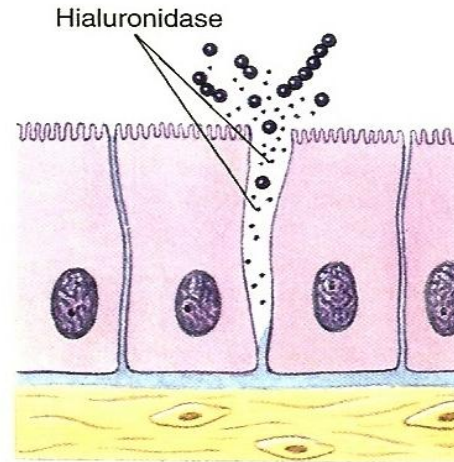
Produção e ação de **enzimas** produzidas pelas bactérias → liberar nutrientes

(Ex. Hialuronidases, DNAase, Estreptoquinase, Colagenases, Elastases, etc) **(=Fatores de Lesão)**

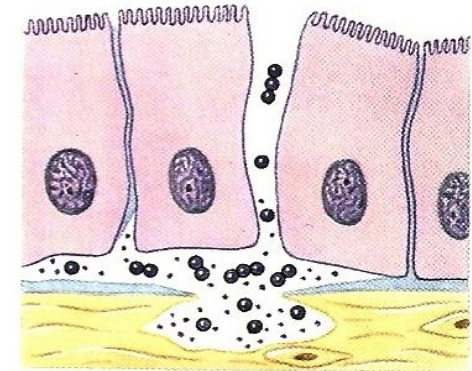
Fatores de Lesão



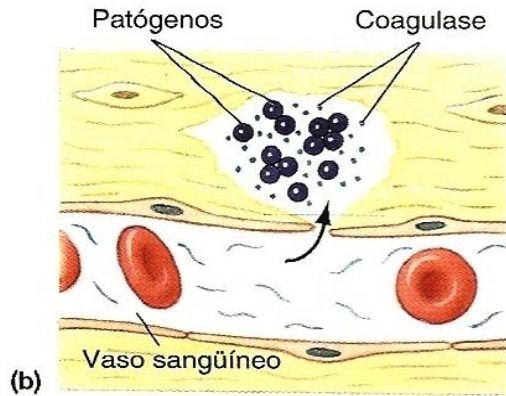
1. Patógenos invasivos alcançam a superfície epitelial



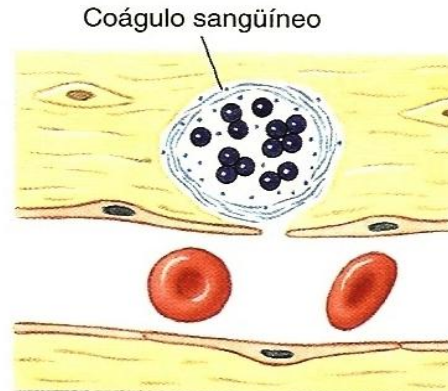
2. Patógenos produzem hialuronidase



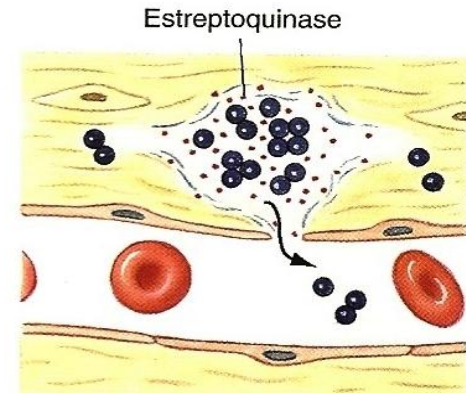
3. Patógenos invadem tecidos mais profundos



1. Patógenos produzem coagulase

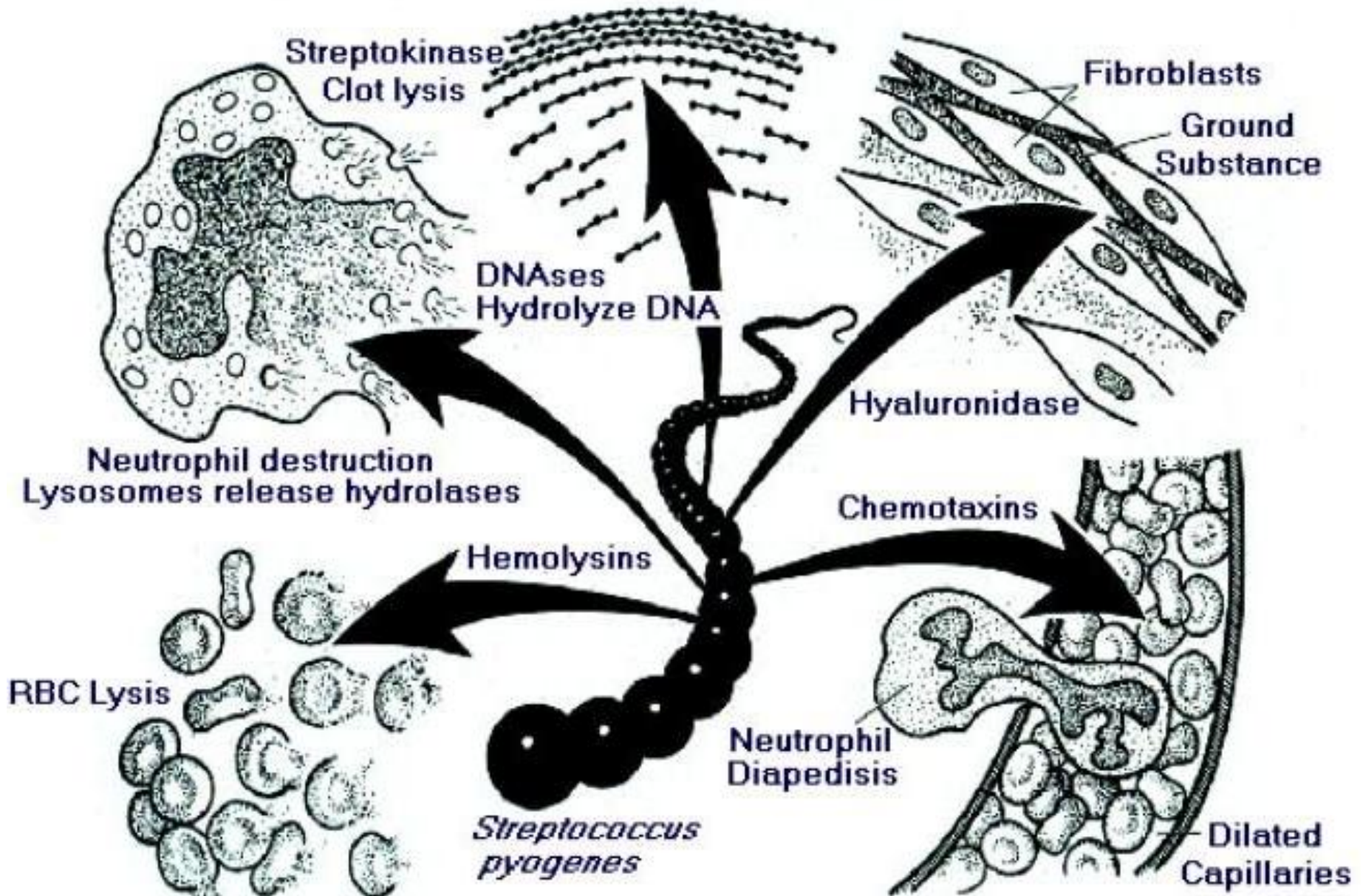


2. Forma-se um coágulo sangüíneo ao redor dos patógenos



3. Patógenos produzem estreptoquinase, ocorrendo a dissolução do coágulo e liberando as bactérias

Fatores de virulência de *Streptococcus pyogenes*



Fatores limitantes do crescimento nos tecidos

- Tensão de O₂

- Ferro Livre

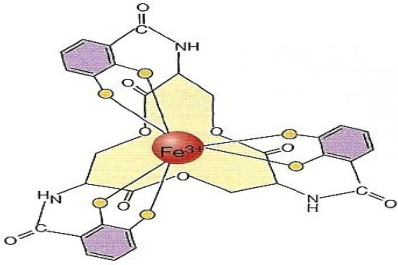
Ferro normalmente na forma Conjugado
(Transferrina, Ferritina, Lactoferrina e Hemina)

A bactéria produz Sideróforos, Enteroquelina
(Quelantes de ferro → **Fatores de Virulência**)

As vezes existe especificidade por tecidos

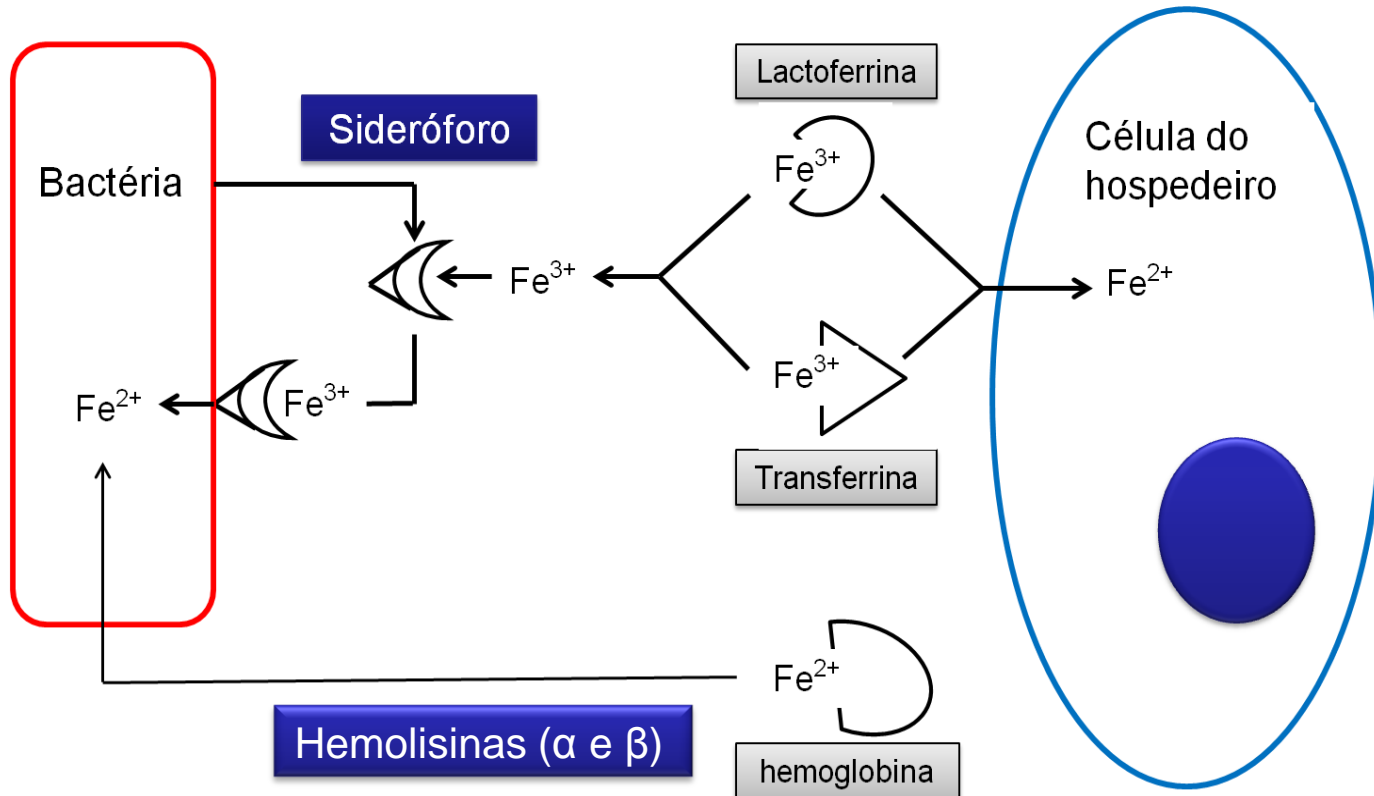
(*Proteus mirabilis* e vias urinárias (Uréia); *Brucella*
e útero gravídico - Eritritol)

Sideróforos (ex. enterobactina e aerobactina) e Hemolisinas



Enterobactina de *E. coli*

Proteínas queladoras de ferro do hospedeiro



➤ **Interferência com Mecanismos de Defesa do hospedeiro**

Alterar ou Escapar a resposta imune do hospedeiro

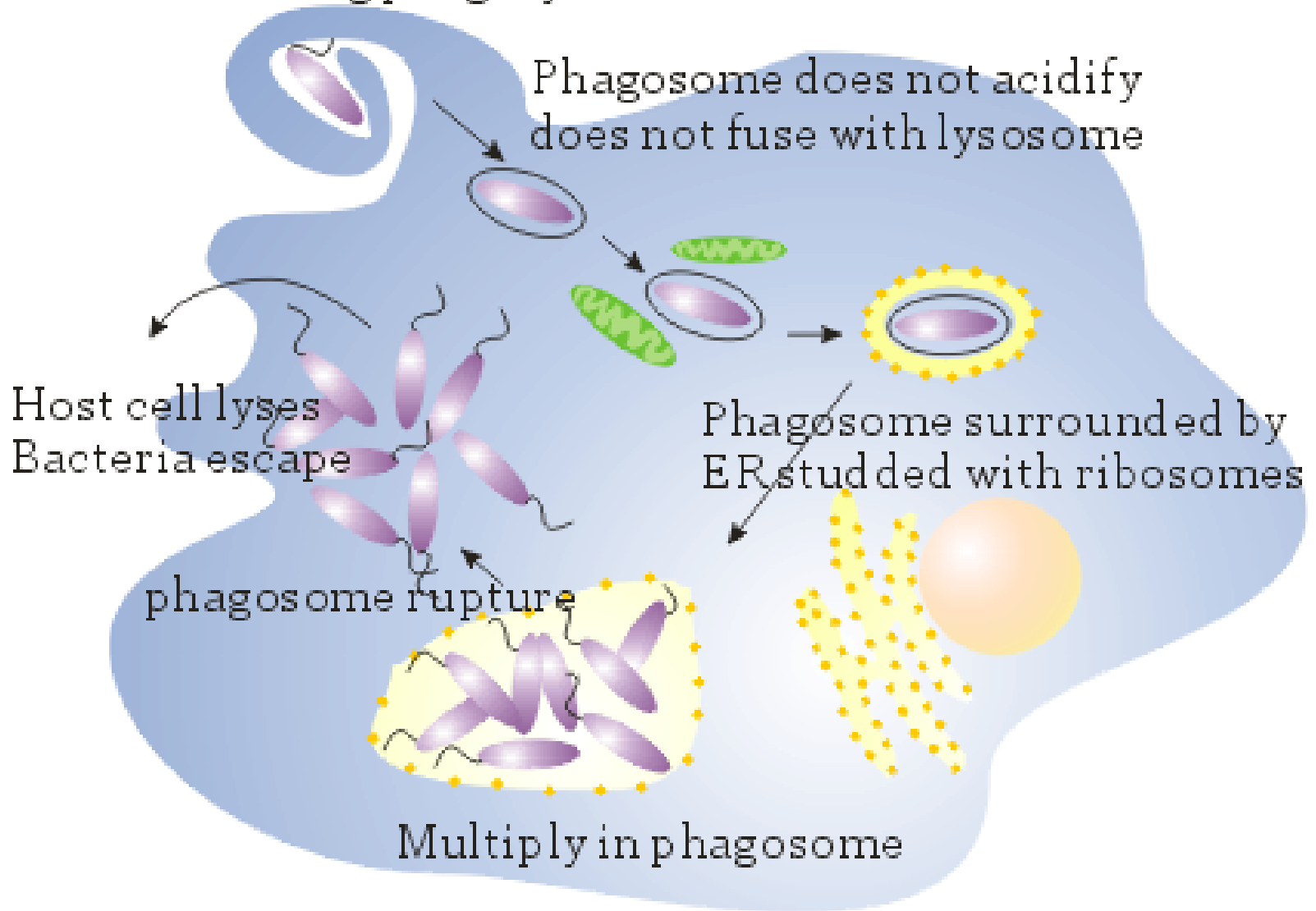
Resposta Inespecífica: Fagocitose, Inflamação, Febre

Resposta Imune: Controlar a doença vigente e aumentar resistência a recorrência da doença

Escapando a Fagocitose

- ✓ Inibir recrutamento do fagócito e suas funções (cascata do complemento e opsoninas)
- ✓ Destruição microbiana de fagócitos (ex. Leucocidinas)
- ✓ Escapando a ingestão pelo fagócito (ex. Cápsula)
- ✓ Algumas sobrevivem no interior do fagócito (impedem liberação dos lisossomos)

Coiling phagocytosis



➤ Danos (Lesões) aos Tecidos do Hospedeiro

Tipo e Intensidade da Lesão → Depende dos tecidos e órgãos afetados.

Agente Invasor e Resposta Exagerada do Hospedeiro

Normalmente causadas pela ação de **TOXINAS**



Substâncias que alteram o metabolismo normal das **células hospedeiras** causando efeitos deletérios sobre o hospedeiro

Exotoxina (Proteínas)

Exemplos: Inibir síntese protéica (Toxina Diftérica);
Perda de fluido ao nível intestinal (Enterotoxinas);
Ação sobre SN (Neurotoxinas); Lise de células
(Citotoxinas = citolisinas, hemolisinas).

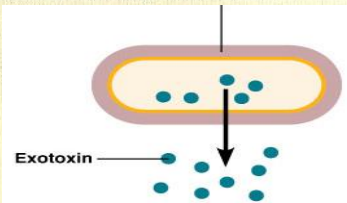
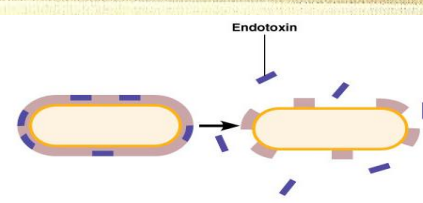
Toxinas A (Active) - B (Binding)

(Ex. Tetânica, Botulínica, *B. anthracis*, Diftérica)

Endotoxina (Lipopolissacarídeo)

Integrantes na parede de Gram negativa (**LPS**)
Em baixas concentrações → Reações de alarme
Em altas concentrações → Choque e morte

Propriedades diferenciais de Exotoxinas e Endotoxinas

Propriedade	Exotoxinas	Endotoxinas
		
Fonte bacteriana	Principalmente bactérias gram-positivas	Bactérias gram-negativas
Relação com o micro-organismo	Produto metabólico de células em crescimento	Presentes em LPS da membrana externa da parede celular e liberadas com a destruição da célula ou durante a divisão celular
Propriedade química	Proteínas, normalmente compostas de duas partes (A-B)	Porção lipídica (lipídeo A) do LPS da membrana externa (lipopolissacarídeo)
Farmacologia (efeito no organismo)	Específica para uma estrutura ou função celular particular no hospedeiro (afeta principalmente funções celulares, neurônios e trato gastrointestinal)	Geral, causando febre, fraqueza, dores e choque; todas produzem os mesmos efeitos
Estabilidade ao calor	Instável; normalmente podem ser destruídas em 60 a 80°C (exceto a enterotoxina estafilocócica)	Estável; podem suportar autoclave (121°C por uma hora)
Toxicidade (habilidade de causar doença)	Alta	Baixa
Geração de febre	Não	Sim
Imunologia (em relação aos anticorpos)	Podem ser convertidas em toxoides para imunização contra a toxina; neutralizadas por antitoxinas	Não são facilmente neutralizadas por antitoxinas; toxoides não podem ser produzidos para imunizar contra as toxinas
Dose letal	Pequena	Consideravelmente maior
Doenças representativas	Gangrena gasosa, tétano, botulismo, difteria, febre escarlatina	Febre tifoide, infecções do trato urinário e meningite meningocócica

Exotoxinas e doenças relacionadas

Doença	Bactéria	Tipo de exotoxina	Mecanismo
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	A-B	A neurotoxina impede a transmissão de impulsos nervosos resultando em paralisia flácida.
Tétano	<i>Clostridium tetani</i>	A-B	A neurotoxina bloqueia os impulsos nervosos da via de relaxamento muscular, resultando em contrações descontroladas dos músculos.
Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	A-B	A citotoxina inibe a síntese proteica, especialmente em células nervosas, cardíacas e renais.
Síndrome da pele escaldada	<i>Staphylococcus aureus</i>	A-B	Uma exotoxina causa a separação das camadas da pele, que se soltam (pele escaldada).
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	A-B	A enterotoxina causa a secreção de grandes quantidades de fluidos e eletrólitos, resultando em diarreia.
Diarreia do viajante	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica e <i>Shigella</i> spp.	A-B	A enterotoxina causa a secreção de grandes quantidades de fluidos e eletrólitos, resultando em diarreia.
Antraz	<i>Bacillus anthracis</i>	A-B	Dois componentes A entram na célula pelo componente B. As proteínas A induzem choque e diminuem as respostas imunológicas do hospedeiro.
Gangrena gasosa e intoxicação alimentar	<i>Clostridium perfringens</i> e outras espécies de <i>Clostridium</i>	Toxina danificadora de membrana	Uma exotoxina (citotoxina) causa destruição maciça de eritrócitos (hemólise); outra exotoxina (enterotoxina) está relacionada à intoxicação alimentar, que resulta em diarreia.
Diarreia associada a antibióticos	<i>Clostridium difficile</i>	Toxina danificadora de membrana	A enterotoxina causa a secreção de grandes quantidades de fluidos e eletrólitos, resultando em diarreia; a citotoxina resulta em desorganização do citoesqueleto das células do hospedeiro.
Intoxicação alimentar	<i>Staphylococcus aureus</i>	Superantígeno	A enterotoxina causa a secreção de grandes quantidades de fluidos e eletrólitos, resultando em diarreia.
Síndrome do choque tóxico (SCT)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Superantígeno	A toxina causa secreção de fluidos e eletrólitos de vasos capilares, resultando em diminuição do volume sanguíneo e queda da pressão arterial.

Toxinas tipo A-B
A= Active)
B= Binding)

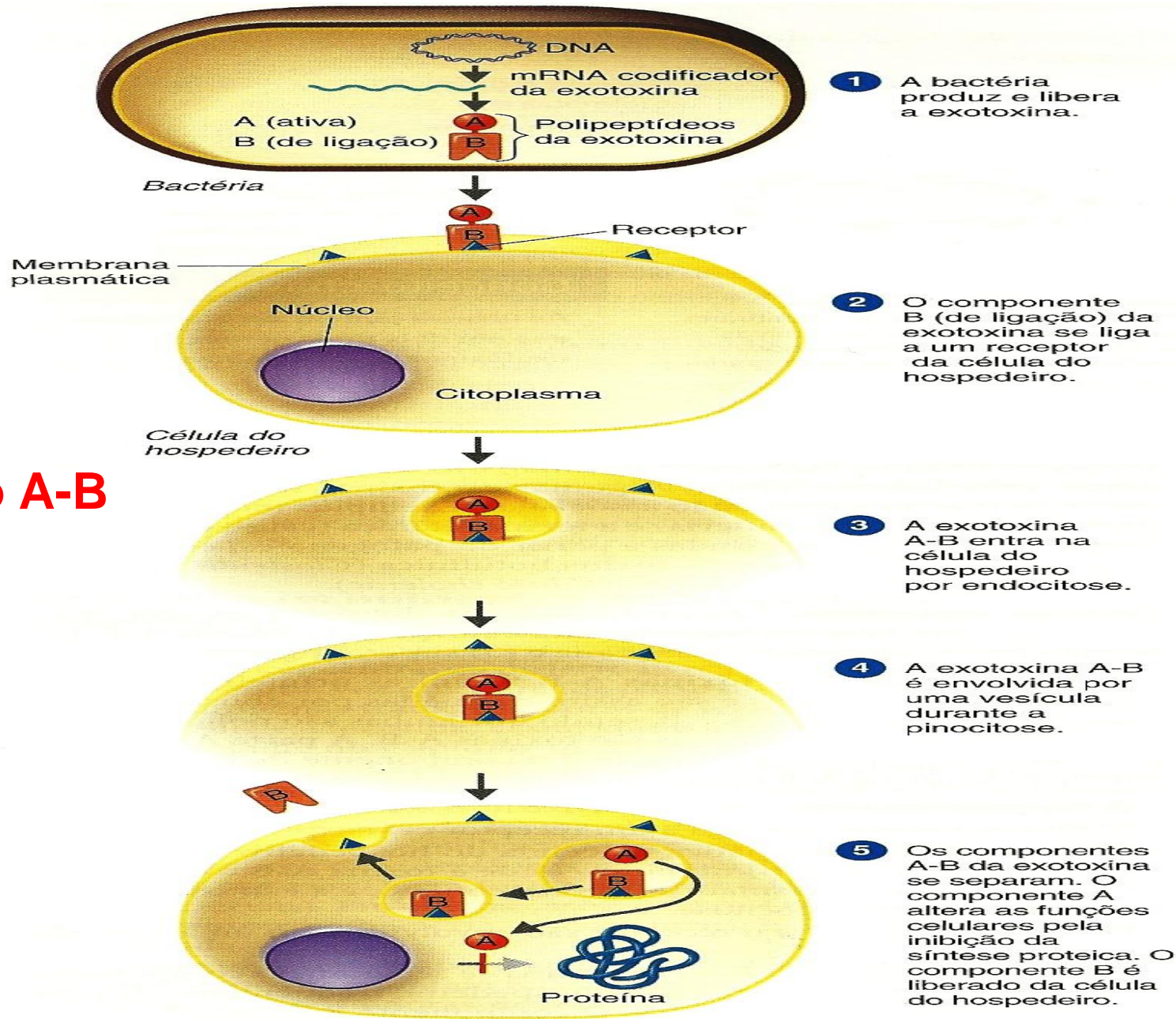
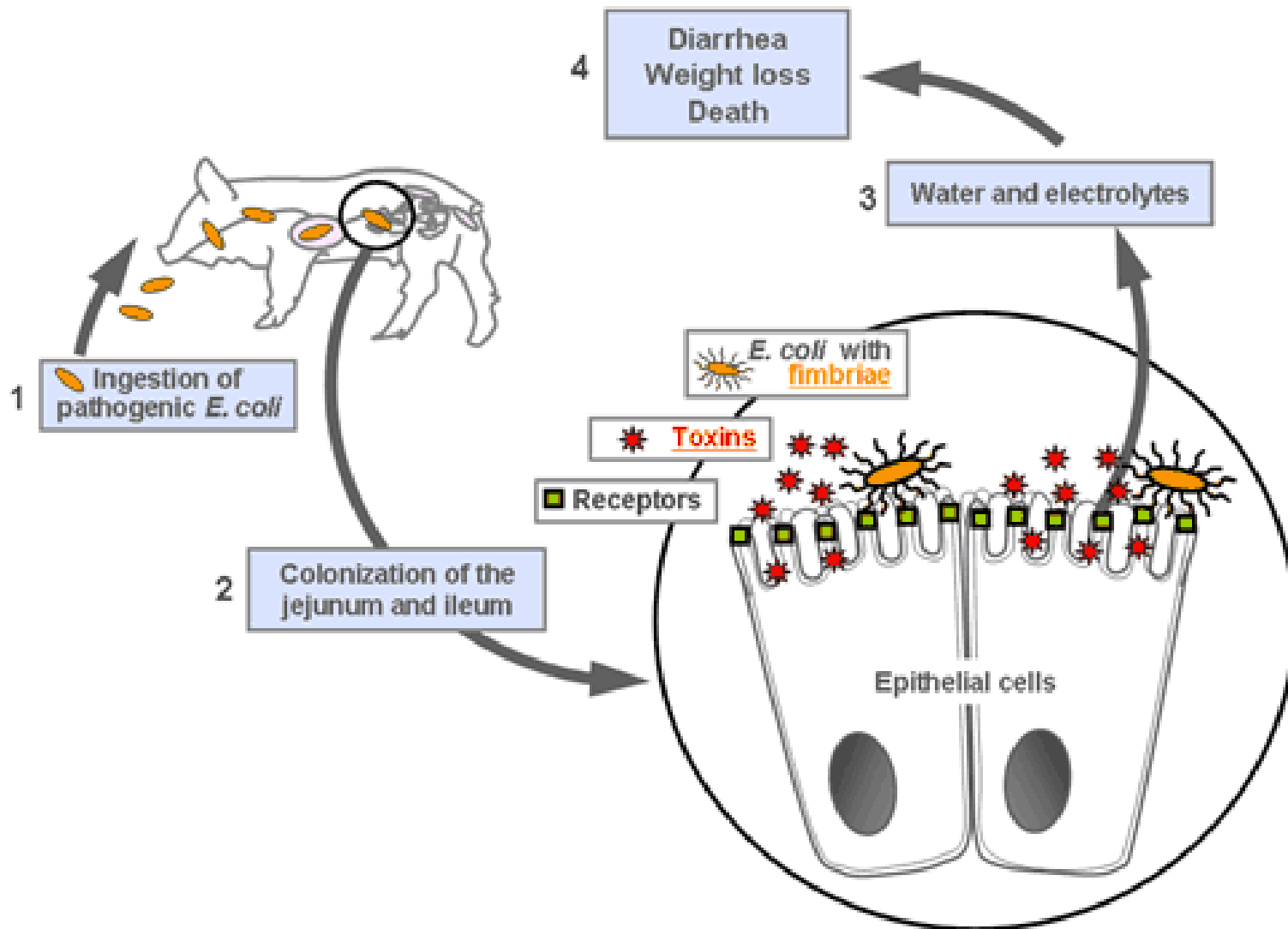
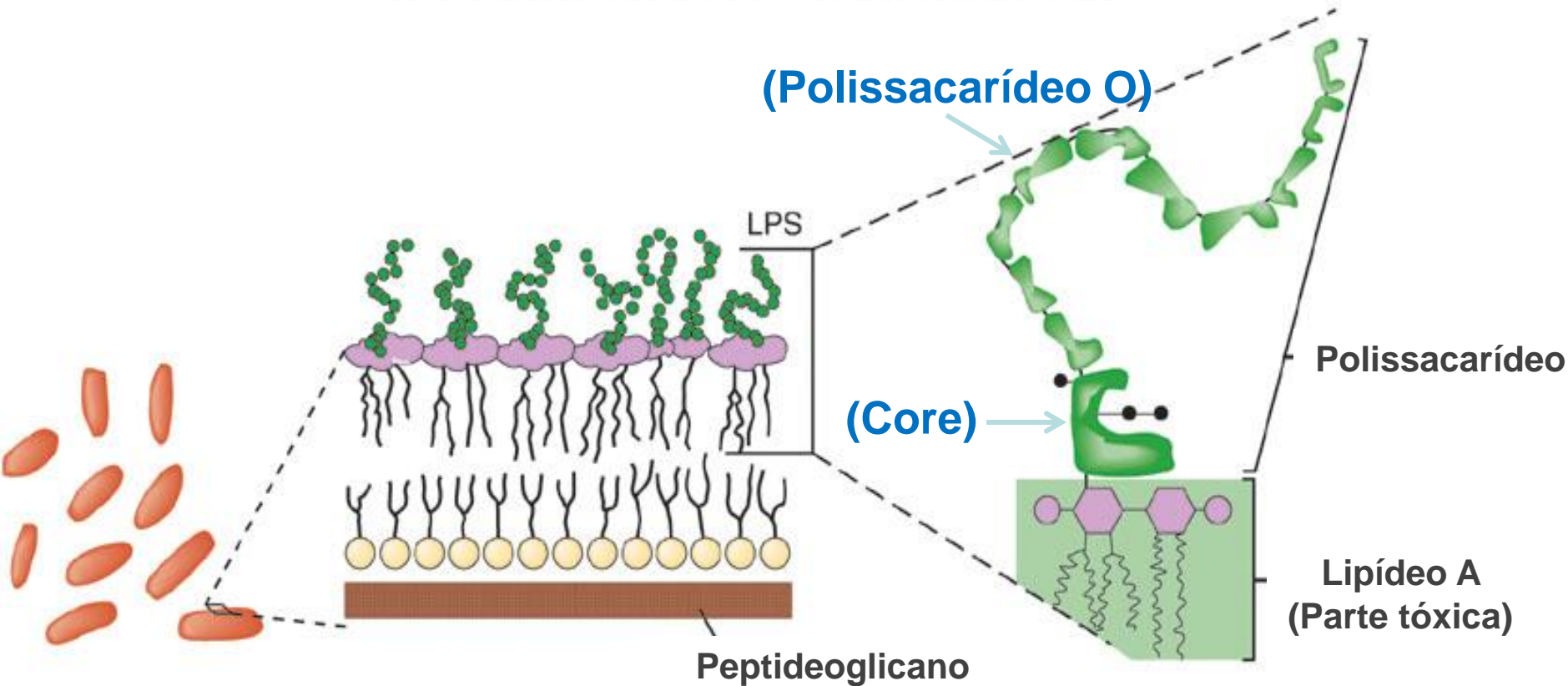


Figura 15.5 A ação da exotoxina A-B. Um modelo proposto para o mecanismo de ação da toxina diftérica.





Bacilo Gram negativo

Membrana externa com lipopolissacarídeo (LPS)

Composição de uma unidade de LPS

(Endotoxina-Fator de Virulência das Gram negativas)

Responsável por muitas manifestações sistêmicas das infecções por bactérias Gram negativas, que ativa o complemento, causa liberação de citocinas, leucocitose, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, febre, diminuição da circulação periférica, choque e morte.

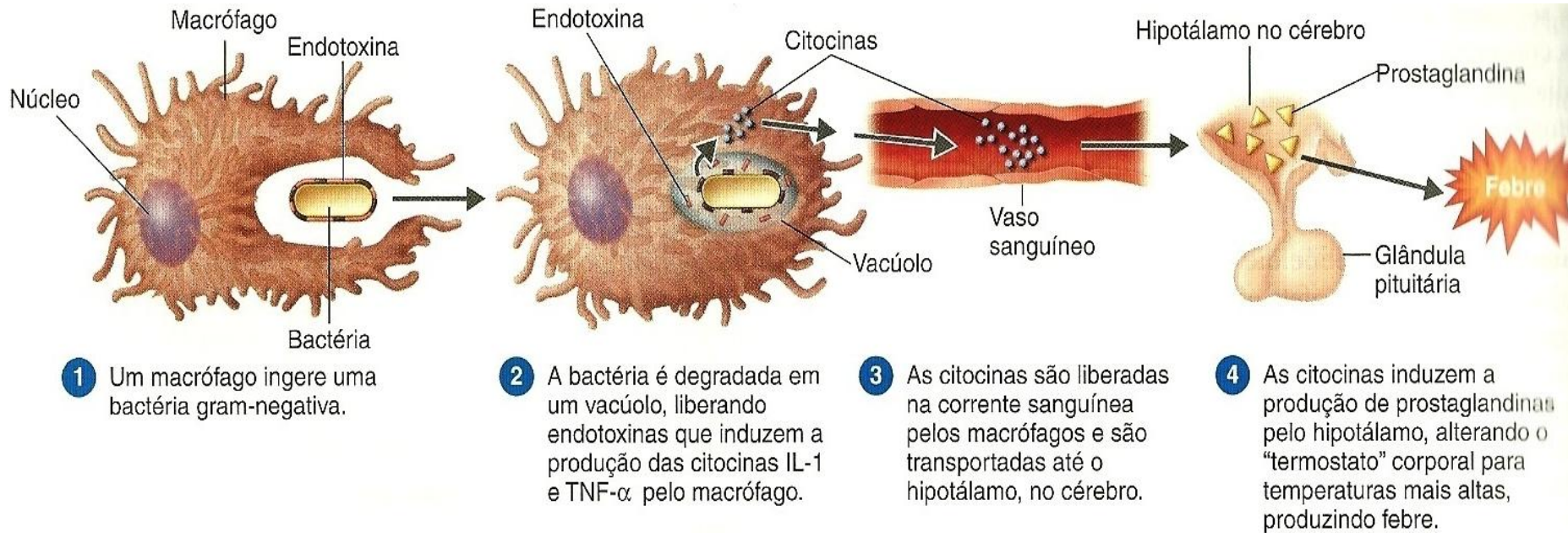


Figura 15.6 Endotoxinas e a resposta pirogênica. O mecanismo proposto pelo qual as endotoxinas causam febre.