

LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS

Bactérias Anaeróbias e diagnóstico microbiológico

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>

ANAERÓBIOS - ORIGEM

- Origem da Terra - ambiente atmosférico era totalmente livre de oxigênio.**
- Evidências filogenéticas sugerem que os organismos anaeróbios estritos seriam as primeiras formas de vida que emergiram em nosso planeta (Gest, 1980).**

ANAERÓBIOS - ORIGEM

- O sucessivo aumento da concentração de oxigênio na atmosfera terrestre causou a evolução dos sistemas biológicos no desenvolvimento de cadeias transportadoras de elétrons, e de complexos enzimáticos capazes de utilizar eficientemente o oxigênio como aceptor final dos elétrons.

HISTÓRICO

- **Hipócrates (400 aC): Tétano**
- **Antony van Leewenhoek (1680): “Animálculos”**
- **Louis Pasteur (1861): Aeróbio e Anaeróbio**

DEFINIÇÃO

Bactéria anaeróbia

“É todo microrganismo que cresce em ambiente isento de oxigênio e que realiza suas funções metabólicas vitais utilizando compostos diferentes do O₂, tais como sulfatos, carbonatos, nitratos”.

SUSCEPTIBILIDADE AO OXIGÊNIO

“ O OXIGÊNIO EXCESSIVO É TÃO PERIGOSO QUANTO A SUA DEFICIÊNCIA” (Lavoisier, 1785)

[O₂] → Organismo → MORTE

*** Por quê existem diferenças quanto à sensibilidade ao oxigênio entre os seres vivos?**

*** A quê se deve a toxicidade desta substância?**

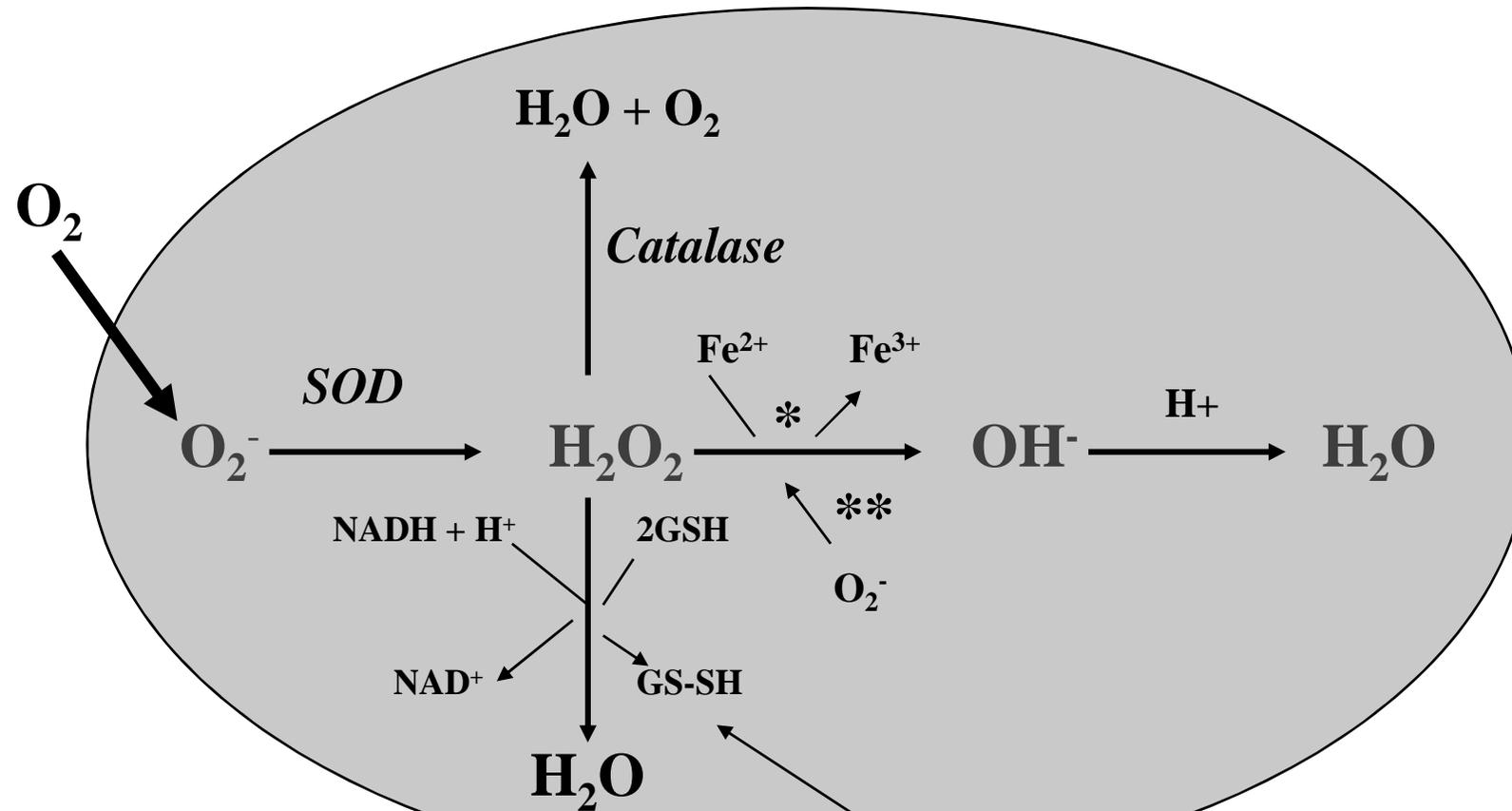
RADICAIS LIVRES LETAIS

➤ **Sub-produtos do metabolismo bacteriano que oxidam proteínas, lipídeos e DNA:**

- **Anion superóxido: O_2^-**
- **Radical hidroxila: OH**
- **Peróxido de hidrogênio: H_2O_2**
- **Óxido nítrico: NO**

Tóxicos para células eucarióticas e procarióticas

MECANISMOS DE DEFESA CONTRA O OXIGÊNIO

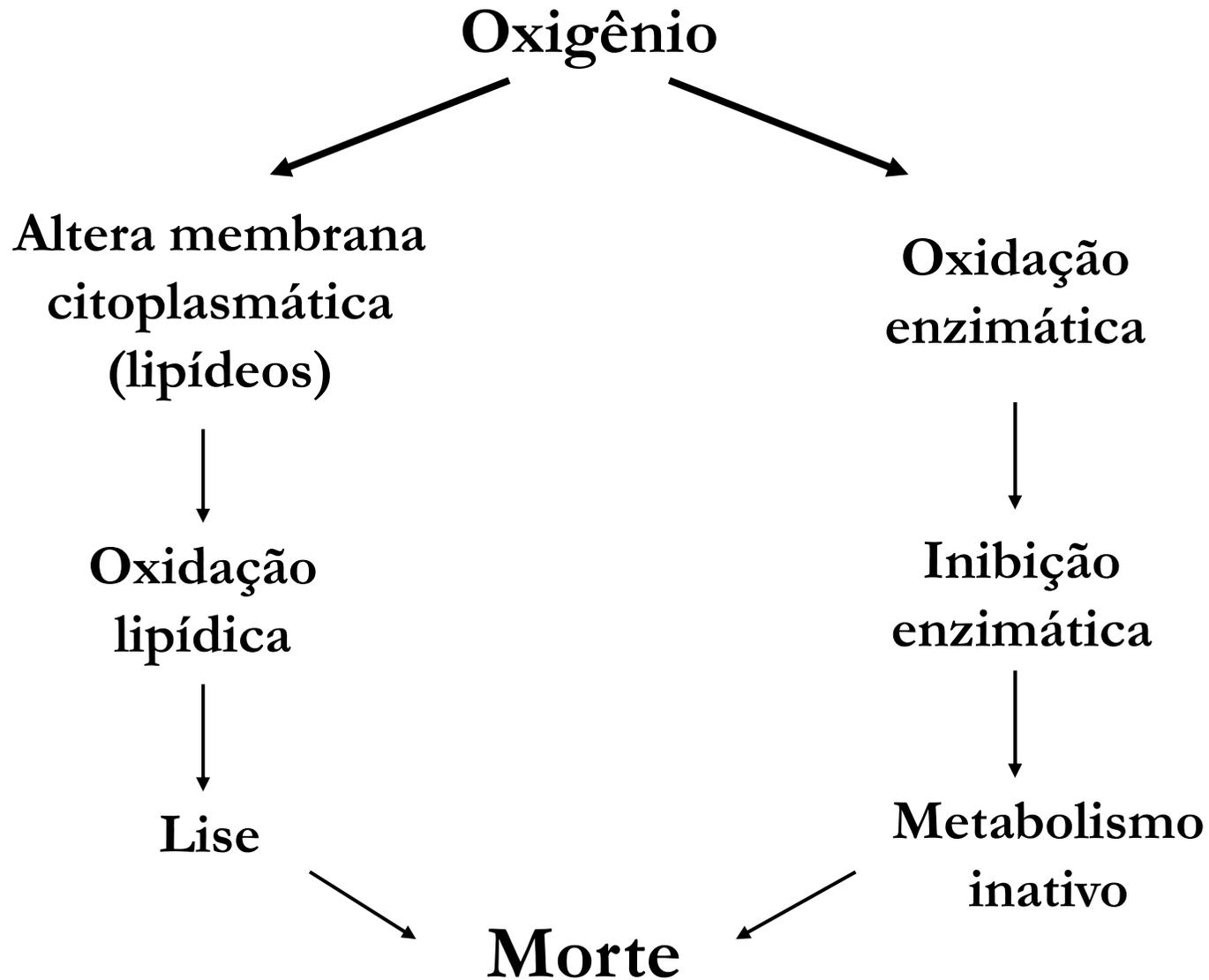


*Reação de Fenton

** Reação de Haber-Weiss

Glutathione peroxidase

TOXICIDADE DO OXIGÊNIO



CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A SENSIBILIDADE AO OXIGÊNIO

- Anaeróbios estritos: não crescem $O_2 > 0,5\%$**
- Anaeróbios intermediários ou moderados: crescem de 2 a 8% O_2**
- Microaerófilos: baixa tensão de O_2**
- Capnofílicos: adição de 5 - 10% CO_2**
- Aerotolerantes: crescem em anaerobiose e viáveis por várias horas na presença de O_2 .**

Metabolismo Bacteriano Anaeróbio

Produção de Energia Anaeróbia:

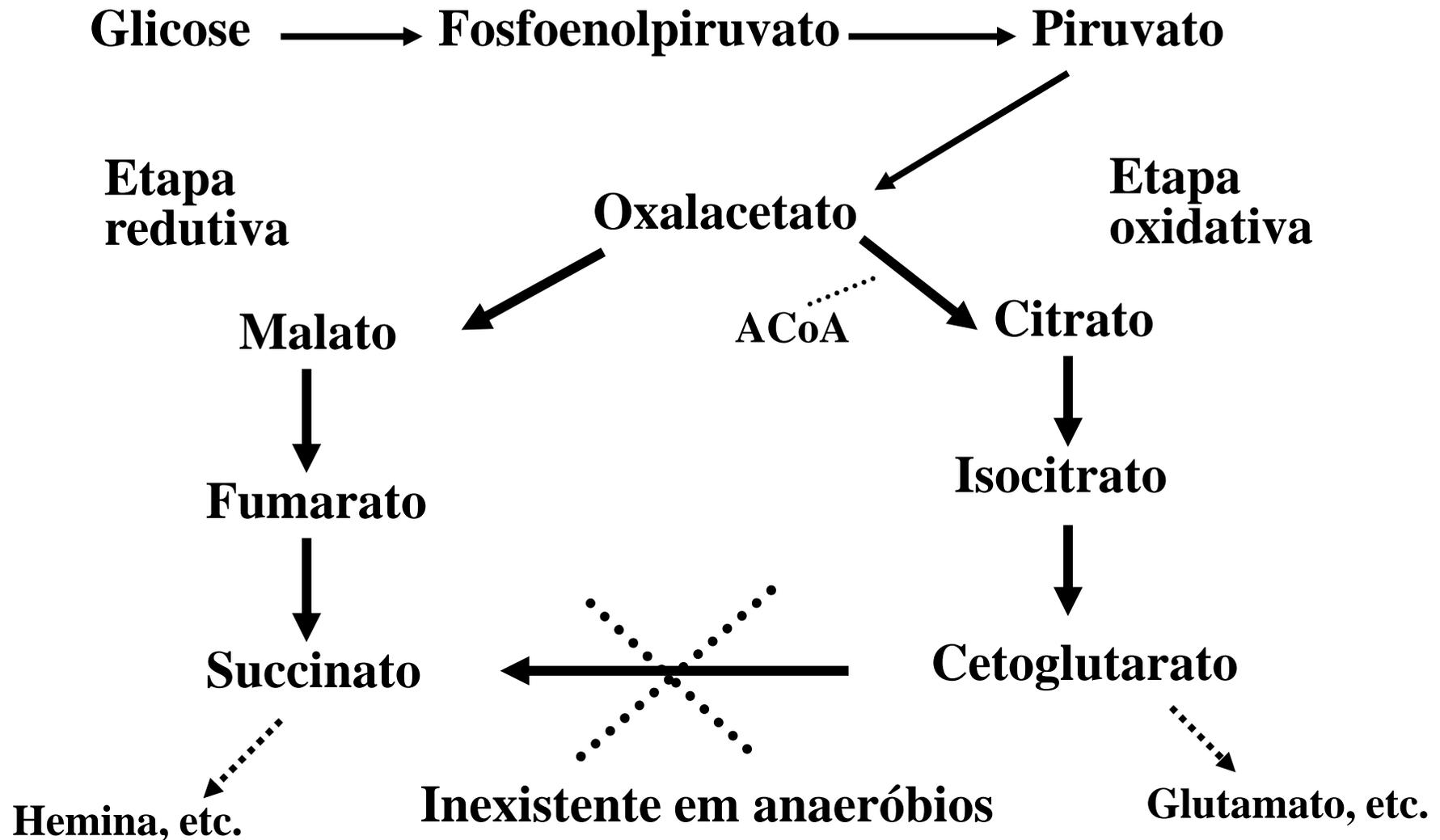
- Não existe participação do oxigênio**
- Realizado por três processos:**
 - » Respiração Anaeróbia**
 - » Fermentação**
 - » Fotossíntese**

Respiração anaeróbia

- » Processo de liberação de energia, onde o acceptor final de elétrons não é o oxigênio, mas sim um substrato inorgânico: NO_3 , SO_4 , CO_3 .
- » Não se observa: Ciclo de Krebs, devido a que A-CoA em baixo Eh é *inativo*, nem a Cadeia Respiratória.
- » É um processo lento, havendo formação de somente 2 ATP.



Ciclo de Krebs em *E. coli* Crescida em Anaerobiose



Fermentação

- Não há aceptor final de elétrons, Cadeia Respiratória, e transporte de elétrons.
- Há pequena liberação de energia pelo processo denominado Fosforilação ao nível do substrato.
- Compostos orgânicos funcionam como aceptores e doadores de elétrons.

» Tipos de Fermentação:

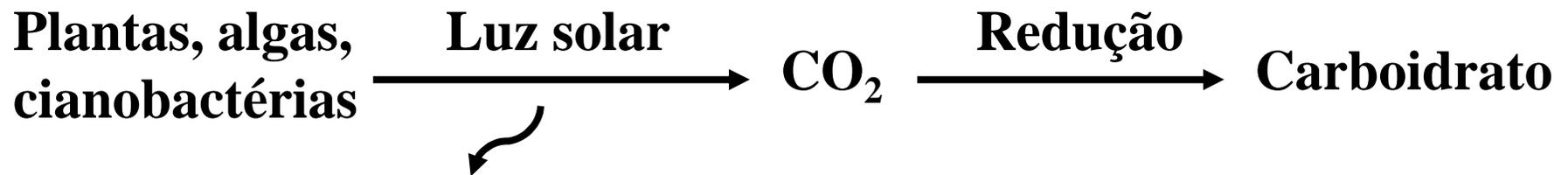
1. Fermentação láctica: Acidifica produtos lácteos

- Fermentação homoláctica: produz só ác. láctico
- Fermentação heteroláctica: ác. láctico, acético, fórmico, etc.

2. Fermentação alcoólica: Produz álcool

Fotossíntese

- Processo dependente da luz solar, utilizado por plantas e algumas bactérias.
- A luz solar é transformada em Energia Química, utilizada para reduzir o CO_2 para carboidrato.



- Bacterioclorofila (Membrana plasmática)
- Clorofila (Cloroplastos)



**Anaeróbios como
microbiota indígena,
residente ou autóctone**

**Sabe-se pouco da associação
hospedeiro-microbiota indígena
Interação dinâmica**

Para a microbiota, a interação fornece:

**nutrientes, ambiente estável,
temperatura constante,
proteção e transporte.**

Para o homem, a interação traz:

**benefícios nutricionais, estimulação
do sistema imune, e regulação da
colonização endógena e exógena.**

TIPOS DE MICROBIOTA

1. MICROBIOTA INDÍGENA, RESIDENTE OU AUTÓCTONE

- ✓ **Bactérias indígenas: > 1% da microbiota total**
- ✓ **Bactérias suplementares: < 1% da microbiota total**

2. MICROBIOTA EXÓGENA, ALÓCTONE OU TRANSITÓRIA

MICROBIOTA INDÍGENA: COLONIZAÇÃO

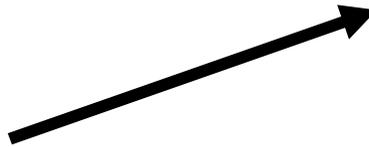
**NASCIMENTO: MICROBIOTA
CERVICAL MATERNA**



**GRUPO MICROBIANO DE
CADA SÍTIO CORPORAL**



**Pele, C. bucal, T.
gastrointestinal, T.
respiratório**

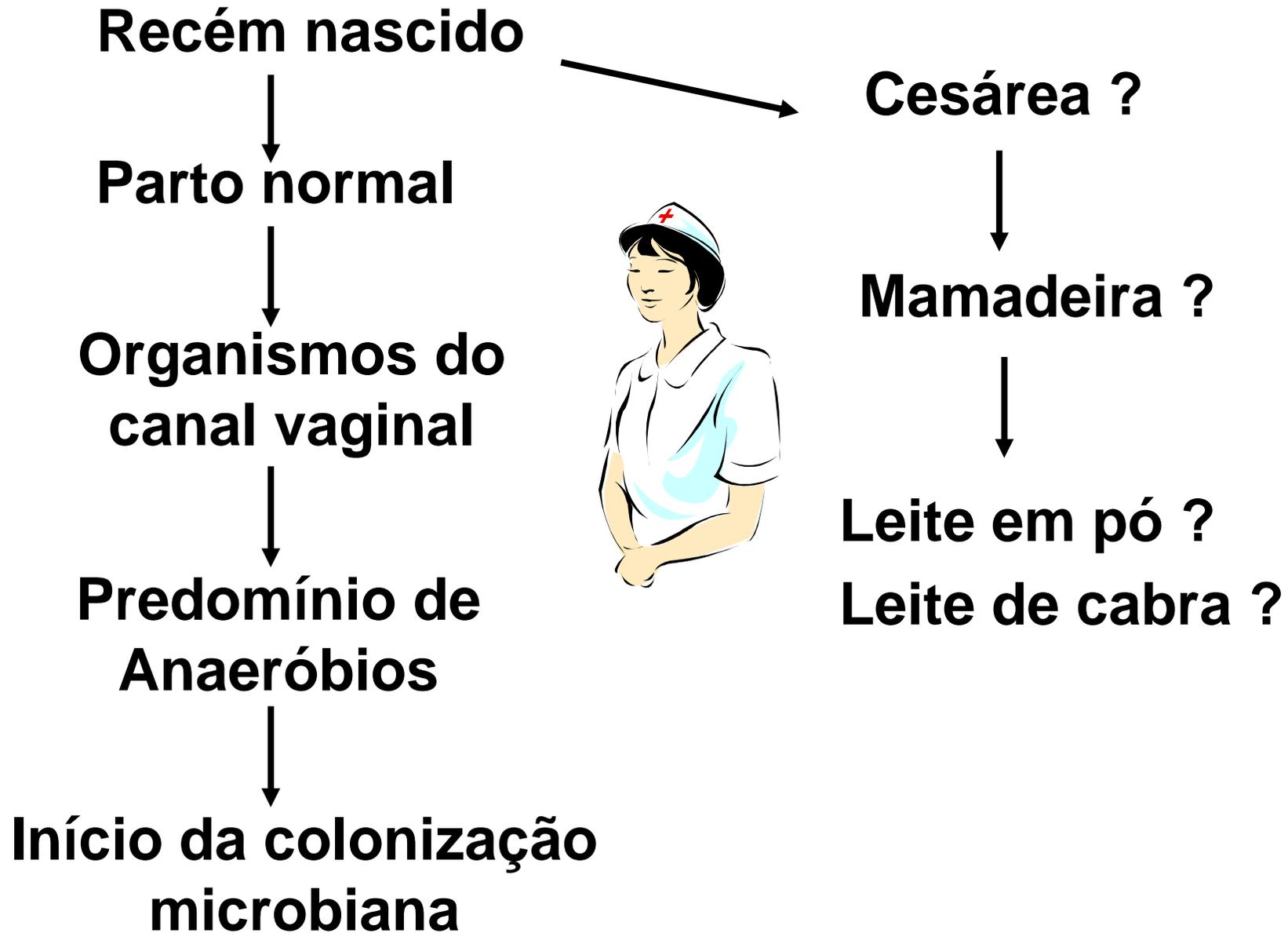


**MICROBIOTA INDÍGENA,
AUTÓCTONE, RESIDENTE**

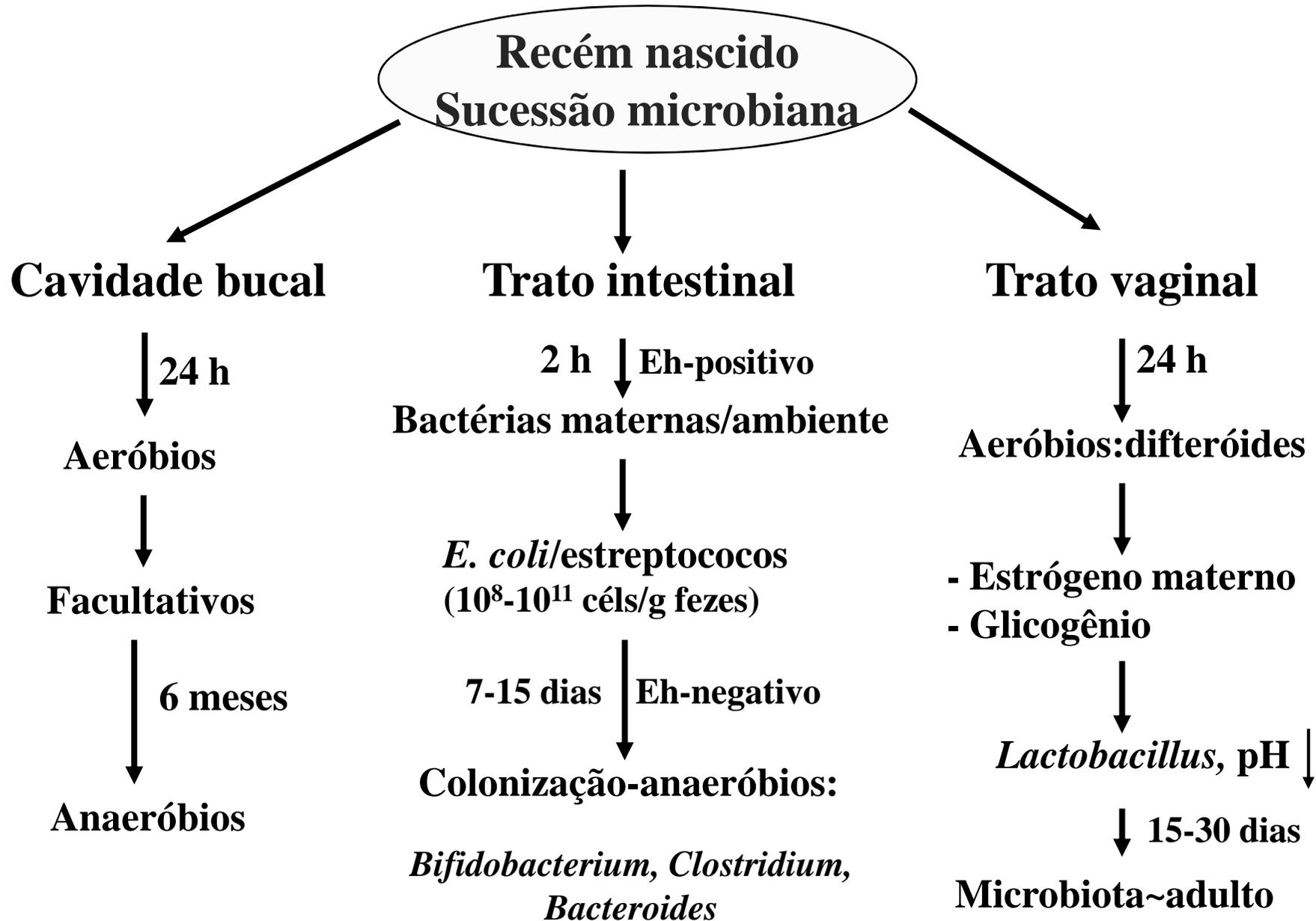


COMUNIDADE CLIMAX

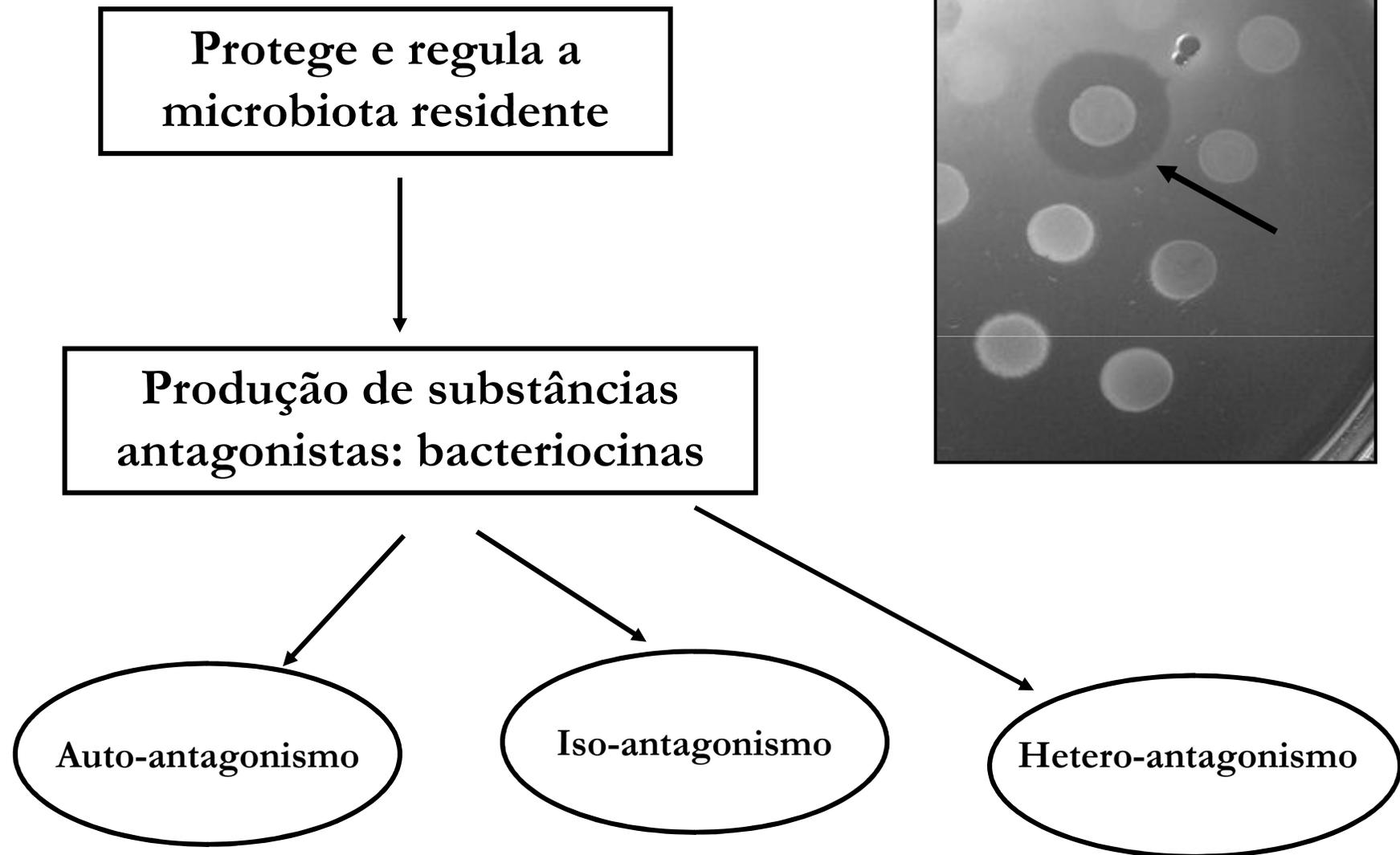
Adquisição da Microbiota



ESTABELECIMENTO DA MICROBIOTA INDÍGENA

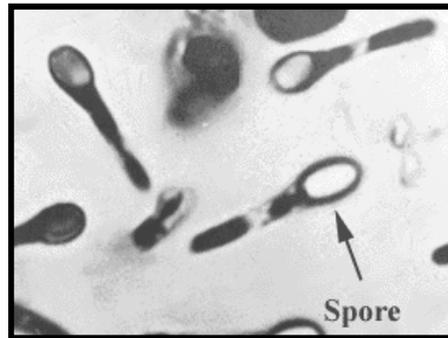


Funções da microbiota residente

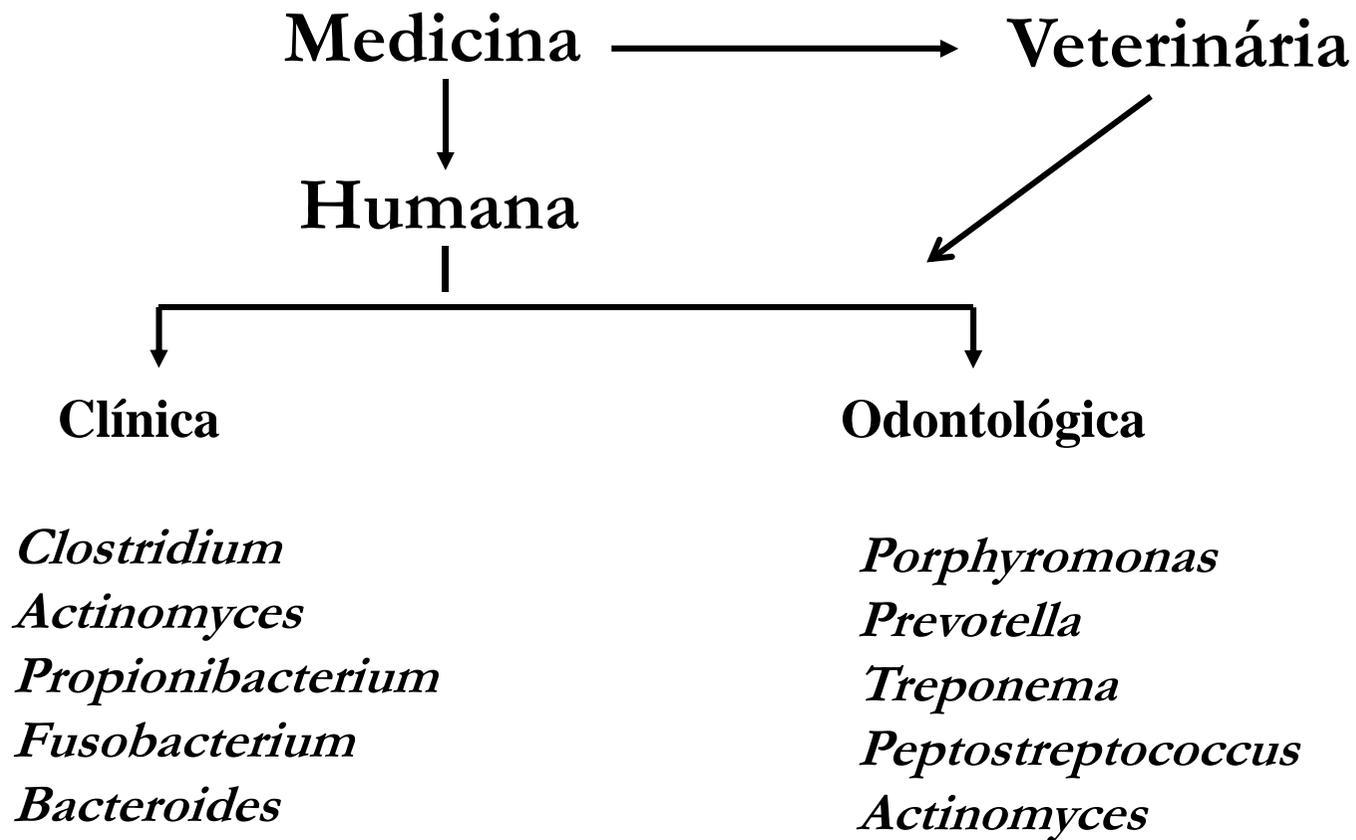


Fatores que influenciam a colonização de bactérias anaeróbias

- ⇒ **Presença de oxigênio ~ Eh**
- ⇒ **Falta de enzimas: superóxido dismutase, catalase, peroxidase**
- ⇒ **Excesso de radicais livres**
- ⇒ **Capacidade de sobreviver no interior do corpo humano**
- ⇒ **Esporos presentes em alimentos, meio-ambiente**



Principais Bactérias Anaeróbias de Interesse Médico



Diagnóstico Laboratorial de Bactérias Anaeróbias

Laboratório de Anaeróbios

Aparelho Respiratório:
Infecções do aparelho respiratório superior, pneumonia necrotizante, abscesso pulmonar, pneumonia aguda.

Abdômen: abscessos intra-abdominais, abscesso hepático, peritonite.

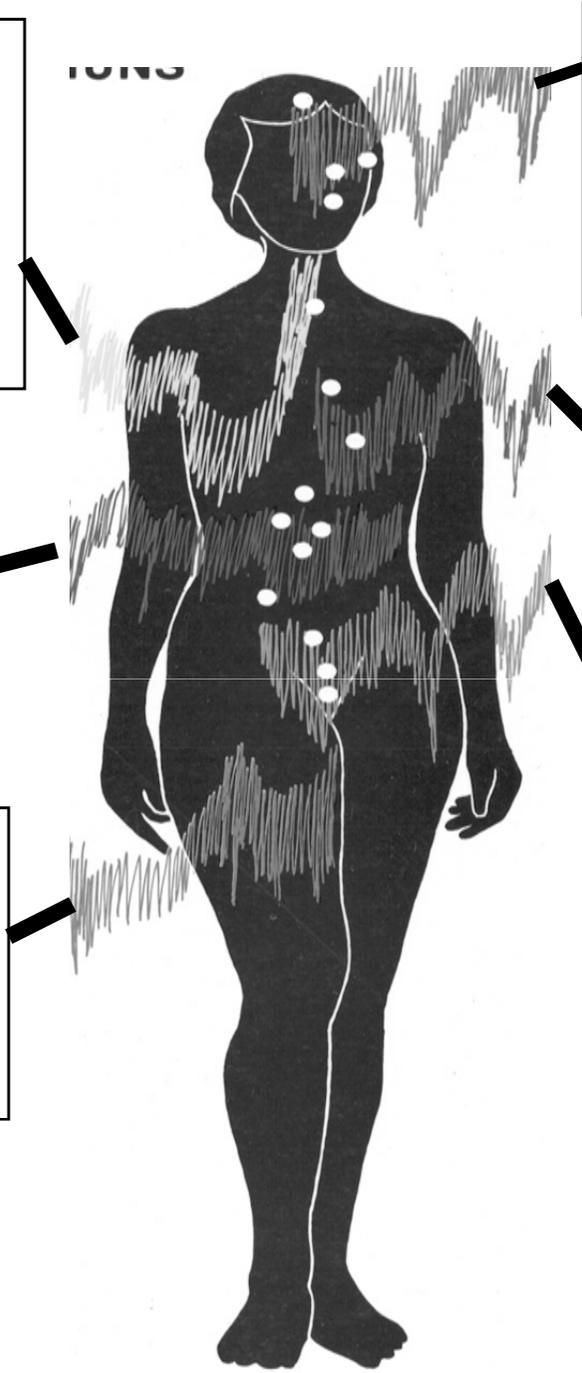
Pele e Tecidos Moles:
feridas profundas infectadas, abscessos profundos, septicemia, gangrena, celulite.

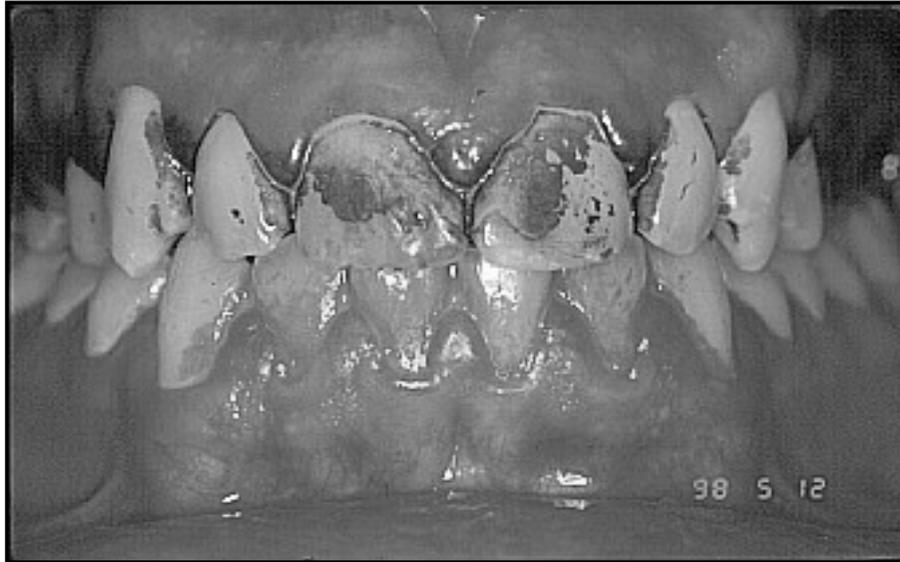
Sistema Nervoso Central e Cabeça: Infecções periodontais, otite média crônica, abscesso cerebral, sinusite crônica.

Tórax: endocardite, bacteremia, abscessos.

Trato Genital Feminino:
abscesso tubo-ovariano, abscesso pélvico, aborto séptico, endometrite

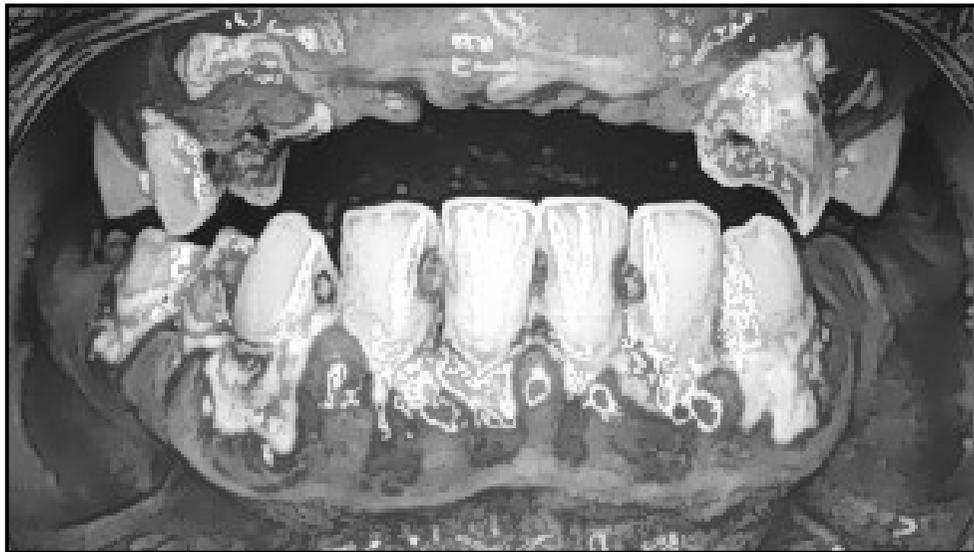
Participação de anaeróbios em processos infecciosos





Gengivite

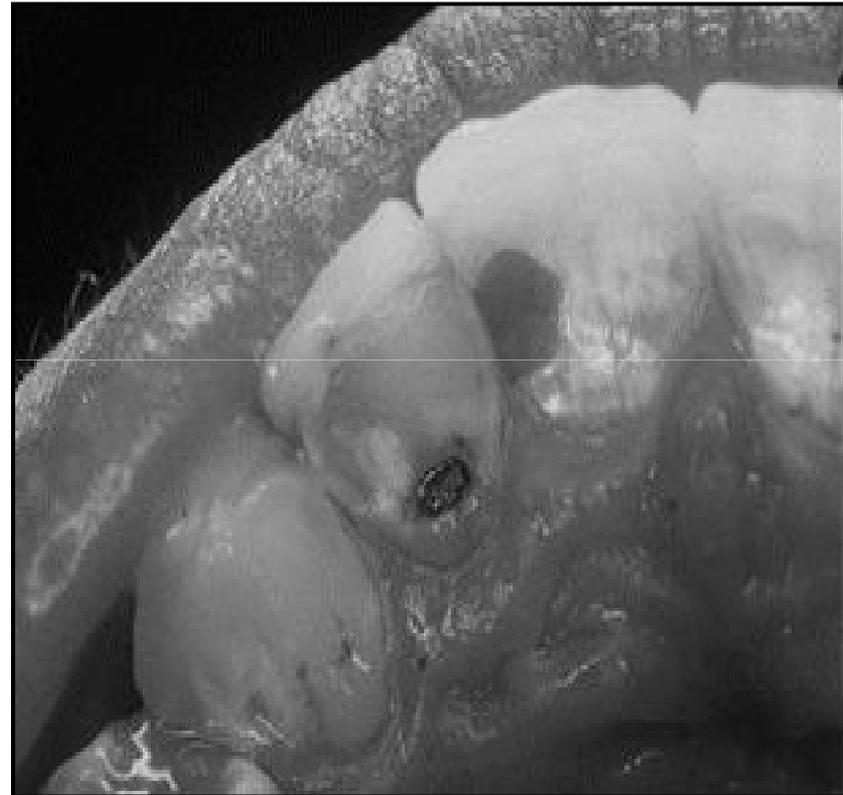
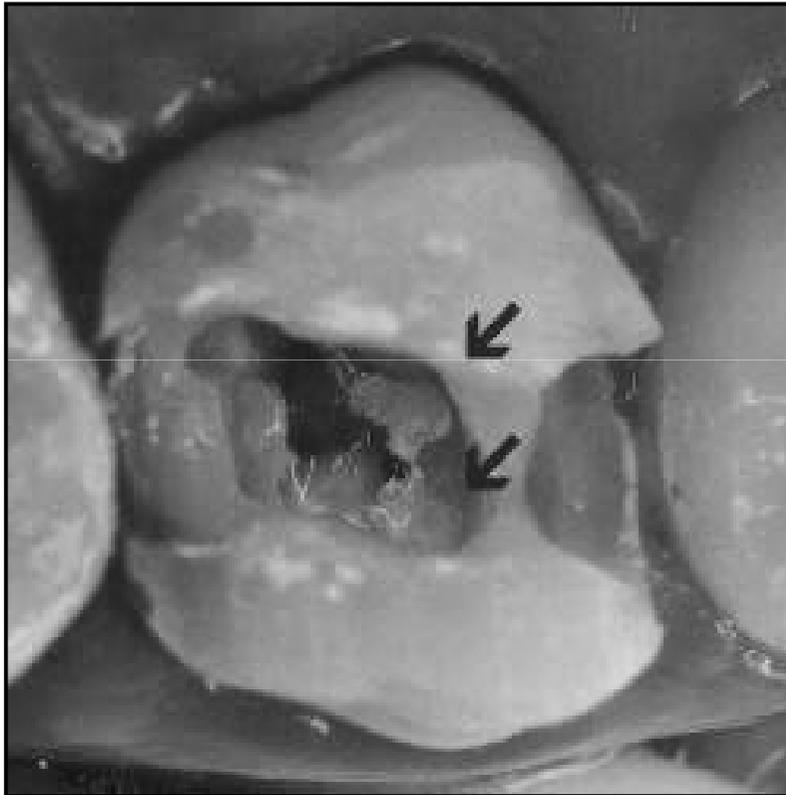
Veillonella spp.



Periodontite

Porphyromonas spp. e
Treponema spp.

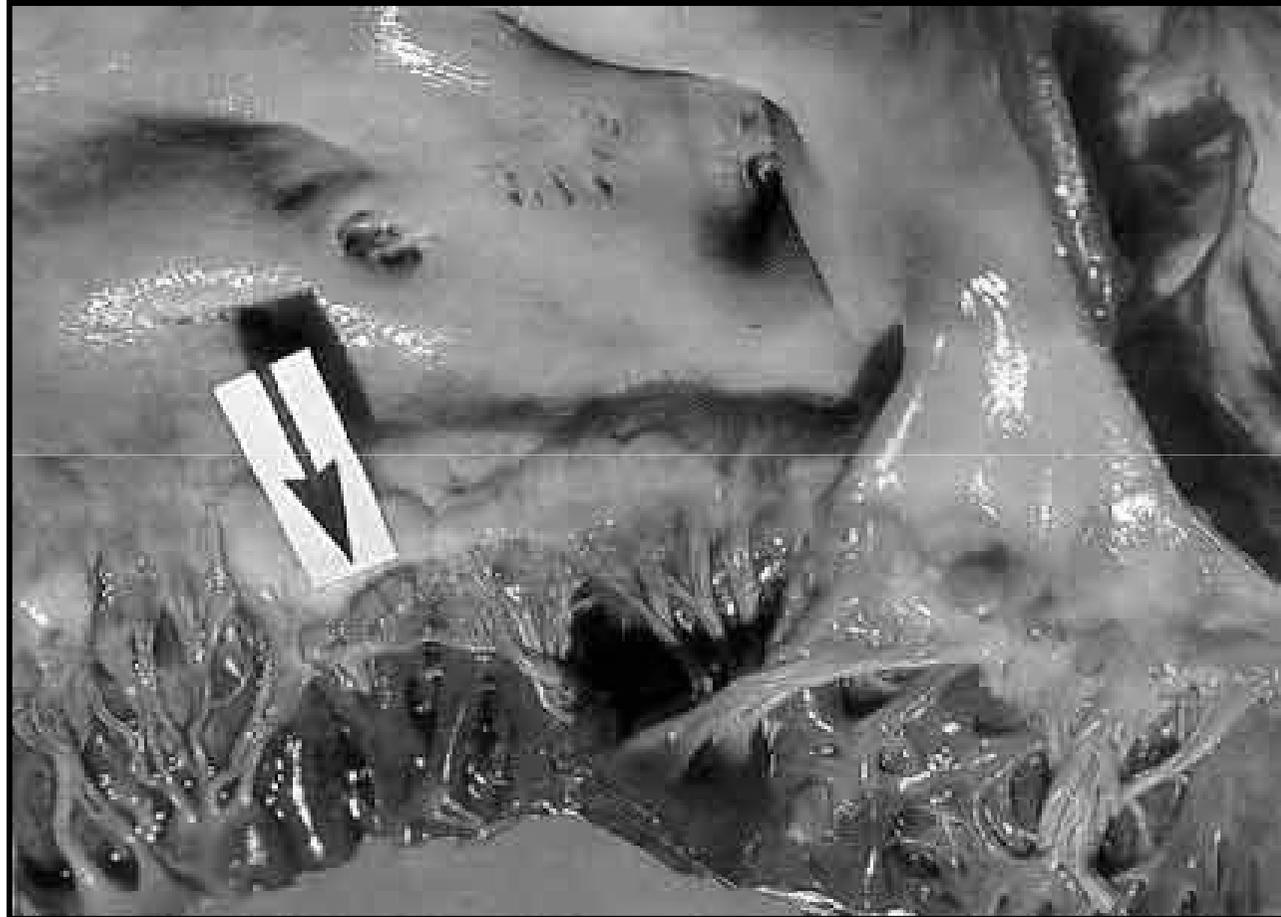
Prevotella spp. e *Porphyromonas* spp.



Infecção endodôntica

Laboratório de Anaeróbios

Peptococcus spp. e *Peptostreptococcus* spp.



Endocardite

Laboratório de Anaeróbios

Bacteroides fragilis



Fascite necrosante



Celulite

Indícios clínicos de infecção por anaeróbios

- **Secreção de odor pútrido**
- **Tecidos: gás, necrose, crepitação, fluorescência, formação de pseudomembrana**
- **Endocardites com hemocultura negativo**
- **Infecções pelo uso de aminoglicosídeos**
- **Infecções após mordidas humanas ou animais; aborto séptico, infecção após cirurgia gastrointestinal, etc.**

Indícios bacteriológicos de infecção por anaeróbios

- **Morfologia única na coloração de Gram.**
- **Resistência a canamicina ou neomicina (100 µg/ml) ou vancomicina (7,5 µg/ml).**
- **Produção de gás, odor pútrido em culturas.**
- **Colônias produzem fluorescência sob luz UV.**

Considerações para Isolamento de Anaeróbios

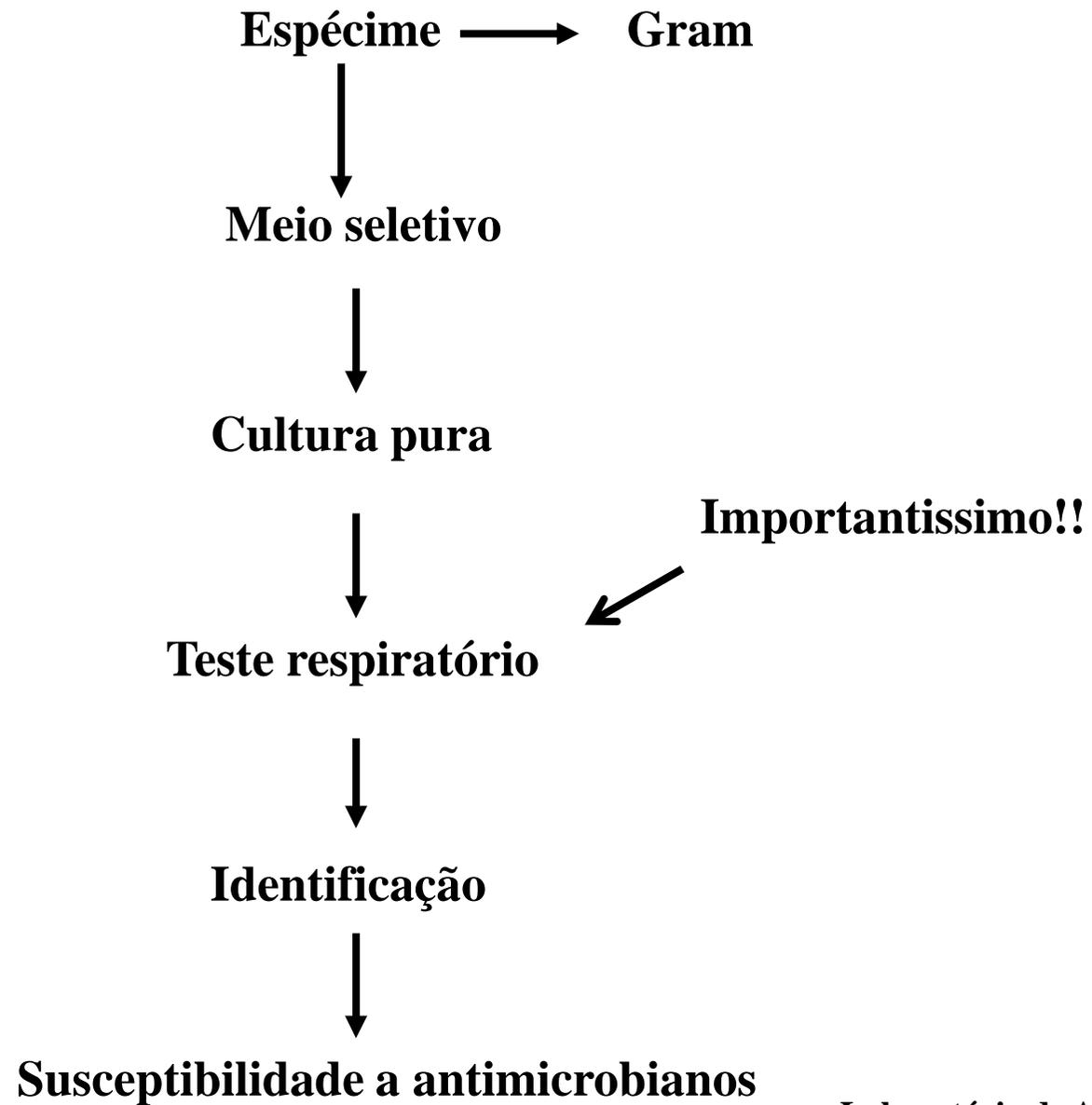
1. São infecções mistas e natureza endógena.

2. Espécimes a serem obrigatoriamente pesquisadas:

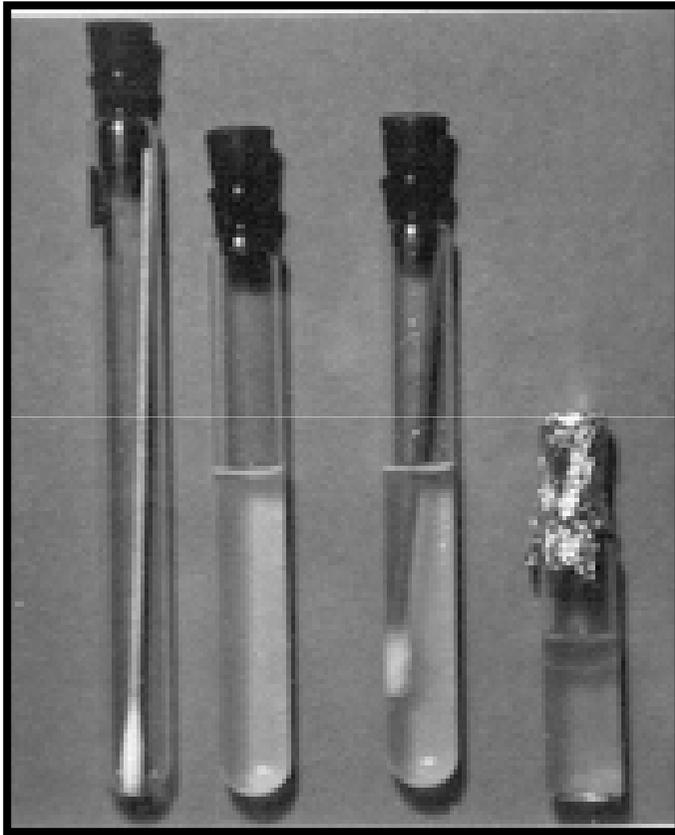
- Lesões associadas com trato gastrointestinal ou trato genital feminino;**
- Septicemia;**
- Infecções crônicas do trato respiratório superior (sinusites, otite média);**

- Lesão supurativa do trato respiratório inferior (pneumonia).**
- Meningites associadas com infecções crônicas do trato respiratório superior (fluido cérebro-espinal).**
- Abscessos superficiais e profundos (cerebral).**
- Infecções dentais.**
- Lesões por queimaduras e mordidas.**

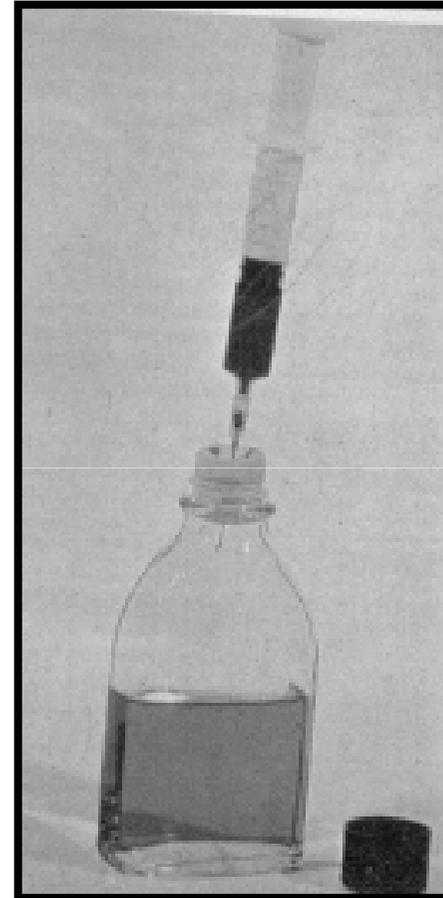
Esquema de Isolamento e Identificação



Coleta e transporte de espécimes clínicos



Soluções ou meios pré-reduzidos



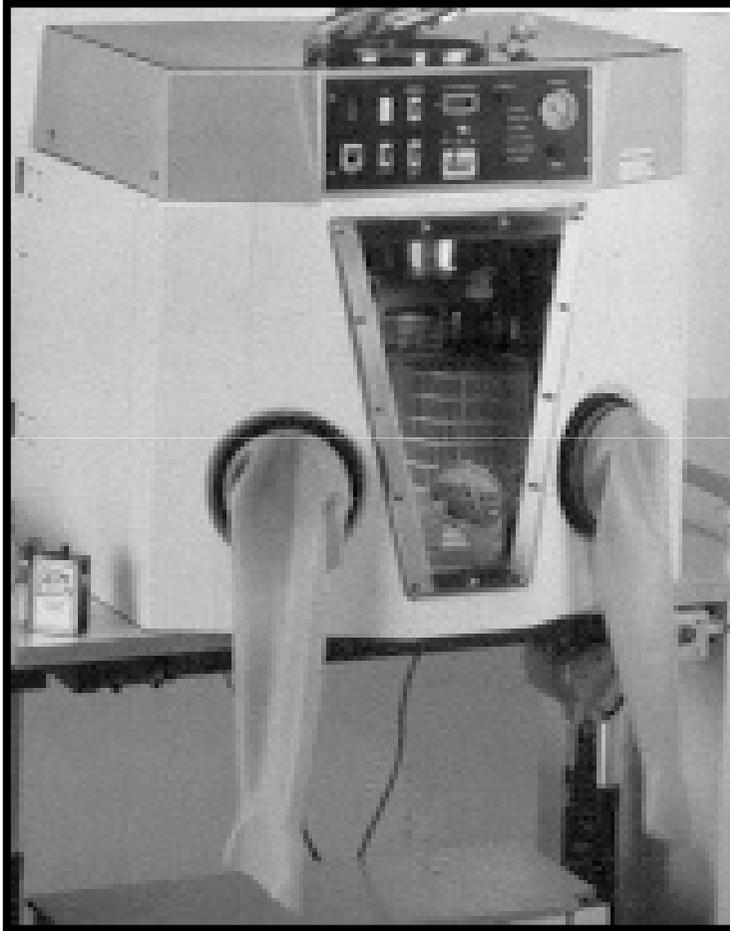
Hemocultura em meio PRAS

Coleta e transporte de espécimes em seringas

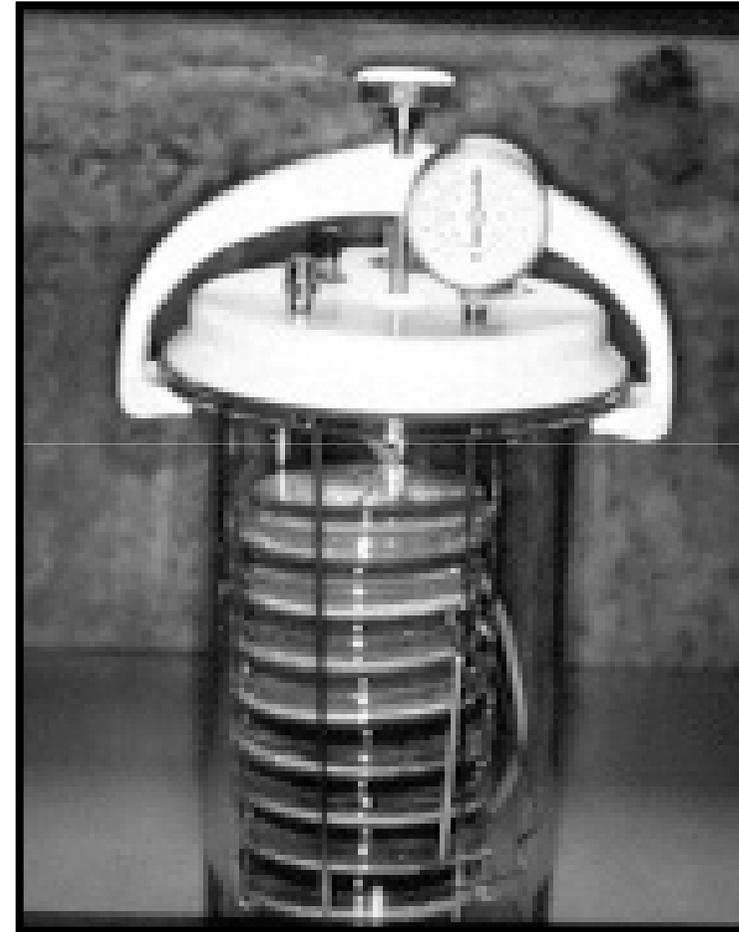


Para líquidos corporais, pus, sangue, etc.

Procedimento de incubação em anaeróbiose

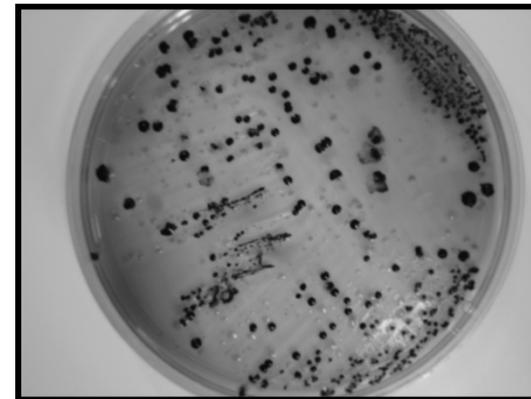
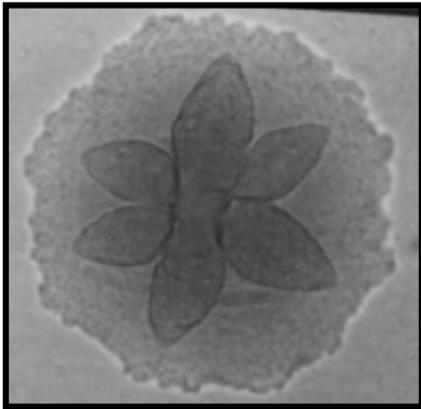
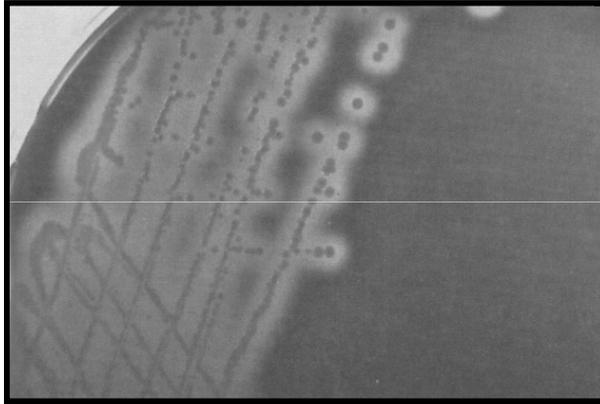


Câmara de Anaerobiose



Jarra de Anaerobiose ou GasPak

Identificação Presuntiva



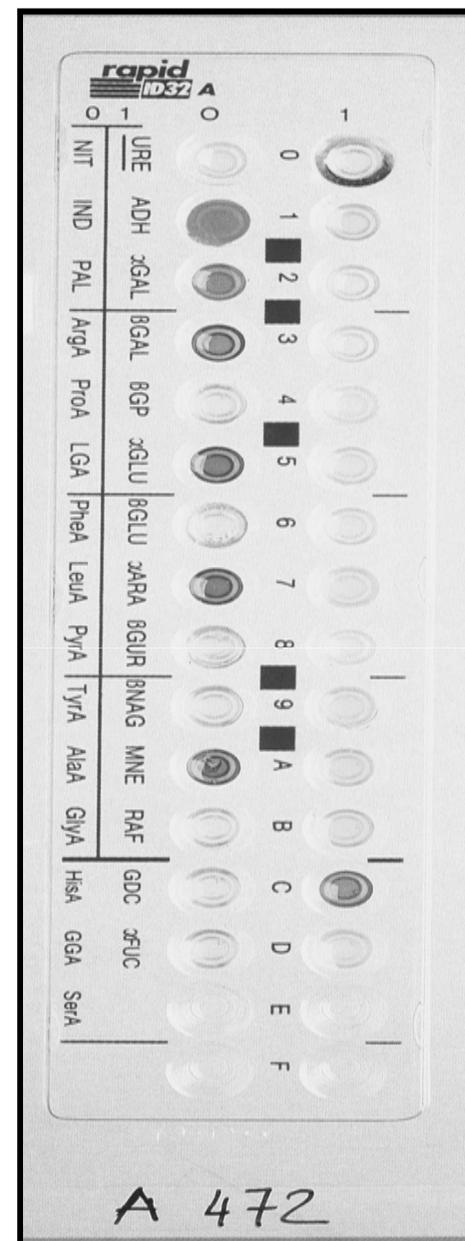
Laboratório de Anaeróbios

Identificação definitiva



Sistema Mini-API (bioMérieux)

Laboratório de Anaeróbios



Kit Rapid 32-A

Genética e Biologia molecular

✓ **Análise plasmídial**

✓ **Enzimas de restrição ou endonucleases:**

✓ **Sondas genéticas**

✓ **PCR**

Considerações Finais

- **A rotina laboratorial para anaeróbios é trabalhosa e de elevado custo;**
- **A maioria é exigente em termos atmosféricos e nutricionais;**
- **Fazem parte da microbiota residente humana e animal, e podem produzir infecções endógenas.**

<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>

Laboratório de Anaeróbios