DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laboratório de Anaeróbios

Introdução ao Diagnóstico Laboratorial

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

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

PAPEL DO LABORATÓRIO CLÍNICO: ISOLAMENTO

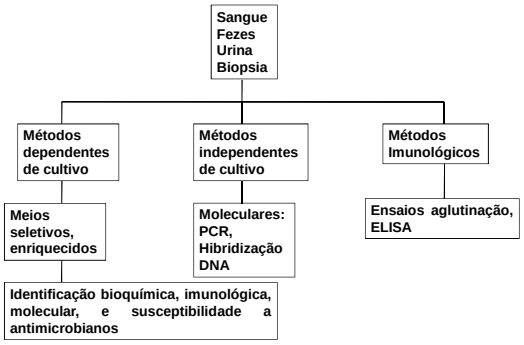
✔ Para que isolar microrganismos?

- Conhecer os diferentes tipos microbianos
- Informação microbiológica completa e rápida
- Identificação dos organismos
- Susceptibilidade a antimicrobianos

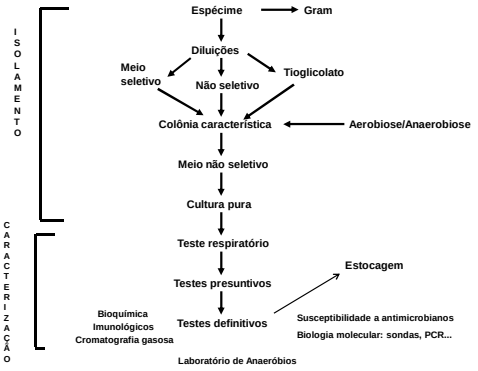
✓ Fatores que influenciam no isolamento

- Coleta do material, transporte livre de oxigênio, técnicas cuidadosas de laboratório.

Processamento de Amostras Clínicas

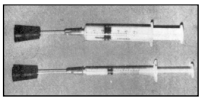


Esquema de Identificação

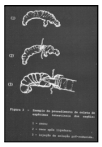


Coleta e transporte de espécimes clínicos

Coleta do duodeno

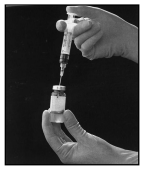


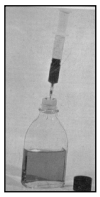
Coleta de abscessos

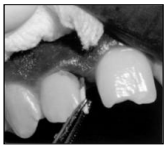


Alça intestinal

Coleta de material e transporte em meio pré-reduzido e agentes redutores

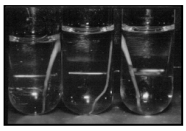






Periodontite

VMGAIII



Ringer-PRAS

Laboratório de Anaeróbios

Alguns Aditivos Usados Para Cultivo de Anaeróbios

Composto	Concentração	Bactéria
Amido	1 g/lt	Todas
Bicarbonato de Na	0,4 g/lt	Todas
Succinato de Na	0,5-2,5 g/lt	Todas
Piruvato de Na	1 g/lt	Todas
Cisteína	0,5 g/lt	*B. fragilis*, *F. necrophorum*
Tween 80	1 ml/lt	Não esporulado G +
Hemina	5-10 mg/lt	Bactéria p. p. negro
Menadiona	0,5-1 mg/lt	Bactéria p. p. negro
Arginina	1 g/lt	*Eubacterium* spp.
Piruvato	1 g/lt	*Veillonella* spp.
Pirofosfato	0,25 g/lt	*P. gingivalis*, *P. intermedia*

Laboratório de Anaeróbios

SUBSTÂNCIAS REDUTORAS MAIS UTILIZADAS

Agente	Concentração	Característica
Ác. tioglicólico	0,01 - 0,2%	Inibe alguns clostrídios. Gradualmente torna-se tóxico para alguns anaeróbios.
Glicose	0,5 - 1%	Bom redutor. Não tóxico.
Ác. ascórbico	0,1%	Inibe bacilos anaeróbios não esporulados.
Cisteína	0,05%	Alta concentração inibe crescimento. Serve como fator de crescimento. Ambiente neutro-alcalina oxida rapidamente.

Laboratório de Anaeróbios

Isolamento de Anaeróbios de Material Clínico

1. Considerações: Infecções mistas e natureza endógena.

2. Espécimes a serem pesquisadas :

- Lesões associadas ao trato gastrintestinal ou genital feminino.

- Infecções crônicas do trato respiratório superior (sinusites, otite média).

- Lesão supurativa do trato respiratório inferior (pneumonia).

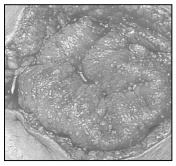
- Meningites associadas a infecções crônicas do trato respiratório superior (fluido cérebro-espinal).

- Abscessos superficiais e profundos (cerebral).

- Septicemia e Infecções dentais.

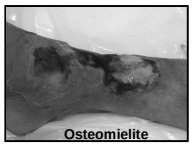
- Lesões por queimaduras e mordidas.

Laboratório de Anaeróbios

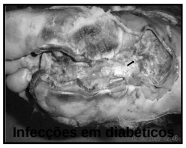


Peritonite produzida por *B. fragilis*

Celulite por *B. fragilis*



Osteomielite



Infecções em diabéticos

Laboratório de Anaeróbios

Que organismos anaeróbios precisam ser identificados?

- Espécies do grupo *B. fragilis:* pela virulência e resistência a antimicrobianos;
- *C. septicum:* associado a infecções gastrintestinais;
- *C. ramosum, C. innocuum, C. clostridioforme:* resistência a antimicrobianos;
- *C. perfringens:* infecções intestinais sérias;
- Cocos anaeróbios: resistência ao metronidazol e clindamicina;
- *Fusobacterium:* virulência e resistência à penicilina e clindamicina.

Laboratório de Anaeróbios

PROCESSAMENTO LABORATORIAL

1. AMOSTRAS: Odor fétido; Fluorescência UV ; Gram.
2. CULTIVO: Meios ricos e seletivos frescos, enriquecidos com vitaminas, succinato, cisteína, piruvato, ou outros agentes redutores.

✓ Hemoculturas: 10-15 ml de sangue para 75-100 ml de meio: turbidez, gás, subcultivo em ágar sangue.

3. INCUBAÇÃO: 48-72 horas, até 5 -15 dias.
4. IDENTIFICAÇÃO: Presuntiva e Definitiva

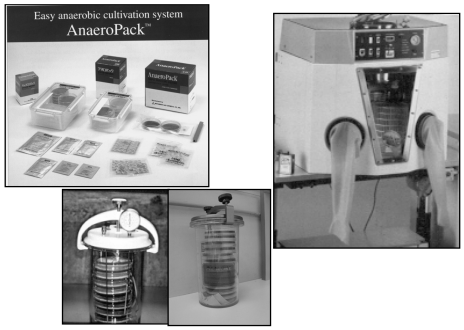
Laboratório de Anaeróbios

Processamento laboratorial

Mistura Gasosa
(90% N_2/10% CO_2)

Laboratório de Anaeróbios

Sistemas de Anaerobiose



Laboratório de Anaeróbios

Testes Presuntivos

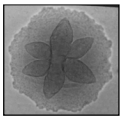
✓ Morfologia colonial
✓ Coloração de Gram: morfologia celular
✓ Pigmentação natural ou à luz UV

Testes definitivos

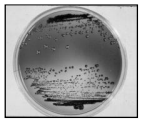
✓ Aspectos bioquímicos e Fisiológicos
✓ Imunológicos
✓ Cromatografia gasosa
✓ Susceptibilidade a drogas antimicrobianas
✓ Biologia molecular: sondas, PCR, sequenciamento

Laboratório de Anaeróbios

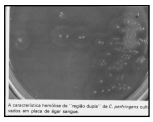
Isolamento e identificação bacteriana



Aggregatibacter actinomycetemcomitans



Porphyromonas gingivalis



Dupla hemólise de *C. perfringens*

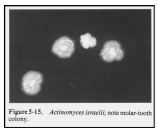
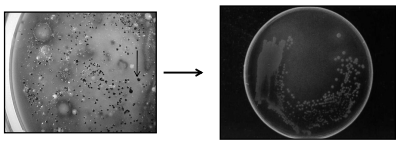


Figure 5-15. *Actinomyces israelii*; note molar-tooth colony.

Laboratório de Anaeróbios

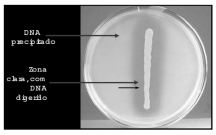
Ágar *Bacteroides* bile esculina

Ágar Cicloserina-Cefoxitina-Frutose



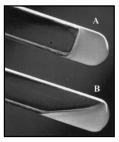
Laboratório de Anaeróbios

Outras Provas

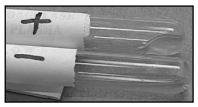


Prova da DNase

Prova da urease



Prova da gelatinase



Prova da coagulase

Laboratório de Anaeróbios

Princípios básicos usados nos métodos fenotípicos e sistemas de identificação bacteriana

- Turbidez como indicador de desenvolvimento;
- Determinação colorimétrica na identificação de microrganismos;
- Detecção do crescimento microbiano por medição de metabólitos voláteis (ácidos graxos).

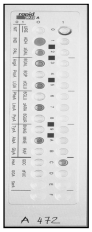
Laboratório de Anaeróbios

Sistemas comerciais de identificação

- API-ZYM (bioMerieux-Vitek);
- API NA-Ident (bioMerieux-Vitek);
- IDS Rap Id-Anall (Innovative Diagnostic System);
- Vitek Anaerobe Identification (ANI) Card (bioMerieux-Vitek);
- Micro Scan Rapid Anaerobe Identification System (Baxter Microscan);
- ATB 32 A Anaerobes ID (bioMerieux-Vitek);
- Rapid ID 32 A (bioMerieux)

Laboratório de Anaeróbios

Métodos automatizados de identificação



Laboratório de Anaeróbios

Sistemas Automatizados para Hemoculturas

Bactec (Becton-Dickinson)

Hemobac (Probac)

Laboratório de Anaeróbios

Benefícios da Automação

- *Paciente*: resultados mais rápidos, redução de internação em hospital, possibilidade de terapia específica;
- *Laboratório de Microbiologia*: padronização e exatidão dos resultados, identificação de espécies raras ou difíceis;
- *Serviço de Controle de Infecção Hospitalar*: geração de relatórios e estatísticas atualizados e padronizados, monitoração de doenças hospitalares e de cepas multi-resistentes.

Laboratório de Anaeróbios

Desvantagens da Automação

- Custo muito elevado tanto dos sistemas miniaturizados como das técnicas de biologia molecular;

- Profissionais treinados e experientes;

- Biologia Molecular – detecta microrganismo (viável ou não), mas não determina o antibiograma.

Laboratório de Anaeróbios

Métodos imunológicos ou imunodiagnóstico

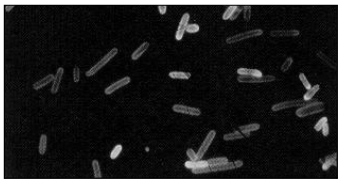
- Imunofluorescência direta e indireta;

- Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA): direto e indireto;

- Imunoaglutinação

Laboratório de Anaeróbios

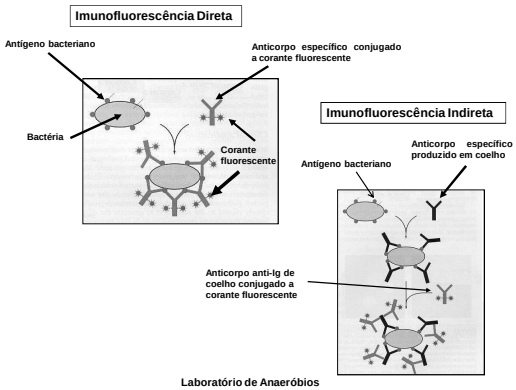
Imunofluorescência



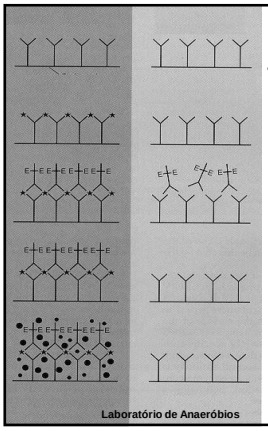
✔*Clostridium septicum* tratados com Ac conjugado com fluoresceína (verde).

✔*Clostridium chauveii* tratado com Ac conjugado com rodamina B (vermelho).

Laboratório de Anaeróbios



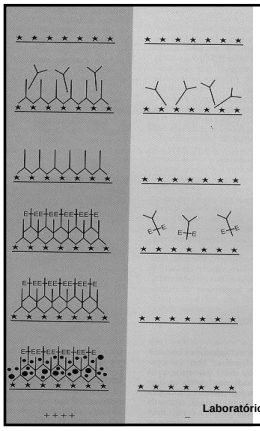
Laboratório de Anaeróbios



Elisa Direto

- Anticorpos específicos ligados a superfície do poço da microplaca
- Adicione amostra problema. Lave para remover Ag não ligado
- Adicione anticorpo específico. conjugado à enzima.
- Lave com tampão
- Adicione o substrato para a enzima.
- Meça a quantidade de produto formado (corado).

Laboratório de Anaeróbios

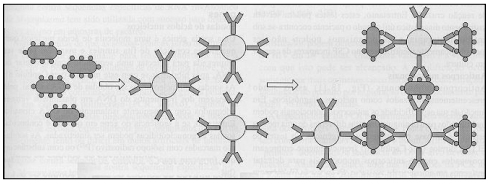


Elisa Indireto

- cubra a microplaca com a preparação do Antígeno
- Adicione amostra de soro do paciente
- Lave com tampão
- Adicione Anticorpos anti-IgG humano, conjugado à enzima
- Lave com tampão
- Adicione o substrato para a enzima. Meça a quantidade de produto corado formado.

Laboratório de Anaeróbios

Imunoaglutinação do látex



Bactérias na amostra exibindo Ag de superfície

Anticorpos específicos ligados a partículas inertes

Aglutinação das partículas, devido a interação antígeno-anticorpo

Questões para estudo

1. Por quê é necessário o isolamento de bactérias anaeróbias de processos infecciosos endógenos?

2. Quais substâncias estimulam o crescimento de anaeróbios?

3. Quais as condições de transporte do material clínico para isolamento de anaeróbios?

4. Em que casos é necessário a utilização de métodos dependentes de cultivo para a identificação de anaeróbios