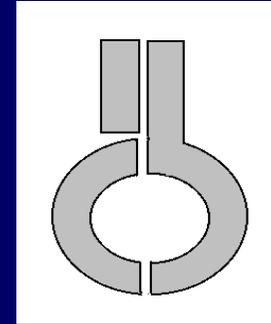




**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS**



**MÉTODOS DE ISOLAMENTO E
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
ANAERÓBIAS**

Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

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

ISOLAMENTO DE ANAERÓBIOS

✓ Para que isolar anaeróbios?

- 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.

Materiais Clínicos a Pesquisar Anaeróbios

- Lesões associadas ao trato gastrintestinal ou genital feminino;
- Septicemia;
- 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;
- Infecções dentais;
- Lesões por queimaduras e mordidas.

Coleta dos espécimes

- A coleta deve ser realizada assepticamente e processada no máximo de 2-4 horas;
- Os espécimes devem ser mantidos em meios de transporte reduzidos;
- Nunca armazenar amostras clínicas para análise de anaeróbios refrigeradas;
- No caso de amostras fecais e feridas coletar em profundidade.

PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANAERÓBIOS

1. AMOSTRAS: Odor fétido; Fluorescência UV; Gram.

2. CULTIVO: Meios ricos e seletivos, suplementados com vitaminas, succinato, cisteína, piruvato, ou outros agentes redutores.

Hemoculturas: 10-15 ml de sangue para 75-100 ml de meio: turbidez, odor, gás.

3. INCUBAÇÃO: 48-72 horas até 5 -15 dias.

4. IDENTIFICAÇÃO: Presuntiva e Definitiva

Indícios clínicos de infecção por anaeróbios

- » Infecções próximas às mucosas de revestimento;
- » Secreção com gás e odor pútrido;
- » Tecido necrótico, gangrena, formação de pseudomembrana;
- » Endocardites com hemocultura negativo;
- » Infecções associadas ao uso de aminoglicosídeos;
- » Quadro de bacteremia com icterícia;
- » Infecções após mordidas humanas ou animais;
- » Secreção escura e fluorescentes sob UV;
- » Condições clínicas: aborto séptico, infecção após cirurgia gastrointestinal, abscessos.

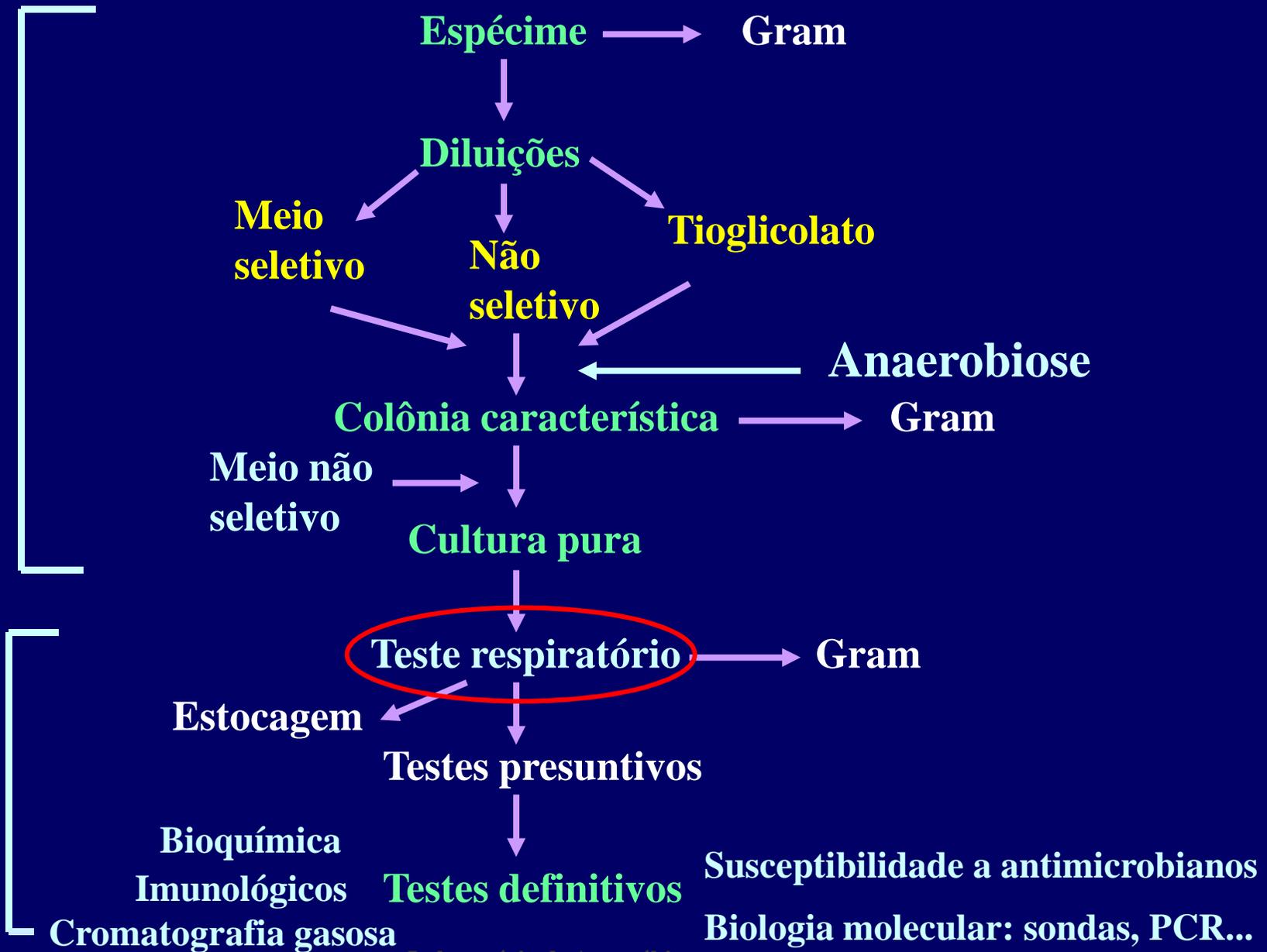
Indícios bacteriológicos de infecção por anaeróbios

- » Morfologia singular na coloração de Gram;
- » Nenhum crescimento em cultura rotineira;
- » Vestígio de crescimento em aerobiose;
- » Crescimento em 100 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina ou neomicina, ou 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina;
- » Cultura com produção de gás e/ou odor pútrido;
- » Colônias fluorescentes sob UV, ex. *P. melaninogenica*, *F. nucleatum*;

Esquema de isolamento e identificação

I
S
O
L
A
M
E
N
T
O

C
A
R
A
C
T
E
R
I.



MÉTODOS DE COLETAS E TRANSPORTE DE ESPÉCIMES CLÍNICOS

DIFICULDADES NO ESTUDO DA MICROBIOTA ANAERÓBIA

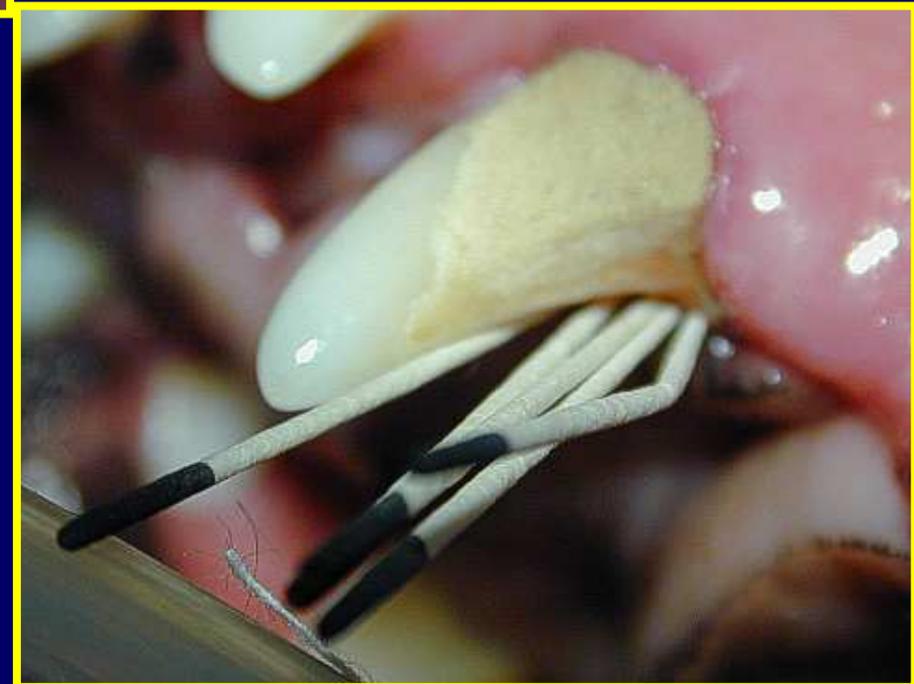
- ✓ **Técnicas de coleta, transporte e processamento;**
- ✓ **Volume do espécime;**
- ✓ **Diluyente e homogeneização do espécime;**
- ✓ **Meios seletivos e não seletivos, suplementos;**
- ✓ **Microbiota associada à mucosa;**
- ✓ **Variações da dieta, e variação dia a dia da amostragem;**
- ✓ **Interferência de Antimicrobianos.**



sondagem

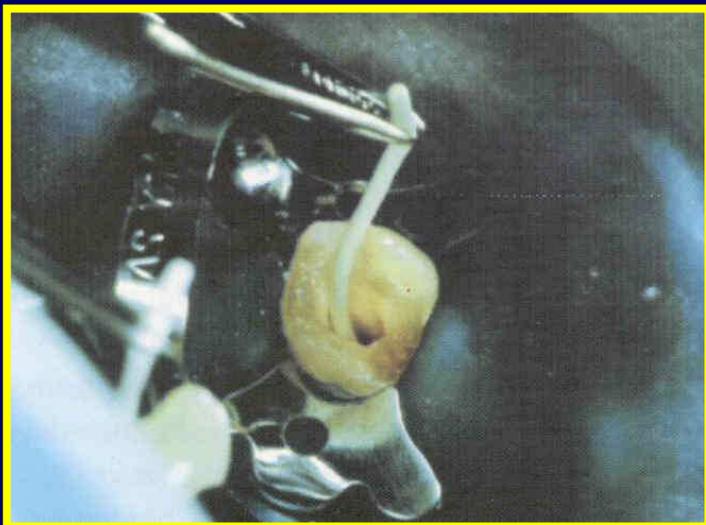
coleta

**Coleta em cães com
doença periodontal**

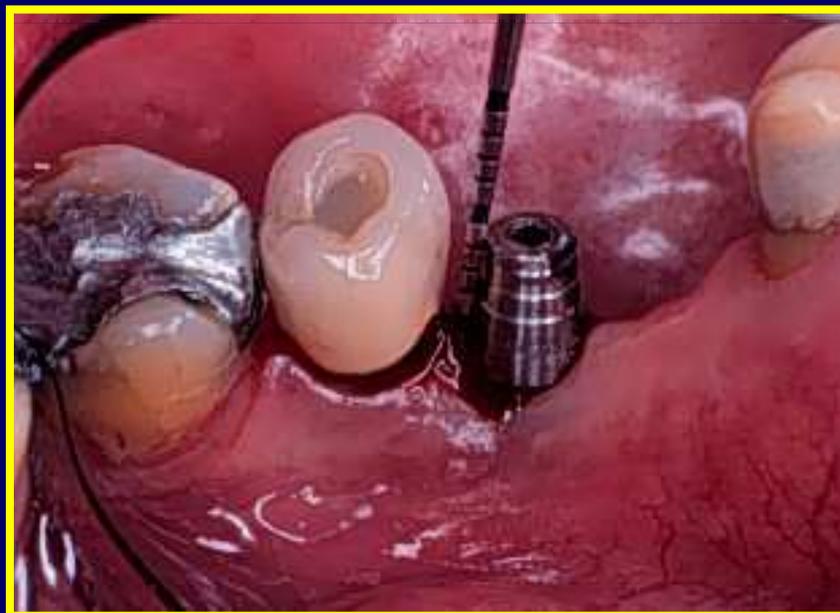
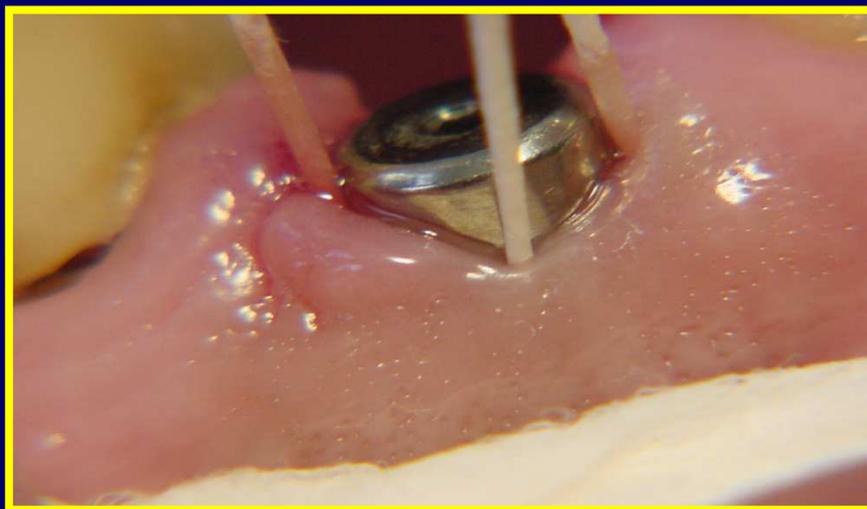




Coleta de lesão periodontal



**Coleta de polpa
necrótica e tecido
periimplantar.**



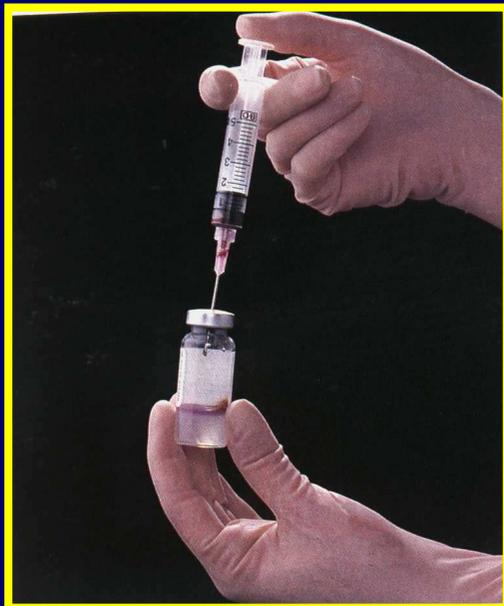
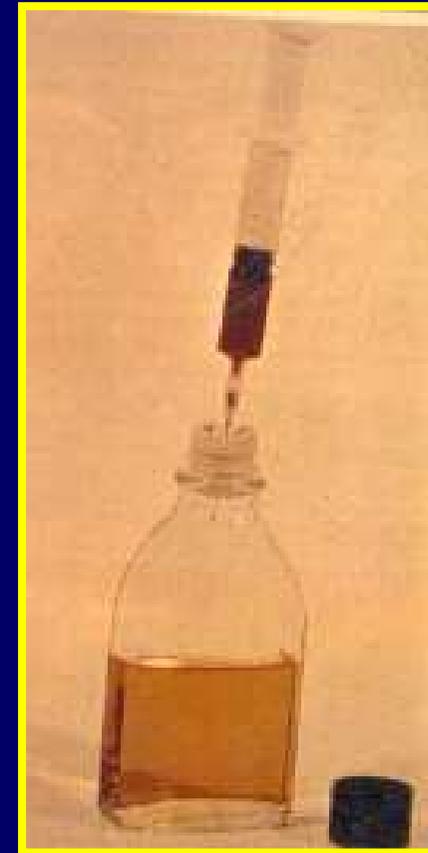
Coleta de Material Clínico

Espécime clínico do duodeno



Espécimes de alça intestinal





Coleta e transporte de espécimes clínicos

Qual a coleta mais adequada?



Transporte de Material Clínico



Mini-jarra (Técnica do bombril com CuSO_4)



Solução Ringer-PRAS



Meio VMGA III



Soluções e meios pré-reduzidos

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ANAEROBIOSE

1. SUBSTÂNCIAS REDUTORAS

- Placas de Brewer
- Absorção pelo Pirogalol
- Jarras com catalizadores de H₂ - Paladium (Gaspak)

2. CONSUMO BIOLÓGICO DO OXIGÊNIO LIVRE

- Técnica de Fortner

3. PROCESSO MECÂNICO DE MISTURA DE GASES

- 90% N₂ + 10% CO₂; 5% H₂ + 85% N₂ + 10% CO₂

4. ESTUFAS E CÂMARAS DE ANAEROBIOSE

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ANAEROBIOSE



Jarra de Anaerobiose



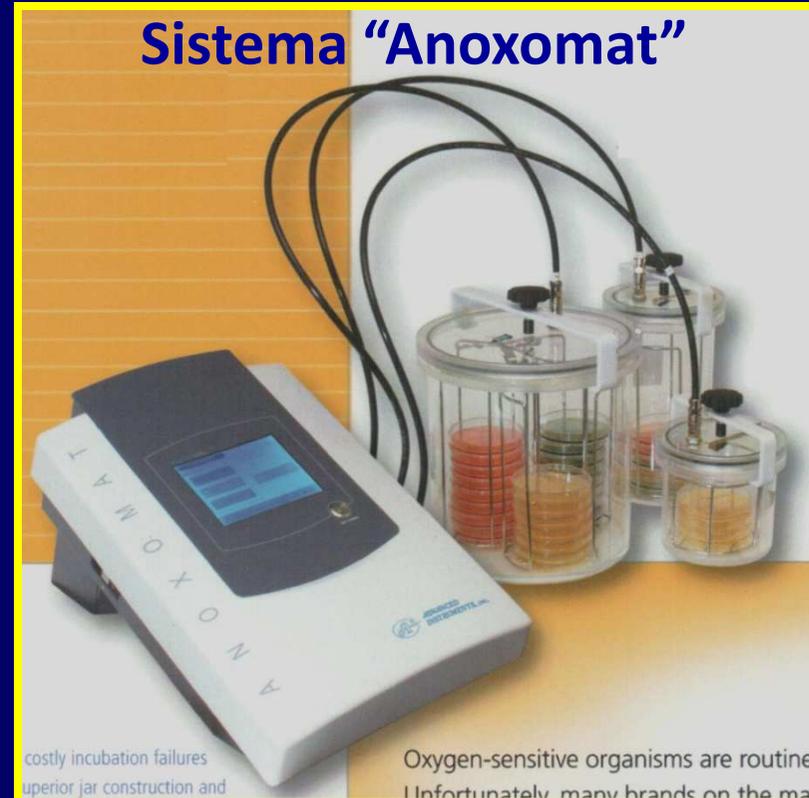
MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ANAEROBIOSE



Câmara de Anaerobiose

Laboratório de Anaeróbios

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ANAEROBIOSE



Processo mecânico: com mistura gasosa (90% N₂ /10% CO₂)

Isolamento e Identificação

Sucesso no isolamento laboratorial

- **Conhecimento da microbiota envolvida**
- **Meios de cultivo: Seletivos, ricos e suplementados**
- **Substâncias inibidoras: antibióticos, sais biliares, corantes.**
- **Substâncias incentivadoras de crescimento: vitaminas, hemina, lactato, glicose.**
- **Atmosfera e temperatura adequadas**
- **Tempo de incubação adequado**
- **Conhecimento das características morfológicas e fisiológicas.**

Aditivos usados nos meios de cultivo para anaeróbios

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

Substâncias redutoras mais utilizadas em meios de cultura

Agente	Concentração	Características
Ác. tioglicólico	0,01 - 0,2%	<ul style="list-style-type: none">- Inibe alguns clostrídios- Torna-se tóxico para alguns anaeróbios.
Glicose	0,5 - 1%	<ul style="list-style-type: none">- Bom redutor e não tóxico
Ác. ascórbico	0,1%	<ul style="list-style-type: none">- Inibe alguns bacilos não esporulados.
Cisteína	0,05%	<ul style="list-style-type: none">- Alta concentração inibe o crescimento.- Bom fator de crescimento.

Substâncias redutoras têm o poder de ganhar ou receber elétrons, fazendo com que o meio de cultura fique isento de oxigênio!!

Alguns meios de cultivo

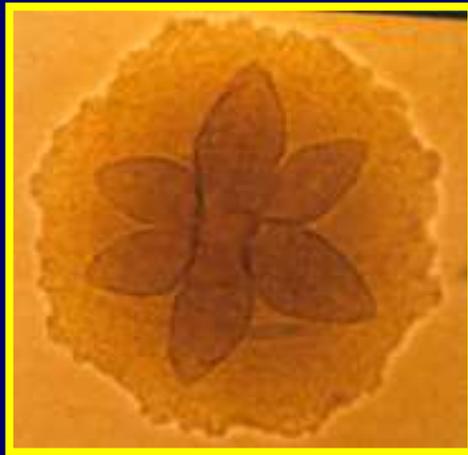
- **BBE:** *Bacteroides fragilis*
- **CCFA - cicloserina, cefoxitina, frutose, ágar. :** *Clostridium difficile*
- **Ágar sangue com canamicina:** *Porphyromonas e Prevotella*
- **Ágar Omata & Disraely:** *Fusobacterium nucleatum*
- **Ágar TSBV:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- **Caldo tioglicolato:** alguns anaeróbios menos exigentes

Testes presuntivos

- **Morfologia colonial**
- **Coloração de Gram**
- **Catalase**
- **Fluorescência**
- **Hidrólise esculina**
- **Hidrólise de amido**
- **Produção de gás e SIM**

TESTES PRESUNTIVOS

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

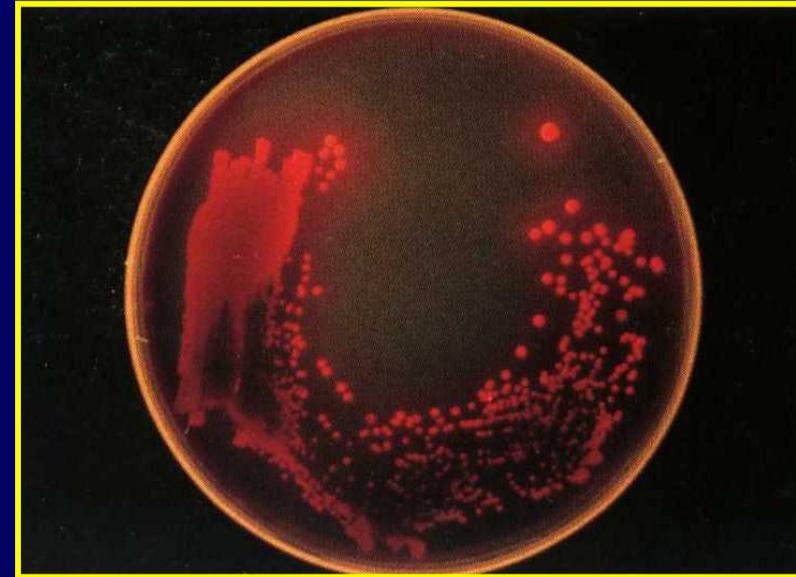


Fusobacterium nucleatum



TESTES PRESUNTIVOS

Porphyromonas spp. e *Prevotella* spp.



Cultura pura de bactérias produtoras de pigmento negro

TESTES PRESUNTIVOS



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



Aparência característica de "migalha de pão" e local de crescimento de *A. israelii* em meio fluido tioglicolato.



Colônia "parecida com aranha" de *A. israelii*. Esta microscopia direta, de baixa potência, de colônia crescendo na superfície ágar, mostra o emaranhado de filamentos delicadamente ramificados, irradiando de um ponto central mal definido.

Actinomyces israelii

TESTES PRESUNTIVOS



Bacteroides fragilis

Clostridium perfringens: Dupla hemólise



A característica hemólise de "região dupla" de *C. perfringens* cultivados em placa de ágar sangue.



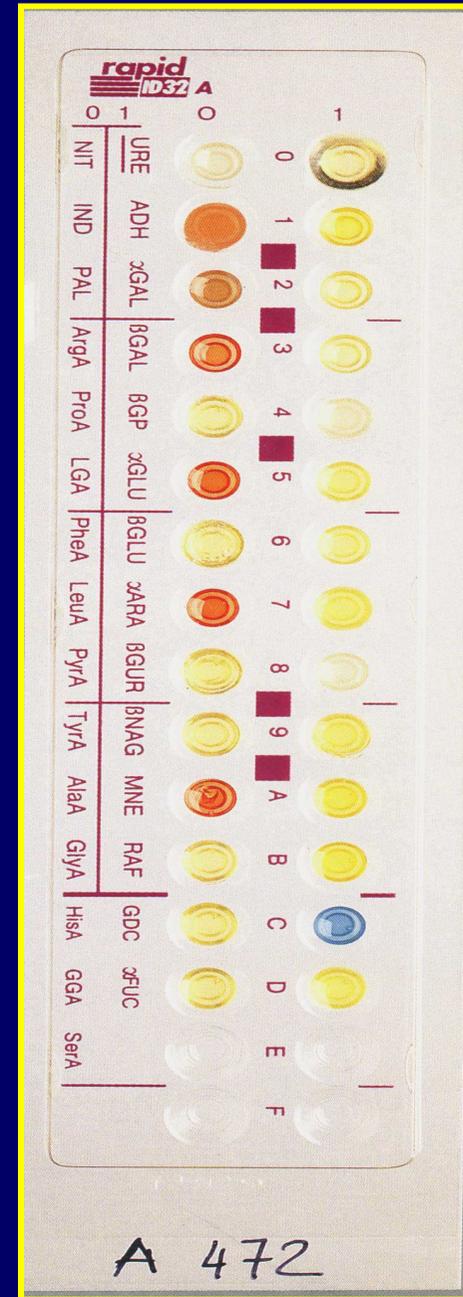
Clostridium difficile: CCFA - cicloserina, cefoxitina, frutose, ágar.

TESTES DEFINITIVOS

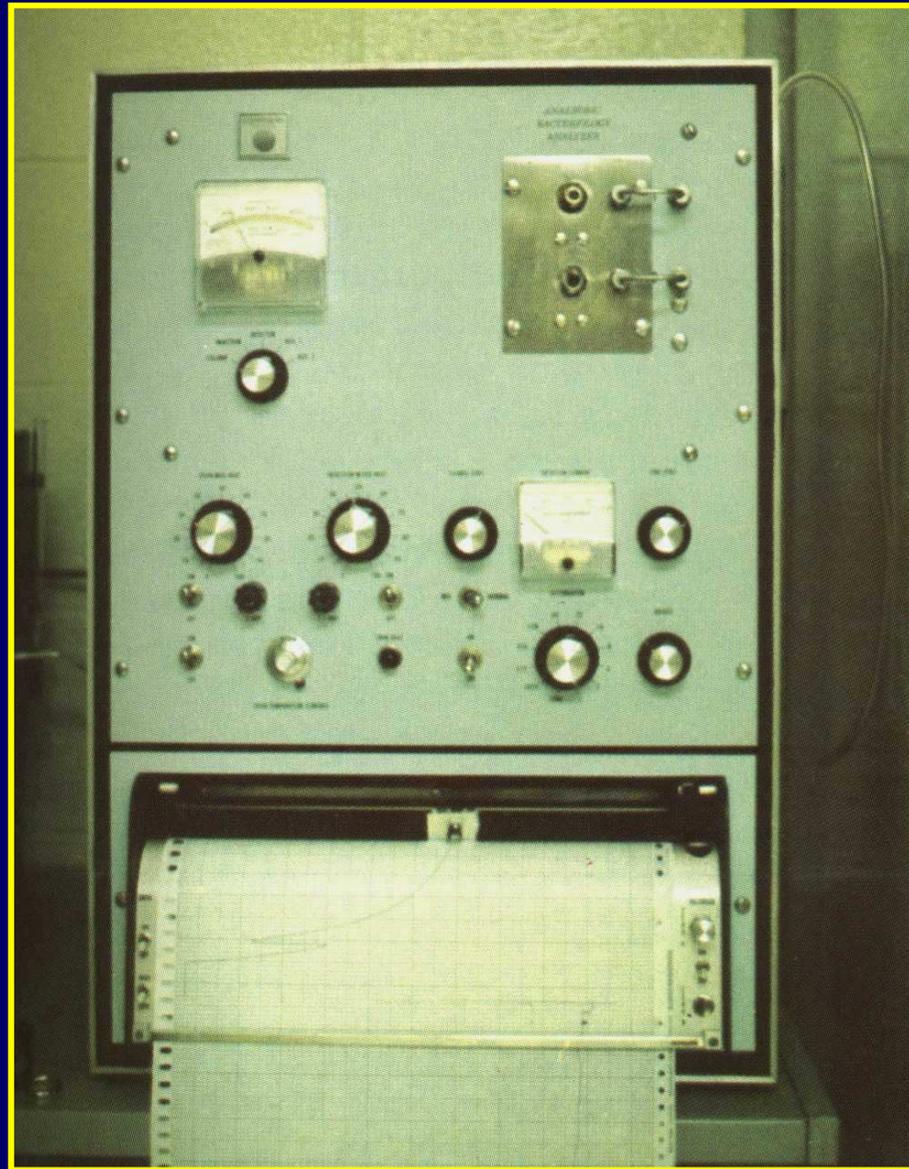
- ✓ Aspectos bioquímicos e Fisiológicos
- ✓ Imunológicos
- ✓ Cromatografia gasosa
- ✓ Biologia molecular: sondas, PCR, sequenciamento
- ✓ Susceptibilidade às drogas antimicrobianas



Sistema Mini-API 32-A (bioMérieux)



Cromatógrafo gasoso



Considerações finais

- ✓ Grupo importante e predominante em ecossistemas humanos, animais e ambientais;
- ✓ Propicia equilíbrio e manutenção de ecossistemas: versatilidade metabólica e adaptabilidade fisiológica;
- ✓ Não recebe a importância clínica necessária;
- ✓ Poucos são os grupos que estudam esses organismos: aspectos fenotípicos e genotípicos.