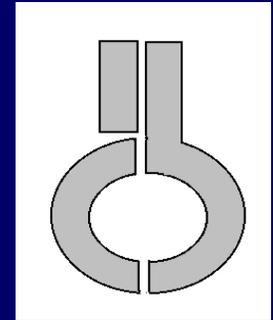




**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS**



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

**Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos
Homepage: 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

Isolamento de Anaeróbios - Espécimes a serem pesquisados

- Lesões associadas ao trato gastrointestinal ou 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.

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, suplementados**
- ✓ **Microbiota associada à mucosa**
- ✓ **Variações da dieta, e variação dia a dia da amostragem**
- ✓ **Interferência de Antimicrobianos.**

Indícios clínicos de infecção por anaeróbios

- » **Secreção de odor pútrido**
- » **Infecção na proximidade de mucosa de revestimento.**
- » **Tecido necrótico, gangrena, formação de pseudomembrana.**
- » **Gás nos tecidos ou na secreção.**
- » **Endocardites com hemocultura negativo.**
- » **Infecções devidas ao uso de aminoglicosídeos**
- » **Quadro de bacteremia com icterícia.**
- » **Infecções após mordidas humanas ou animais.**
- » **Secreção escura e fluorescentes na UV**
- » **Condições clínicas tais como aborto séptico, infecção após cirurgia gastro-intestinal, etc.**

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 (*P. melaninogenica*, *F. nucleatum*)

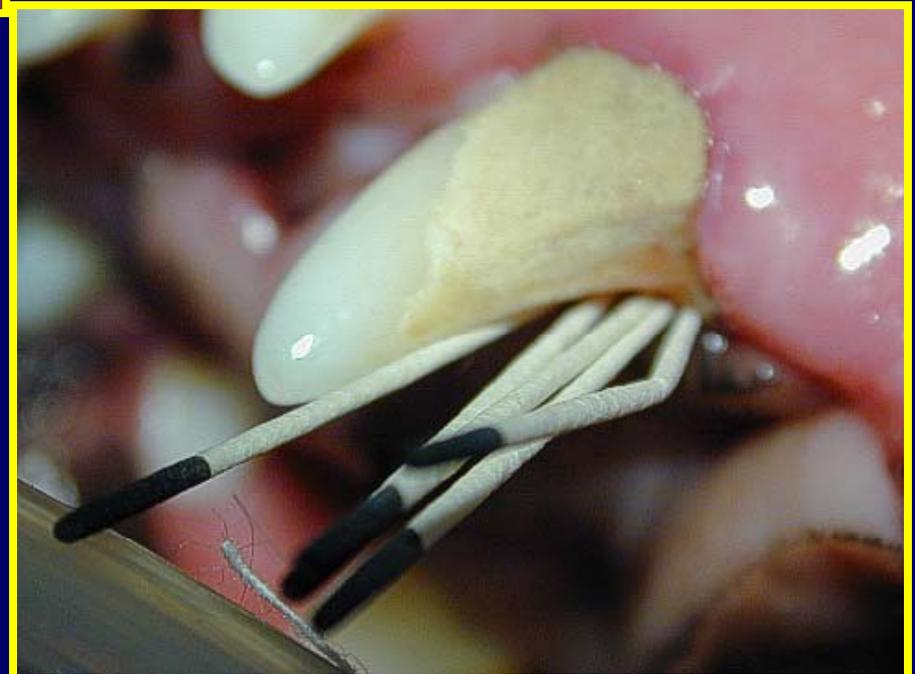
**MÉTODOS DE COLETAS E
TRANSPORTE DE
ESPÉCIMES CLÍNICOS**



sondagem

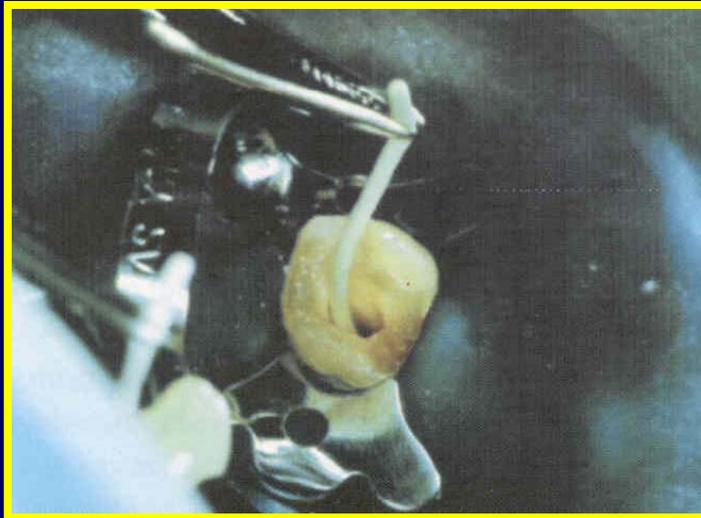
coleta

**Coleta em cães com
doença periodontal**

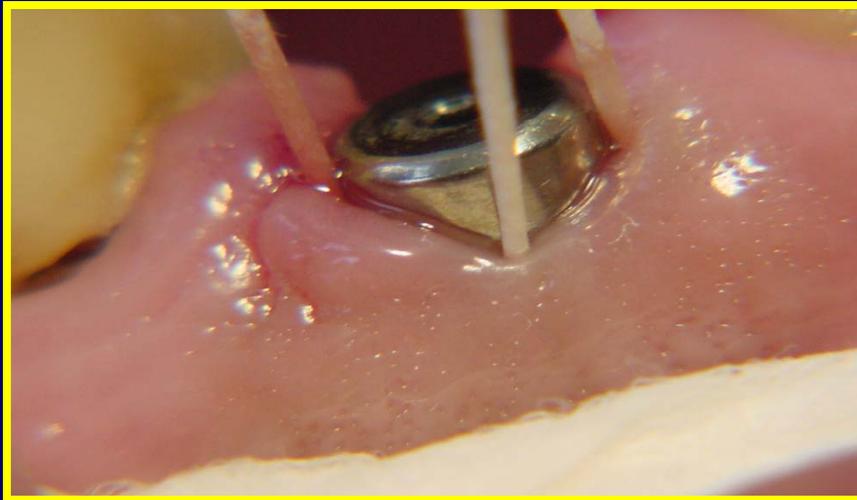




**Coleta de lesão
periodontal**



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



Espécime clínico do duodeno



Espécimes de alça intestinal





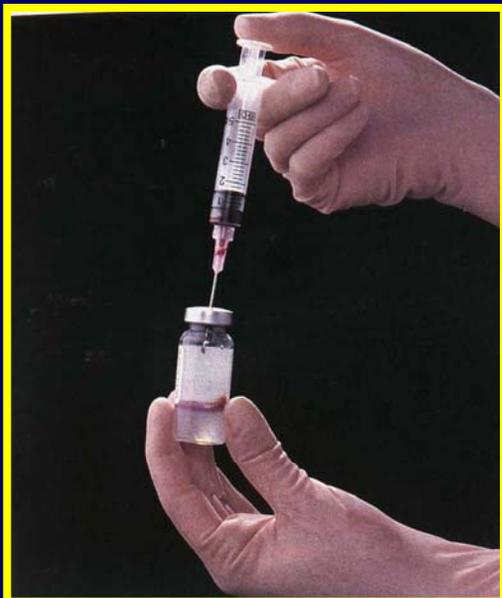
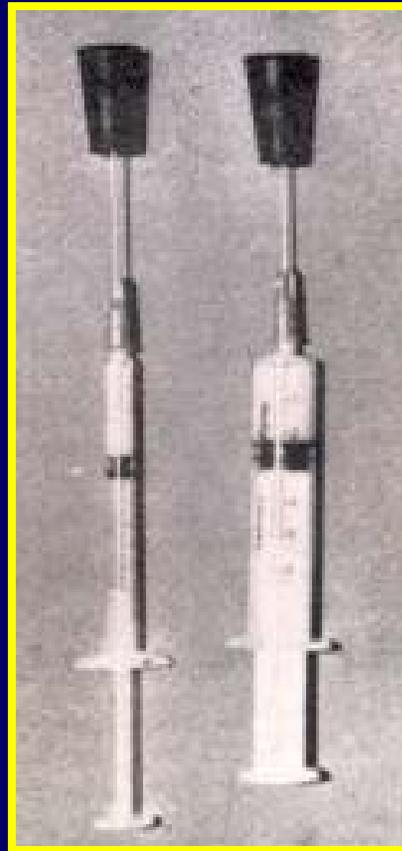
Mini-jarra (Técnica do bombril com CuSO_4)



Solução Ringer-PRAS



Meio VMGA III



**Coleta e transporte de
espécimes clínicos**

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ANAEROBIOSE

1. SUBSTÂNCIAS REDUTORAS

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

2. CONSUMO BIOLÓGICO DO OXIGÊNIO LIVRE

- Técnica de Fortner

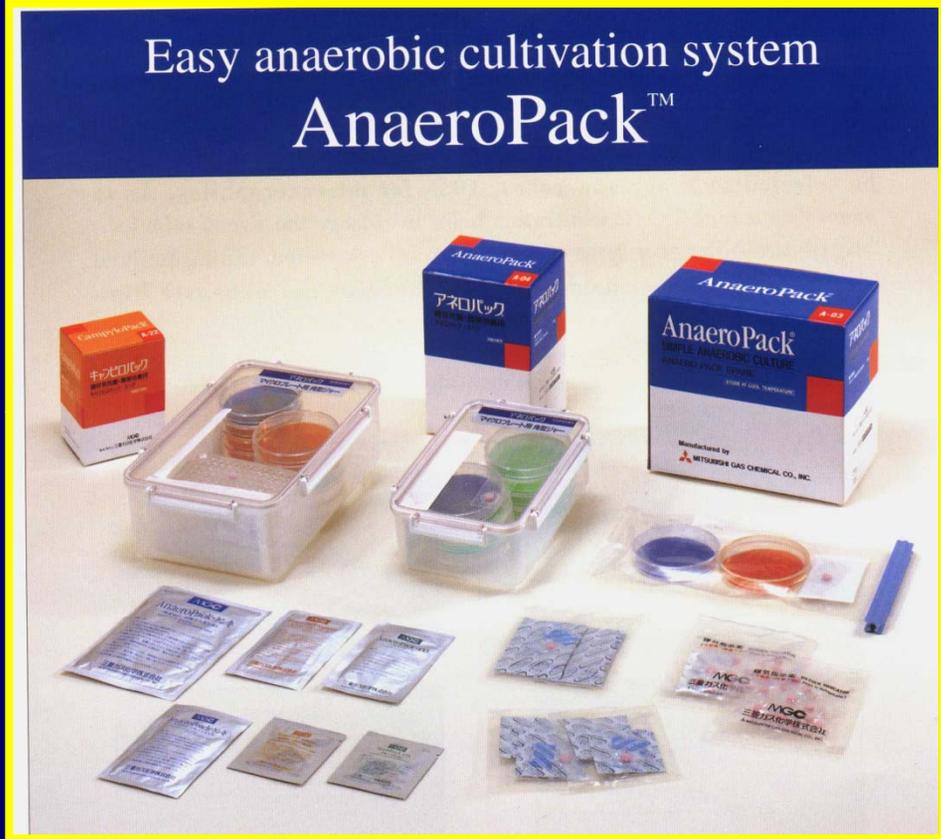
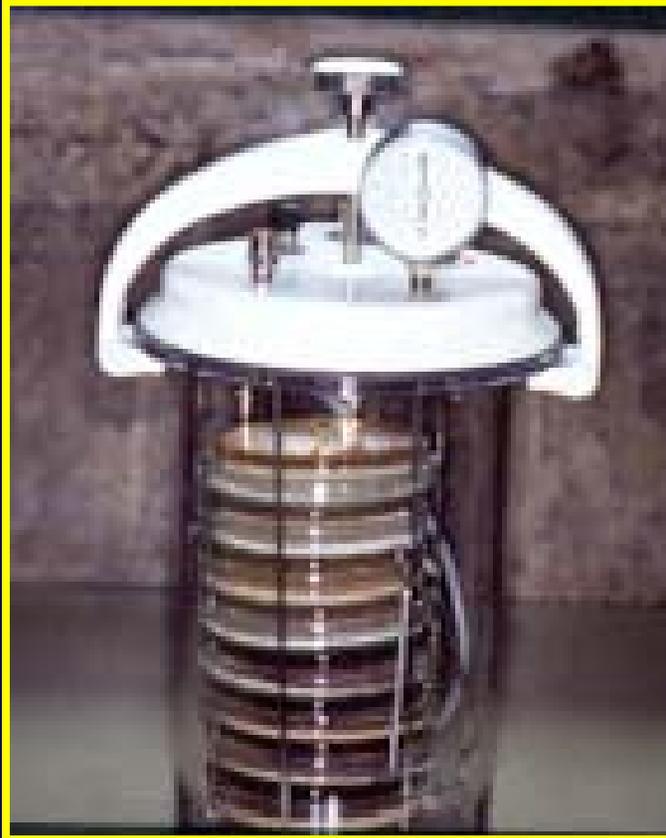
3. PROCESSO MECÂNICO DE MISTURA DE GASES

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

4. ESTUFAS E CÂMARAS DE ANAEROBIOSE

**Processo
mecânico de
obtenção de
anaerobiose por
mistura gasosa
(90% N₂ /10% CO₂)**





Jarra de Anaerobiose



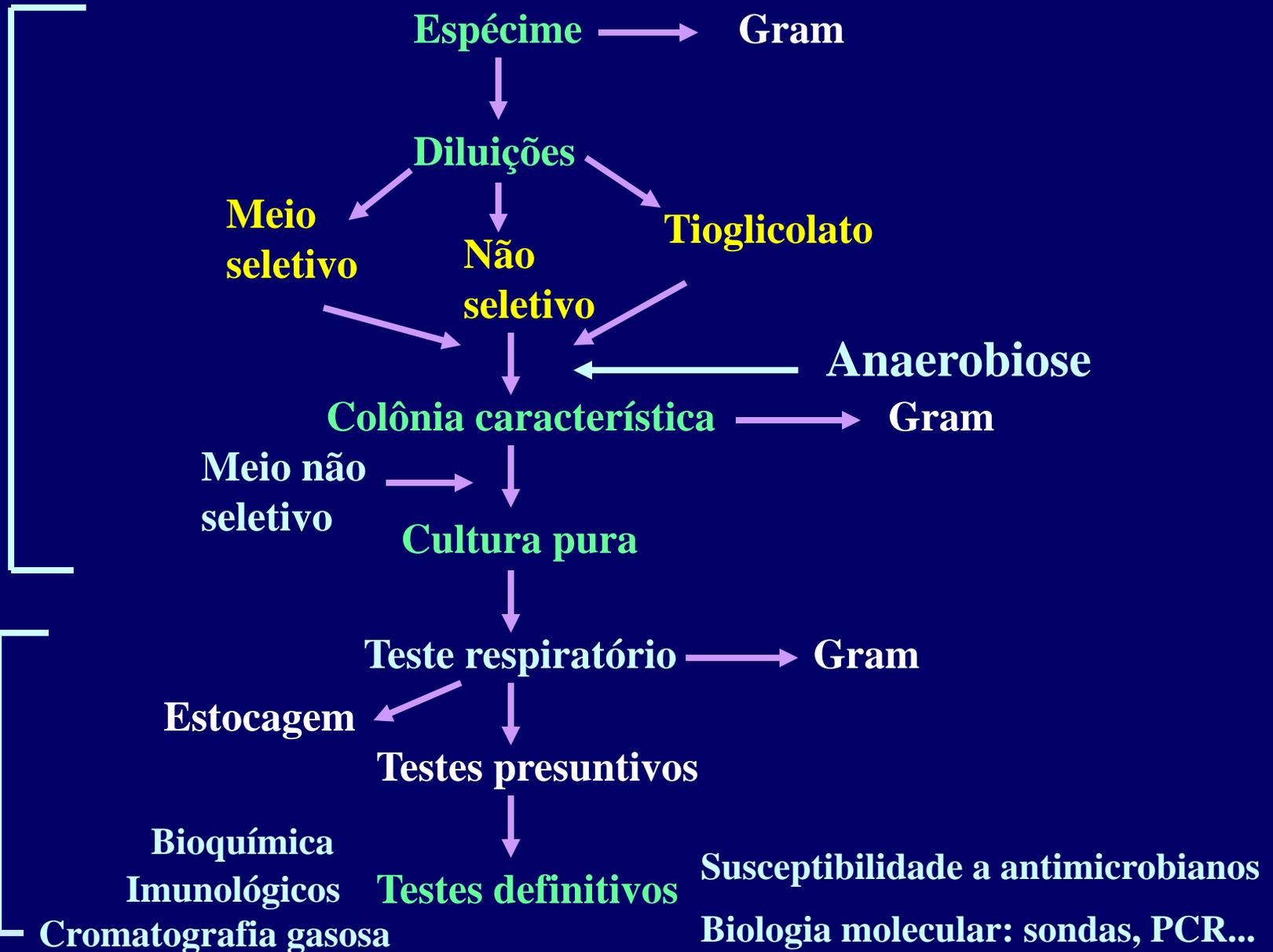
Câmara de Anaerobiose

Isolamento e Identificação

Esquema de isolamento e identificação

I
S
O
L
A
M
E
N
T
O

C
A
R
A
C
T
E
R
I
L



Isolamento e meios de cultivo

Prevotella
Porphyromonas

Fusobacterium

Bacteroides

Meios
seletivos

Ágar sangue com
canamicina

Omata-Disraely

BBE

Período de
incubação

7-14 dias

3-5 dias

3-5 dias

Tempo de
exposição
ao ambiente

1 hora

3 horas

72 horas

Identificação Bacteriana Presuntiva

Prevotella
Porphyromonas

Fusobacterium

Bacteroides

Gram

Gram

Gram

Testes
presuntivos

Fluorescência

Hidrólise esculina

Hidrólise esculina

Hidrólise amido e
esculina

SIM

Produção de gás

SIM

SIM

Testes
definitivos

Fermentação de
açúcares

Fermentação de
açúcares

Fermentação de
açúcares

Kits comerciais

Kits comerciais

Kits comerciais

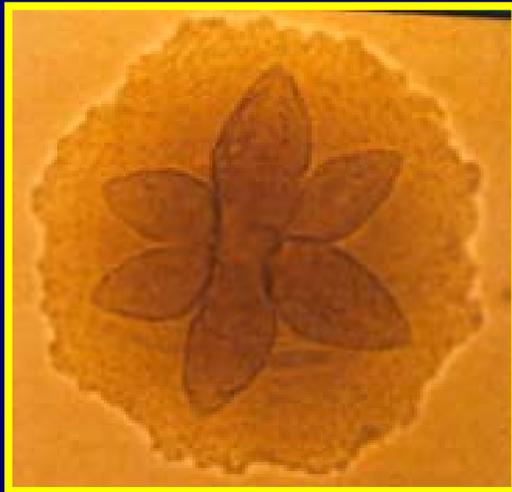
Testes moleculares

Testes moleculares

Testes moleculares

TESTES PRESUNTIVOS

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

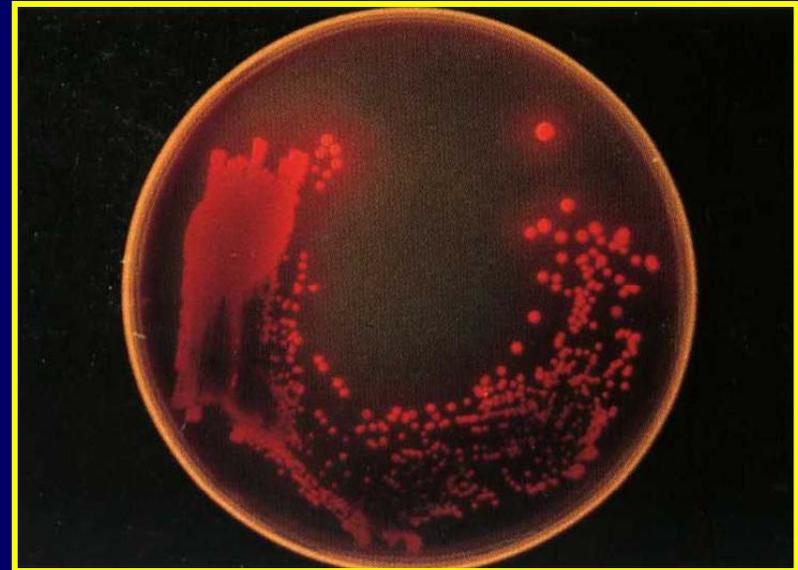


B. fragilis

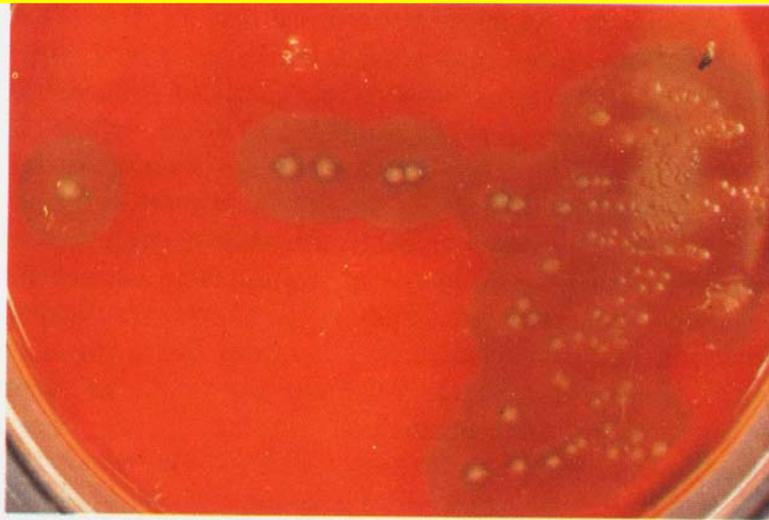


F. nucleatum





Cultura pura de bactérias produtoras de pigmento negro



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

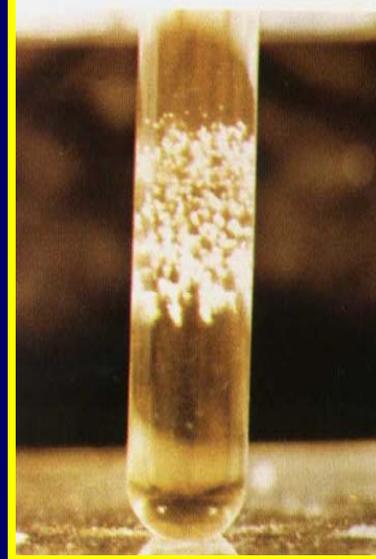
***C. Perfringens* :**
Dupla hemólise



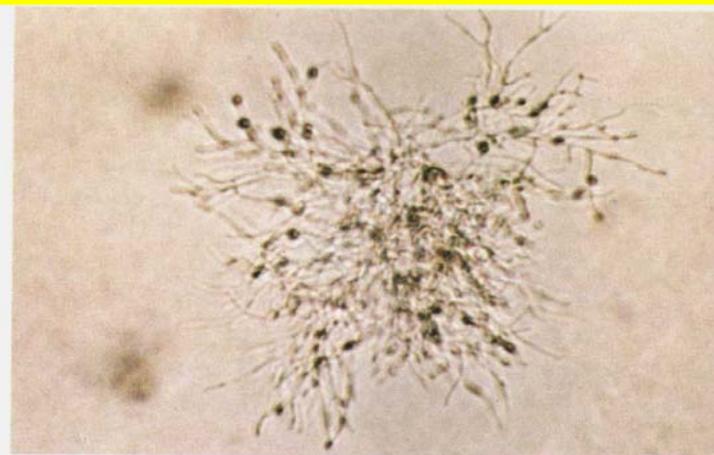
***C. difficile*:**
CCFA - cicloserina,
cefoxitina, frutose,
ágar.



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.



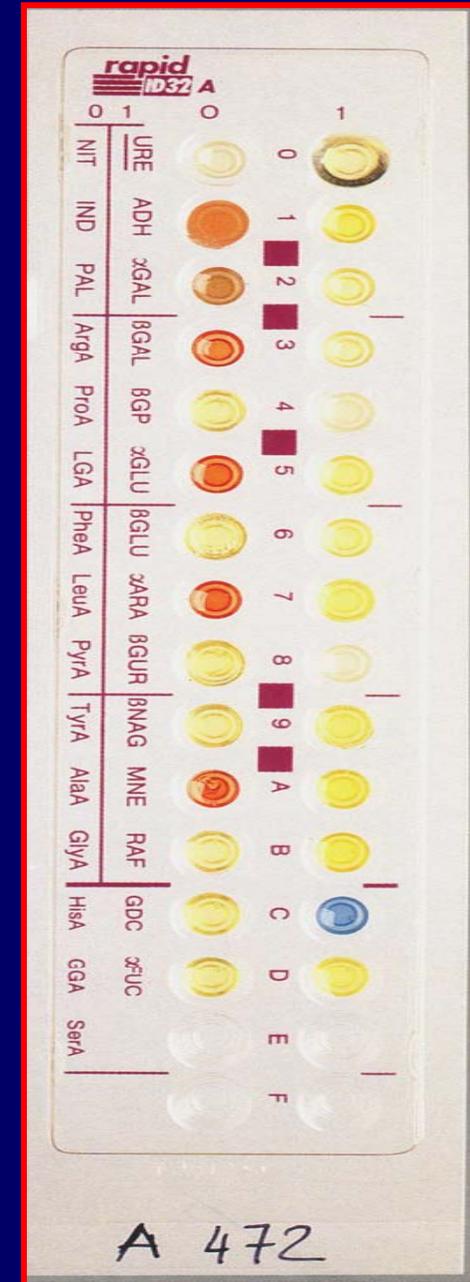
Colônia "parecida com aranha" de *A. israelii*. Esta microscopia direta, de baixa potência, de colônia crescendo na superfície ágar, mostra o emaranhado de filamentos delicadamente ramificados, irradiando de um ponto central mal definido.

TESTES DEFINITIVOS

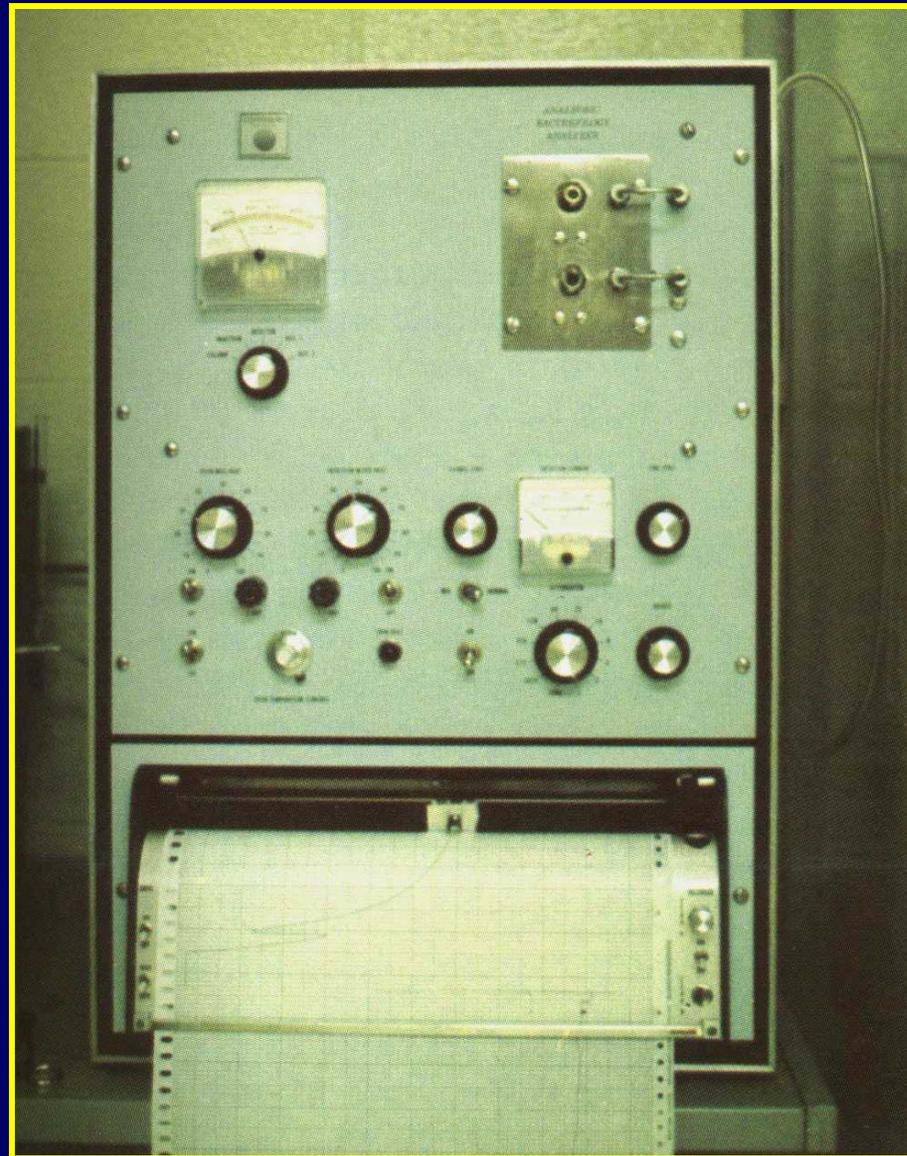
- ✓ Aspectos bioquímicos e Fisiológicos
- ✓ Imunológicos
- ✓ Cromatografia gasosa
- ✓ Biologia molecular: sondas, PCR, sequenciamento
- ✓ Susceptibilidade a drogas antimicrobianas



**Sistema Mini-API 32-A
(bioMérieux)**



**Cromatógrafo
gasoso**



CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA



Características fenotípicas



**Estabilidade influenciada pela pressão seletiva
do meio ambiente**



Identificação pouco precisa ou específica

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

- ✓ REA: análise com enzima de restrição
- ✓ Hibridização usando sondas de DNA ou RNA
- ✓ RFLP: polimorfismo tamanho fragmentos restrição
- ✓ PFGE: eletroforese gel em campo pulsado
- ✓ Polymerase Chain Reaction (PCR)
- ✓ Sequenciamento

Métodos Moleculares

- ✓ Especificidade e sensibilidade
- ✓ Rapidez e facilidade
- ✓ Detecção e identificação simultâneas
- ✓ Custo
- ✓ Área física

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

(Década de 80)



Deteccção de genes alvos



**Rapidez diagnóstica de doenças infecciosas e
facilitou estudos epidemiológicos**

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

- ✓ Detecta pequenas quantidades de DNA bacteriano (ng) mesmo em amostras mistas;
- ✓ Permite amplificação de pouco DNA para gerar grandes quantidades do mesmo;
- ✓ Pode detectar microrganismos em espécimes clínicos estocados;

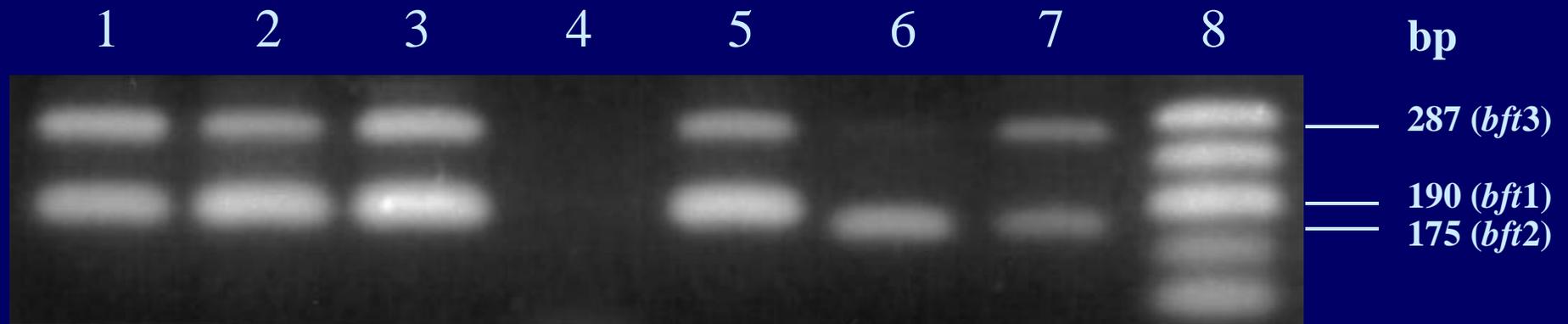
Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

- ✓ Viabilidade microbiana não é necessária para a identificação;
- ✓ Identifica e distingue organismos com alta similaridade fenotípica e genotípica;
- ✓ Detecta organismos difíceis de distinguir por cultivo tradicional ou não cultiváveis.

Alguns genes estudados em anaeróbios de relevância clínica

Organismos	Genes	Metodologia
<i>B. fragilis</i>	<i>bft</i> (<i>bft1</i> , <i>bft2</i> , <i>bft3</i>)	PCR; Multiplex-PCR
	<i>nanH</i>	PCR; Nested-PCR
	<i>cepA</i>	PCR; AP-PCR; PFGE
	<i>cfiA/ccrA</i>	PCR; AP-PCR; PFGE
	<i>cfxA</i>	PCR; AP-PCR; PFGE
<i>C. difficile</i>	PaLoc (<i>tcdA/tcdB</i>)	PCR; Sequenciamento
	Toxina binária (<i>cdtA/cdtB</i>)	PCR
	<i>fliC</i>	PCR
<i>P. gingivalis</i>	<i>prtC</i>	PCR
	<i>fimA</i>	PCR; Sequenciamento

ETBF: subtipos do gene *bft* (*bft1*, *bft2*, *bft3*)



Colunas 1, 2, 3 e 5: cepas P13C, P60A, P60C e P60F (*bft1* e *bft3*);
coluna 4, cepa *B. distasonis*; colunas 6 e 7: cepa GAI 97124 e ATCC
43858 (*bft2* e *bft3*); coluna 8: 50 bp.

Multiplex-PCR.

“Há ainda muito que estudar no que se refere à estrutura genômica de bactérias anaeróbias, e certamente as técnicas moleculares incluindo a clonagem e sequenciamento deverão contribuir para o esclarecimento das dúvidas, ainda existentes nesse grupo microbiano”

Considerações finais

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