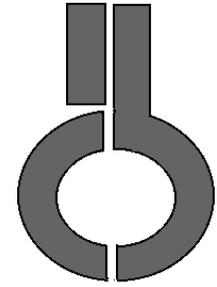




DEPARTAMENTO DE
MIcroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

LABORATÓRIO DE ANAERÓBIOS

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



MÉTODOS DE ESTUDO DE BACTÉRIAS BUCAIS

Prof. Dr. Mario J. Avila-Campos

Para que isolar microrganismos?

- Conhecer os diferentes tipos microbianos**
- Informação microbiológica completa e rápida**
- Identificação dos organismos**
- Susceptibilidade a antimicrobianos**
- Melhor opção terapêutica e tratamento**

DIFICULDADES NO ESTUDO DE BACTÉRIAS BUCAIS

- ✓ > 700 espécies podem ser cultivadas e ≥ 30 de um único sítio;**
- ✓ Espécies são difíceis para cultivar e identificar;**
- ✓ Características físicas de sítios de coleta;**
- ✓ Sítios com progressão ativa diferente nos tempos de coleta;**
- ✓ Infecções bucais > infecções mistas e presença de oportunistas.**

MÉTODOS NO ESTUDO DE BACTÉRIAS BUCAIS

Microscopia

Dependente Cultivo



- Material clínico fresco
- Meio de cultivo
- Bactérias vivas
- Conta células viáveis
- Útil para antibiograma

independente Cultivo

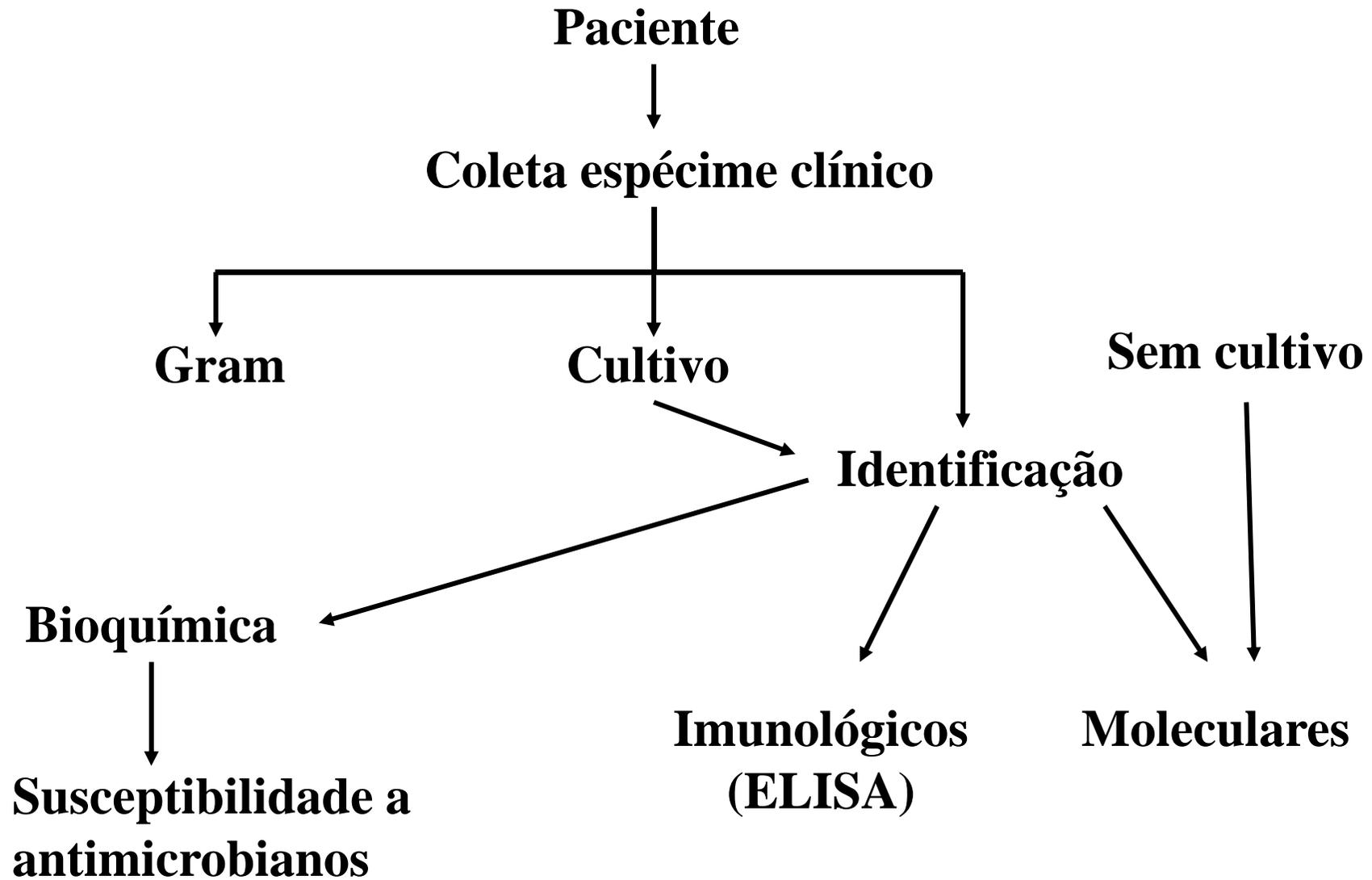


- Material clínico fresco ou congelado
- Não precisa de meio de cultivo
- Não são necessárias bactérias vivas
- Não conta células bacterianas
- DNA diretamente de material clínico
- Métodos moleculares

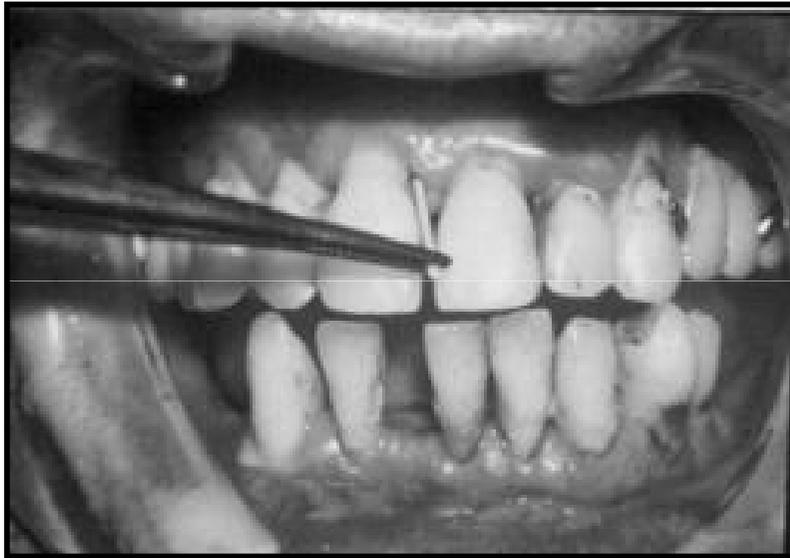
MÉTODOS DE COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Laboratório de Anaeróbios

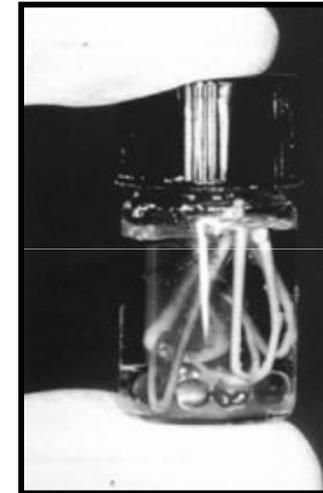
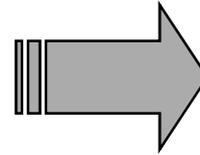
Fluxograma Geral de análise de espécimes clínicos



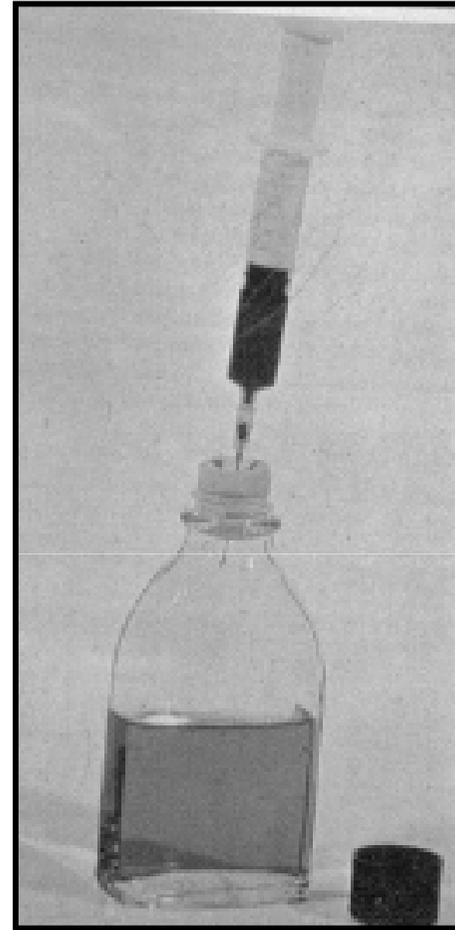
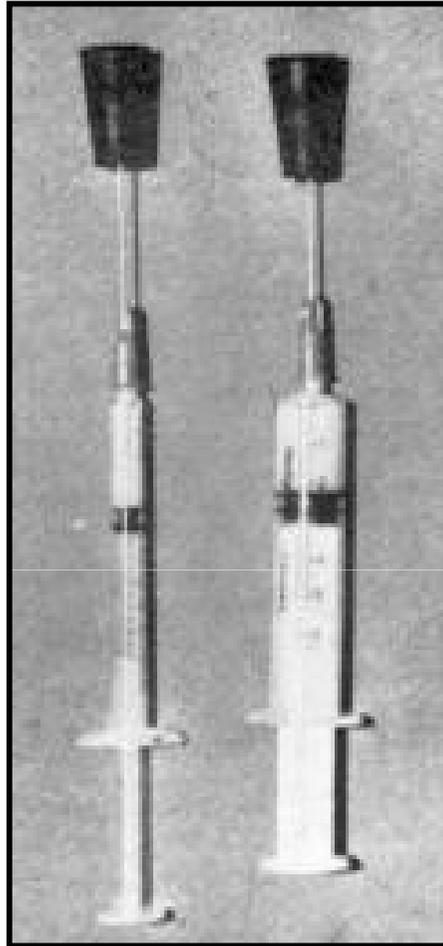
Processamento de coleta, transporte e cultivo de espécimes clínicos



Bolsa periodontal



Meio de transporte



Coleta e transporte de espécimes

Laboratório de Anaeróbios

MÉTODO DEPENDENTE DE CULTIVO

Laboratório de Anaeróbios

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

✓ **Morfologia colonial**

✓ **Morfologia celular - Coloração de Gram**

✓ **Pigmentação natural ou à luz UV**

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

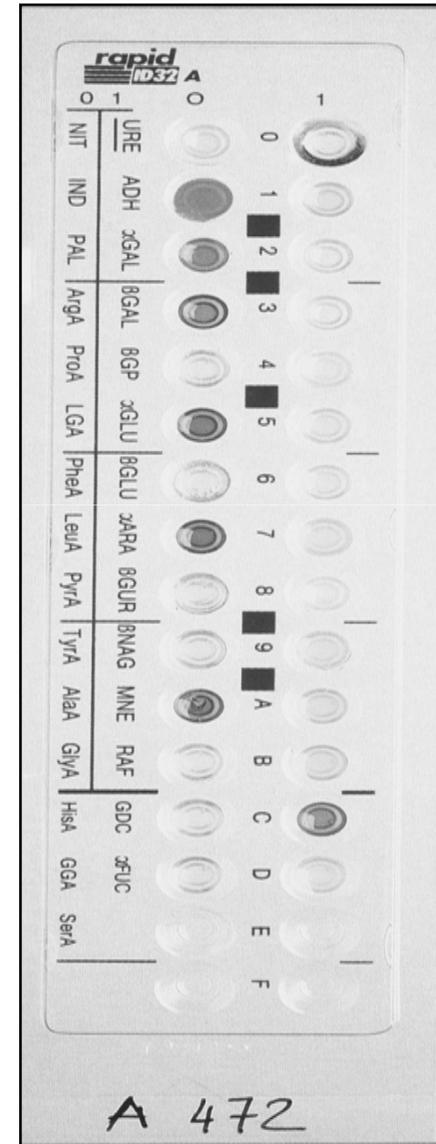
- ✓ **Testes bioquímicos e fisiológicos**
- ✓ **Imunológicos**
- ✓ **Cromatografia gasosa**
- ✓ **Biologia molecular: sondas, PCR, sequenciamento de DNA.**

Testes Bioquímicos



**Sistema de identificação Mini-API Rapid
(bioMérieux)**

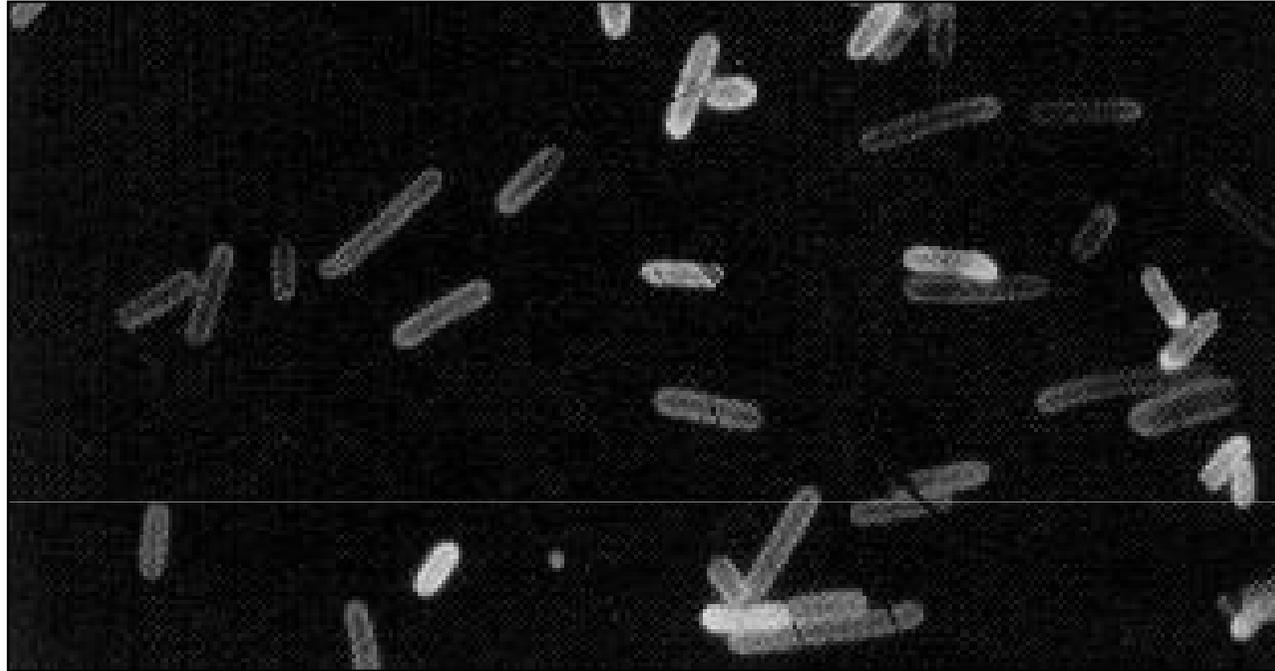
Laboratório de Anaeróbios



Métodos Imunológicos ou de Imunodiagnóstico

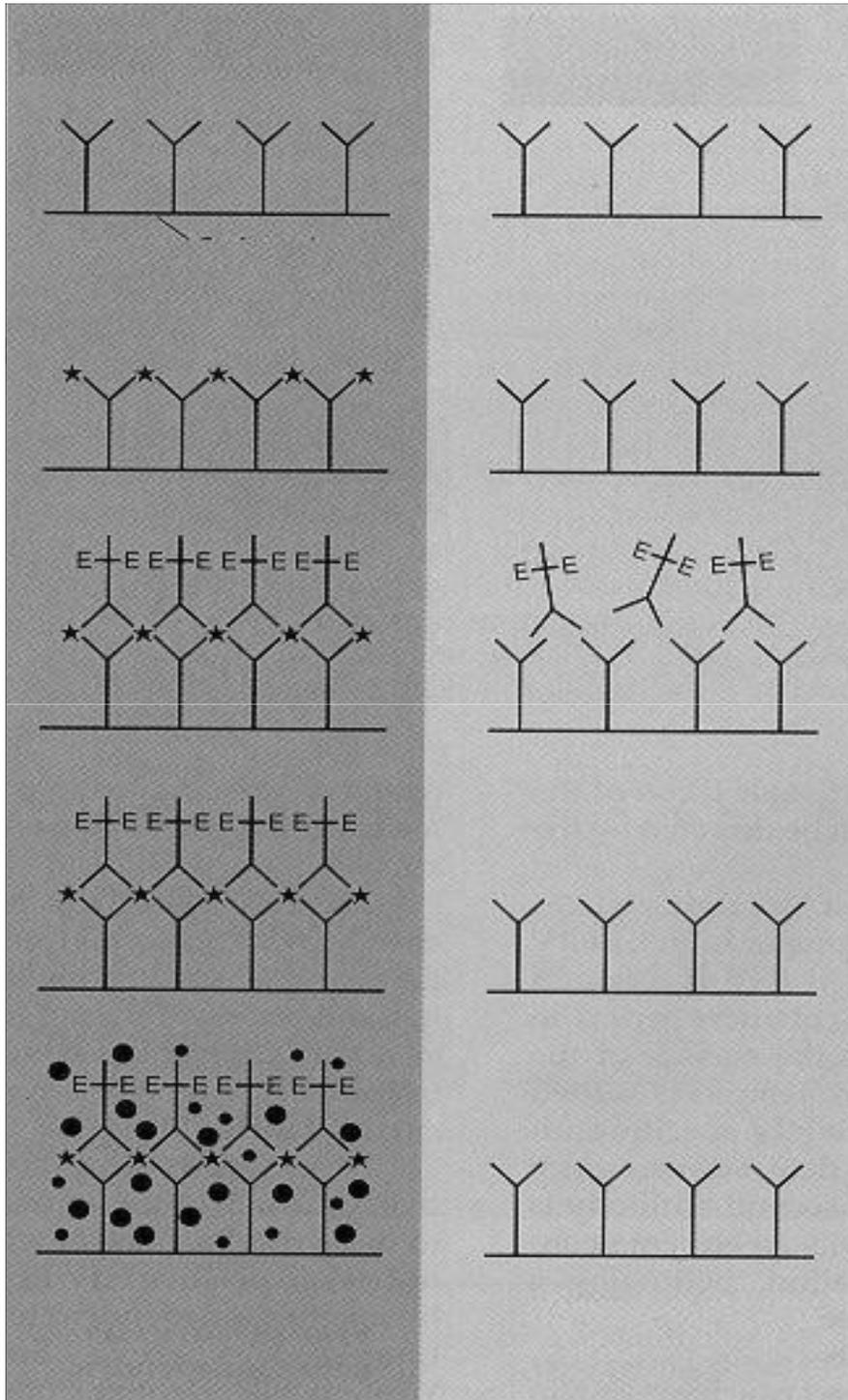
- ✓ **Imunofluorescência.**
- ✓ **Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).**
- ✓ **Imunoaglutinação.**

Método imunológico: de Imunofluorescência

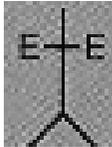


✓ *Clostridium septicum* (verde).

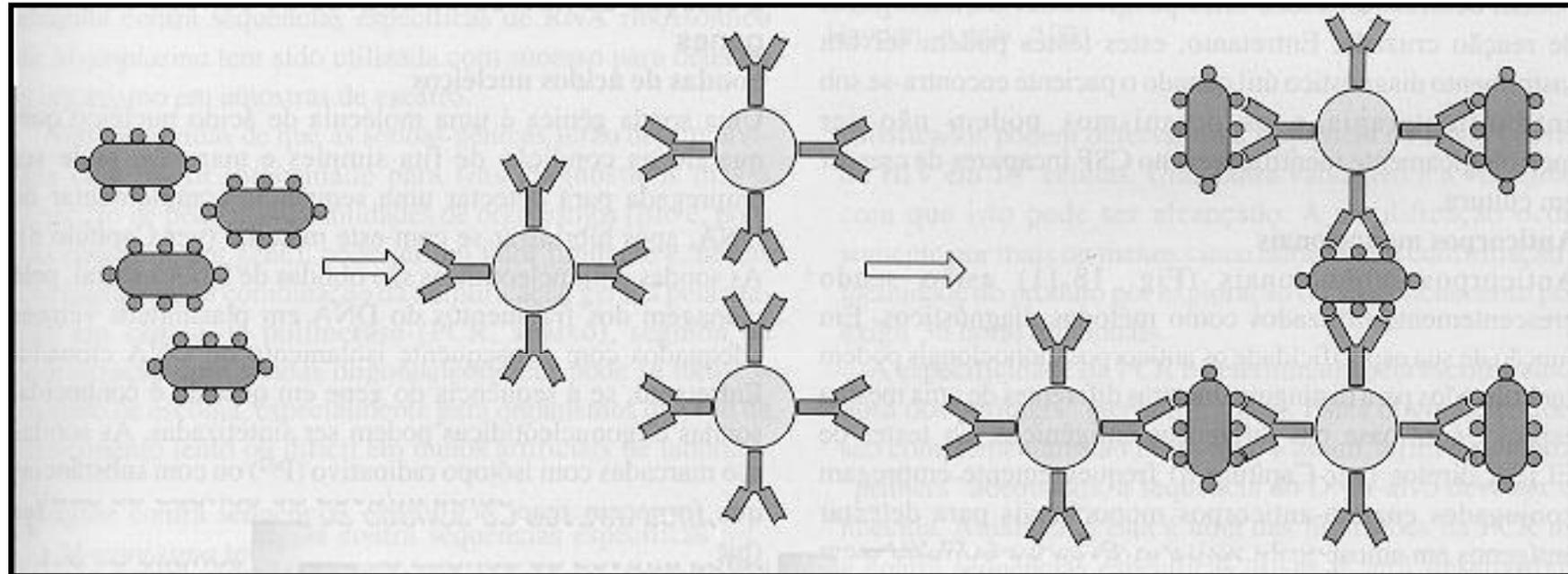
✓ *Clostridium chauveii* (vermelho).



Método ELISA- imunoabsorvente ligado a enzima

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

Método imunológico: Imunoaglutinação do látex



Bactérias

**Anticorpos específicos
ligados látex**

Agglutinação

MÉTODOS INDEPENDENTE DE CULTIVO

MÉTODOS MOLECULARES

Métodos Moleculares

Etapas principais:

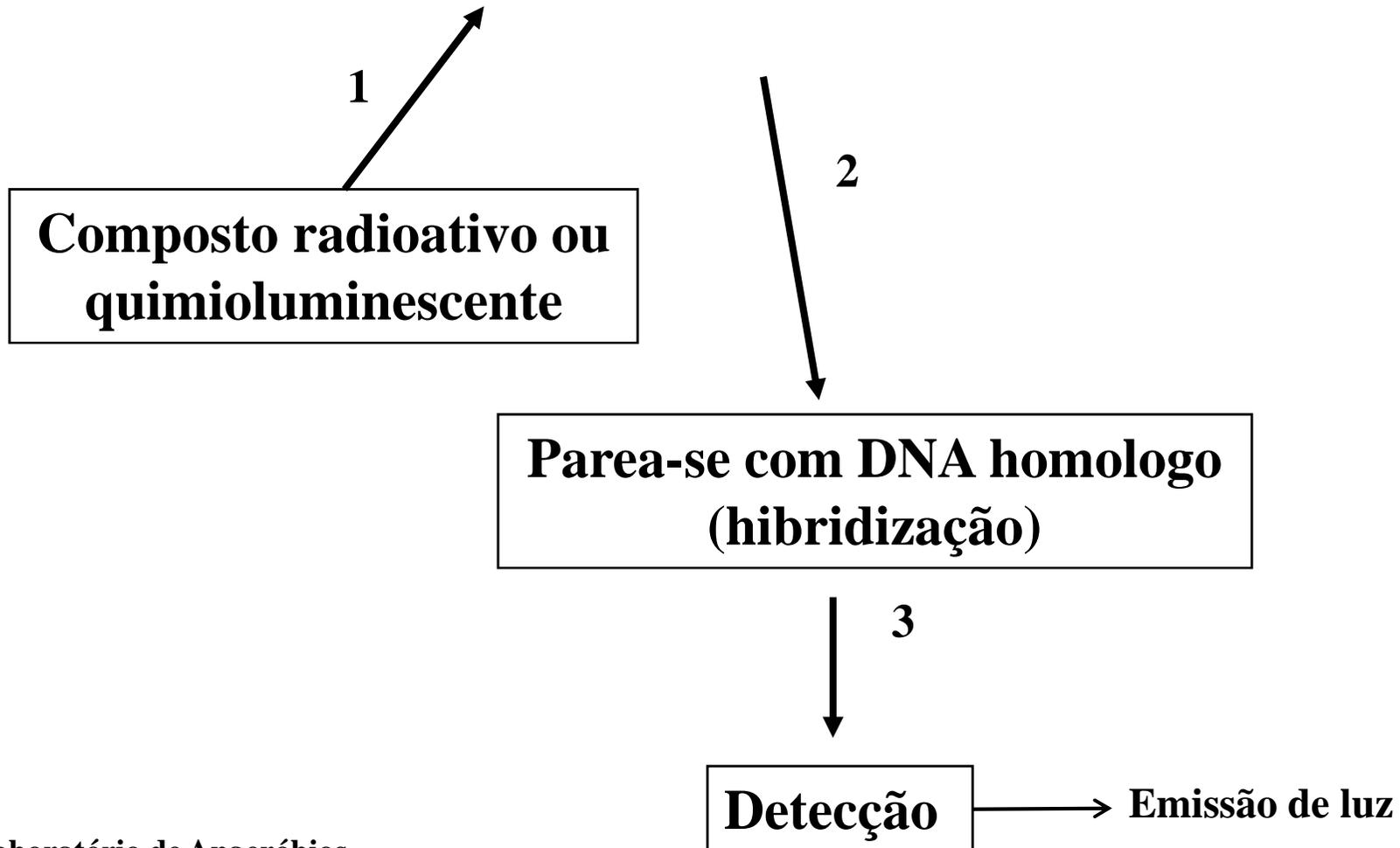
√ **Desnaturação do DNA**

√ **Hibridização**

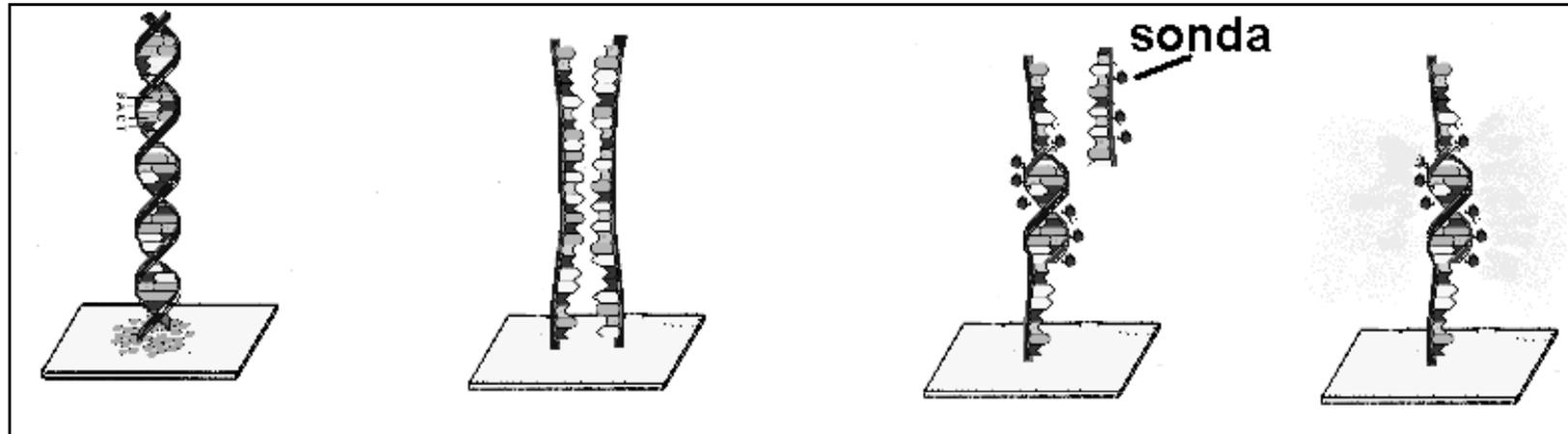
√ **Detecção**

Sondas de DNA

Sonda: AGC TTA CGG AAC TCA GAT T



Sondas de DNA



1.

Imobilização do DNA alvo na membrana de nitrocelulose.

2.

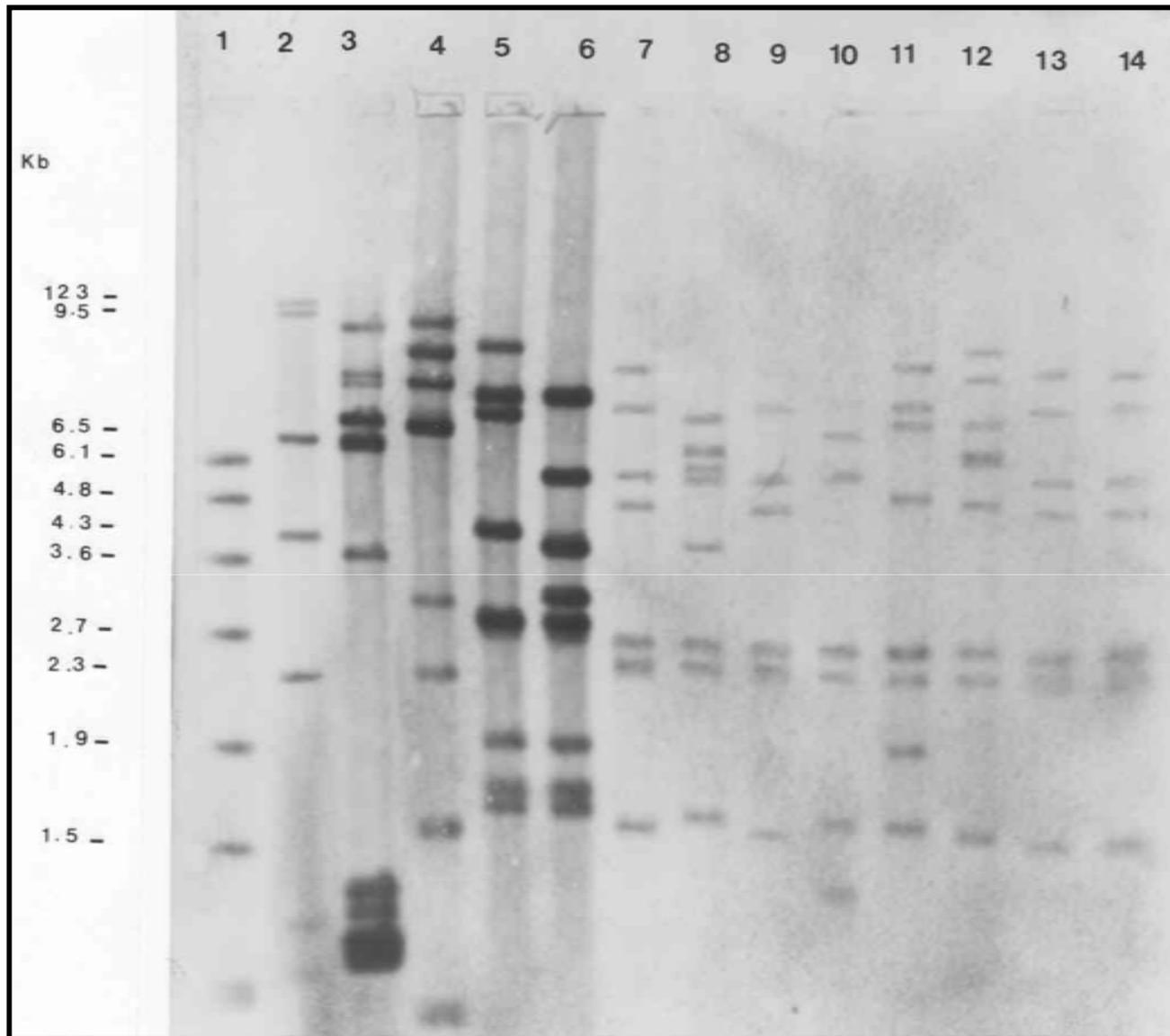
denaturação

3.

hibridização

4.

Detecção pela sonda



Detecção bacteriana por sondas de DNA

Laboratório de Anaeróbios

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

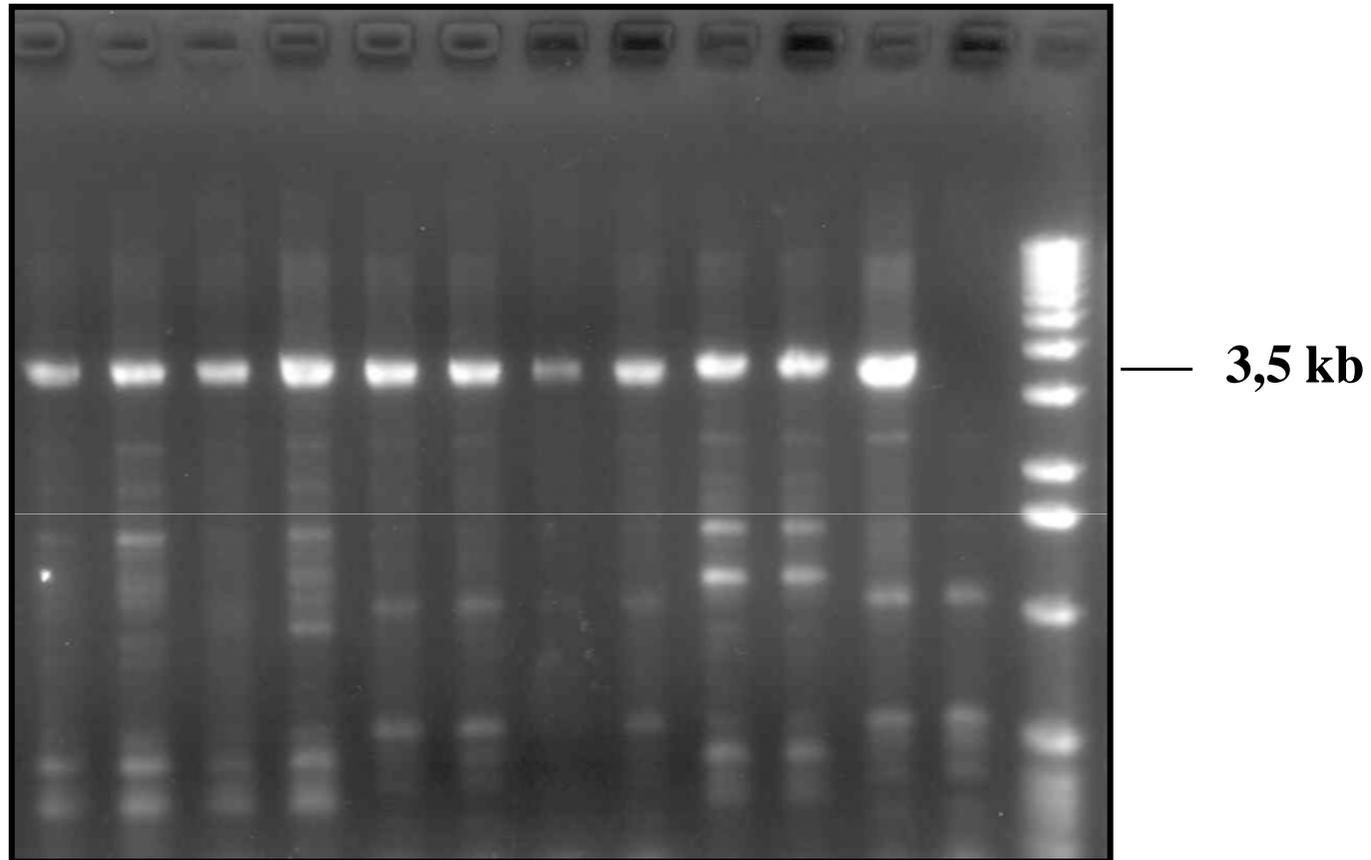
- ✓ Detecta-se pequenas quantidades de DNA bacteriano;**
- ✓ Amplifica-se pouco DNA gerando grandes quantidades;**
- ✓ Detecta-se microrganismos em espécimes clínicos estocados;**
- ✓ Viabilidade microbiana não é necessária.**

- **Iniciadores específicos**
- **Enzima: Taq polimerase**
- **Mg⁺⁺**
- **Mistura de nucleotídeos**
- **Temperatura anelamento**
- **DNA**



**Máquina de PCR
9700. Perkin Elmer**

INICIDADORES ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO DE *A. actinomycetemcomitans*



Linhas 1 a 11: *A. actinomycetemcomitans*; Linha 12: *F. necrophorum*; Linha 13: 1 kb ladder.

Métodos de detecção bacteriana

Teste	Vantagens	Desvantagens
Microscopia campo escuro e contraste de fases	Detecta formas, tamanho, motilidade.	Não distingue espécies bacterianas
Cultivo bacteriano	Amplo espectro de bactérias em uma amostra; Susceptibilidade a antimicrobianos	Caro, demorado, falha para bactérias não-cultiváveis
Sondas DNA e imunoenaios	Específicos, rápidos e relativamente baratos	Reação-cruzada, caro
Ensaio enzimáticos	Específicos, rápidos e baratos	Grupos bacterianos e não espécies individuais
PCR	Organismos específicos, rápido, é o teste mais sensível	Instrumentos caros

Sensibilidade dos Métodos de Detecção Microbiana

Método	Limite de detecção	Detecção de espécies não viáveis	Tempo
Cultivo não seletivo	10^4-10^5	Não	1-3 semanas
Métodos imunológicos	10^4	Sim	Minutos-horas
Imunofluorescência	10^3	Sim	Minutos-horas
Hibridização de DNA	10^3	Sim	1-48 horas
Sondas DNA	10^2	Sim	1-48 horas
PCR	10	Sim	2-4 horas

French et al. (1986); Furrer et al. (1991); Maiden et al. (1991); Socransky et al. (1994); Zambon & Haraszthy (2000).

Laboratório de Anaeróbios

APLICAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÕES BUCAIS

- » Caracterização molecular fornece sequências nucleotídicas.**
- » Detecção e identificação de organismos exigentes.**
- » Amplificação de sequências alvo diretamente de material clínico.**

“A aplicação de um único método para detecção de organismos pode não ser ideal, assim, a combinação de técnicas é necessária para avaliar melhor as doenças infecciosas bucais em termos ecológicos, epidemiológicos e de patogênese”