

# CULTURA EM ANAERÓBIOS

Denise Xavier Mariano

## RESUMO

Os microrganismos anaeróbios estão presentes em grande quantidade no organismo humano, desenvolvendo-se em áreas com pouco ou até mesmo sem a presença de oxigênio. Todavia, embora presentes na microbiota normal humana, podem se transformar em agentes responsáveis por várias doenças em face de determinadas condições que alteram seu habitat natural. Tomando-se, por base tal pressuposto o presente trabalho tem por objetivo discorrer sobre a cultura em anaeróbios. A metodologia utilizada é a pesquisa de natureza bibliográfica com base na consulta aos bancos de dados existentes, inclusive, em meio eletrônico. Consta-se, inicialmente que as bactérias anaeróbias possuem características que as distinguem das demais existentes, sendo a principal a capacidade de se desenvolverem em áreas do organismo com baixo nível ou até mesmo sem a presença de oxigênio. No que diz respeito à cultura em anaeróbios, os resultados indicam a necessidade de obtenção do espécime adequado, rápido transporte e manipulação com precisão. Conclui-se, de tal modo que, a qualidade do meio de cultura é essencial em termos de diagnóstico e sucesso do tratamento terapêutico empregado.

**Palavras-chaves:** Anaeróbios. Espécime Adequado. Rápido Transporte. Manipulação com precisão.

## ABSTRACT

Anaerobic microorganisms are present in large quantities in the human body, developing in areas with little or even without the presence of oxygen. However, although present in the normal human microbiota, can become agents responsible for various diseases in the face of certain conditions that alter their natural habitat. Taking, based on this assumption the present study aims to discuss the culture of anaerobes. The methodology used is the research literature nature based on the consultation of existing databases, including in electronic form. It appears initially that the anaerobic bacteria have characteristics that distinguish them from other existing, the main one being the ability to develop in areas of the body with low or even without the presence of oxygen. With respect to the anaerobic culture, the results indicate the need to obtain adequate specimen, rapid transport and handling accurately. It follows, so that the quality of the culture medium is essential in the diagnosis and therapeutic treatment success employed.

**Keywords:** Anaerobic. Suitable specimen. Fast shipping. Manipulation accurately

## INTRODUÇÃO

Centenas de espécies de bactérias anaeróbias foram identificadas como parte da flora normal nos seres humanos. Apesar da complexa variedade de bactérias na flora normal, relativamente poucas espécies costumam ser isoladas de infecções humanas. Ocorrem infecções anaeróbicas quando a relação harmoniosa entre o hospedeiro e as bactérias é rompida, sendo que qualquer local no corpo é suscetível de infecção por estes microrganismos nativos, quando uma barreira mucosa ou a pele são comprometidas por cirurgia, traumatismo, tumor, isquemia ou necrose, que podem reduzir os potenciais redox nos tecidos locais (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

Os anaeróbios são caracterizados por sua capacidade de crescer somente em atmosfera contendo menos de 20% de oxigênio, formando um grupo heterogêneo composto por uma variedade de bactérias, desde que as exibem crescimento mínimo em 20% de oxigênio até as capazes de crescer apenas em uma atmosfera com teor de oxigênio abaixo de 0,02% (LEVINSON, 2016).

Ademais, para muitas espécies destas bactérias o oxigênio é deletério (ANVISA, 2004). Um número menor de bactérias anaeróbias patogênicas e que também fazem parte da flora normal, morre após breve contato com o oxigênio, mesmo em baixas concentrações (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

Estas bactérias são chamadas de anaeróbios estritos, para diferenciar dos chamados anaeróbios facultativos, que têm a capacidade de desenvolver seus processos metabólicos, tanto em presença como na ausência do oxigênio. A maior parte das bactérias patogênicas do ser humano são anaeróbios facultativos e as famílias *Micrococaceae*, *Streptococaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, são exemplos destes microrganismos (ANVISA, 2004).

Os anaeróbios estritos estão constituídos por numerosas famílias, gêneros e espécies com caracteres morfológicos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se formam em presença de oxigênio e que podem ser tóxicos, bioquímicos e antigênicos muito diferentes (ANVISA, 2004).

Os aeróbios obrigatórios, como a *Pseudomonas aeruginosa*, exibem melhor crescimento na atmosfera ambiente com oxigênio a 20% e nenhum crescimento em condições de anaerobiose (LEVINSON, 2016).

Os aneróbios facultativos, como a *Escherichia coli*, podem crescer bem em qualquer das circunstâncias. Os organismos aerotolerantes, como o *Clostridium histolyticum*, podem exibir certo grau de crescimento na atmosfera ambiente; entretanto, multiplicam-se de forma mais rápida em uma concentração de oxigênio mais baixa (LEVINSON, 2016).

De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – (2004), a labilidade dos anaeróbios estritos ao oxigênio explica a dificuldade existente nos laboratórios para seu isolamento e estudo e como tal, por este motivo também, boa parte das infecções provocadas por estes microrganismos não eram diagnosticadas até a década de 1970, quando foram desenvolvidos procedimentos práticos de laboratórios para criar atmosferas de anaerobiose.

Assim sendo, as infecções provocadas pelos microrganismos mais resistentes dentro deste grupo, os esporulados do gênero *Clostridium*, eram diagnosticadas com maior frequência; na atualidade as infecções por *Clostridium* são menos frequentes que as infecções provocadas por outros gêneros de bactérias anaeróbias (ANVISA, 2004).

### **Anaeróbios de interesse médico**

Muitos dos anaeróbios de importância médica são membros da microbiota normal humana. Assim, não correspondem a patógenos em seu hábitat normal, causando doenças apenas quando deixam esses locais (LEVINSON, 2016).

Duas exceções importantes são o *Clostridium botulinum* e o *Clostridium tetani*, os agentes do botulismo e do tétano, respectivamente, que são organismos do solo, sendo que o *Clostridium perfringens*, outro importante patógeno de seres humanos, é encontrado no colo e também no solo (LEVINSON, 2016).

Os cocos Gram-positivos anaeróbios não formadores de esporos são um grupo heterogêneo de bactérias que colonizam a pele e as mucosas. Esses organismos são patógenos oportunistas, caracteristicamente responsáveis por infecções de natureza endógena, e são usualmente isolados em infecções mistas constituídas por bactérias aeróbias e anaeróbias (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Os anaeróbios Gram-negativos mais importantes que colonizam o trato respiratório superior, gastrointestinal e geniturinário humanos são bacilos dos

gêneros *Bacteroides*, *Fusovacterium*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas* e *Prevotella*, e os cocos do gênero *Veillonella* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

A bactéria *Legionella* é um importante patógeno respiratório; no entanto, nunca havia sido cultivada em cultura, até que se reconheceu que para o isolamento do organismo era necessário um meio suplementado com ferro e L-cisteína (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

*Campylobacter*, um importante patógeno entérico, não foi isolado de amostras fecais até que meios altamente seletivos foram incubados a 42° C em uma atmosfera de microaerofilia. *Chlamydia*, uma importante bactéria responsável por doenças sexualmente transmissíveis, é um patógeno intracelular obrigatório que só pode ser cultivado em células vivas (cultura de células) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Em muitas infecções, como por exemplo, gastroenterite, faringite, uretrite, o organismo responsável pela infecção estará presente entre muitos outros organismos que fazem parte da microbiota do local da infecção (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

## **Diagnóstico laboratorial**

Muitos meios de cultura têm sido desenvolvidos no intuito de inibir o crescimento da microbiota normal e facilitar a detecção dos organismos clinicamente importantes. A imunidade ativa e adaptativa do paciente pode suprimir o patógeno; assim, técnicas de cultura altamente sensíveis frequentemente são necessárias (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Ainda segundo tais autores do mesmo modo, algumas infecções são caracterizadas pela presença de um número relativamente pequeno de organismos, sendo que, por exemplo, a maioria dos pacientes sépticos apresenta menos de um organismo por mililitro de sangue, de modo que a recuperação desses organismos a partir de culturas de sangue tradicionais requer a inoculação de grande volume de sangue em caldos de enriquecimento (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Dois aspectos do diagnóstico microbiológico de uma infecção anaeróbica são importantes, antes mesmo da cultura do espécime: (1) obtenção do espécime apropriado e (2) o rápido transporte do espécime ao laboratório em condições de anaerobiose (LEVINSON, 2006).

Kasper e Cohen-Poradosu (2015) inclui ainda outro importante aspecto, quer seja, a correta manipulação das amostras pelo laboratório.

Um espécime apropriado é o que não contém membros da microbiota normal que poderiam confundir a interpretação. Por exemplo, espécimes como sangue, líquido pleural, pus e aspirados transtraqueais são apropriados, ao contrário do escarro e das fezes (LEVINSON, 2006).

As amostras devem ser coletadas meticulosamente dos locais infectados, evitando a contaminação pela flora normal. Quando essa contaminação é provável, a amostra torna-se inaceitável (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

No que diz respeito a coleta do material, preconiza a ANVISA (2004) que as amostras devem ser colhidas de forma que não entrem em contato com oxigênio e não se contaminem com bactérias anaeróbias da flora normal. Por este motivo devem ser aspiradas com seringa, da qual é eliminado o ar imediatamente após a obtenção da amostra.

Consequentemente, o material não pode ser colhido com zaragatoa (*swab*) e portanto, para evitar a contaminação pelos anaeróbios da flora normal, não devem ser semeados escarro, secreção faríngea ou nasal, secreções vaginais, fezes ou material de colostomia, pois estes materiais sempre têm bactérias anaeróbias. Idealmente, as bactérias anaeróbias estritas são pesquisadas em líquidos aspirados de cavidades fechadas, material obtido por aspiração profunda de feridas, punção de traquéia ou pulmonar e sangue para hemocultura (ANVISA, 2004).

No laboratório, as culturas são manipuladas e incubadas em condições anaeróbias. Além dos critérios diagnósticos usuais da coloração de Gram, morfologia e reações bioquímicas, a técnica especial de cromatografia gasosa é importante. Nesse procedimento, ácidos orgânicos, como os ácidos fórmico, acético e propiônico, são quantificados (LEVINSON, 2006).

Como até mesmo uma breve exposição ao oxigênio pode matar alguns microrganismos anaeróbios e impossibilitar seu isolamento no laboratório, o ar deve ser expelido da seringa utilizada para aspirar a cavidade do abscesso, e a agulha deve ser tampada com um protetor de borracha esterilizado (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

O sucesso dos métodos de cultura é definido pela biologia do organismo, pelo local da infecção, pela resposta imune do paciente à infecção e pela qualidade do meio de cultura (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

É importante lembrar que a antibioticoterapia anterior diminui a possibilidade de cultura dessas bactérias. As amostras podem ser injetadas em frascos de transporte que contêm um meio reduzido ou levadas imediatamente em seringas para o laboratório para a cultura direta em meios anaeróbios (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

A demora no transporte pode levar à incapacidade de isolar anaeróbios devido à exposição ao oxigênio ou à proliferação de microrganismos facultativos, que podem eliminar ou obscurecer qualquer anaeróbio que esteja presente (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

Com base em Barros (2016) os membros da equipe envolvida na coleta da amostra devem ter em mente que microrganismos são seres vivos que se multiplicam e/ou morrem rapidamente.

Se isso ocorrer durante a coleta, o transporte ou a estocagem, a amostra clínica enviada para o exame não será representativa do processo infeccioso. Portanto, deve-se encaminhar a amostra imediatamente após a coleta ao laboratório, com a finalidade de assegurar o isolamento de microrganismos, principalmente dos patógenos mais sensíveis e exigentes, além de prevenir o crescimento maior de bactérias da microbiota normal, que, em geral são mais resistentes e menos exigentes (BARROS, 2016).

Para evitar tais problemas, a ANVISA (2004) recomenda que o transporte pode ser feito com a mesma seringa com que foi colhido o material, devendo atentar para o fato de que este transporte deve ser o mais rápido possível, sendo ideal que o mesmo profissional que colheu leve imediatamente a seringa ao laboratório.

Ainda de acordo com as diretrizes da ANVISA (2004), também pode ser empregado, com este fim, um vidro do tipo de penicilina, que contém meio de tioglicolato de sódio ( $\pm 7$  ml). O tioglicolato é um sal redutor, de forma que no interior do meio existem condições de anaerobiose. A este meio líquido pode acrescentar uma pequena quantidade de ágar (0,5%) para transformá-lo em um meio mais espesso, o que dificulta a difusão de oxigênio. O meio tem um indicador de oxigenação que é a rezarsurina, de modo que se por algum motivo existe oxigenação do mesmo, o indicador adquire cor rosa.

Segundo a ANVISA (2004) o material aspirado deve ser inoculado no interior do meio de cultura, através da tampa de borracha, devendo ter um cuidado especial para não agitar o meio, antes e depois da inoculação, para evitar sua oxigenação,

sendo que as amostras colhidas neste meio podem ser encaminhadas ao laboratório várias horas após sua inoculação (até 24 horas).

A presença de gás nos tecidos é altamente sugestiva, mas não diagnóstica, de infecção anaeróbia. Quando as culturas de locais obviamente infectados ou de material purulento não exibem nenhum crescimento, apresentam menos estreptococos ou uma única espécie aeróbia, a exemplo da *E. Coli*, e a coloração de Gram revela uma flora mista, deve-se suspeitar de envolvimento de anaeróbios; a conclusão é a de que os microrganismos anaeróbicos não cresceram devido a técnicas inadequadas de transporte e/ou de cultura. A ausência de resposta de uma infecção a antibióticos que não são ativos contra anaeróbios, como por exemplo, aminoglicosídeos e, em algumas circunstâncias, penicilina, cefalosporinas ou tetraciclina) sugere uma etiologia anaeróbia (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

Todas as amostras clínicas de infecções anaeróbias suspeitas devem ser coradas pelo método de Gram e examinadas à procura de microrganismos com morfologia característica. Não é raro observar microrganismos na coloração de Gram, porém não isolá-los em cultura (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

Com base nas recomendações da ANVISA (2004) deve sempre ser feita uma coloração de Gram e de esporos, quando necessário, da amostra recebida, o que pode orientar o clínico para o diagnóstico e a terapêutica precoce. Por exemplo, a observação num processo com aspecto de gangrena gasosa de bacilos gram positivos, grandes esporulados, é quase confirmação do diagnóstico de *Clostridium* e de gangrena gasosa.

Devido ao tempo e à dificuldade envolvidos no isolamento de bactérias anaeróbias, o diagnóstico de infecções anaeróbias frequentes deve-se basear em evidências presuntivas. Existem algumas pistas clínicas para a provável presença de bactérias anaeróbias nos locais infectados. O envolvimento de determinados locais com potencial de oxidação-redução diminuído, por exemplo, tecidos necróticos avasculares, favorece o diagnóstico de infecção anaeróbia. Quando ocorrem infecções na proximidade de superfícies mucosas que normalmente abrigam uma flora anaeróbia, como trato gastrointestinal, trato genital feminino ou orofaringe, os anaeróbios devem ser considerados agentes etiológicos potenciais. Um odor fétido indica frequentemente a presença de anaeróbios, que produzem determinados

ácidos orgânicos à medida que proliferam no tecido necrótico (KASPER; COHEN-PORADOSU, 2015).

A existência de poucas ou muitas bactérias na amostra permite orientar o bacteriologista se ele deve enriquecer previamente a amostra em um caldo ou fazer diretamente a semeadura em placa. Quando o material vem numa seringa, a semeadura é feita em tioglicolato e em placa. Quando o material já vem no meio de tioglicolato, é feita, a partir deste, a semeadura em placa, e incubados ambos os meios (ANVISA, 2004).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As bactérias anaeróbicas possuem características importantes que as distinguem dos demais tipos de bactérias, dentre as quais a capacidade de crescer em um ambiente com pouco e até nenhum oxigênio e a quantidade reduzida e até mesmo ausência de catalase e superóxido dismutase (SOD).

Embora estejam presentes em diversas partes da microbiota humana, sem qualquer nenhum tipo de dano, são de grande importância médica na medida em que diferentes condições podem fazer com que o ambiente normal nas quais ela se faz presente seja alterado, resultando em quadros infecciosos que quando não adequadamente tratados podem ser letais.

Sendo assim, torna-se essencial a atenção aos aspectos que concorrem para o sucesso da cultura anaeróbia, ao passo em que uma breve exposição ao oxigênio podem impedir seu isolamento no laboratório, atentando-se de tal modo para a obtenção do espécime e seu transporte rápido, bem como pela precisão na manipulação da amostra colhida.

Conclui-se, diante de todos esses aspectos que a qualidade do meio de cultura é essencial em termos de diagnóstico e sucesso do tratamento terapêutico empregado.

## **REFERÊNCIAS**

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. 2004.

BARROS, A. L. B. L. **Anamnese e exame físico: avaliação diagnóstica de Enfermagem no Adulto**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

KASPER, D. L.; COHEN-PORADOSU. **Infecções Causadas por Microrganismos Anaeróbios Mistos**. Doenças Infecciosas de Harrison. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2015.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13ª edição. Porto Alegre-RS: Artmed, 2016.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.