

neusa.silva@edu.ulisboa.pt

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A cavidade oral consiste num ecossistema único, colonizada por uma grande variedade de microrganismos, principalmente bactérias anaeróbias Gram-negativas e *Streptococcus*. Estes microrganismos vivem em harmonia simbiótica com o hospedeiro, porém, qualquer alteração nessa microbiota afeta a saúde oral [1, 2, 3]. O desequilíbrio na relação microorganismo-hospedeiro é considerado como uma das principais causas para o aparecimento de patologias orais como a cárie e a doença periodontal, que estão fortemente associadas a bactérias anaeróbias [4].

Assim, o objetivo deste estudo é o desenvolvimento e a validação de protocolo de isolamento e identificação de bactérias anaeróbias de amostras de placa bacteriana.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada a colheita de amostras de placa bacteriana em dois voluntários do sexo feminino, com uma média de idade de 34 anos. A colheita deu-se de forma similar, mediante a inserção de cureta estéril nas faces proximais dos dentes. As amostras foram transferidas para um tubo com uma solução tampão (PBS) estéril e transportadas para o laboratório, para assegurar o crescimento de bactérias anaeróbias. Posteriormente, foram semeadas no meio de cultura ágar cérebro-coração com a adição de sangue de cavalo desfibrinado (5% ), menadiona (1 mg /L) e hemina (5 mg/L). A incubação foi realizada numa jarra de anaerobiose com uma atmosfera de 10% dióxido de carbono, 10% hidrogénio e 80% nitrogénio a 37°C durante 7 a 14 dias. Da variedade de colónias isoladas, 8 delas foram subcultivadas com base nas suas características morfológicas. A identificação presuntiva das colónias foi determinada mediante observação e aquisição de imagens pelo microscópio estereoscópico, coloração de Gram, prova da catalase e provas bioquímicas com o *rapid id 32 A*.

## DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam que a coloração de Gram, o procedimento mais amplamente utilizado em microbiologia, é fundamental para a caracterização fenotípica de bactérias. É um procedimento aparentemente simples e rápido, contudo, é ineficaz na identificação de bactérias Gram-variáveis, como *Actinomyces spp.*

O uso de testes complementares como a prova da catalase e a observação pelo microscópio estereoscópico são uma mais valia para a identificação presuntiva das colónias.

O sistema *rapid id 32 A* identificou apenas uma das colónias em estudo. Desta forma, a sua utilização para estudos de isolamento e identificação de bactérias anaeróbias em amostras de placa bacteriana parece ser discutível uma vez que a base de dados APIWEB é limitada e pode não incluir todas as espécies presentes na amostra.

## CONCLUSÕES

O protocolo desenvolvido permitiu o isolamento, cultura e identificação presuntiva de bactérias anaeróbias. No entanto, serão necessários ensaios moleculares para uma identificação correta dessas colónias a nível de espécie.

## REFERÊNCIAS

1. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. Dent Clin N Am. 2017; 61: 199-215.
2. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43(11): 5721-5732.
3. Derafshi R, Bazargani A, Ghapanchi J, Izadi Y, Khorshidi H. Isolation and Identification of Nonoral Pathogenic Bacteria in the Oral Cavity of Patients with Removable Dentures. J Int Soc Prev Community Dent. 2017; 7(4): 197-201.
4. Sutter VL. Anaerobes as Normal Flora. Reviews of infectious diseases. 1984.

## RESULTADOS

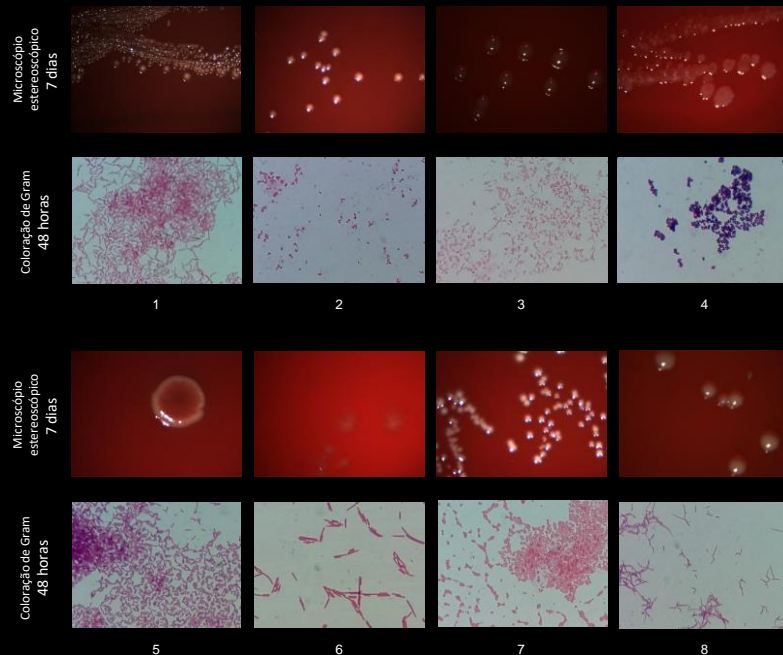


Figura 1. Imagens da coloração de Gram após 48 horas de cultura em ágar sangue (em cima) e imagens de Microscópio Estereoscópico após 7 dias de cultura em ágar sangue (em baixo) de todas as placas. Ampliação de 1000x (óleo de imersão). As imagens 1,5 e 8 bacilos Gram-variável, as imagens 2,3 e 4 cocos Gram-variável ou Gram-positivo e a imagem 6 bacilos Gram-negativo

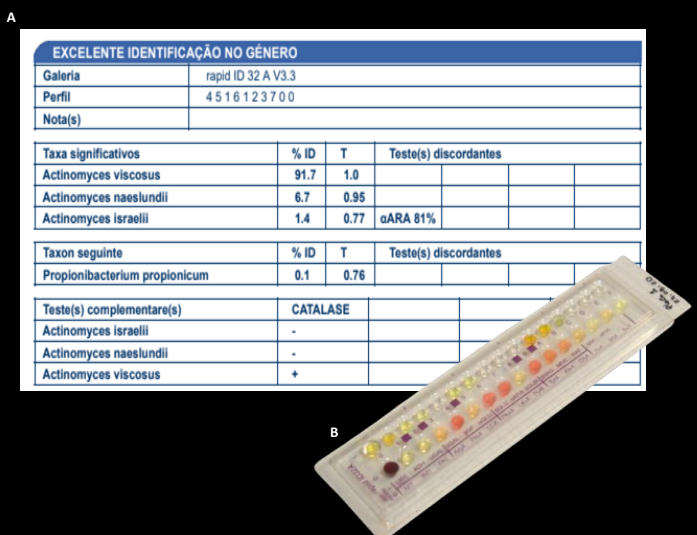


Figura 2. A. Imagem da aplicação APIWEB com a identificação da placa 1 para *Actinomyces viscosus* ( 91.7 %). B. Imagem da galeria *rapid id 32 A* da placa 1, preparada após 48 horas de cultura das colónias em ágar sangue.