

INTRODUÇÃO À BACTERIOLOGIA

MIP8001 - ORGANISMOS PATOGÊNICOS DE
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

Curso de Graduação em Saúde Pública



Profa. Dra. Inneke M. van der Heijden Natário

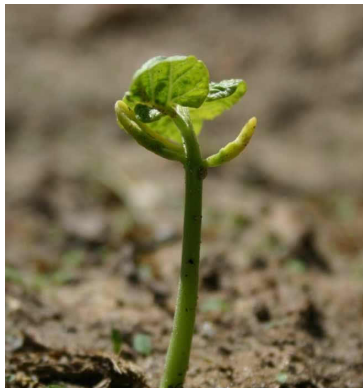
inneke@usp.br

inneke.heijden@gmail.com

OBJETIVOS DA AULA

- ▶ IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS
 - ▶ ONDE ESTÃO?
 - ▶ COMO PODEM SER TRANSMITIDAS?
- ▶ CONHECER A ESTRUTURA BÁSICA DAS BACTÉRIAS
- ▶ COMO DETECTAR E IDENTIFICAR BACTÉRIAS
 - ▶ POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS
- ▶ COMO DEFINIR SEU PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

ONDE ESTÃO OS MICRORGANISMOS?



Solo e plantas



Águas



Alimentos

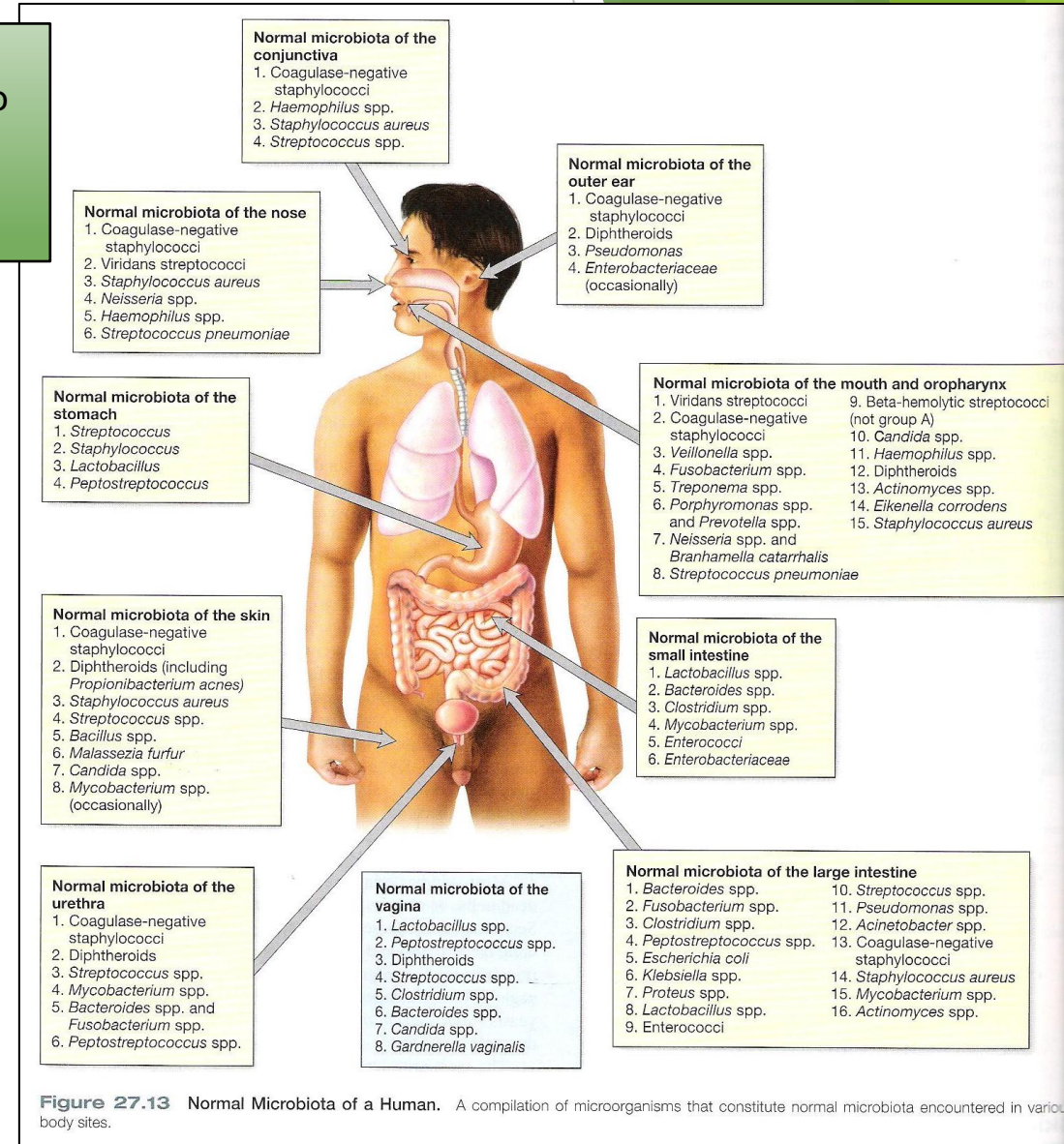
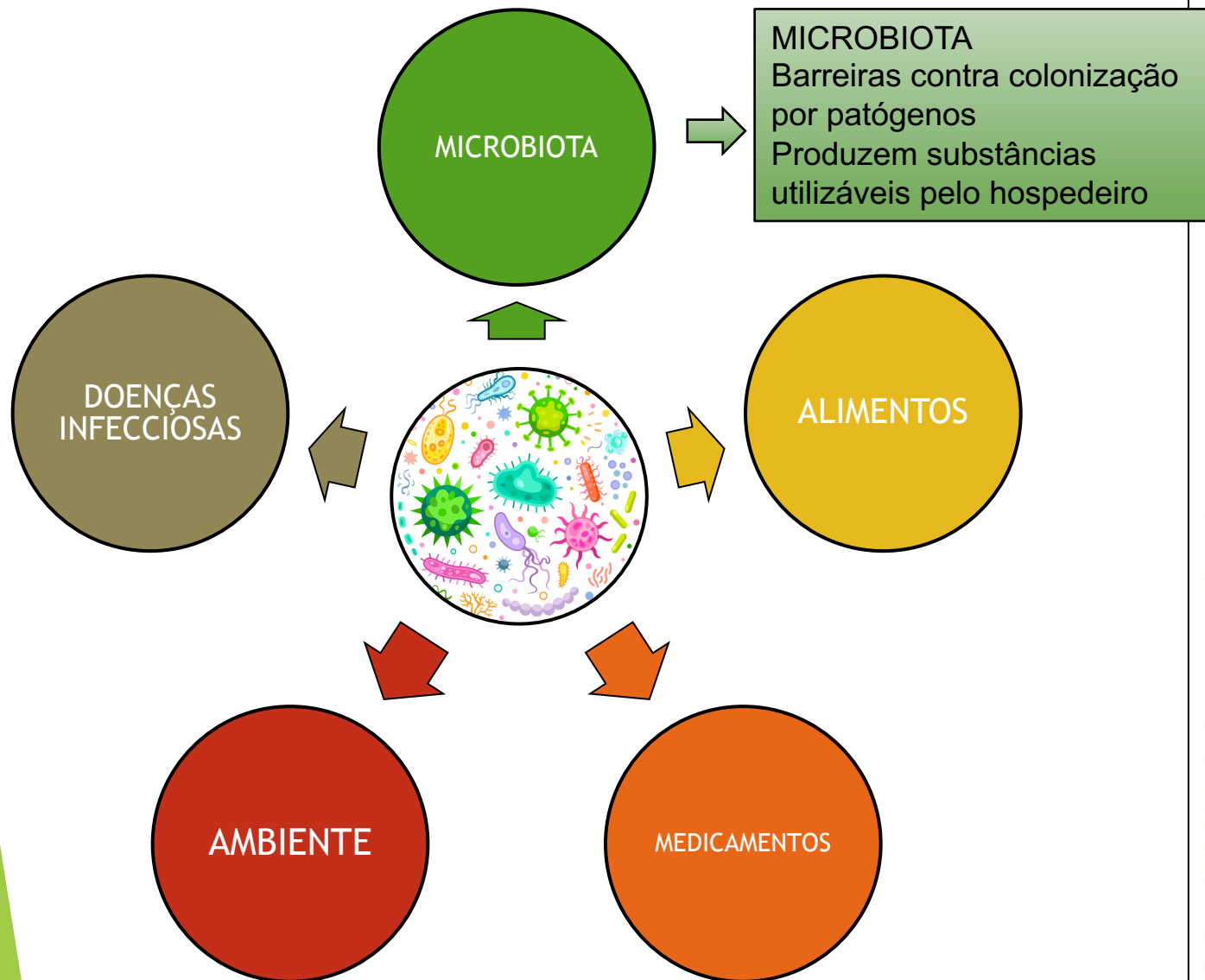


E no nosso organismo:

MICROBIOTA...



QUAL A IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS?



Microbiome

IN NUMBERS

100 Trillion

syntiotic microbes live in and on every person and make up the human microbiota

The human body has more microbes than there are stars in the milky way

95%

of our microbiota is located in the GI tract

150:1

The genes in your microbiome outnumber the genes in our genome by about 150 to one

The surface area of the **GI tract** is the same size as 2 tennis courts

You have **1.3X**

more microbes than human cells

>10,000

Number of different microbial species that researchers have identified living in and on the human body

2kg

The gut microbiota can weigh up to 2Kg



Interfacing Food & Medicine

The microbiome is more medically accessible and manipulable than the human genome

90%

It is thought that of disease can be linked in some way back to the gut and health of the microbiome

5:1

Viruses:Bacteria in the gut microbiota

2.5

The number of times your body's microbes would circle the earth if positioned end to end



Each individual has a unique gut **microbiota**, as personal as a fingerprint



- 100 trilhões de microrganismos
- 10 vezes mais células procariontes
- Mais de 10.000 espécies microbianas
- Genoma humano possui 22.000 genes
- Microbioma contribui com cerca de 8 milhões de genes
- 80-95% não cultiváveis *in vitro*

<https://www.genome.gov/27549144/>

<http://www.nih.gov/news/health/jun2012/nhgri-13.htm>

COMO OS MICROORGANISMOS SÃO TRANSMITIDOS?

DIRETA

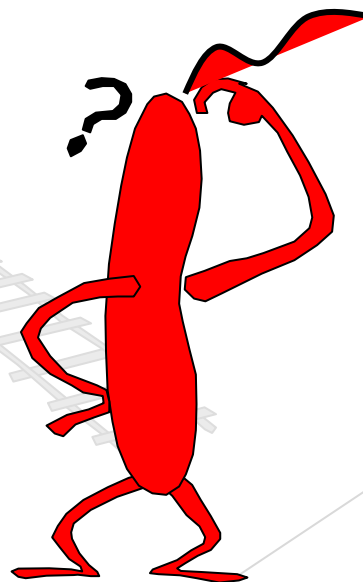
RESERVATÓRIO
↓
HOSPEDEIRO

INDIRETA

RESERVATÓRIO
↓
VEÍCULO
↓
HOSPEDEIRO

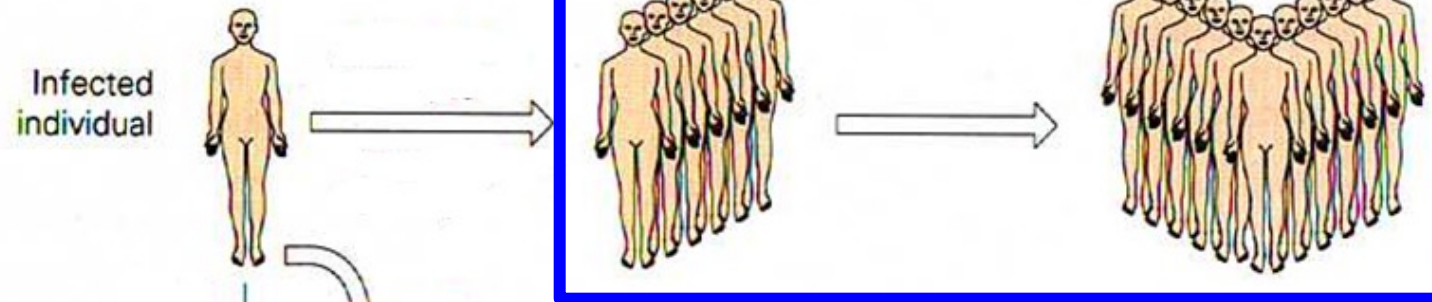
VETORES

RESERVATÓRIO
↓
VETOR
↓
HOSPEDEIRO



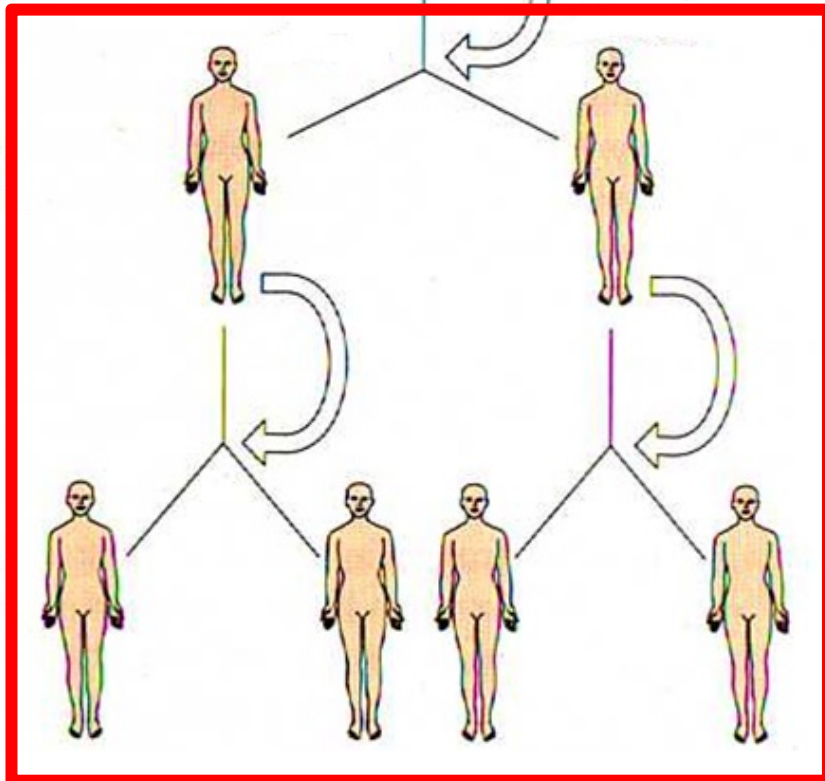
VERTICAL AND HORIZONTAL TRANSMISSION

horizontal transmission



first
generation

second
generation



vertical transmission

TRANSMISSÃO INDIRETA

FÔMITES: OBJETOS INANIMADOS

**Impressão de estetoscópio em
ágar-sangue**



**Swab do estetoscópio
depois de desinfecção
com álcool**



O QUE PRECISAMOS SABER SOBRE AS BACTÉRIAS?

COMO É A
ESTRUTURA DE
UMA BACTÉRIA?

COMO PODEMOS
DETECTAR OU
IDENTIFICAR AS
BACTÉRIAS?

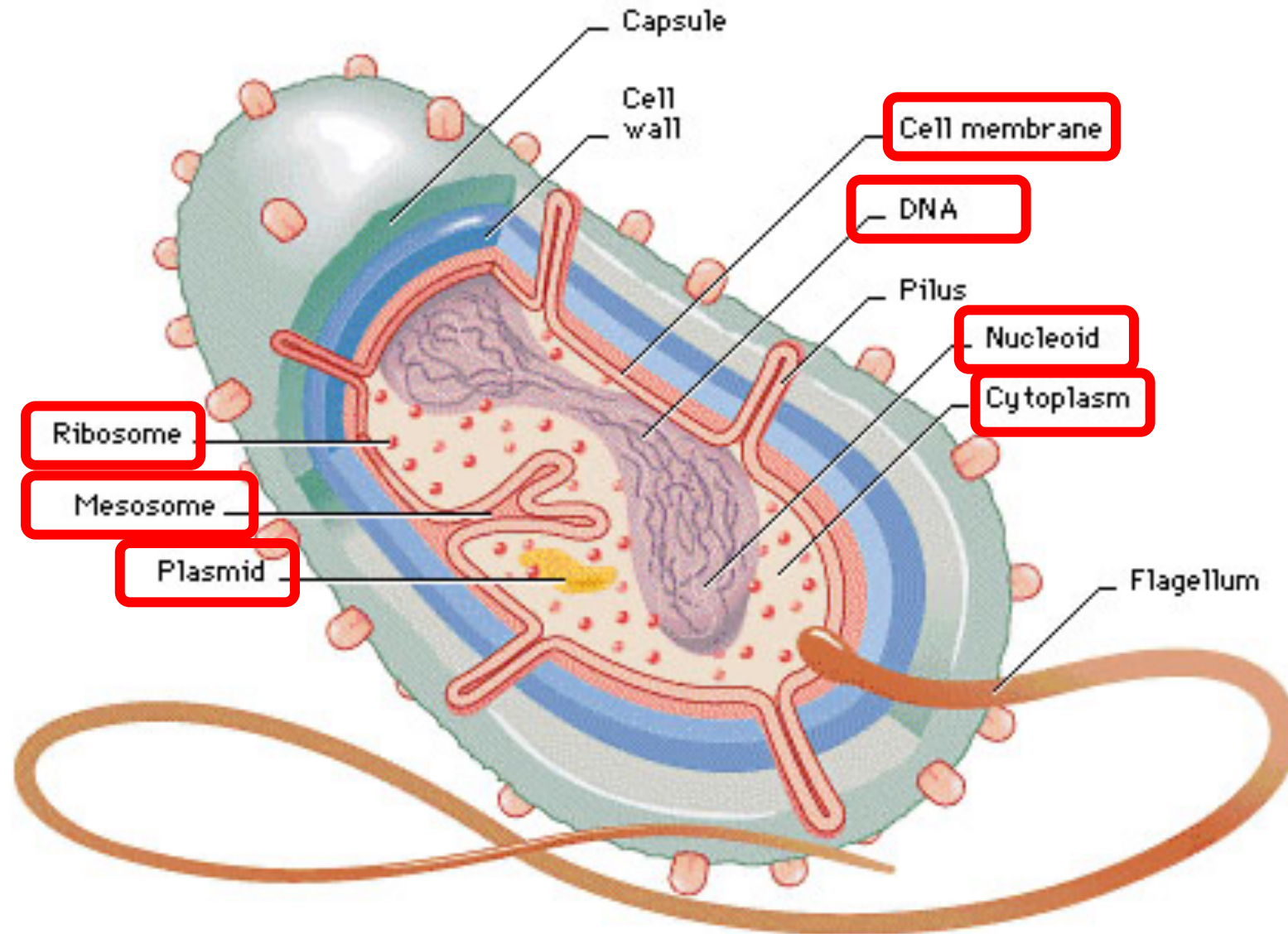


ESTRUTURA DAS BACTÉRIAS

As bactérias são células procarióticas

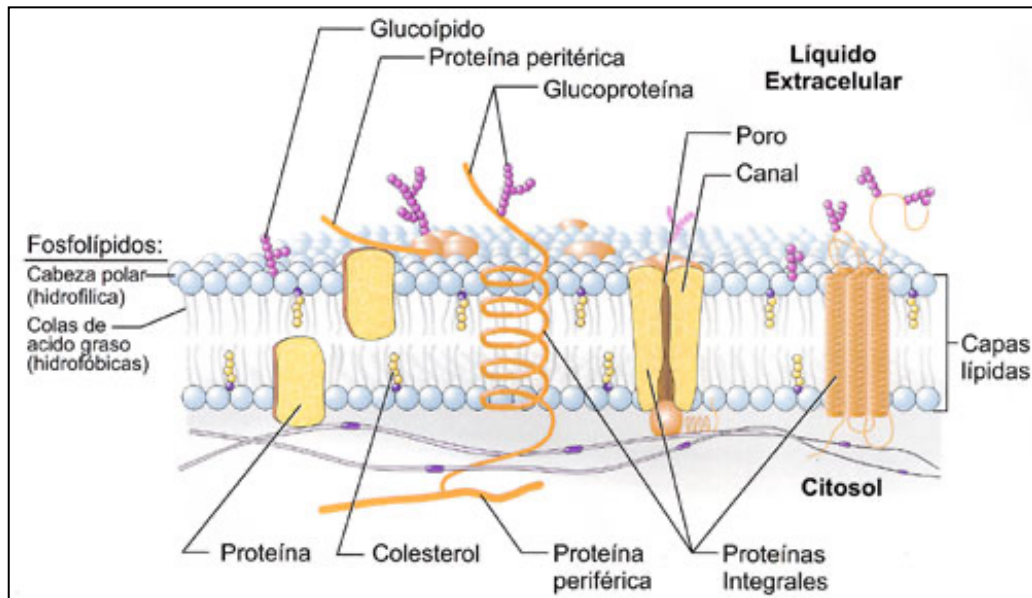
**Algumas estruturas tem importante papel na
patogênese das doenças infecciosas, conhecidas
como **fatores de virulência****

Quais são as principais estruturas das bactérias?



Membrana Citoplasmática

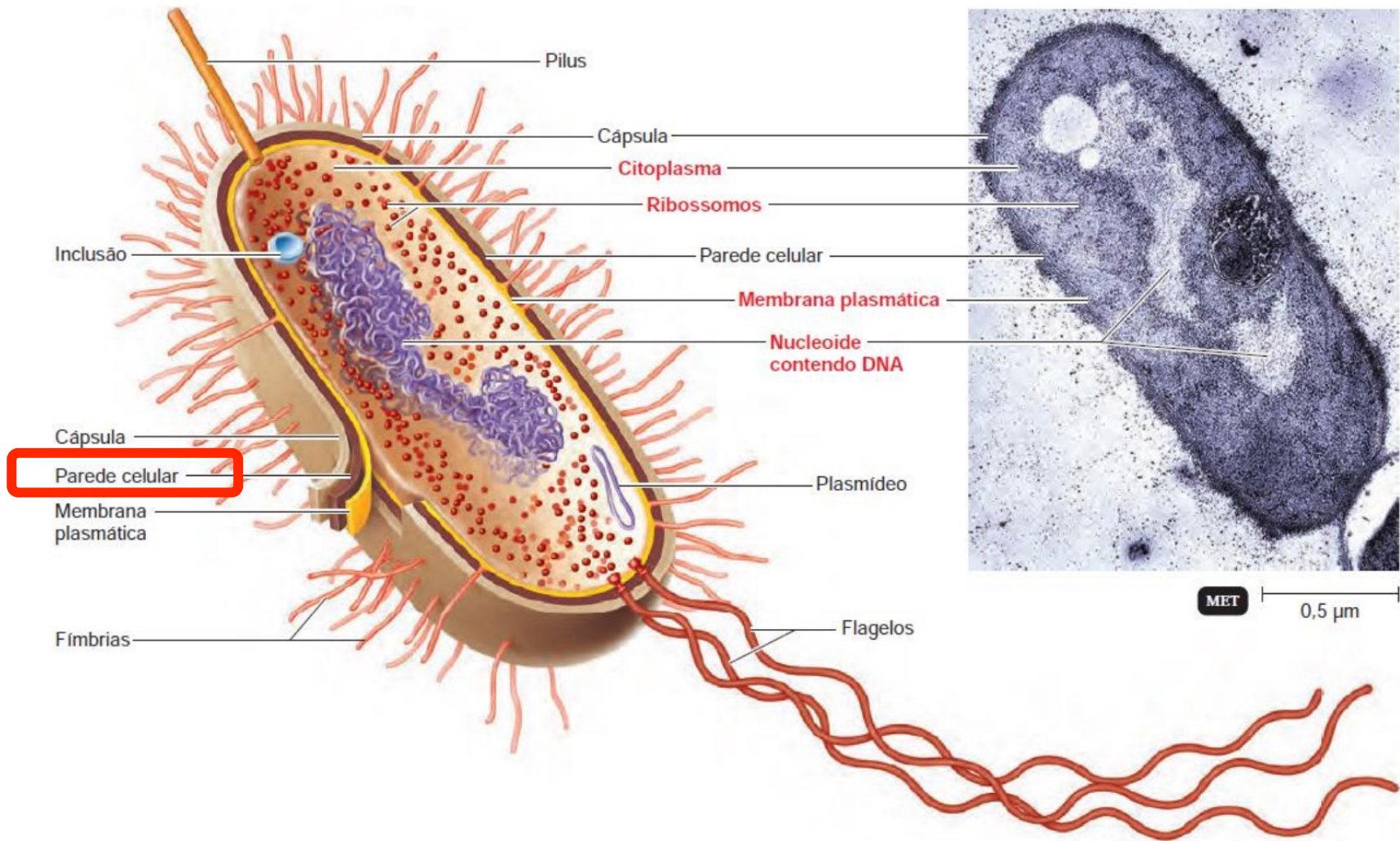
- ▶ Dupla camada de fosfolípidios
- ▶ Proteínas periféricas e integrais, podendo formar canais (**porinas**)
- ▶ Funções: trocas nutritivas, produção de energia e síntese de parede



Trocas nutritivas:
permeabilidade
seletiva ativa ou
passiva

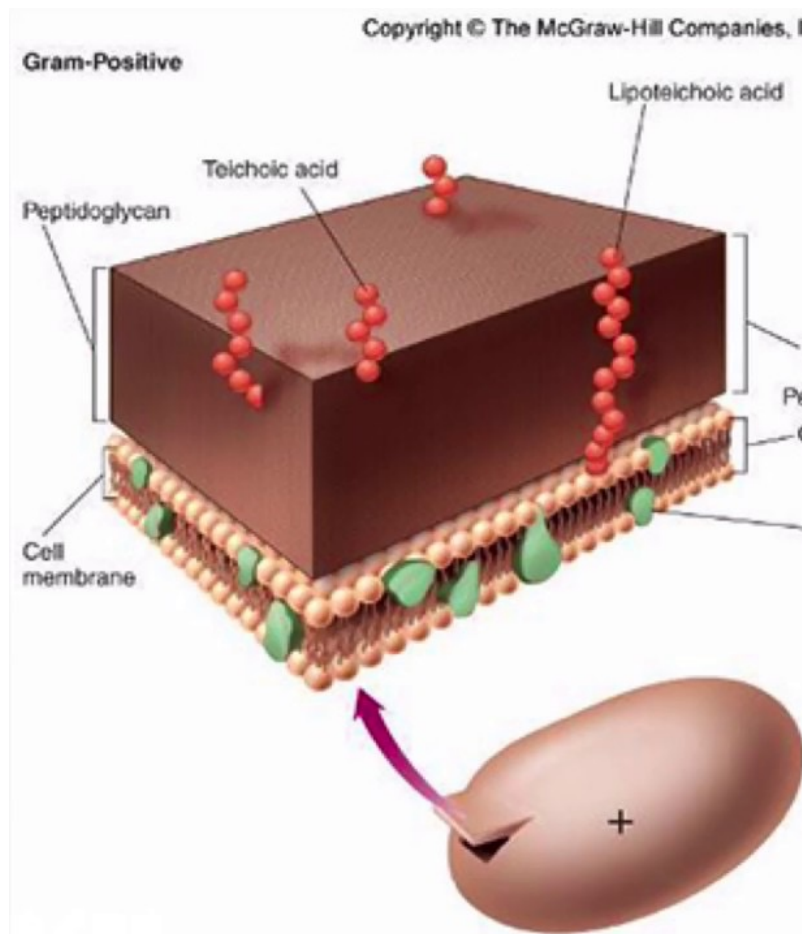
Produção energia

ESTRUTURA DAS BACTÉRIAS: PAREDE CELULAR

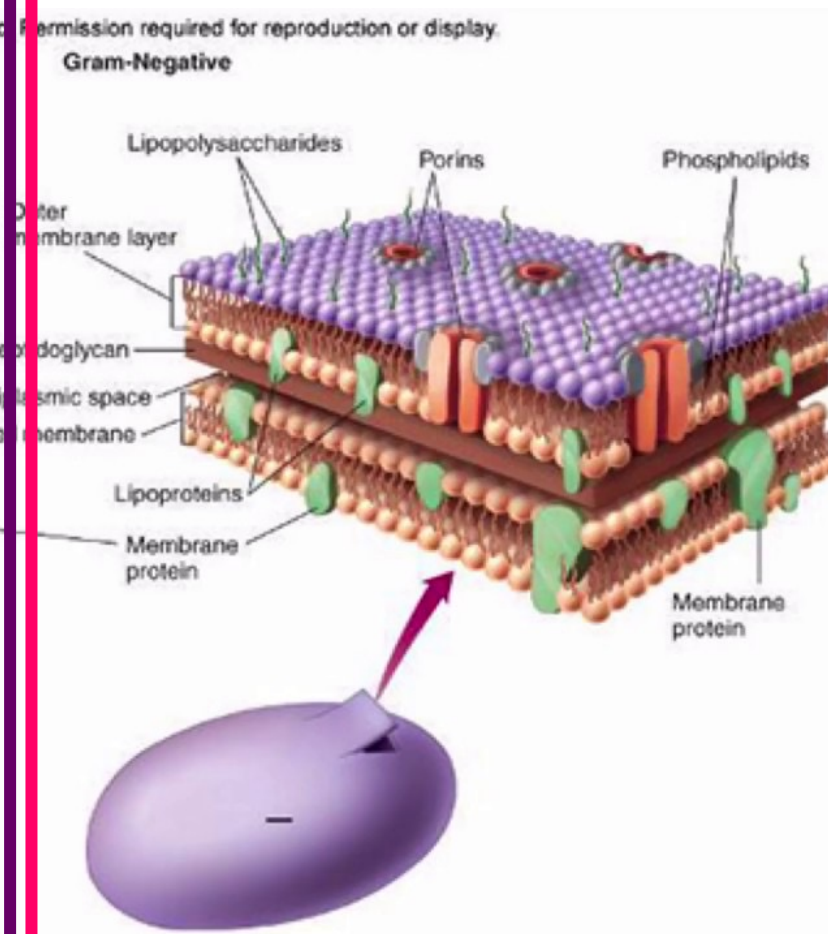


PAREDE CELULAR

Bactéria Gram-positiva

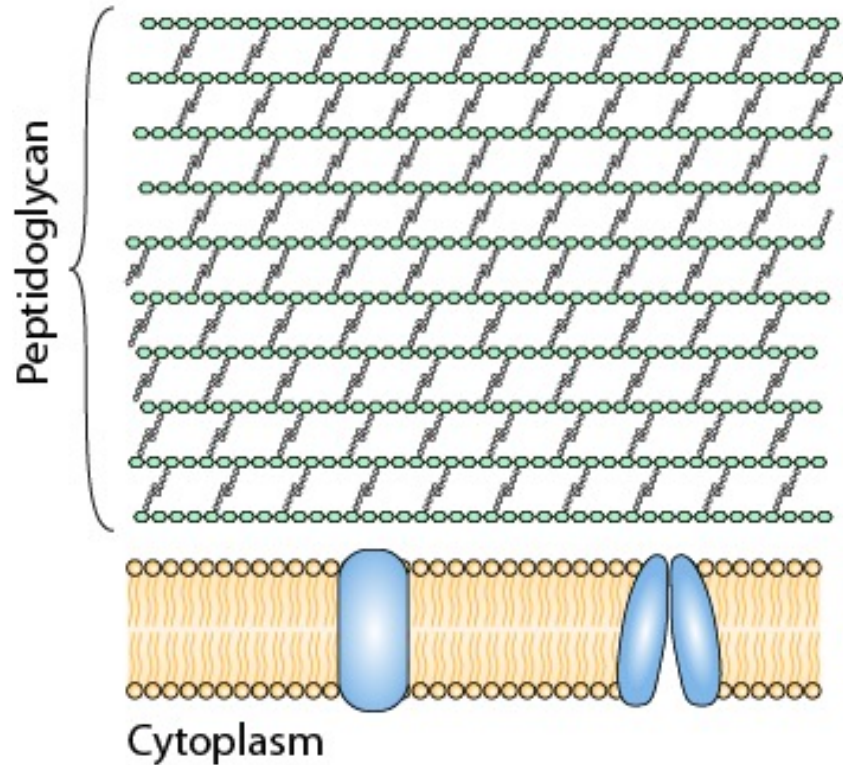


Bactéria Gram-negativa

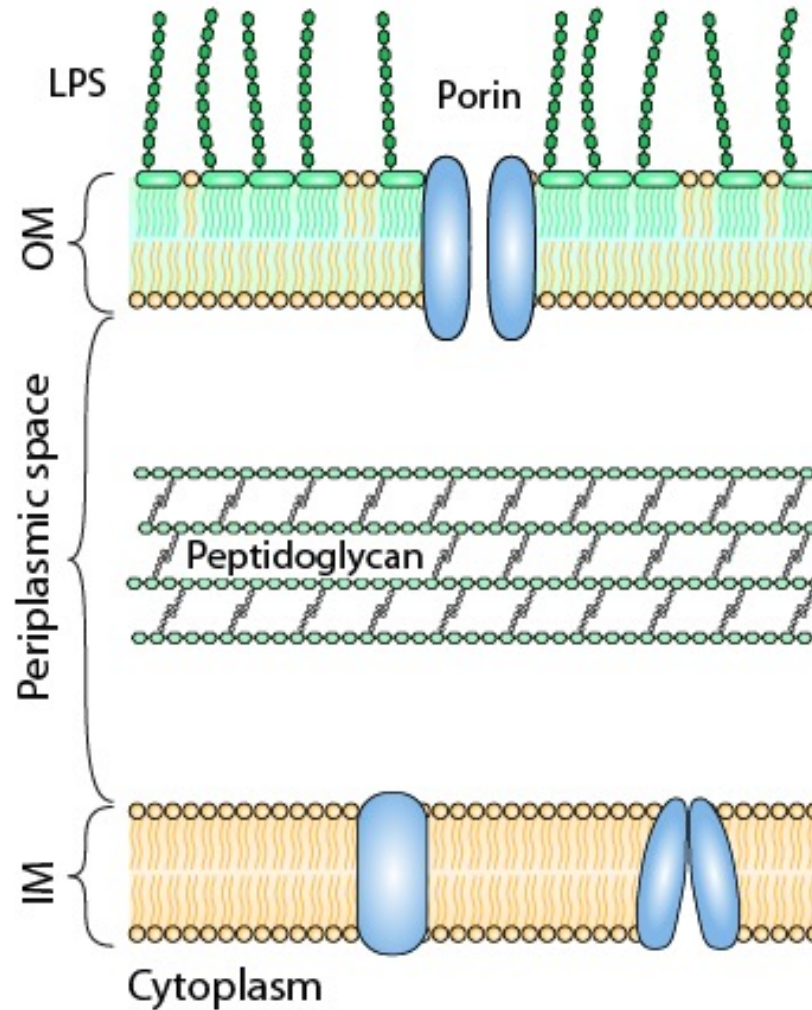


ESTRUTURA DAS BACTÉRIAS: PAREDE CELULAR

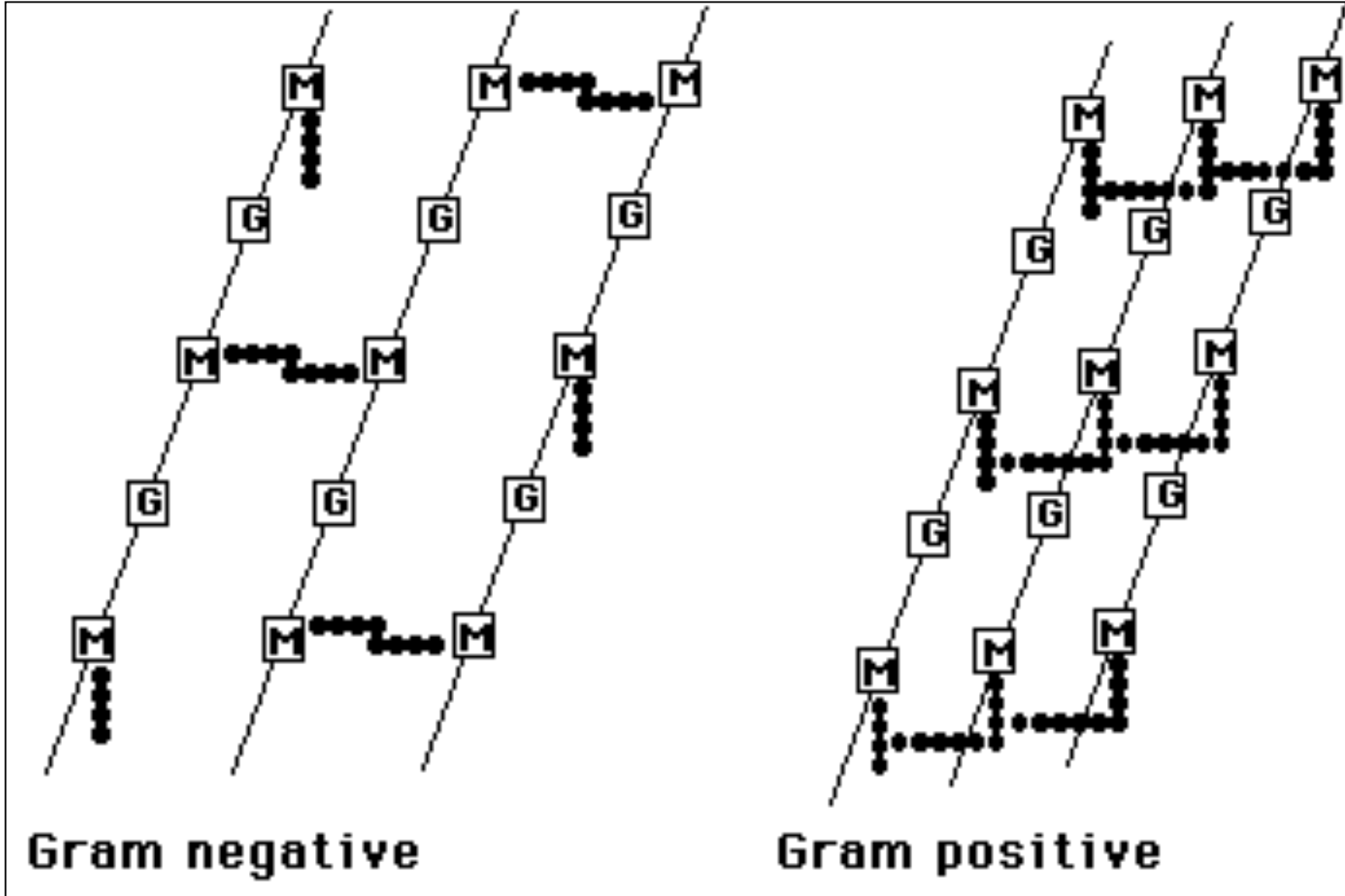
Gram-positive bacteria



Gram-negative bacteria



PEPTIDIOGLICANO



Como visualizar as bactérias?

► Coloração de Gram

- Finalidade: evidenciar os microrganismos quando observados através do microscópio óptico
- Várias etapas
- Resultados em pouco minutos

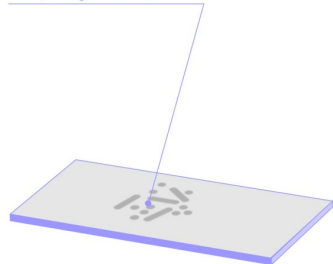
Esta técnica recebeu este nome pois foi determinada pelo bacteriologista dinamarquês
Hans Cristian J. Gram



1853-1938

1. Coloração de Gram

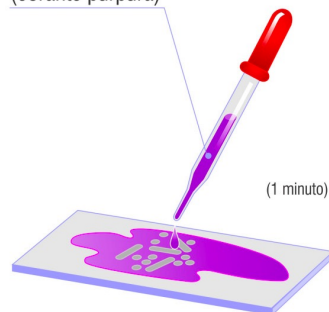
Preparação da lâmina



listop

2. Coloração de Gram

Aplicação de violeta de genciana
(corante púrpura)



(1 minuto)

lavar com água
destilada

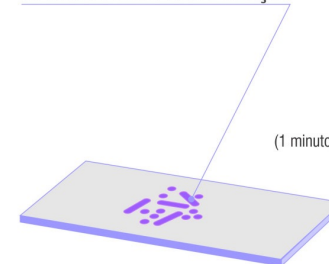


listop

3. Coloração de Gram

Aplicação de violeta de genciana
(corante púrpura)

as células absorvem a solução



(1 minuto)

lavar com água
destilada



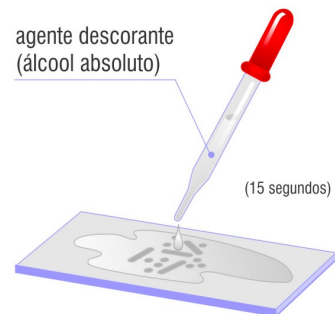
listop



6. Coloração de Gram

Lavar com agente descorante
(descoloração)

agente descorante
(álcool absoluto)



(15 segundos)

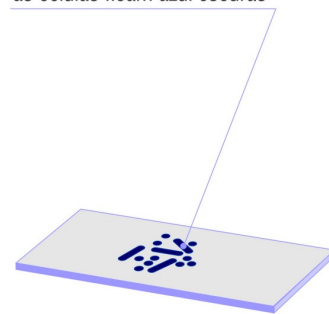
lavar com água
destilada



listop

5. Coloração de Gram

Solução de iodo (mordente)
as células ficam azul escuras



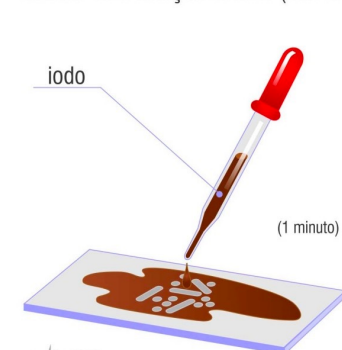
lavar com água
destilada



listop

4. Coloração de Gram

Inundar com solução de iodo (mordente)



(1 minuto)

lavar com água
destilada



listop

7. Coloração de Gram

Lavagem com álcool (descoloração)

células Gram-positivas azul escuras

células Gram-negativas
sem cor



lavar com água
destilada

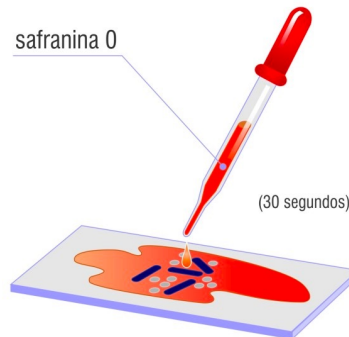
listop



8. Coloração de Gram

Aplicação de agente contrastante
(contracorante)

safranina 0



lavar com água
destilada



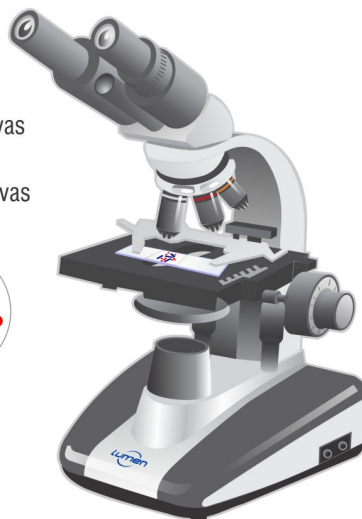
listop



10. Coloração de Gram

Observar no
microscópio

- células Gram-positivas
azul escuras
- células Gram-negativas
vermelhas



listop

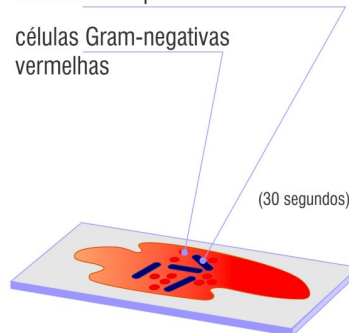


9. Coloração de Gram

Aplicação de agente contrastante

células Gram-positivas azul escuras

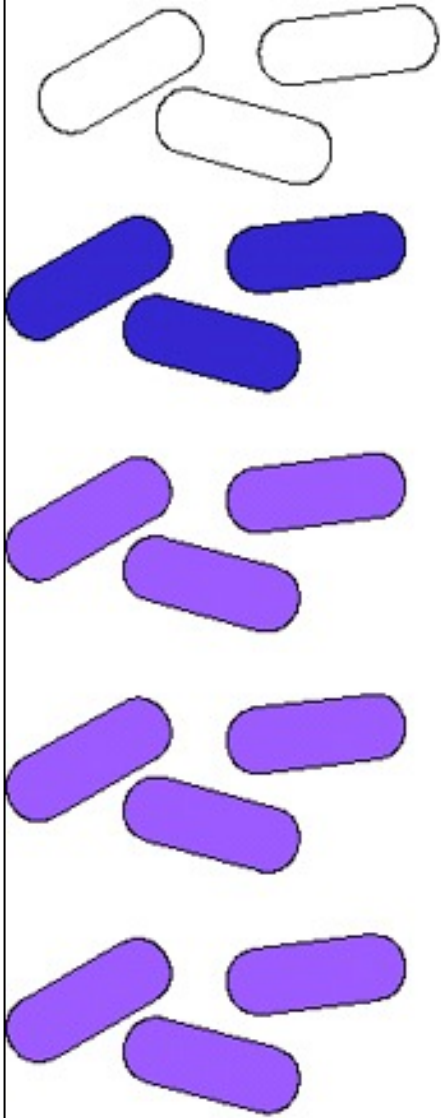
células Gram-negativas
vermelhas



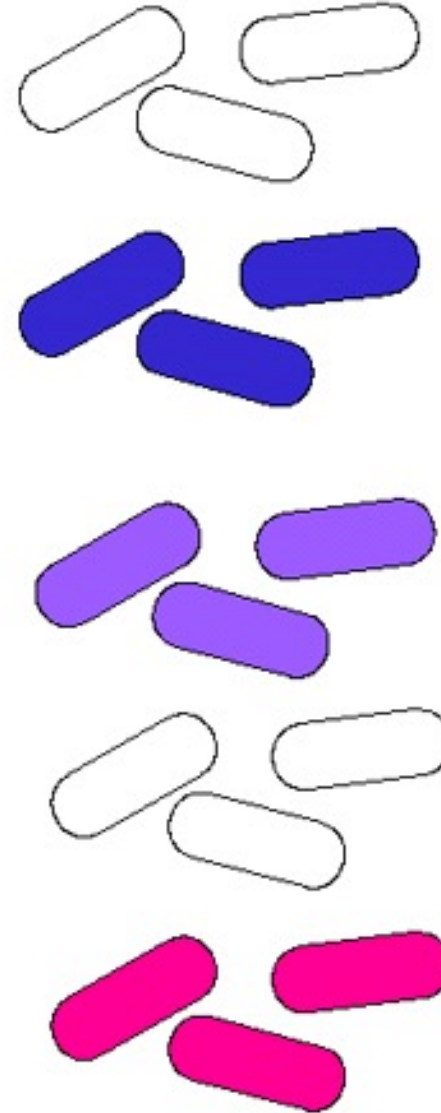
lavar com água
destilada

listop

Gram Positive



Gram Negative



Fixation



Crystal violet



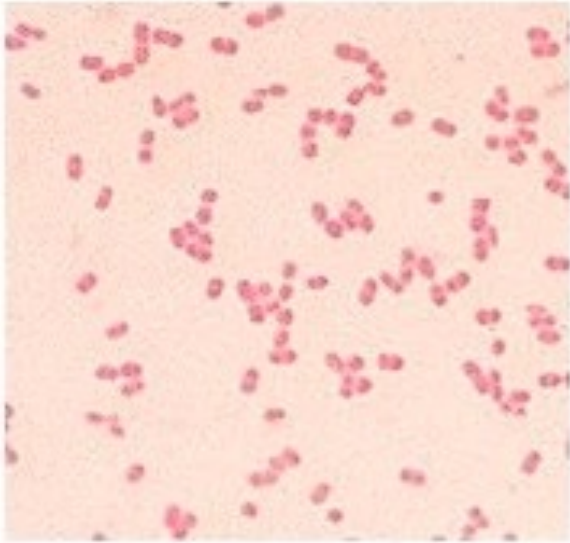
Iodine treatment



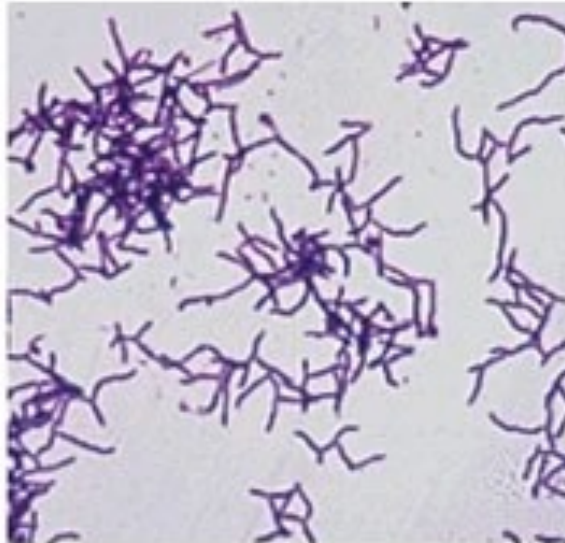
Decolorization



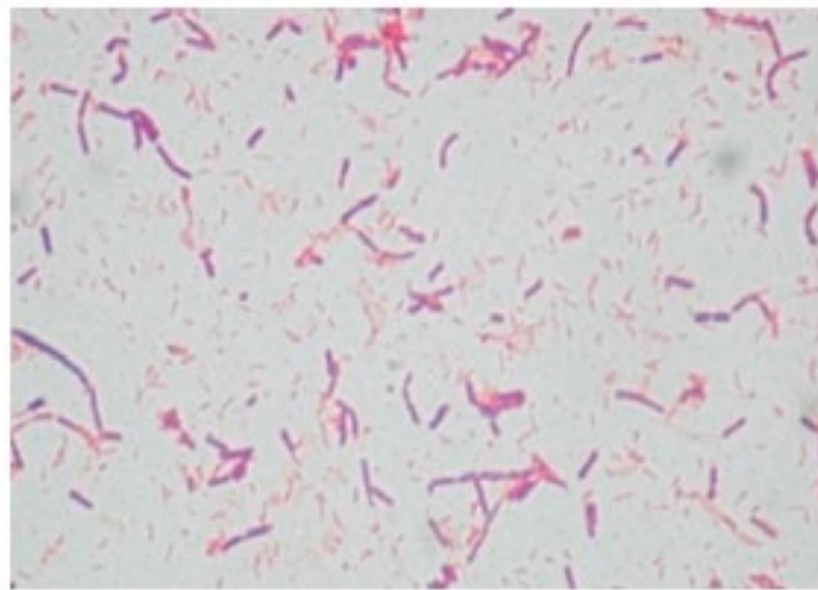
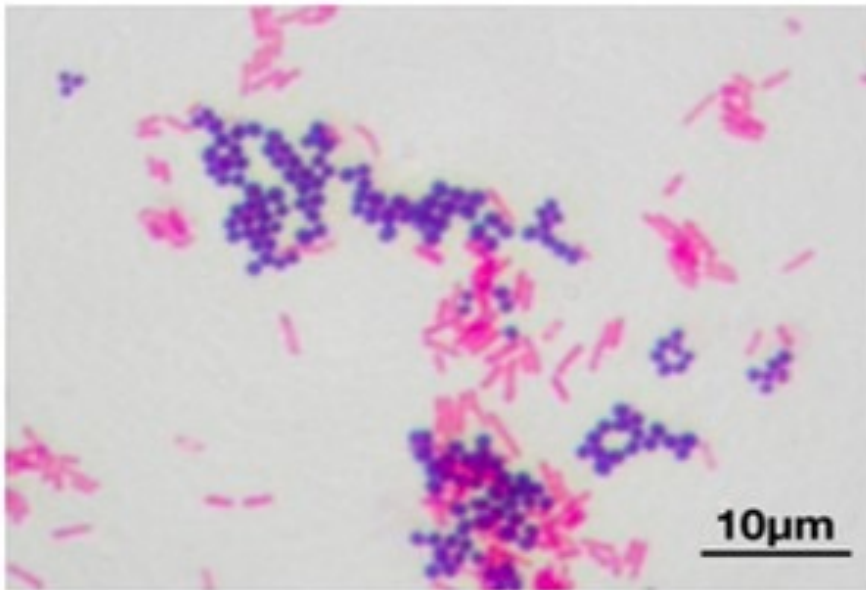
Counter stain
safranin



Gram-negative



Gram-positivo

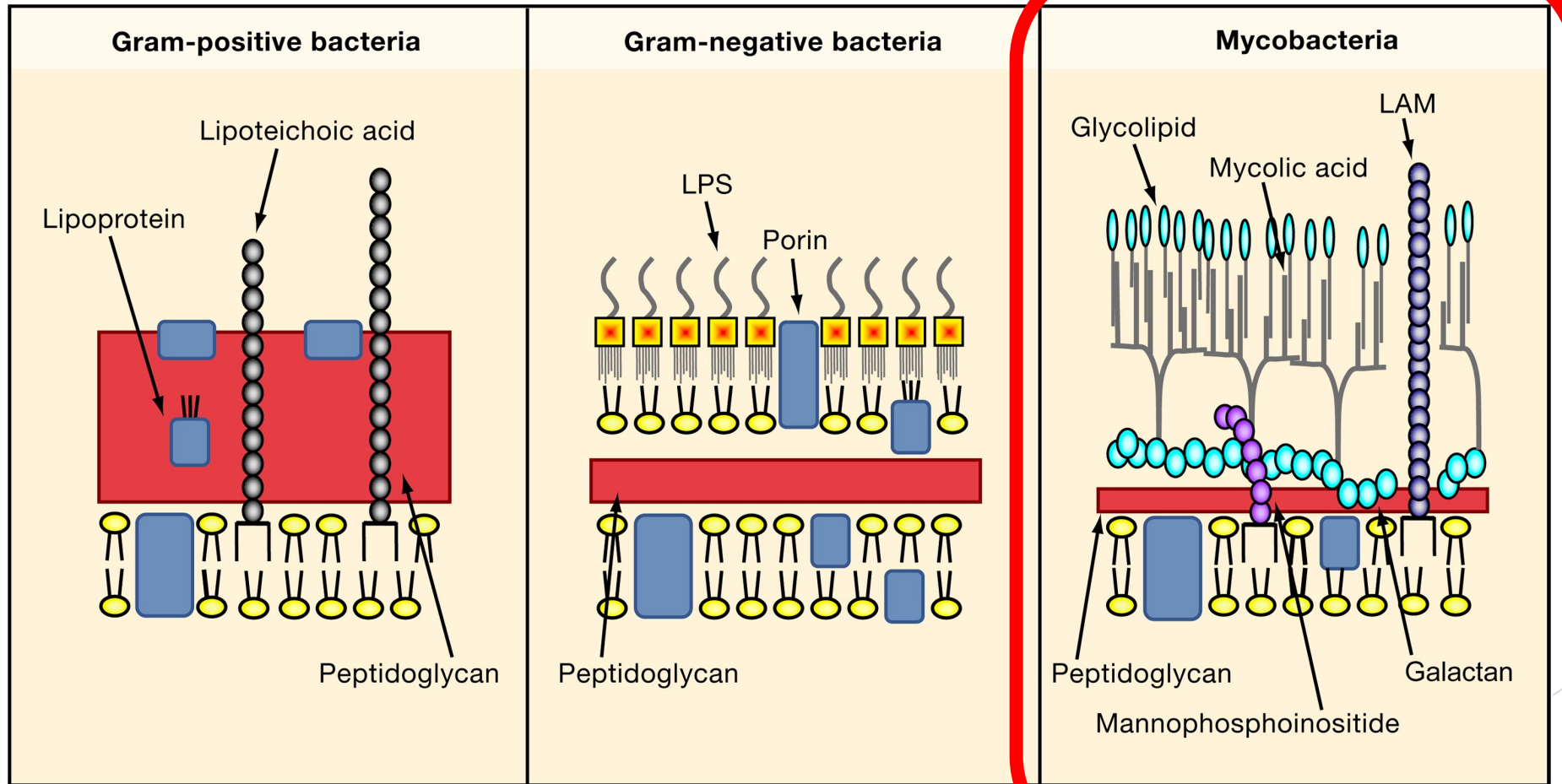


MAS NEM TODAS AS BACTÉRIAS PODEM SER OBSERVADAS COM A COLORAÇÃO DE GRAM...

- ▶ Bactérias Gram-negativas ✓
- ▶ Bactérias Gram-positivas ✓
- ▶ Bactérias Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) ✗
 - ▶ Micobactérias

ESTRUTURA DAS BACTÉRIAS

PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS



BACTÉRIAS ÁLCOOL-ÁCIDO-RESISTENTES

- Camada grossa de peptidoglicano e de ácidos micólicos
- Camada de glicolipídeos

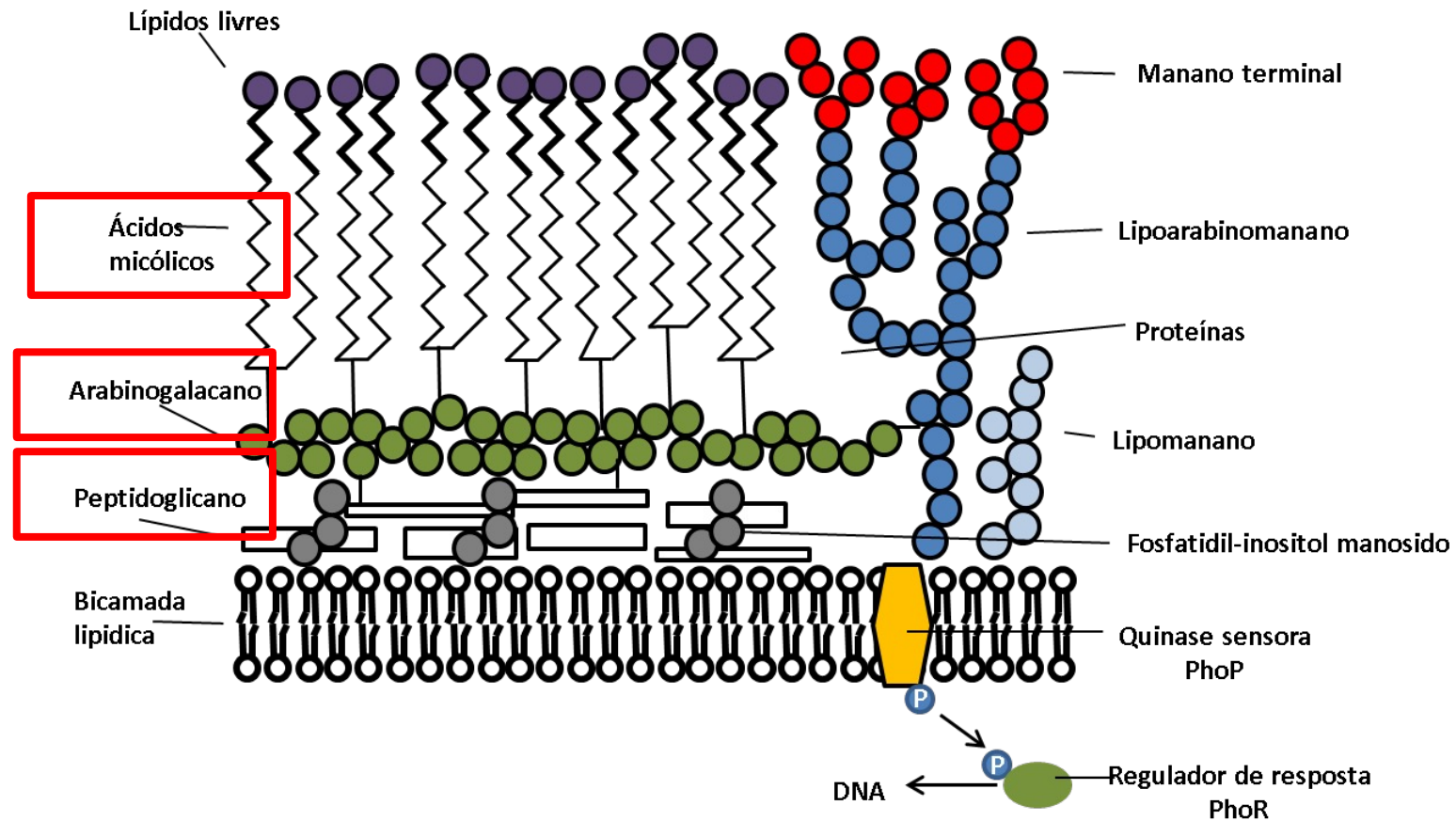


Figura 1. Representação esquemática da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Modificado de Park e Bendelac, 2000.

COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN

BAAR

Outras bactérias

Fixar esfregaço



Corar com fucsina fenicada
▲ Emissão de vapores



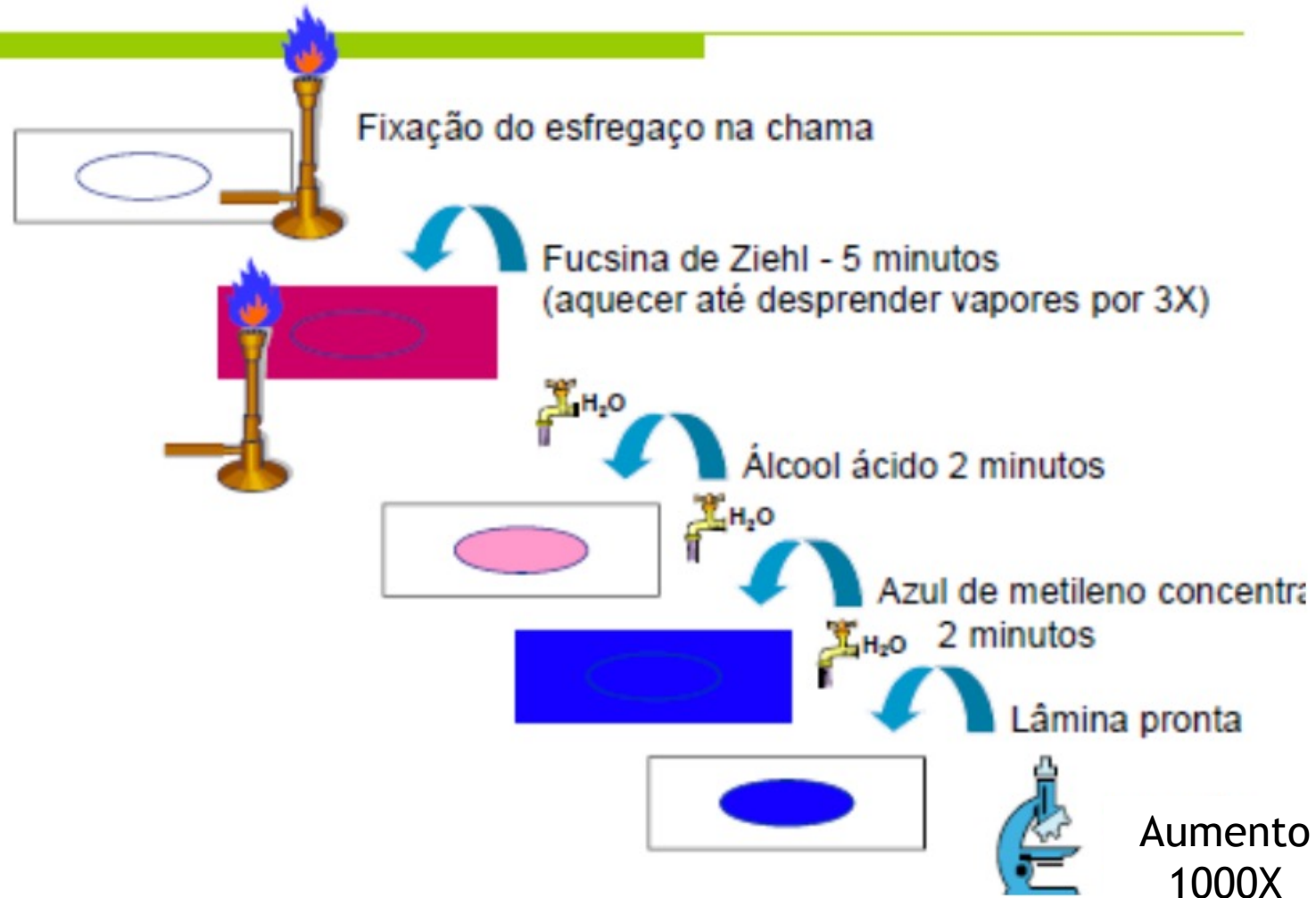
Descorar com álcool-ácido

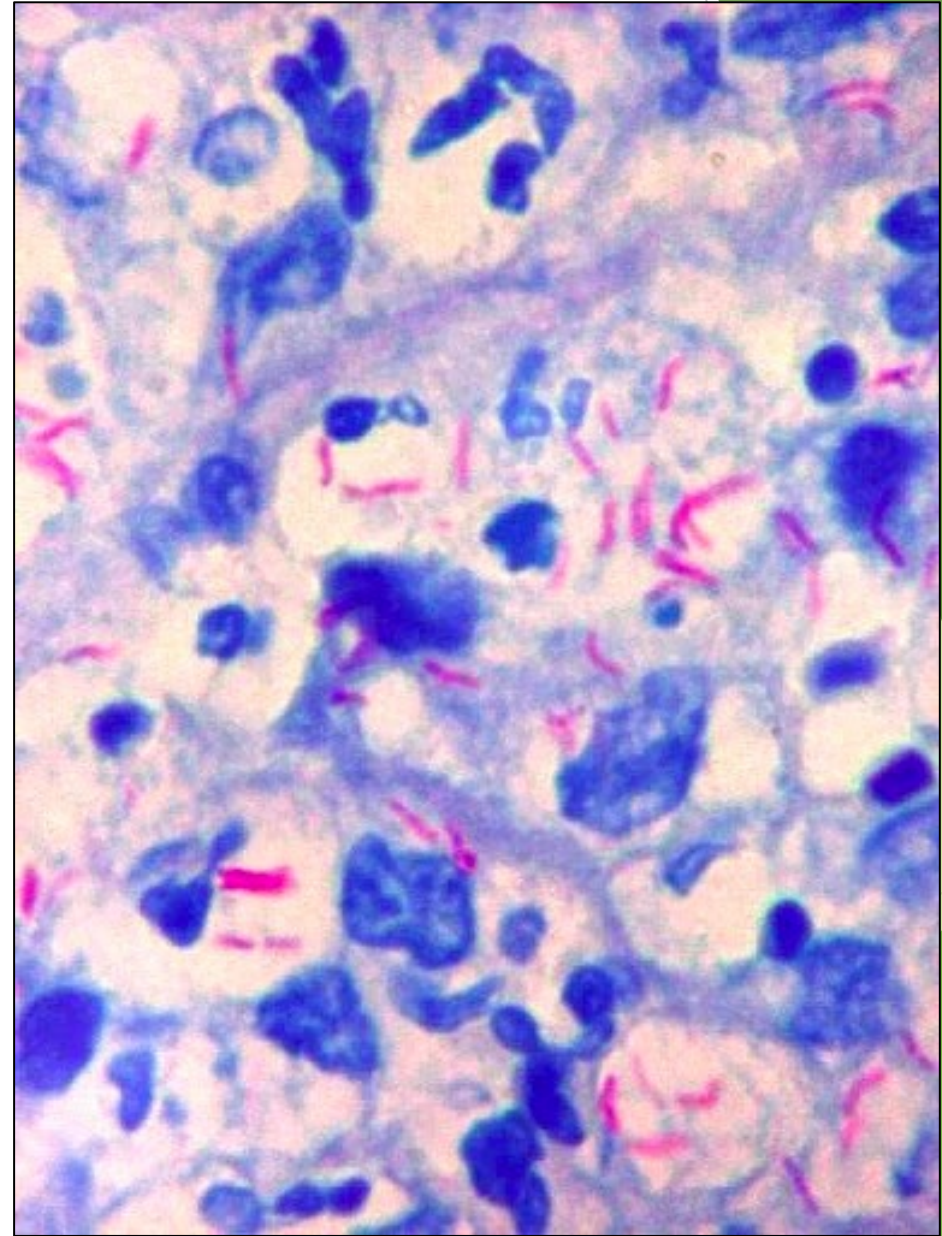
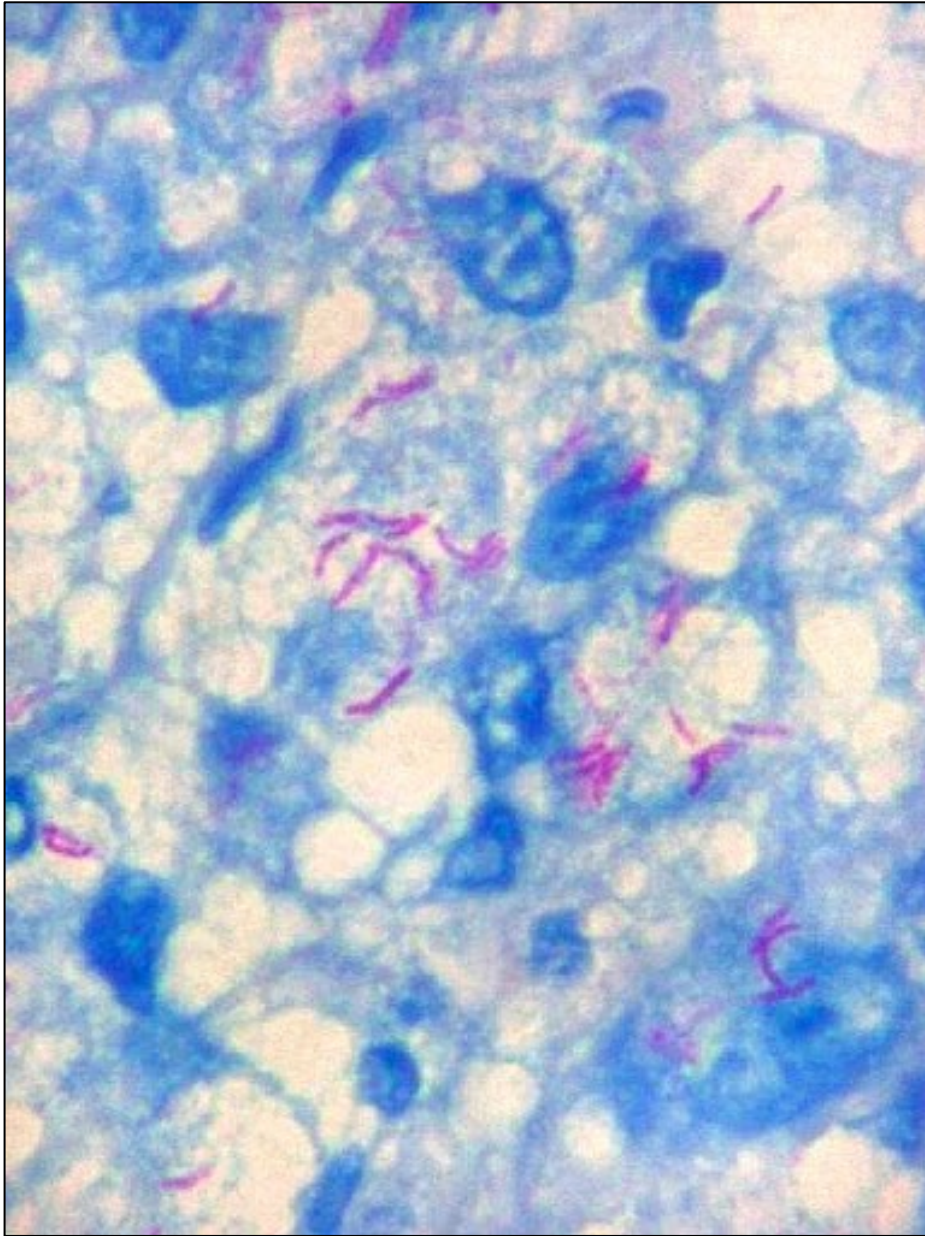


Corar com azul de metileno

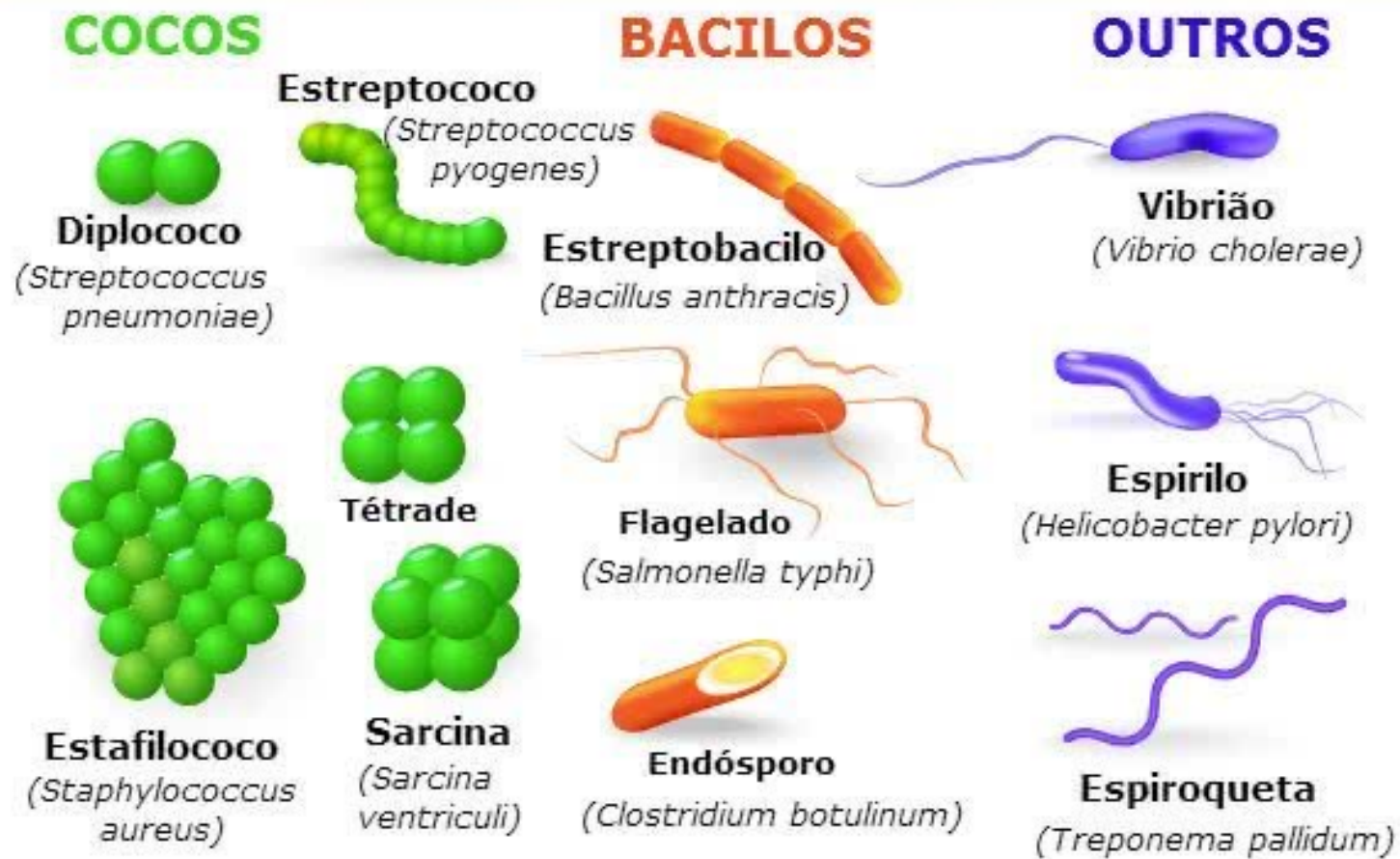


Coloração de Ziehl-Neelsen

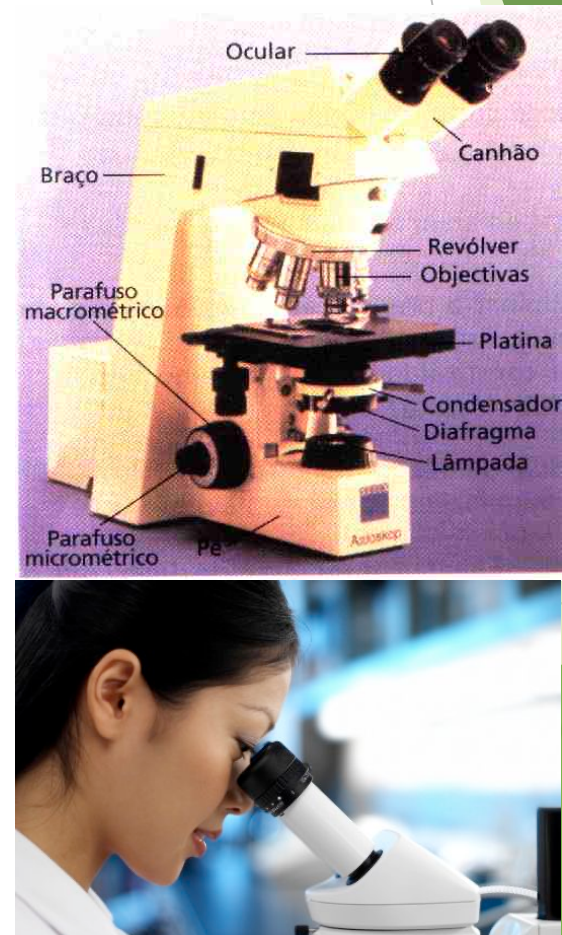




Na microscopia, também é possível verificar a morfologia das bactérias...

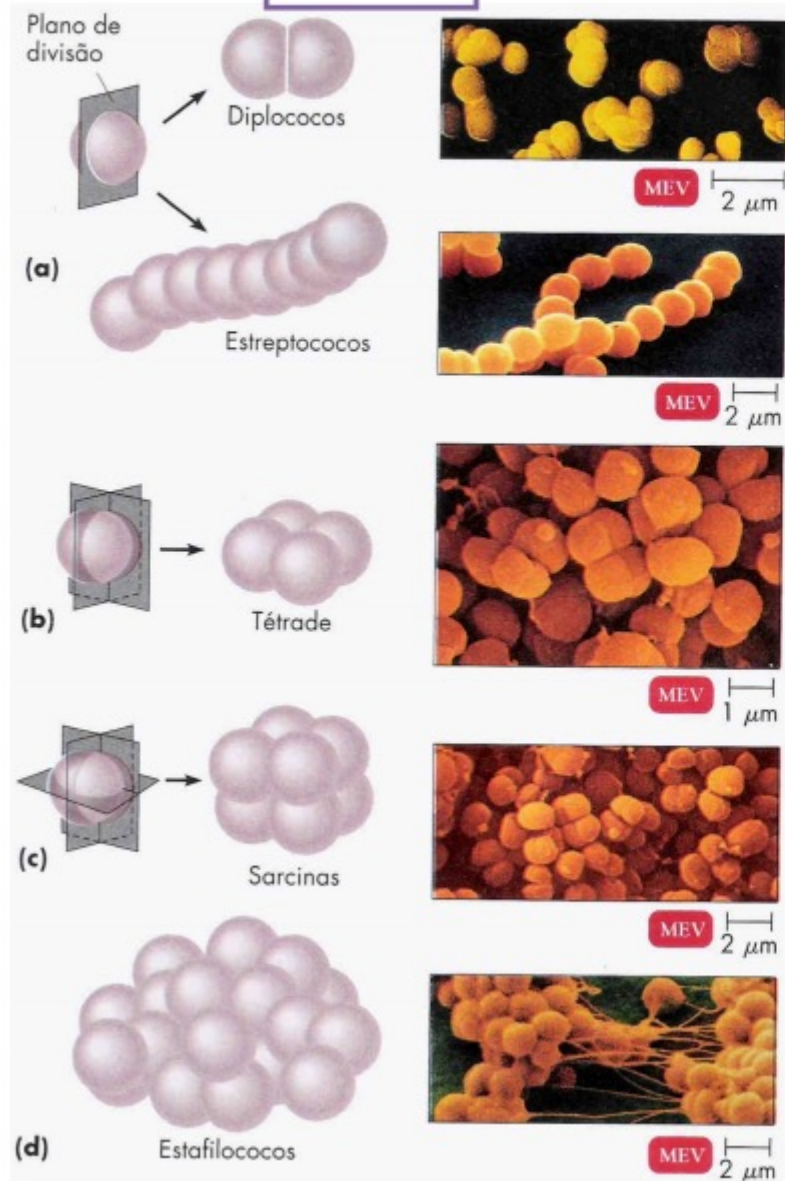


Microscopia de imersão
Aumento de 1000X

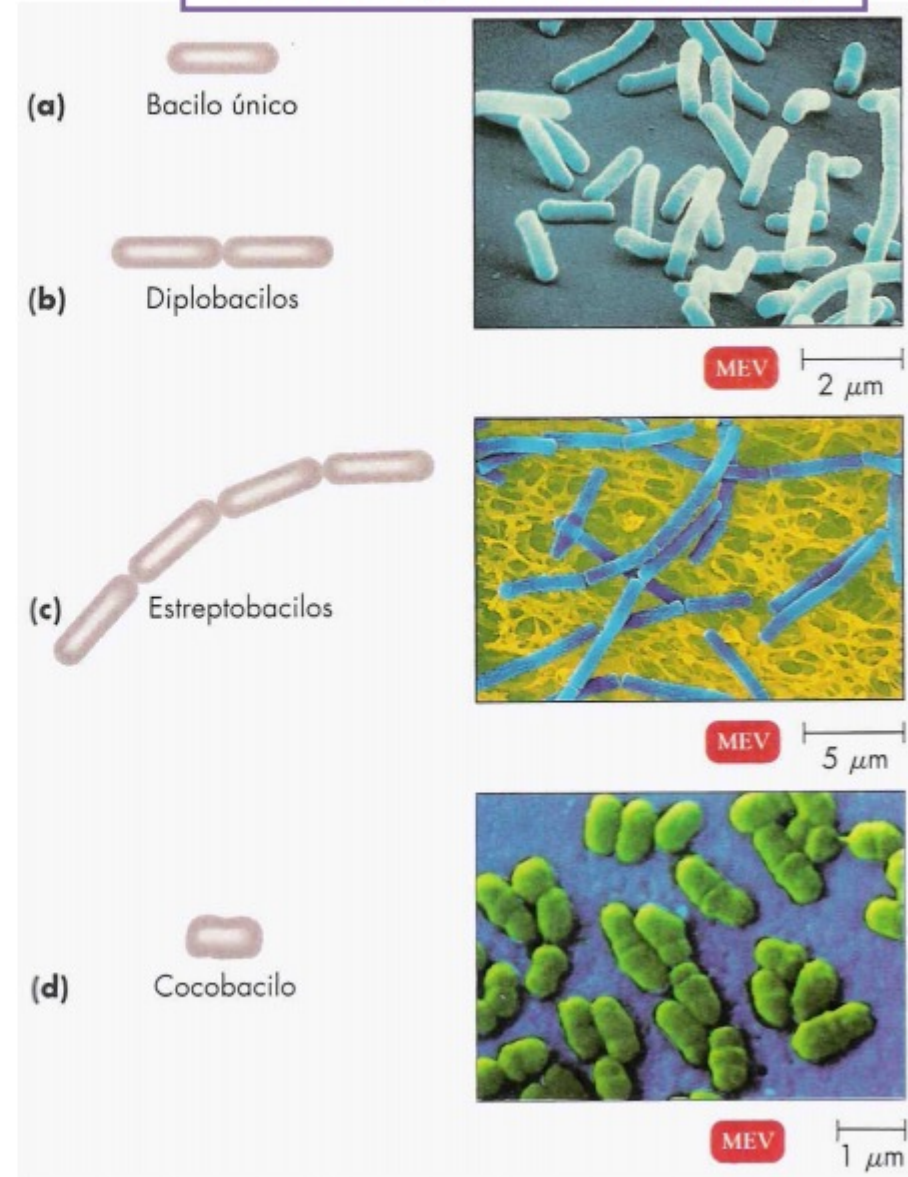


Morfologia celular: Forma e arranjo

Coco



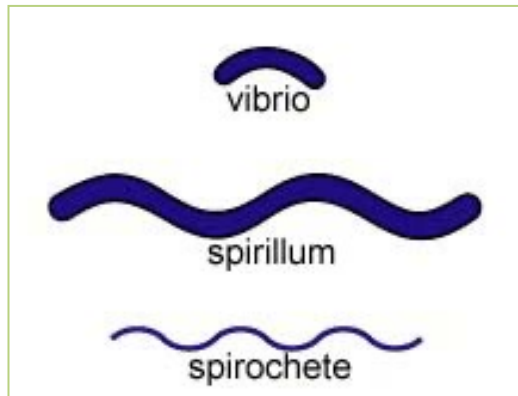
Bacilo (ou bastonete)



ESPIRALADAS

(possuem uma ou mais curvaturas)

- ▶ Vibriões: ligeiramente curvos
- ▶ Espirilos: forma helicoidal e corpo rígido
- ▶ Espiroquetas: forma helicoidal e corpo flexível



Espiral

(a) Vibrião



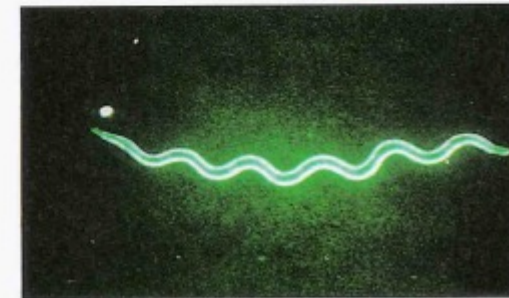
MEV 4 μm

(b) Espirilo



MEV 2 μm

(c) Espiroqueta



MEV 1,5 μm

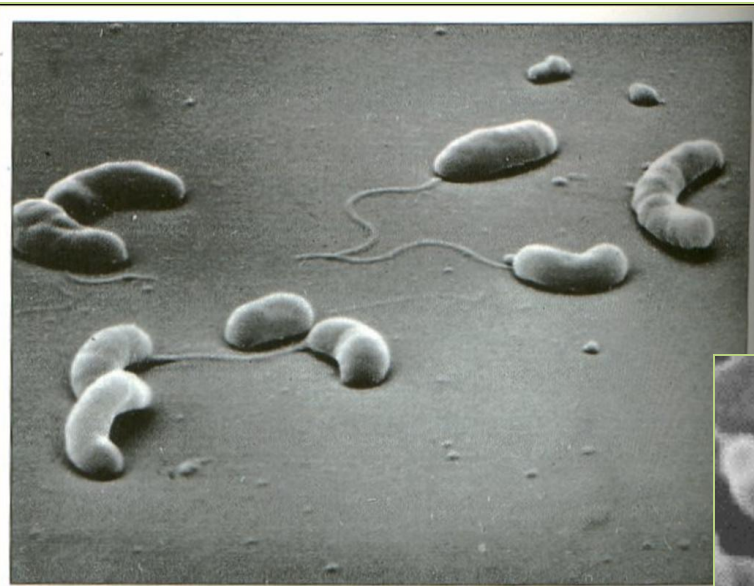
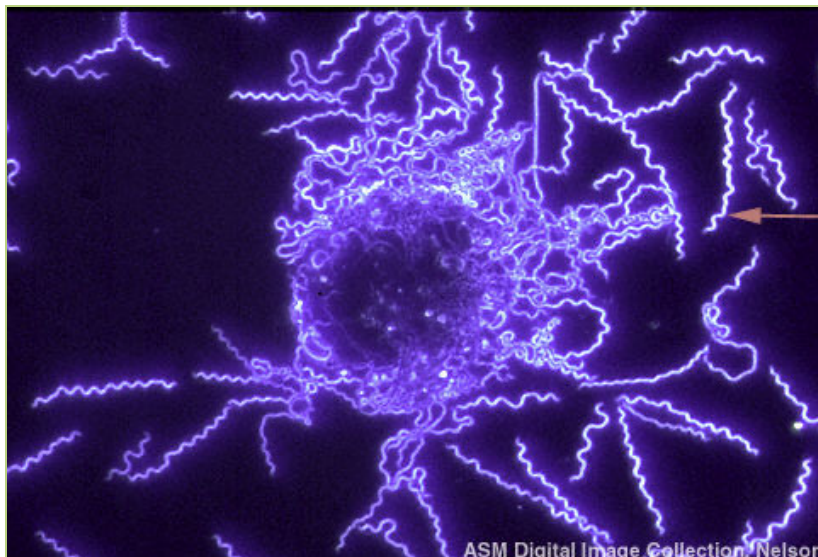
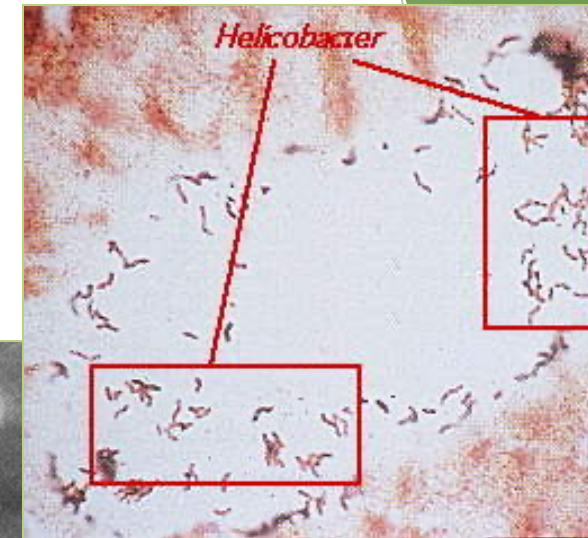
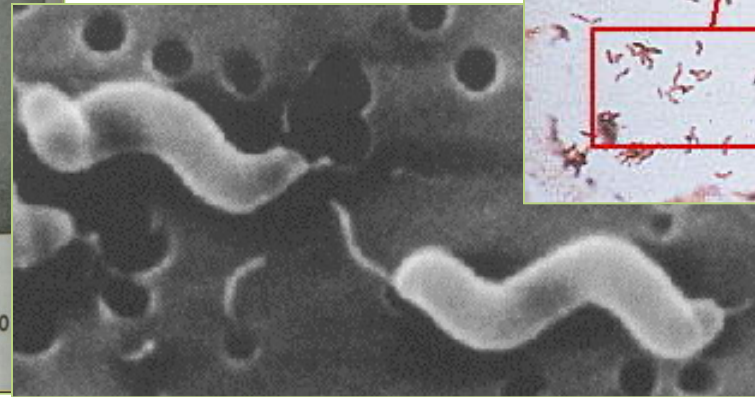


Fig. 25.16 Micrografia eletrônica de varredura de *Vibrio cholerae* mostrando bacilos em forma de vírgula e flagelo polar único. x13 000. Cortesia de DK Banerjee.

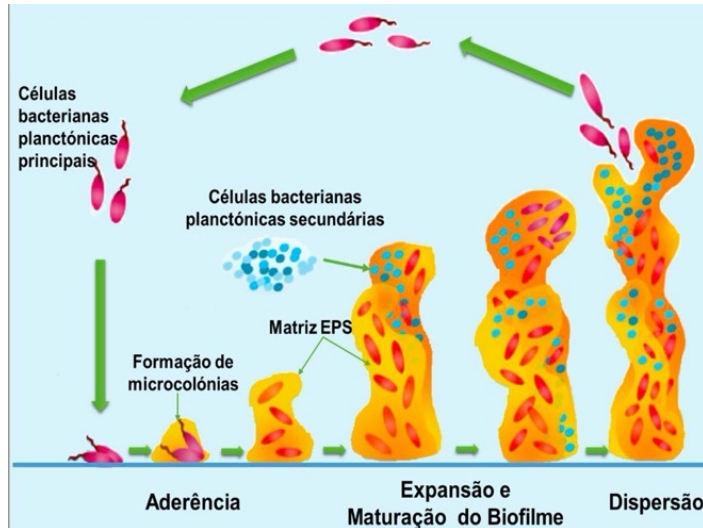
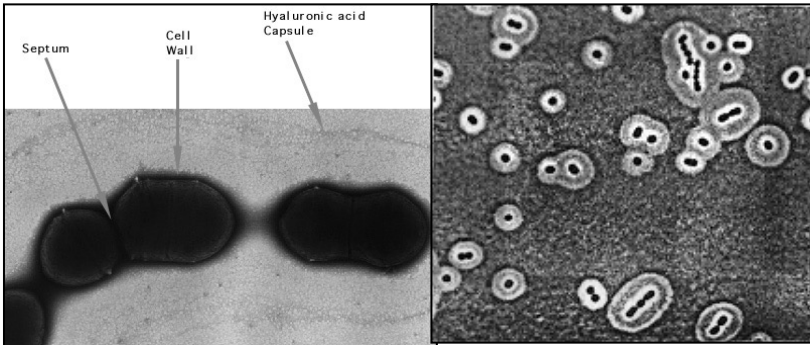


Outras estruturas importantes das bactérias

GLICOCÁLICE (Cápsula e *Slime*)

► Funções

- Proteção contra a fagocitose
- Fixação da bactéria no ambiente
- BIOFILME

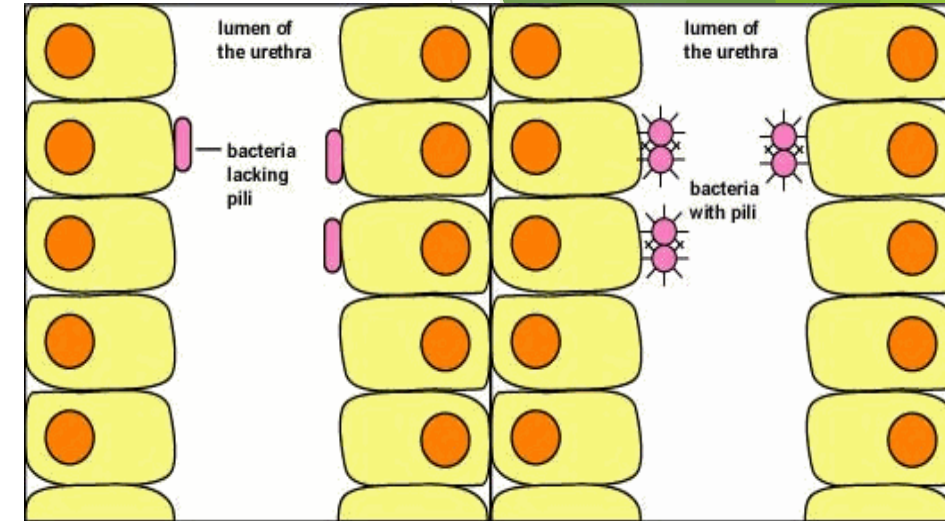
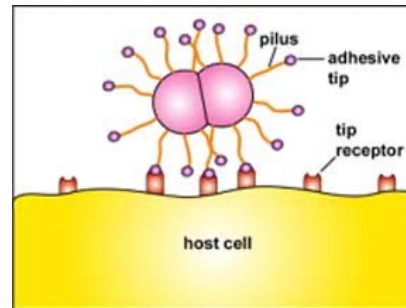


FÍMBRIAS OU PÊLOS

► Existem 2 tipos

1. ADESÃO

Fator de Colonização
Finos e Curtos

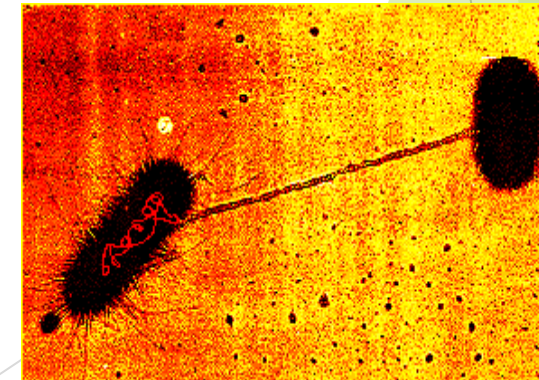


Exemplo: fímbrias de adesão de *Neisseria gonorrhoeae*
(doença: Gonorréia)

2. CONJUGAÇÃO

FÍMBRIA SEXUAL

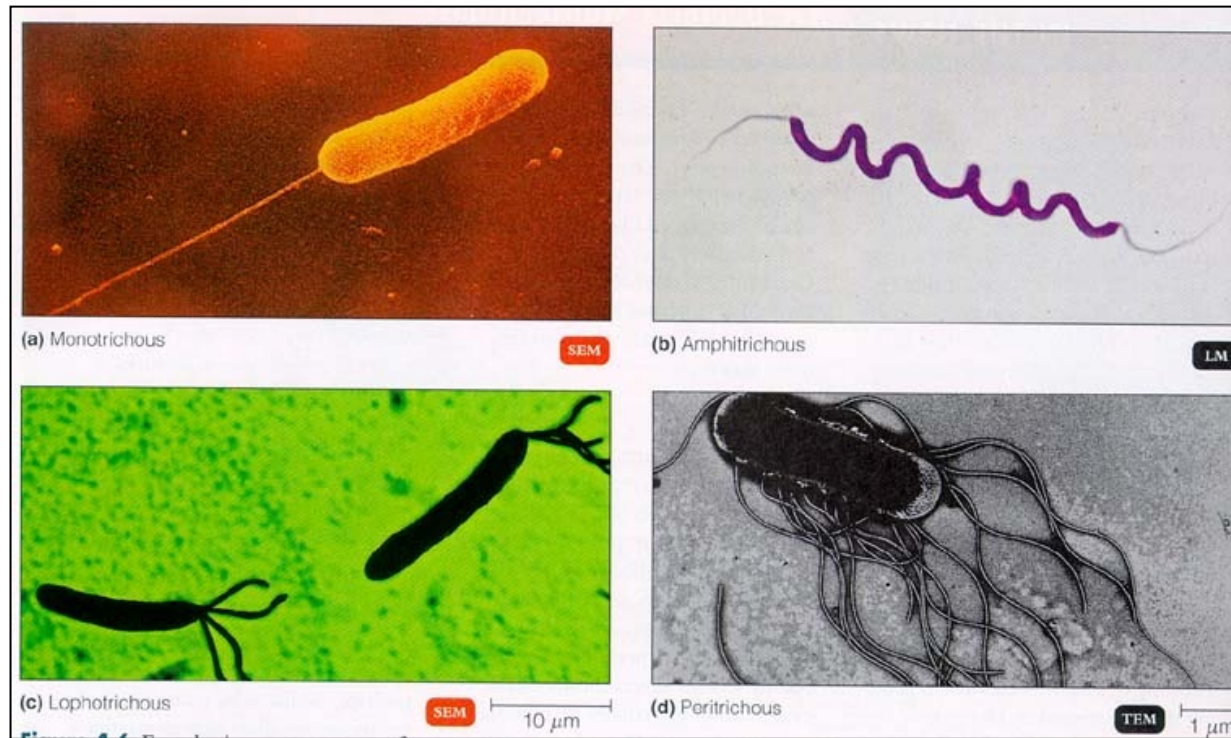
Finos e longos
Transferência de material
genético



Flagelos

Permite a motilidade bacteriana

Favorecendo sua invasão em tecidos



FILAMENTOS AXIAIS

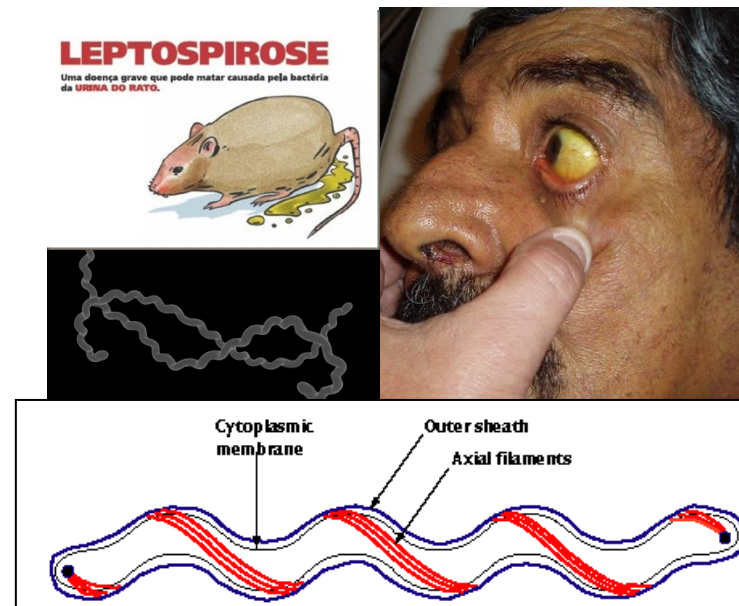
Endoflagelos que permitem movimento de saca-rolhas

Característico das espiroquetas

Exemplos:

Leptospirose - *Leptospira interrogans*

Sífilis - *Treponema pallidum*



Outras estruturas importantes das bactérias

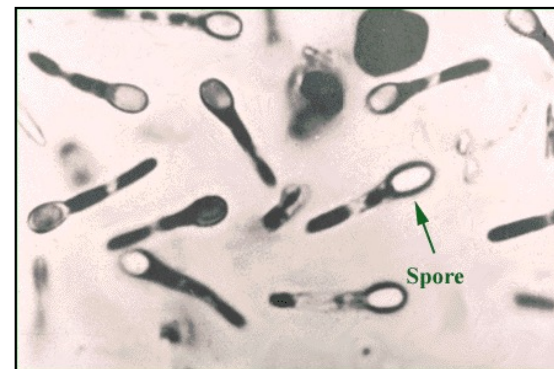
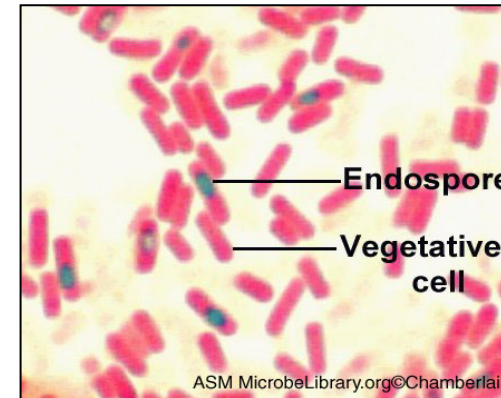
ESPOROS (ou endosporos)

- ▶ Produzidos por alguns bacilos Gram-positivos
 - ▶ *Clostridium* spp.
 - ▶ *Bacillus* spp.

- ▶ Função

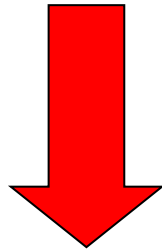
Resistência a condições adversas por longos períodos de tempo

- ▶ Aumentam sua sobrevivência; suportam
 - ▶ temperaturas extremas
 - ▶ falta de água
 - ▶ substâncias tóxicas



ESPORULAÇÃO

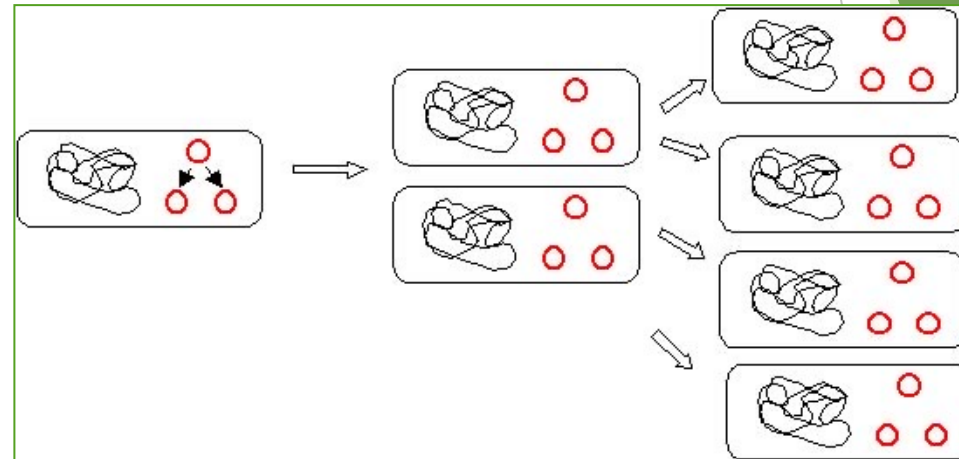
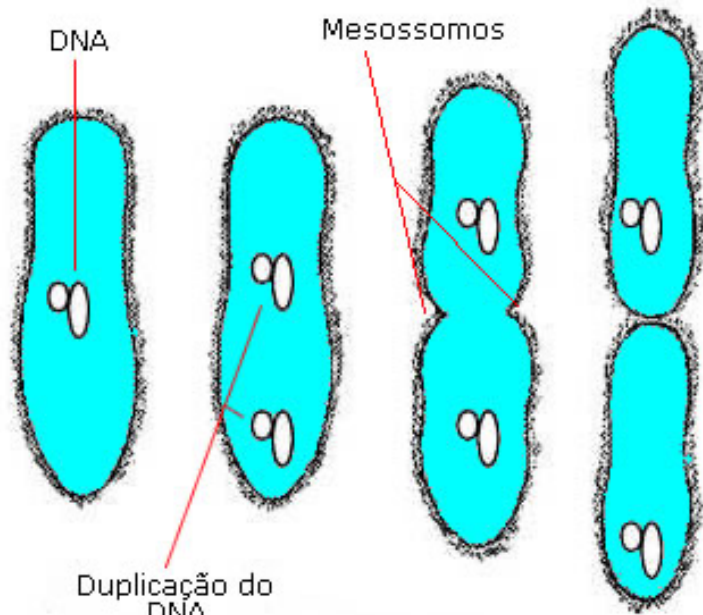
**NÃO OCORRE AUMENTO DO
NÚMERO DE CÉLULAS**



**NÃO É UM PROCESSO
DE REPRODUÇÃO**

Como as bactérias se reproduzem?

Divisão de uma bactéria por Fissão Binária



Tempo de geração

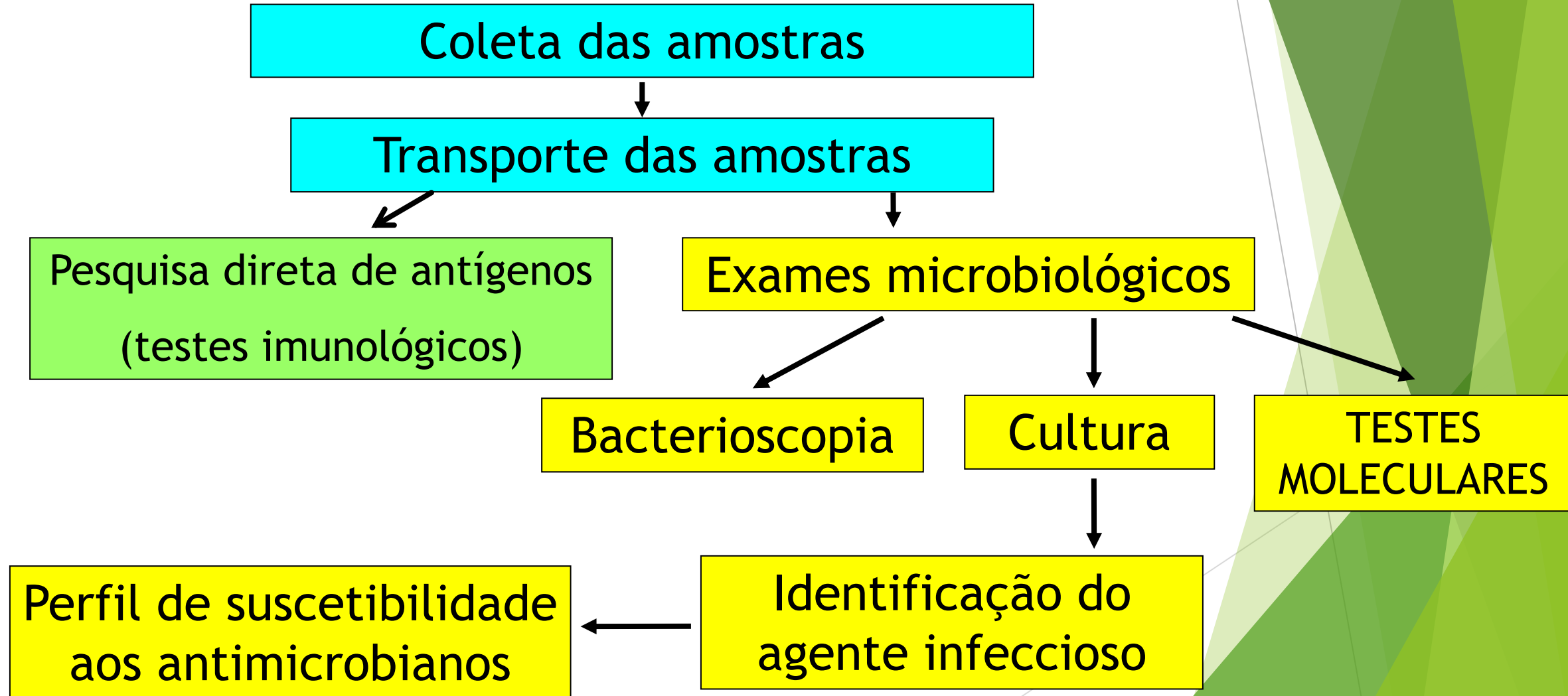
É o tempo necessário para uma célula se dividir

Será que o tempo de geração de uma bactéria pode ser importante na patogenia das doenças por elas causadas?

O tempo de geração também está
relacionado com a cultura das bactérias
in vitro

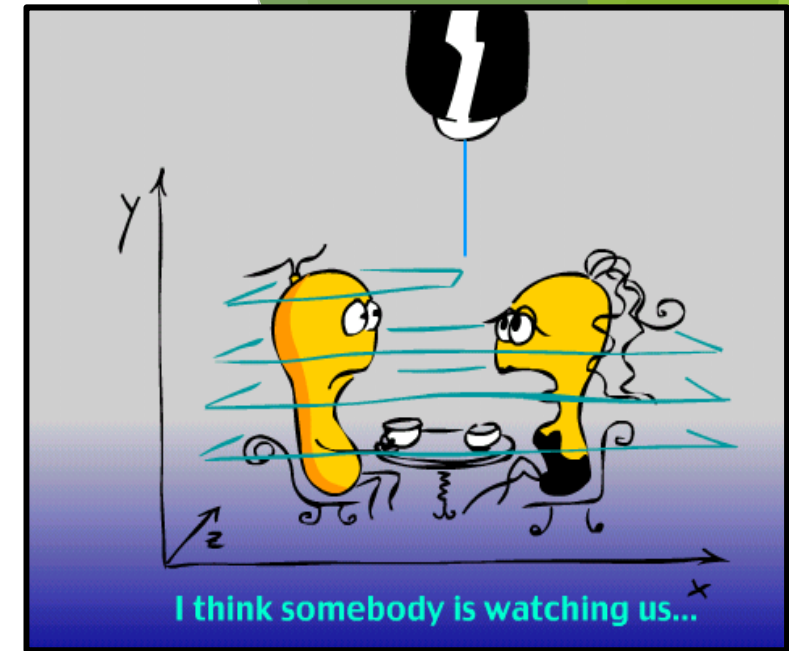


ETAPAS DO DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

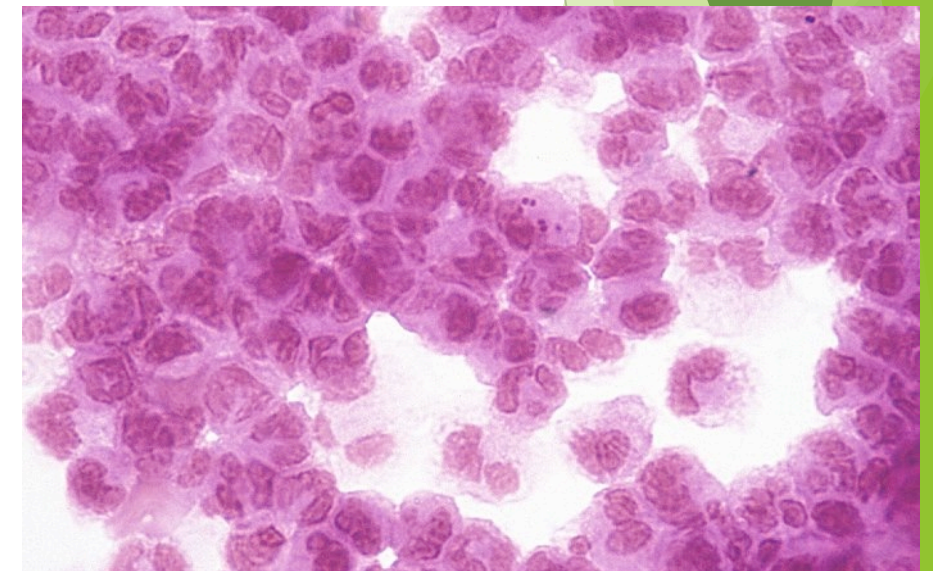


MICROSCOPIA

- ▶ COLORAÇÃO DE GRAM
- ▶ COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEESEN
- ▶ COLORAÇÃO DE FONTANA-TRIBONDEAU
- ▶ PESQUISA DIRETA DE FUNGOS
- ▶ OUTRAS



Fonte: www.biotoon.com

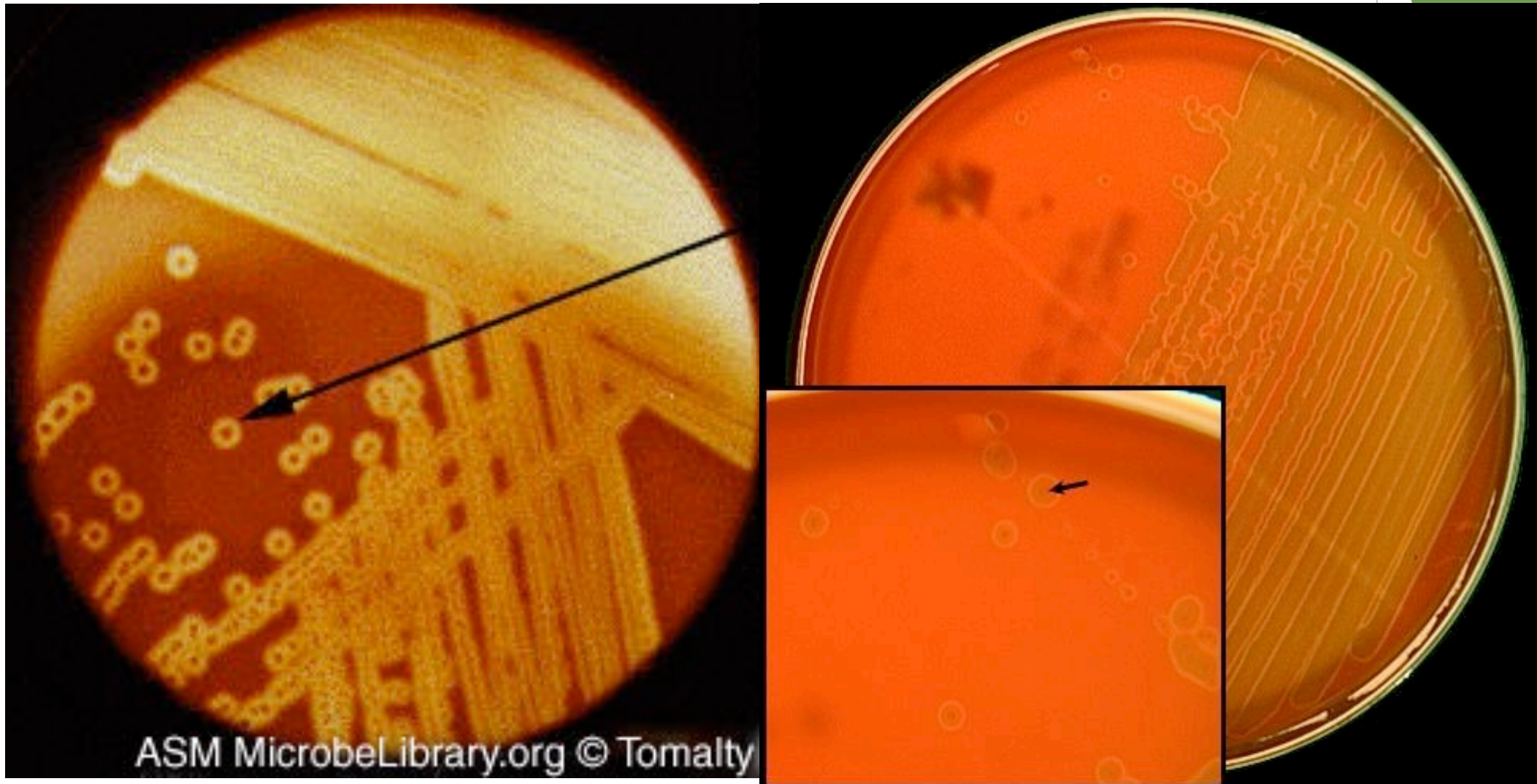


CULTURA MICROBIOLÓGICA

- ▶ DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
 - ▶ NUTRIÇÃO BACTERIANA
- ▶ TÉCNICAS DE SEMEADURA
- ▶ CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO
 - ▶ TEMPO
 - ▶ TEMPERATURA
 - ▶ ATMOSFERA



Meios de cultura: Agar Sangue

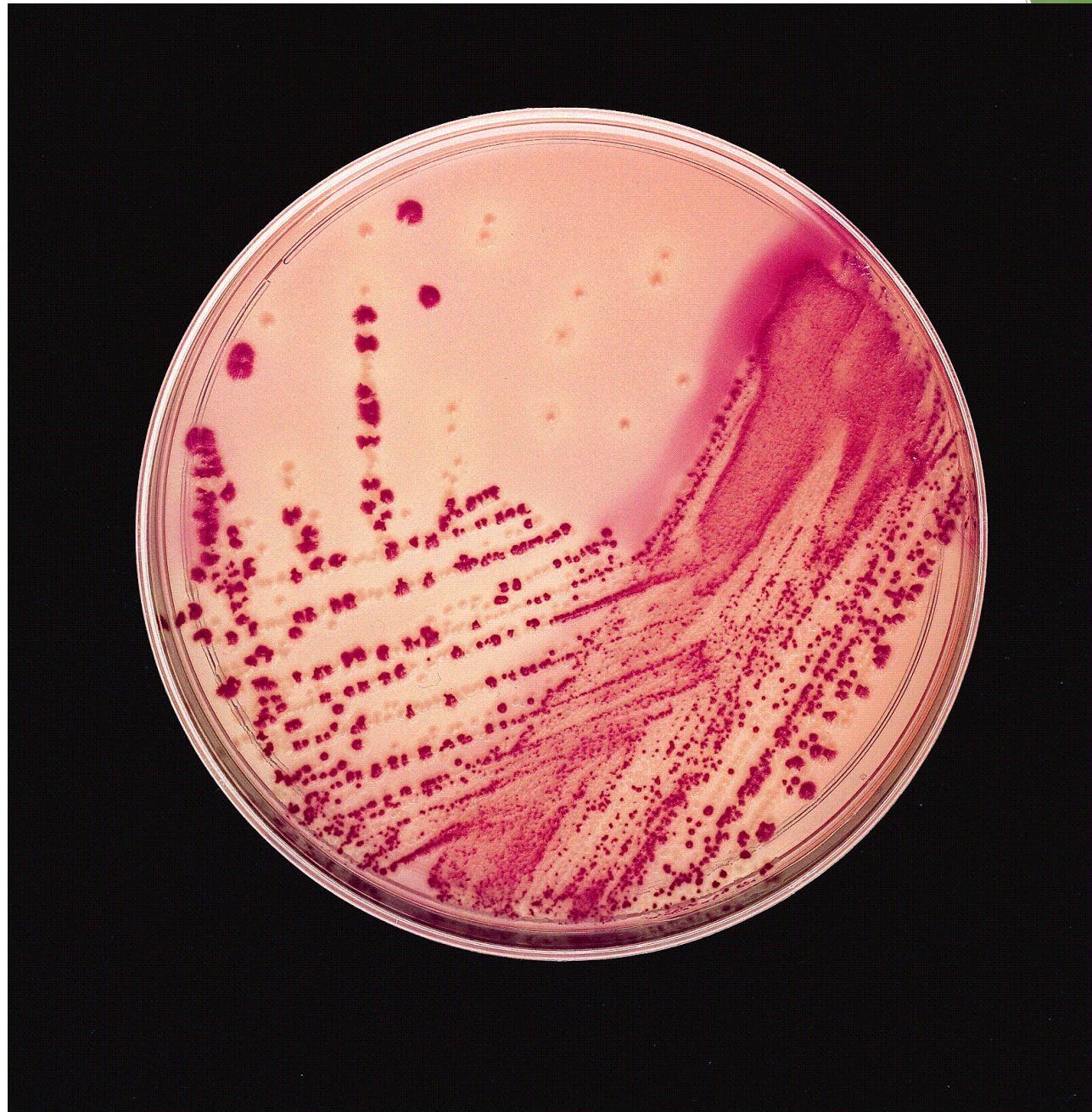


EXEMPLOS DE MEIOS DE CULTURA

<i>Patógeno Potencial</i>	<i>Meio de Isolamento</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	Agar Chocolate ou Thayer-Martin modificado
<i>Haemophilus influenzae</i>	Agar chocolate
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Agar Sangue de carneiro a 5%
<i>Listeria monocytogenes</i>	Agar Sangue de carneiro a 5% ou Agar BEA
<i>Mycobacterium spp.</i>	Agar Lowenstein-Jensen
<i>Escherichia coli</i>	Agar macConkey

Meio Seletivo e Diferencial

Agar
MacConkey
(MC)
Enterobactérias



Meios Cromogênicos

CHROMagar

Candida

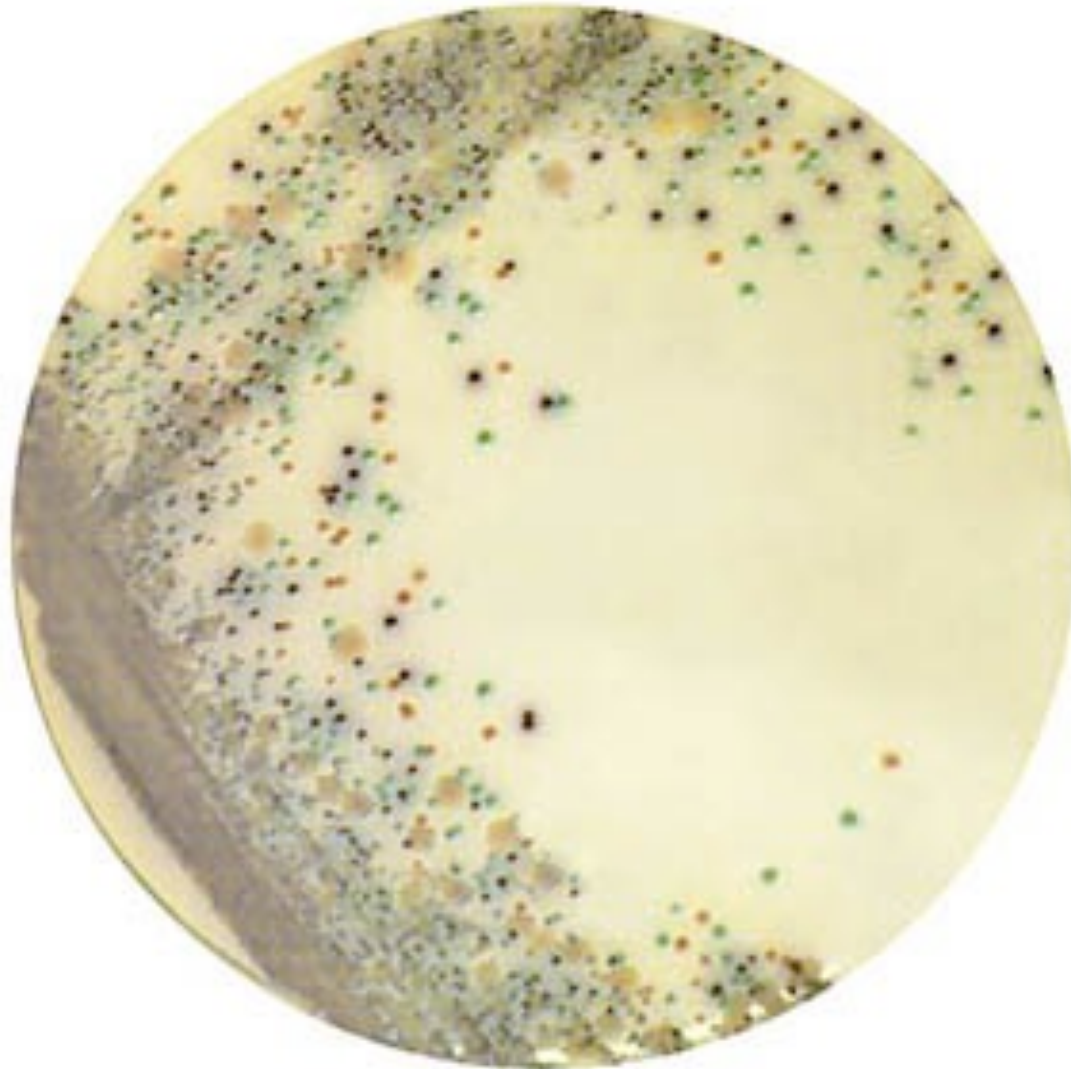
Colônias:

Verdes = *C. albicans*

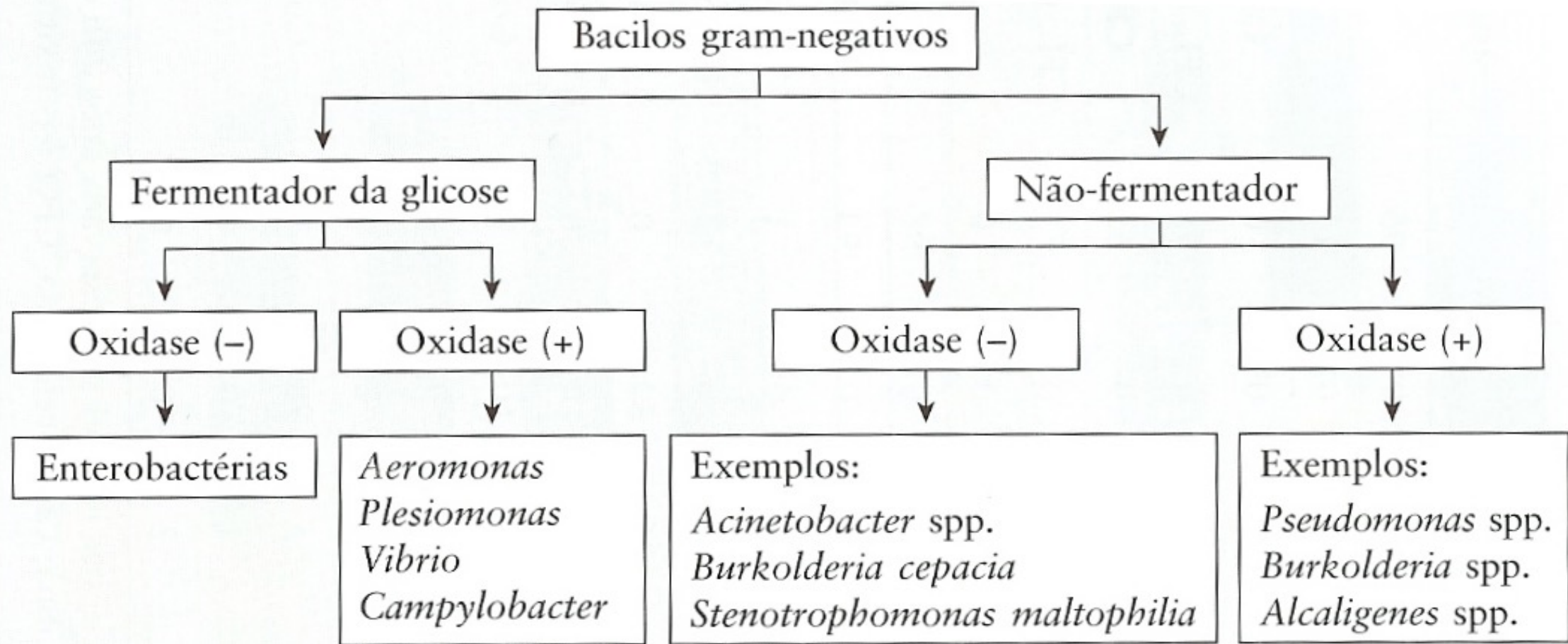
Azul = *C. tropicalis*

Rosa = *C. krusei*

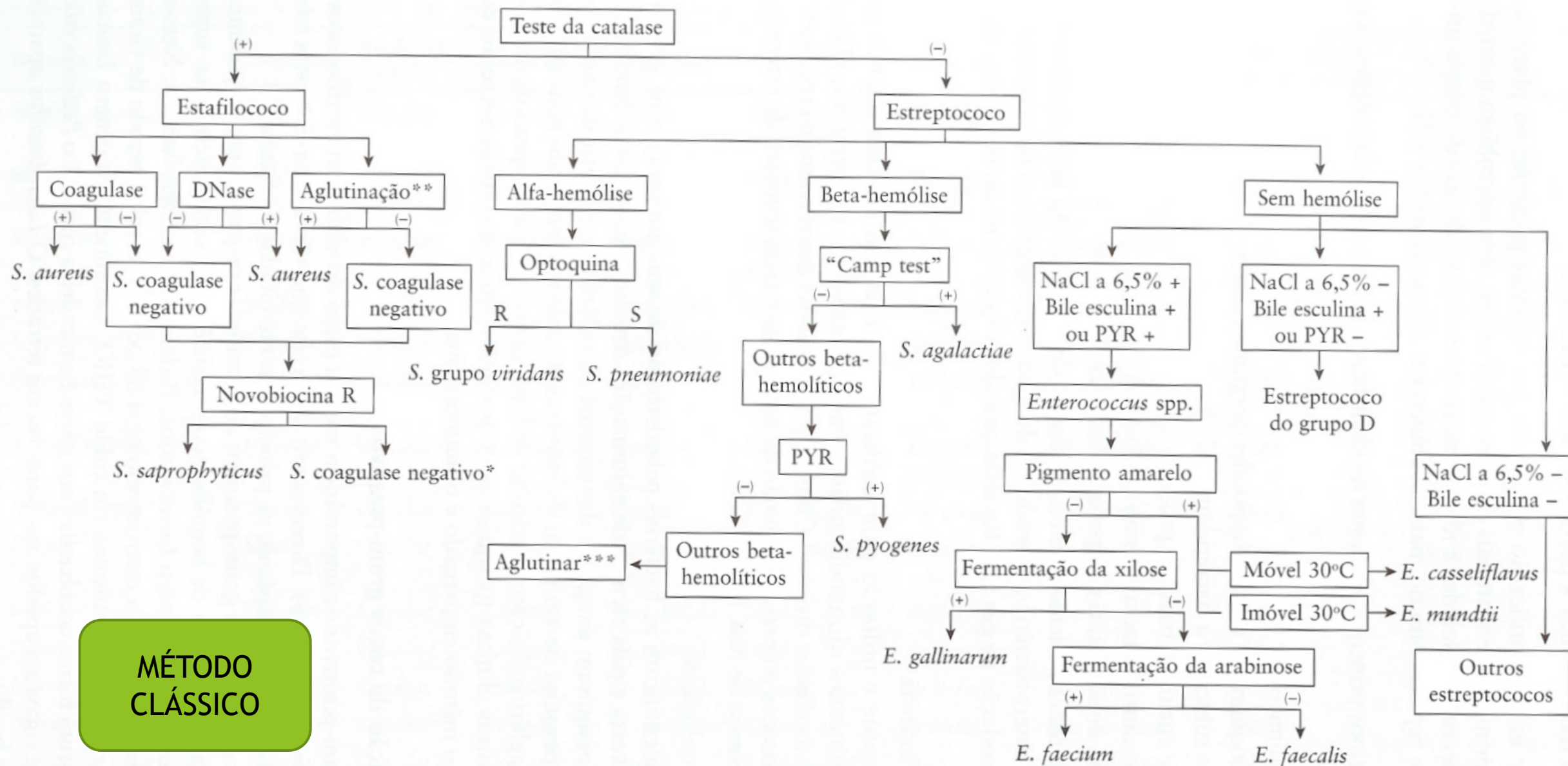
Branco = outras espécies



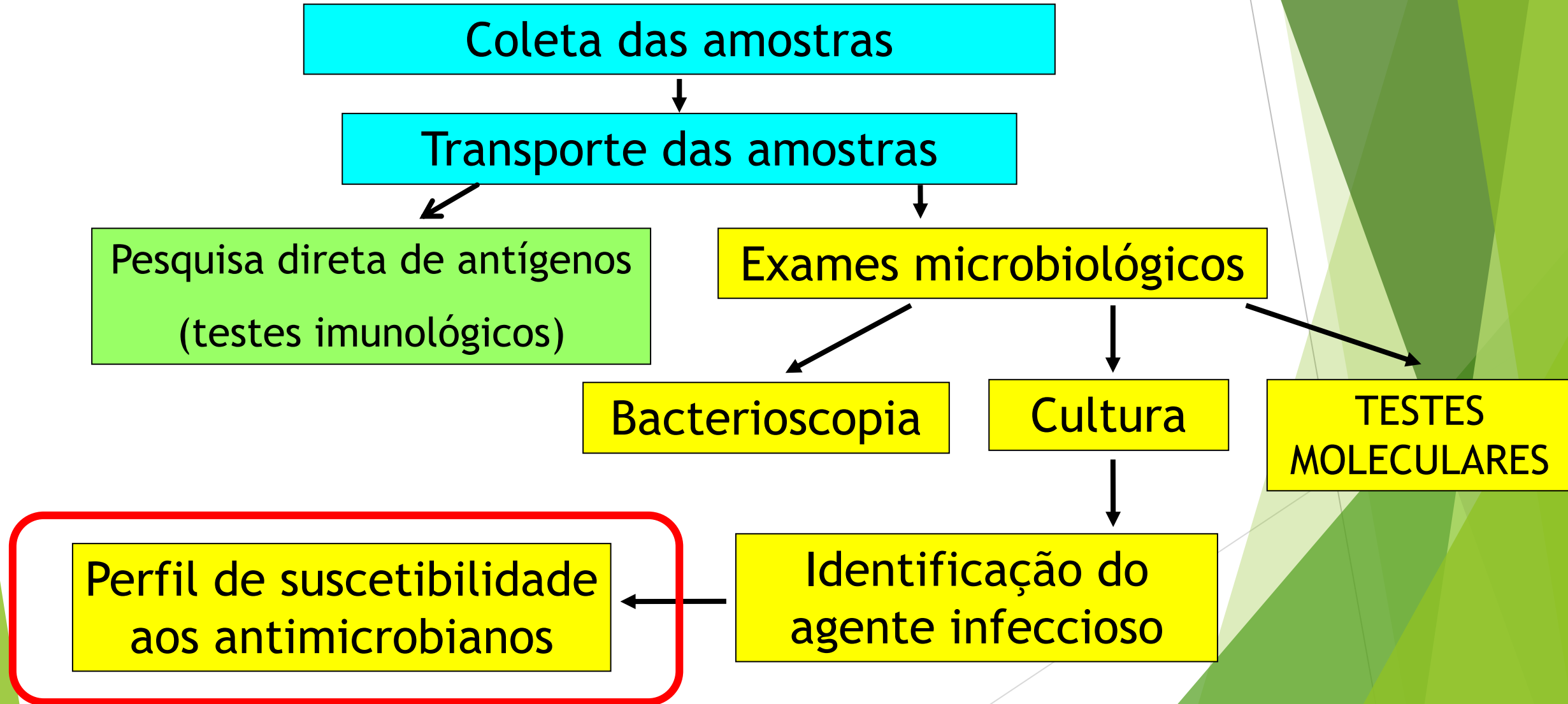
Identificação de Bacilos Gram-negativos

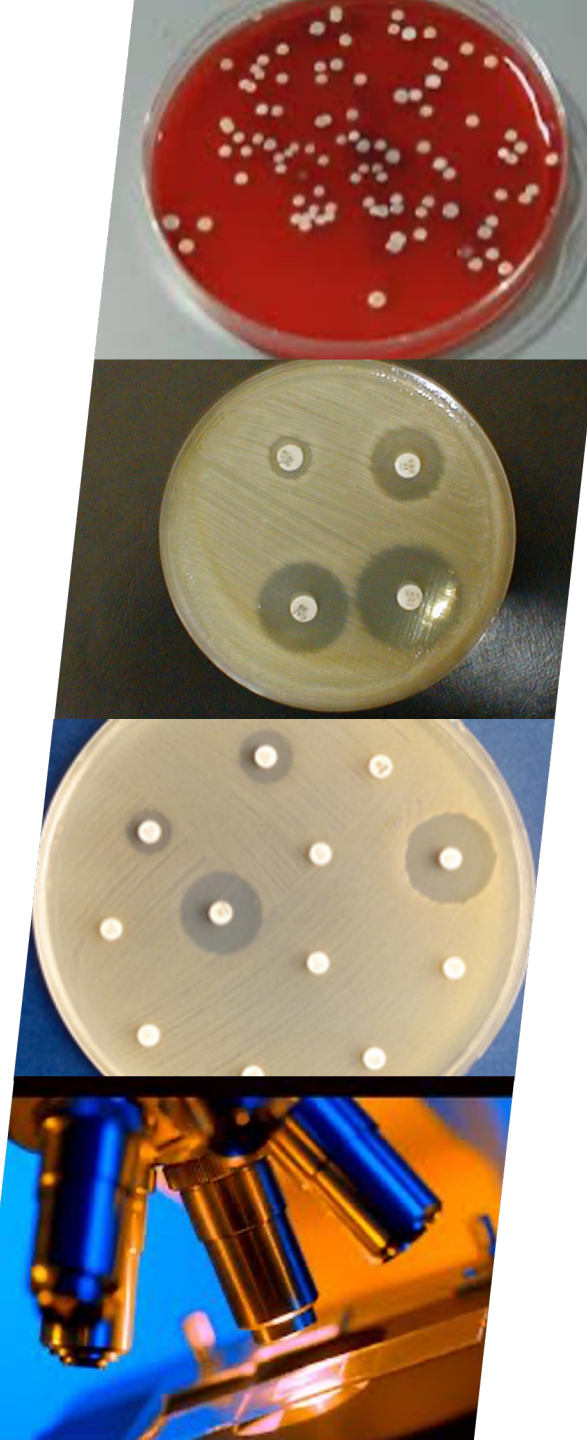


Identificação de Cocos Gram-positivos



ETAPAS DO DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO



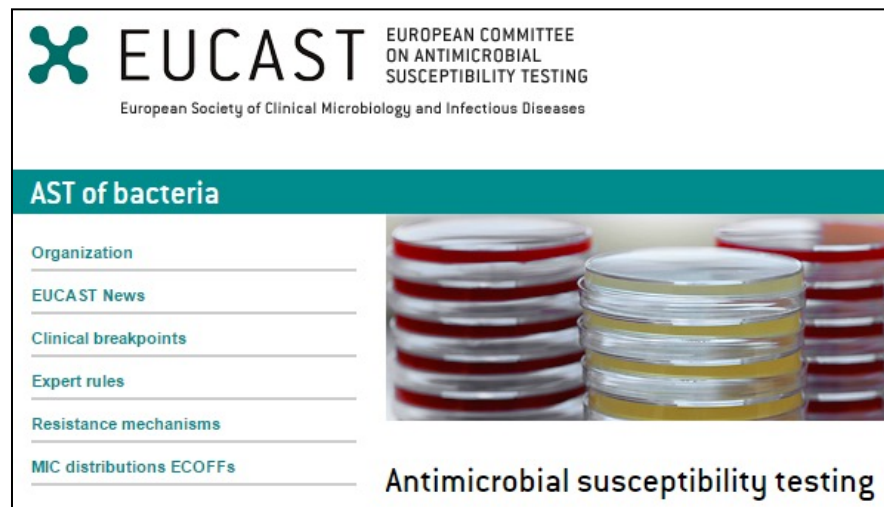


IMPORTÂNCIA DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE (TSA) NA PRÁTICA CLÍNICA

- ▶ INSTITUIR TERAPIA ADEQUADA
- ▶ DETECTAR A RESISTÊNCIA MICROBIANA
- ▶ DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

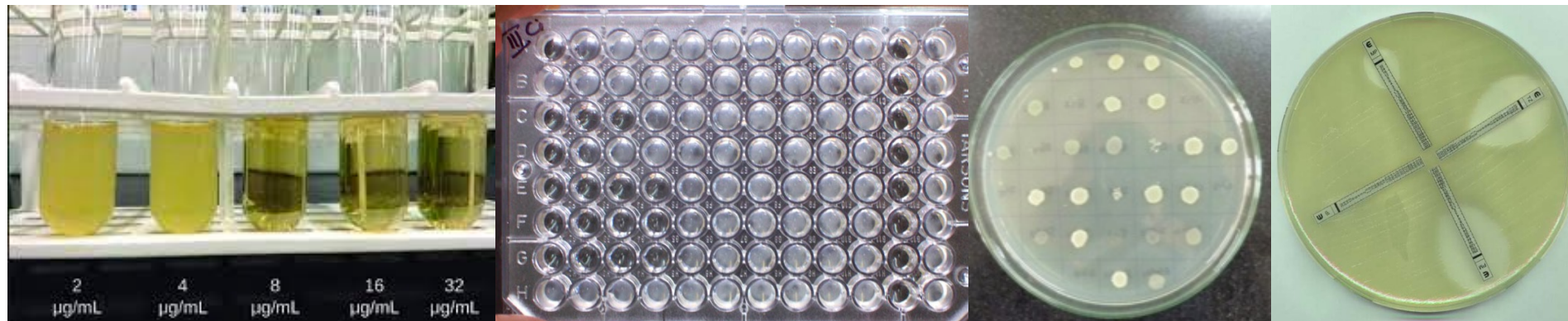
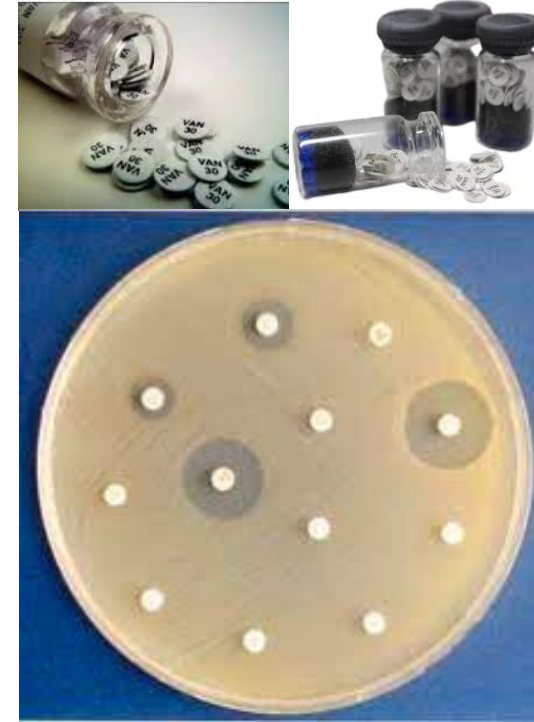
TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

- ▶ Padronização
 - ▶ Normas para bactérias e fungos
 - ▶ Documentos
 - ▶ execução (procedimentos)
 - ▶ interpretação dos testes



TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

- ▶ Avaliação **QUALITATIVA**
 - ▶ Classifica a bactéria em S, I ou R
 - ▶ DISCO DIFUSÃO
- ▶ Avaliação **QUANTITATIVA**
 - ▶ Avaliação da **Concentração Inibitória Mínima – CIM**



COMO INTERPRETAR OS RESULTADOS DE UM TESTE DE SUSCETIBILIDADE?

Tabelas específicas e
padronizadas com
critérios de
interpretação



Enterobacterales

Regras de Especialistas e Tabelas de Resistência Intrínsecas

Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST - EUCAST, válida a partir de 01-05-2020

Cefalosporinas ¹	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Cefaclor	-	-	-			-	-	-		1. Os pontos de corte de cefalosporinas para <i>Enterobacterales</i> permitem detectar todos os mecanismos de resistência clinicamente relevantes (incluindo ESBL e AmpC mediada por plasmídios). Alguns isolados produtores de β-lactamases são sensíveis ou sensíveis, aumentando exposição a cefalosporinas de 3ª ou 4ª gerações, considerando-se estes pontos de corte, e devem ser relatados de acordo com o resultado do teste, ou seja, a presença ou ausência de ESBL não influencia na categorização da sensibilidade. A detecção e caracterização de ESBL são recomendadas para fins de saúde pública e controle de infecções. 2. O ECOFF (8 mg/L) de cefoxitina apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade para a identificação de <i>Enterobacterales</i> produtoras de AmpC, uma vez que esse fármaco é afetado também por alterações de permeabilidade e algumas carbapenemases. Isolados classicamente não produtores de AmpC têm perfil selvagem, enquanto os produtores de AmpCs plasmidiais ou hiperprodutores de AmpC cromossômica têm perfil não selvagem. 3. Para fins de testes de sensibilidade, a concentração de avibactam é fixada em 4 mg/L. 4. Ver tabela de dosagens para doses para diferentes indicações. 5. Para fins de testes de sensibilidade, a concentração de tazobactam é fixada em 4 mg/L.
Cefadroxila (exclusivamente ITU não complicada)	16	-	>16		30	12	-	<12		
Cefalexina (exclusivamente ITU não complicada)	16	-	>16		30	14	-	<14		
Cefazolina (infecções com origem no trato urinário, <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp. (exceto <i>K. aerogenes</i>))	0,001	0,002-4	>4		EP	EP	EP	EP		
Cefepima	1	2-4	>4		30	27	24-26	<24		
Cefotaxima	1	2	>2		5	20	17-19	<17		
Cefoxitina (exclusivamente triagem) ²	NA	NA	NA		30	19	-	<19		
Cefpodoxima (exclusivamente ITU não complicada)	1	-	>1		10	21	-	<21		
Ceftarolina	0,5	-	>0,5		5	23	-	<23	22-23	
Ceftazidima	1	2-4	>4		10	22	19-21	<19		
Ceftazidima-avibactam	8 ³	-	>8 ³		10-4	13	-	<13		
Ceftolozana-tazobactam ⁴	2 ⁵	-	>2 ⁵		30-10	22	-	<22		
Ceftriaxona	1	2	>2		30	25	22-24	<22		
Cefuroxima IV, <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (exceto <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. e <i>P. mirabilis</i>	0,001	0,002-8	>8		30	50	19-49	<19		
Cefuroxima oral (exclusivamente ITU não complicada), <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (exceto <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella</i> spp. e <i>P. mirabilis</i>	8	-	>8		30	19	-	<19		
Carbapenêmicos ¹	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Ertapenem	0,5	-	>0,5		10	25	-	<25		1. Alguns isolados produtores de carbapenemases são categorizados como sensíveis utilizando esses pontos de corte e devem ser relatados de acordo com o resultado do teste, ou seja, a presença ou ausência de carbapenemases não influencia na categorização da sensibilidade. A detecção e a caracterização de carbapenemases são recomendadas para fins de saúde pública e controle de infecções. Para a triagem de carbapenemases, é recomendado um ponto de corte para meropenem de >0,125 mg/L (diâmetro de halo <28 mm). 2. A atividade intrinsecamente baixa do imipenem contra <i>Morganella morganii</i>, <i>Proteus</i> spp. e <i>Providencia</i> spp. requer alta exposição ao imipenem. 3. Para fins de teste de sensibilidade, a concentração de relebactam é fixada em 4 mg/L. 4. Para fins de teste de sensibilidade, a concentração de vaborbactam é fixada em 8 mg/L.
Imipenem	2	4	>4		10	22	17-21	<17		
Imipenem ² , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp.	0,001	0,25-4	>4		10	50	17-49	<17		
Imipenem-relebactam, <i>Enterobacterales</i> exceto para <i>Morganellaceae</i>	2 ³	-	>2 ³		EP	EP	EP	EP		
Meropenem	2	4-8	>8		10	22	16-21	<16		
Meropenem-vaborbactam	8 ⁴	-	>8 ⁴		EP	EP	EP	EP		
Monobactâmicos	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)				Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)				Notas
	S ≤	I	R >	AIT		S ≥	I	R <	AIT	
Aztreonam ¹	1	2-4	>4		30	26	21-25	<21		1. Os pontos de corte de aztreonam para <i>Enterobacterales</i> permitem detectar todos os mecanismos de resistência clinicamente relevantes (incluindo ESBL). Alguns isolados produtores de β-lactamases são sensíveis ou sensíveis aumentando exposição ao aztreonam utilizando esses pontos de corte e devem ser relatados de acordo com o resultado do teste, ou seja, a presença ou ausência de ESBL não influencia na categorização da sensibilidade. A detecção e a caracterização de ESBL são recomendadas para fins de saúde pública e controle de infecções.

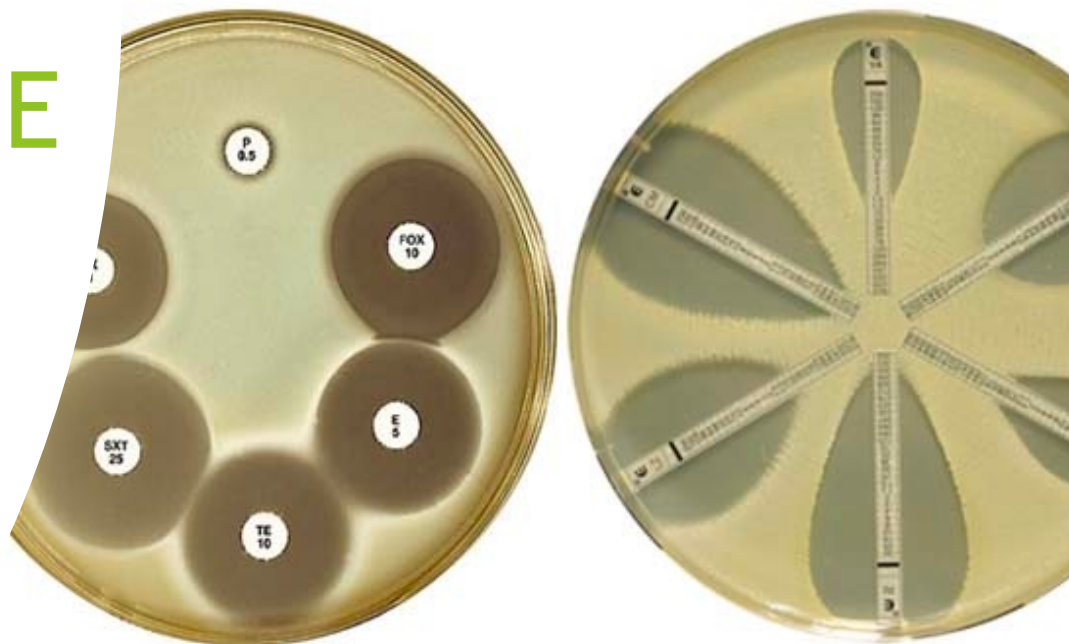
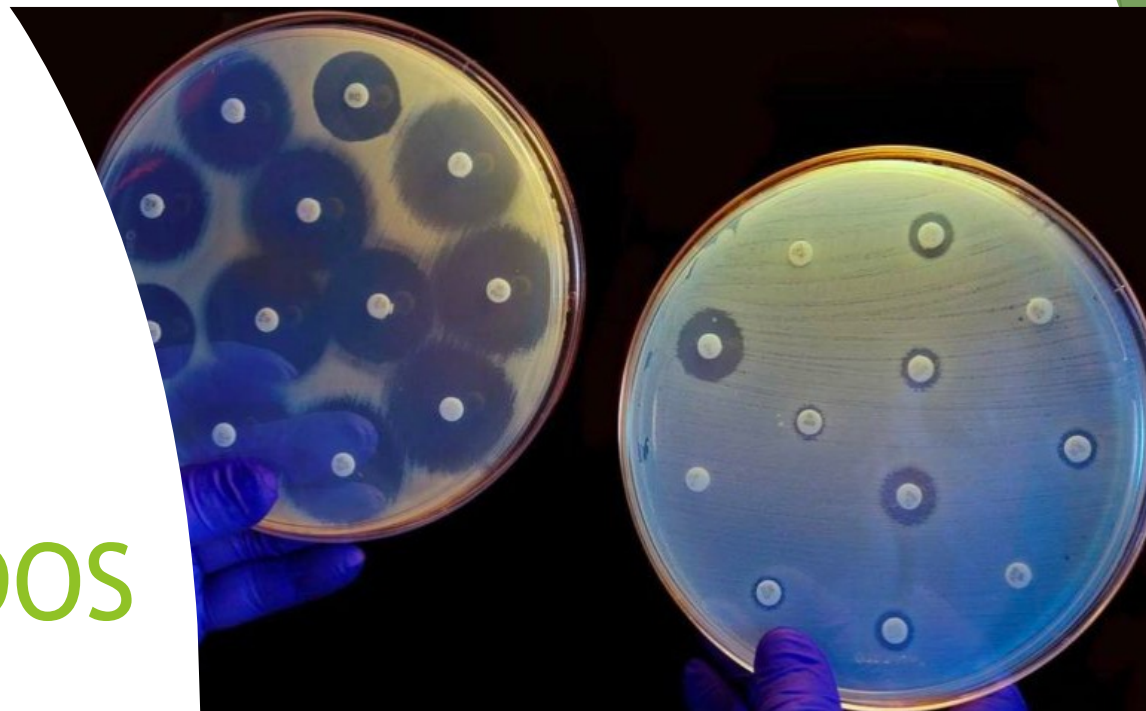
Várias TABELAS com critérios interpretativos padronizados para diferentes bactérias

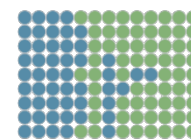
<http://brcast.org.br/documentos/Tabelas de Pontos de Corte Clínicos BrCAST 2023.pdf>



RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE

CATEGORIZAÇÃO DOS
ISOLADOS

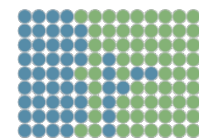




Sensível, dosagem padrão (S)

S - Sensível, dose padrão: Um microrganismo é categorizado como *Sensível, dosagem padrão**, quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dosagem padrão do agente.

*Exposição depende do modo como, a via de administração, a dose, o intervalo entre as doses, o tempo de infusão assim com a distribuição, o metabolismo e a excreção do antimicrobiano, influenciam o microrganismo no local da infecção.



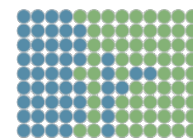
Sensível, aumentando exposição (I)

I – Sensível, aumentando exposição: Um microrganismo é categorizado como *Sensível, aumentando exposição** quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico porque a exposição foi aumentada ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção.

*Exposição depende do modo como, a via de administração, a dose, o intervalo entre as doses, o tempo de infusão assim com a distribuição, o metabolismo e a excreção do antimicrobiano, influenciam o microrganismo no local da infecção.

Redefinição S, I e R 2019 - www.eucast.org

**OPÇÃO
TERAPÊUTICA**



Resistente (R)

R - Resistente: um microrganismo é categorizado como *Resistente* quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento da exposição*.

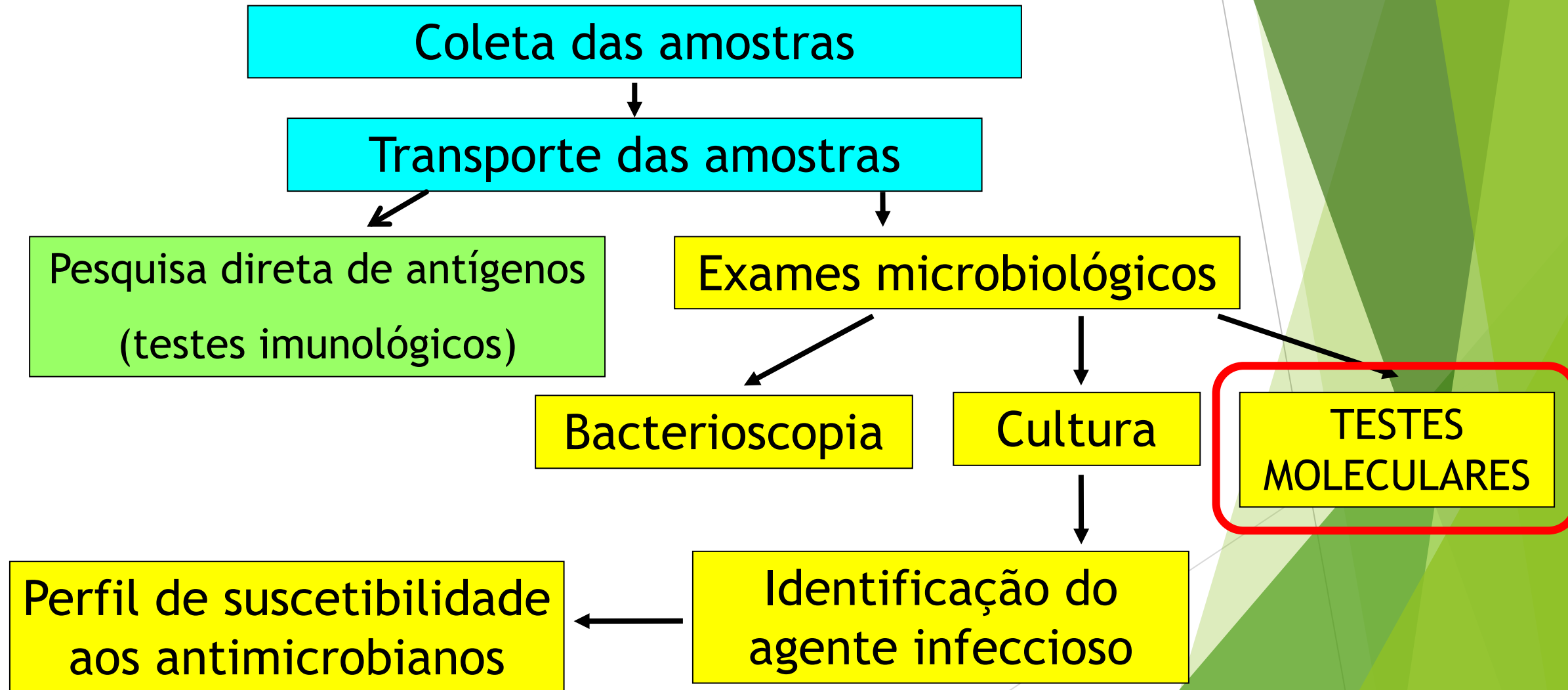
*Exposição depende do modo como, a via de administração, a dose, o intervalo entre as doses, o tempo de infusão assim com a distribuição, o metabolismo e a excreção do antimicrobiano, influenciam o microrganismo no local da infecção.

Resultado **POSITIVO** para *Pseudomonas aeruginosa* MDR
ANTIBIOGRAMA DE ISOLADO DE CULTURA DE SECREÇÃO TRAQUEAL

ANTIBIOGRAMA	[1]	
	SENS.	MIC
Amicacina	R	16
Aztreonam	R	32
Cefepime	I	1
Ceftazidima	I	2
Ceftazidima-Avibactam	NR	VIDE OBS
Ciprofloxacina	R	8
Colistina	S	1
Imipenem	R	16
Levofloxacina	R	4
Meropenem	R	32
Piperacilina/Tazobactam	I	8/4
Polimixina B	S	1

OBS: Micro-organismo multidroga resistente (MDR), ou seja, resistente a 3 ou mais classes de antimicrobianos (ANVISA, 2010). Favor entrar em contato com a CCIH.

ETAPAS DO DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO



MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS À BACTERIOLOGIA

- ▶ TÉCNICAS GENOTÍPICAS PARA DETECTAR GENES BACTERIANOS
 - ▶ REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)
 - ▶ VARIAÇÕES DA PCR
- ▶ TÉCNICAS DE TIPAGEM MOLECULAR
 - ▶ DETERMINAR O GENOMA BACTERIANO

PCR

PCRnested

PCR *multiplex*

RFLP

RAPD

PFGE

PCR real time

Sequenciamento

Microarray

Outras

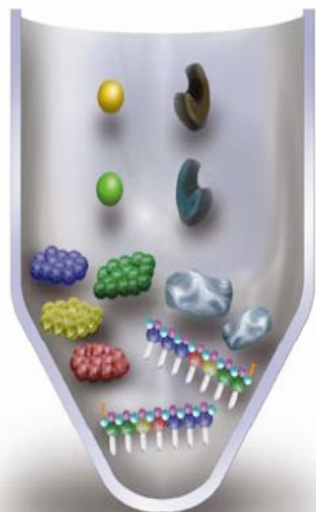


Reação em cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

- ▶ Método simples e prático para copiar e amplificar genes
- ▶ Introduzida em 1986
- ▶ Aplicação: estudo e análise genética
- ▶ Diagnóstico de doenças infecciosas
- ▶ Detecção de mecanismos de R
- ▶ Investigação epidemiológica
 - ▶ Variações da PCR
 - ▶ RAPD
 - ▶ RFLP
 - ▶ outras

PCR

- ▶ DNA molde (*template*)
- ▶ Taq DNA Polimerase
- ▶ Primer 1
- ▶ Primer 2
- ▶ $MgCl_2$
- ▶ dNTPs (A, T, C, G)
- ▶ PCR Buffer (Tampão)



- ▶ A técnica da PCR possui 3 etapas distintas:

1. DESNATURAÇÃO

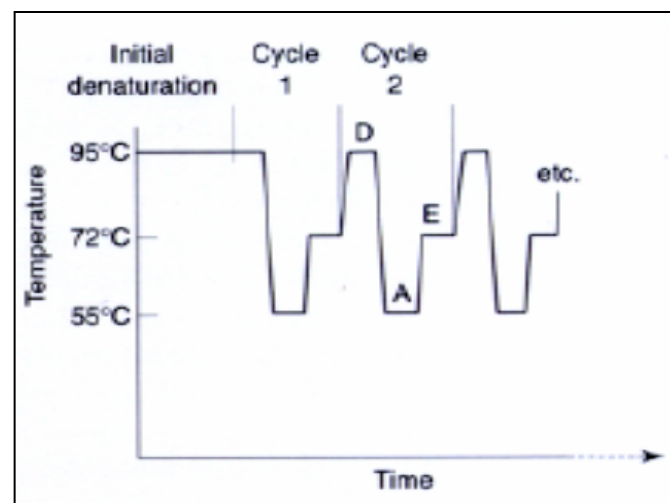
**Separação das fitas de DNA
(92 a 96°C)**

2. ANELAMENTO

**Pareamento do iniciador
ou “primer” (45 a 72°C)**

3. EXTENSÃO

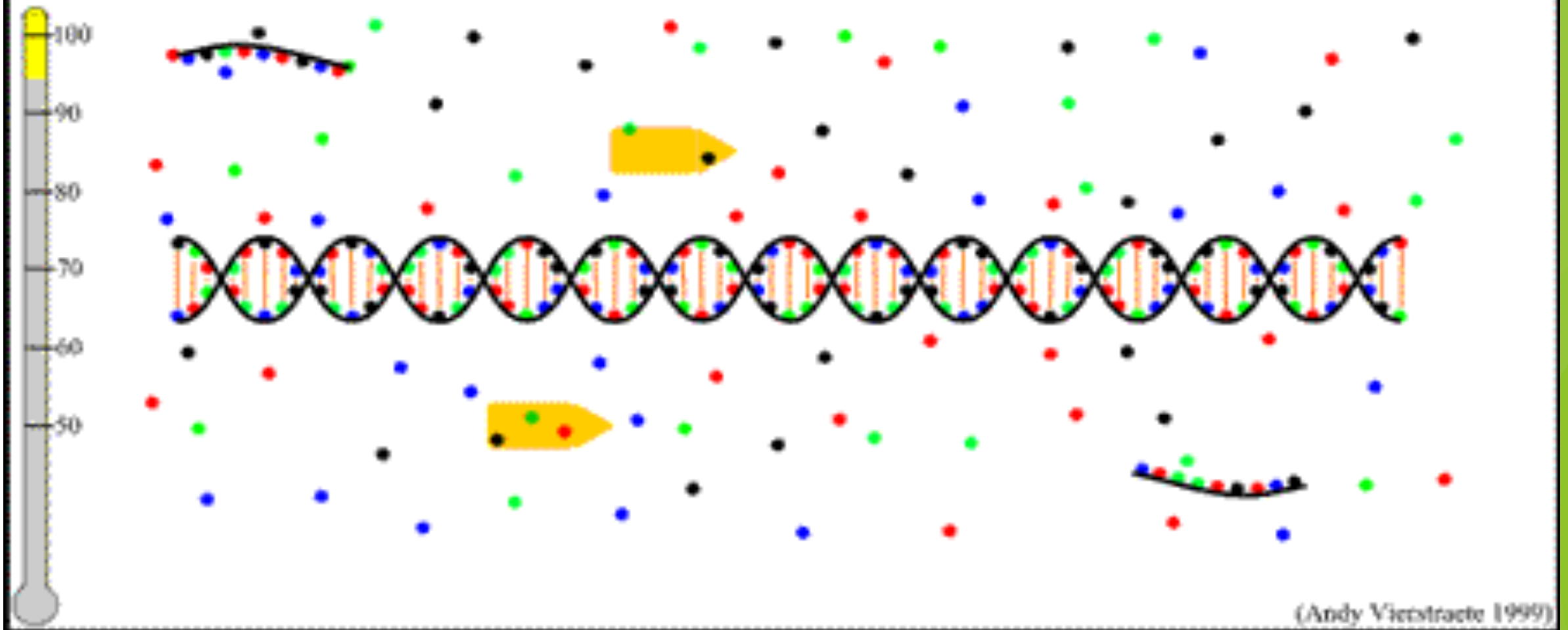
**Síntese de DNA complementar
(72°C)**



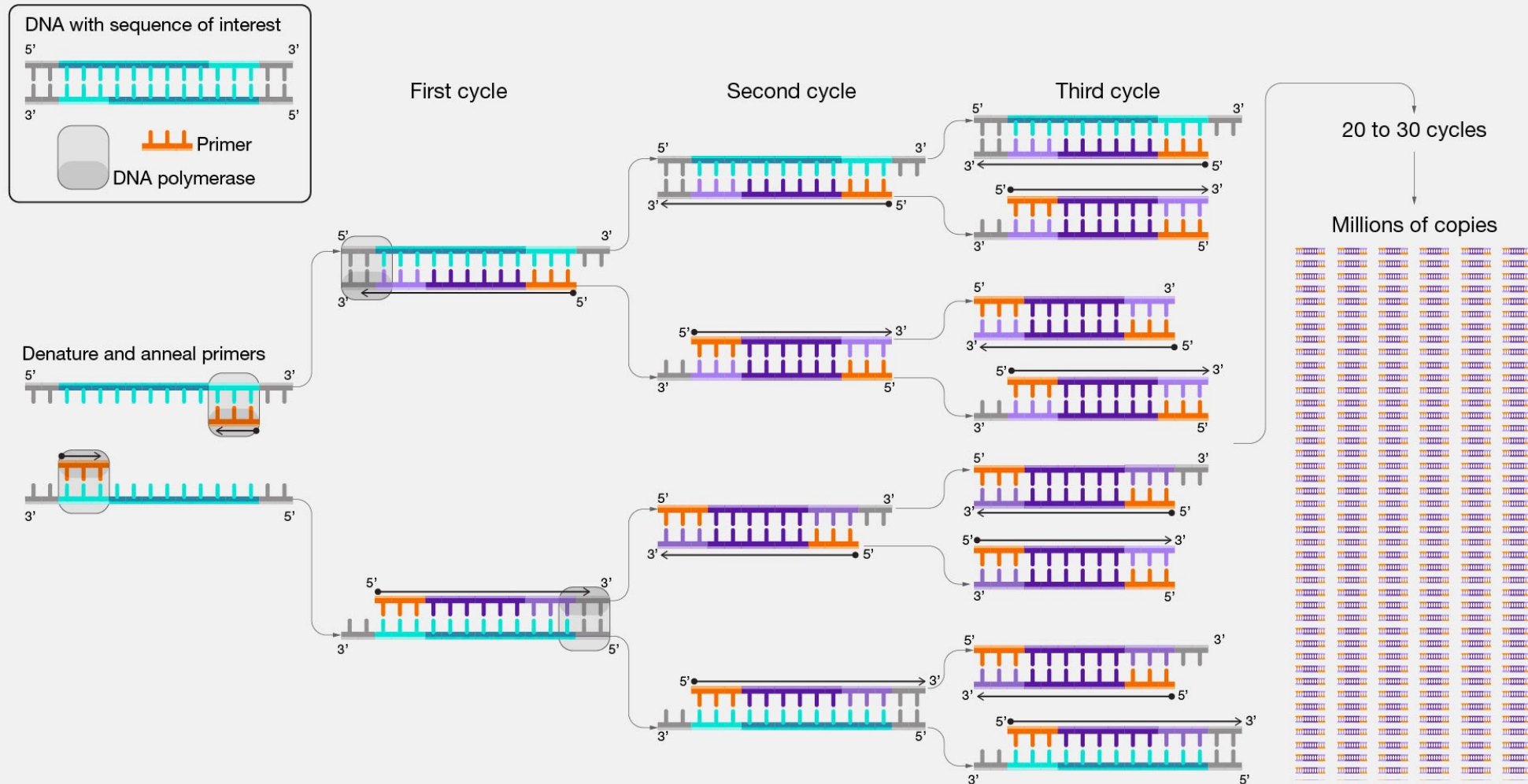


Termocicladores

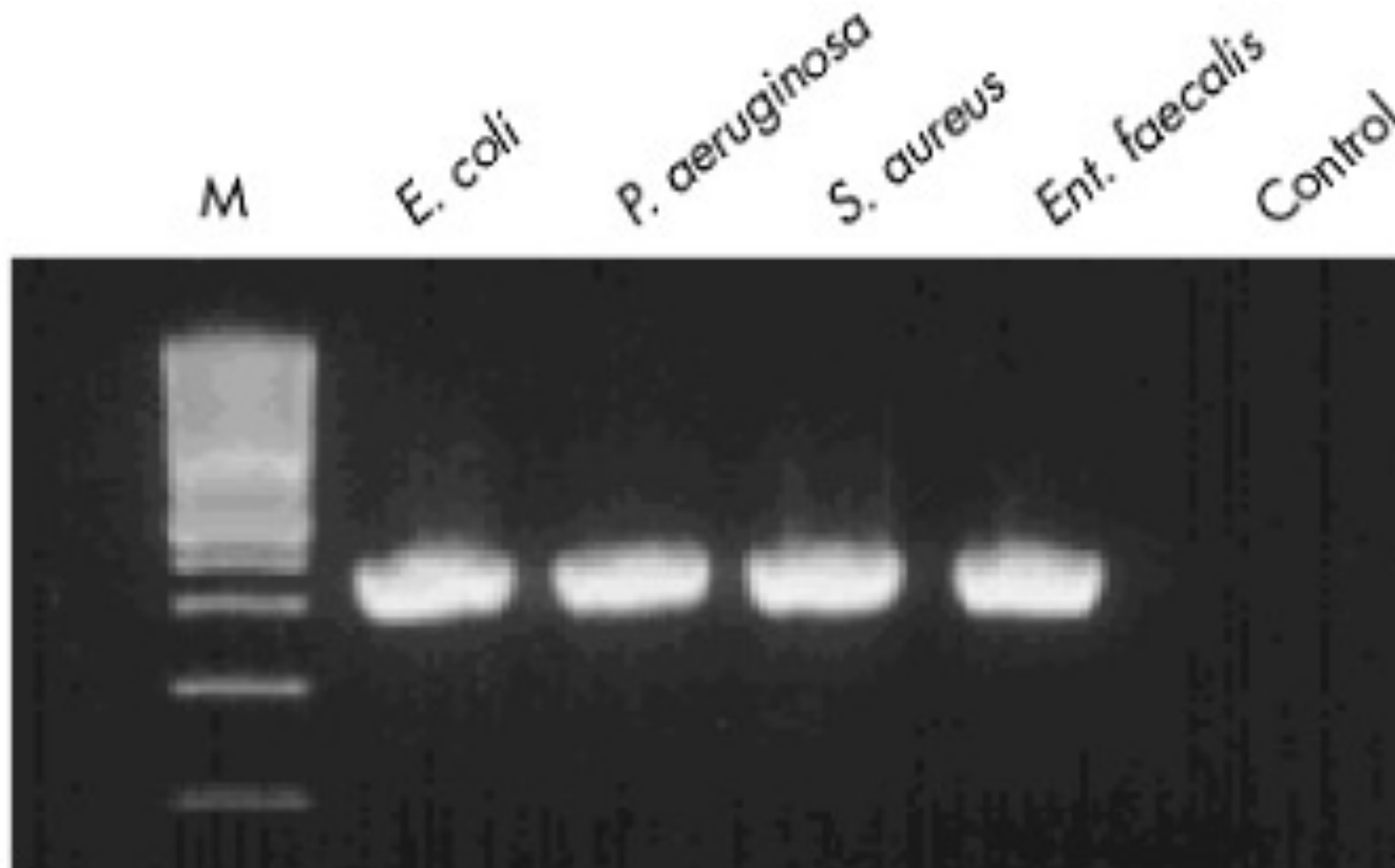
PCR : Denaturation 94°C



REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

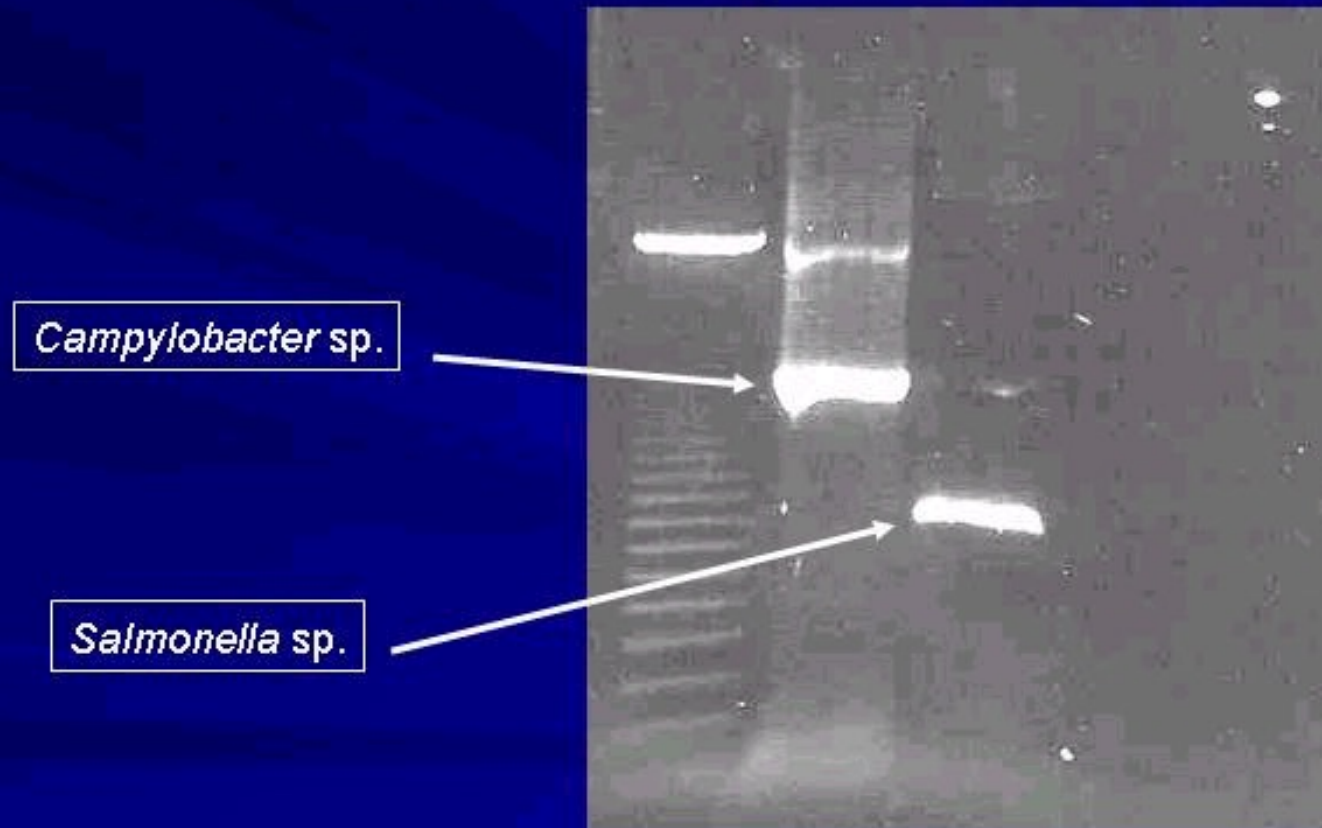


PCR - *Primers* universais (para detectar DNA bacteriano)



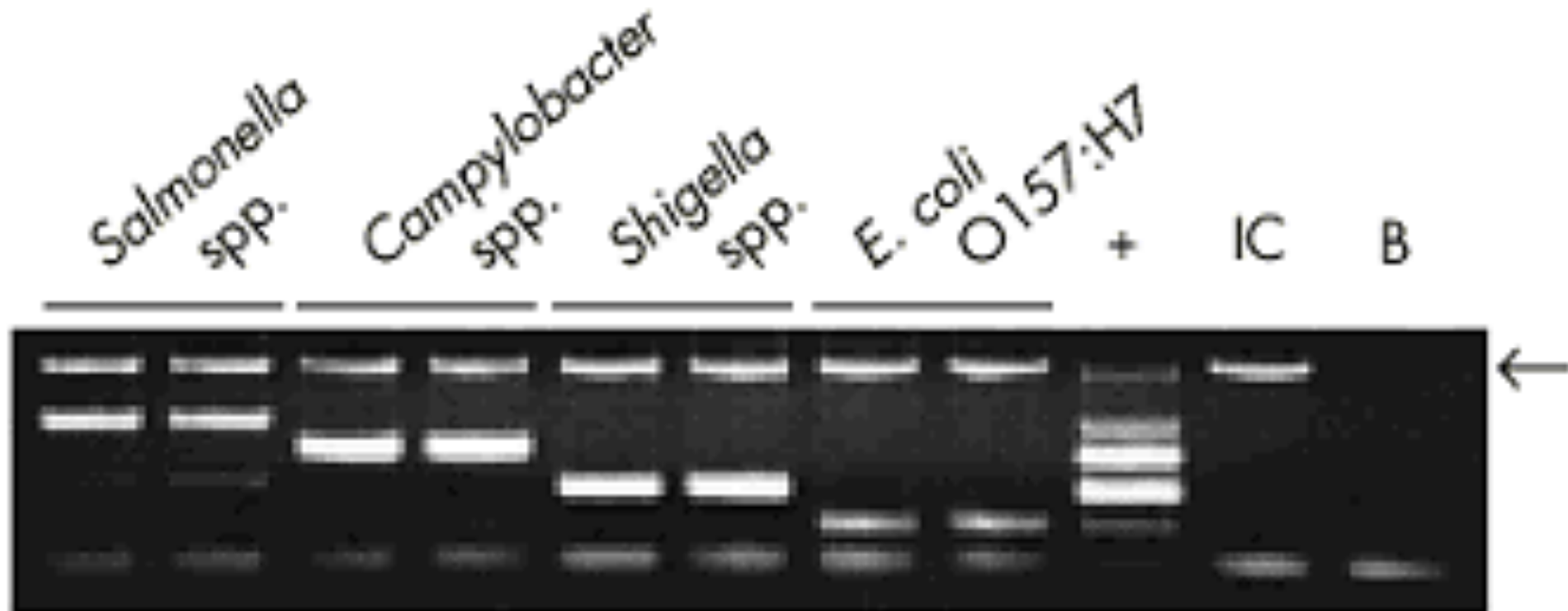
Molecular detection of pathogens

Bacteria specific PCR



Primers específicos

PCR Multiplex para enterobactérias

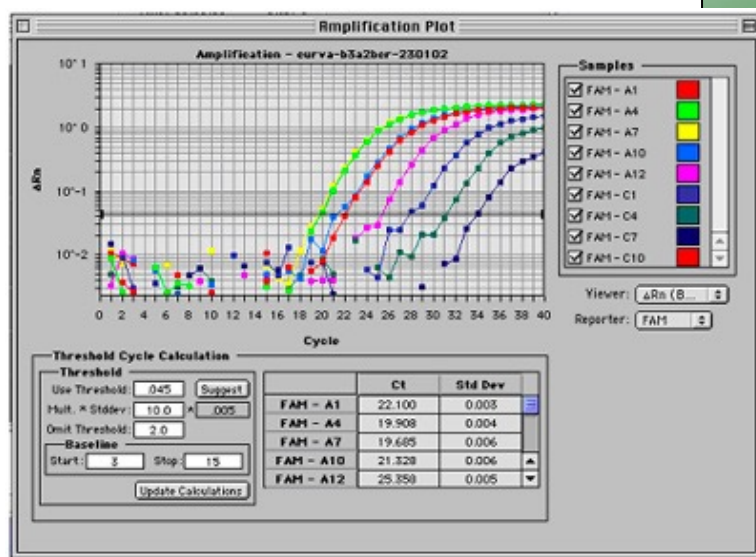


Material clínico: Fezes

Gel de agarose. A seta indica um *amplicon* universal (revelado em todas as amostras = presença de enterobactérias)

+: Controle Positivo da PCR; IC: Controle Interno da Reação; B: Branco da Reação (água destilada estéril)

PCR EM TEMPO REAL



ABI 7500



<https://lmbm.fmrp.usp.br/equipamentos/>

Obrigada!

inneke@usp.br

inneke.heijden@gmail.com

