

Microbiota anaeróbia do saco conjuntival humano normal¹

MAURO SILVEIRA DE QUEIROZ CAMPOS²; ELCIO HIDEO SATO³; WALTON NOSÉ⁴; EDUARDO NASCIMENTO MÓS⁵; MANOEL ANTONIO AZEVEDO SANTOS⁶

INTRODUÇÃO

A microbiota da conjuntiva de olhos normais é estudada desde o início do século¹, versando os primeiros estudos apenas sobre a presença de bactérias aeróbias ou facultativas, sendo questionado por alguns autores a existência de bactérias estritamente anaeróbias no saco conjuntival normal^{6, 7}.

Cross, em 1941, sugeriu pela primeira vez, a capacidade de bactérias anaeróbias estarem presentes no saco conjuntival, após avaliação laboratorial de 12 casos de panoftalmite⁴. Contudo, estudos posteriores negavam o isolamento de bactérias anaeróbias a partir de "raspados" obtidos de conjuntivas normais^{2, 6, 7}.

Com o aprimoramento de técnicas laboratoriais para o isolamento e identificação destas bactérias⁵, a presença destes agentes como participantes da flora conjuntival normal é referida na literatura a partir da década de 70^{8, 9, 10}.

Apesar desta microbiota anaeróbia estar sendo exaustivamente estudada, os resultados obtidos e relatados na literatura mostram diversidades quanto às espécies bacterianas e suas frequências^{8, 9, 10}.

A inexistência de trabalhos nacionais e a escassez de laboratórios especializados na análise destas bactérias motivou a realização deste trabalho, cujo objetivo foi determinar a presença e estabelecer a microbiota anaeróbia conjuntival em olhos de indivíduos normais.

MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta amostras provenientes de sacos conjuntivais de quarenta voluntários, sem evidência clínica de doenças oculares, e ou sistêmicas recentes, com idade variando de 19 a 59 anos, foram submetidos a exames microbiológicos. Estes indivíduos selecionados, a partir do corpo docente e discente da Escola Paulista de Medicina, não eram usuários de lentes de contato. Dos 40 pacientes, 29 eram do sexo feminino e 11 do sexo masculino. As amostras foram obtidas entre agosto e novembro de 1988.

Espécimes clínicos foram obtidos através de raspado conjuntival de ambos os olhos, com auxílio de cotonete alginatado estéril (Cefanete Pediátrico[®]), previamente umedecido em solução tampão fosfatada pré-reduzida (PRAS)⁵ e sem utilização de anestésico tópico (Fig. 1). Após a coleta, as primeiras 26 amostras obtidas foram semeadas em meio de transporte produzido em anaerobiose, não enriquecido, que continha 2 ml de solução tampão fosfato e resazurina como indicador de oxidação. Após a semeadura, as amostras eram imediatamente transportadas ao laboratório para o processamento microbiológico. Pelo fato destas 26 amostras apresentarem resultados negativos optou-se pela utilização de um meio de transporte enriquecido. Estes primeiros 13 pacientes foram então submetidos a nova coleta. As amostras obtidas destes e dos outros 27 pacientes, foram inoculadas em meio semi-sólido de infuso de cérebro e coração,

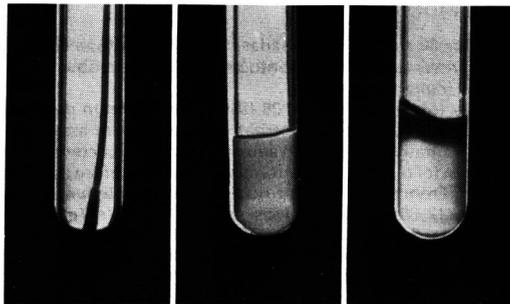


Fig. 1 — a) tubo de ensaio contendo cotonete alginatado.
b) tubo contendo o meio enriquecido para o transporte.
c) coloração violácea indica meio de transporte oxidado, impossibilitando sua utilização.

enriquecido com vitamina K (menadiona) e hemina, pré-reduzido, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante período de 7 dias. Foram realizadas duas leituras do crescimento bacteriano. A primeira leitura após 48 horas de incubação, e a segunda ao sétimo dia. O método de anaerobiose utilizado foi a jarra Gaspak[®] (Fig. 2).

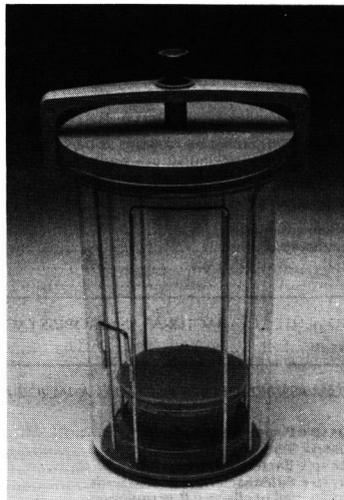


Fig. 2 — Jarra de anaerobiose contendo placas de cultura e sistema gerador de anaerobiose — Gaspak[®]. A parede transparente da jarra permite a avaliação do crescimento bacteriano sem a necessidade da abertura da jarra para este fim.

1 Trabalho realizado no Ambulatório da Disciplina de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina (Hospital São Paulo) em conjunto ao Laboratório de Bactérias Anaeróbias do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo.

2 Pós Graduando (nível mestrado) em Oftalmologia da E.P.M.

3 Pós Graduando (nível doutorado) em Oftalmologia da E.P.M.

4 Chefe do Serviço de Córnea e Pós Graduando (nível doutorado) em Oftalmologia da E.P.M.

5 Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia do I.C.B. — USP.

6 Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia do I.C.B. — USP.

A partir do primo-cultivo procederam-se: bacterioscopia (Gram) das colônias representativas e conseqüente teste do tipo respiratório, já em meios seletivos e ou enriquecidos, visando a identificação presuntiva: Ágar Bacteróides Bile Esculina, Ágar Phenyletanol, Ágar Veillonella, Rogosa S. L. Ágar, Ágar Bifidobacterium, Campy Bap e Ágar Sangué Vitamina K. A identificação final foi realizada conforme preconizam Holdeman e Moore⁵.

RESULTADOS

Das 80 amostras analisadas, 9 foram negativas (11,25%) e 71 apresentaram crescimento bacteriano anaeróbico, estrito ou facultativo (88,75%).

Do total de amostras, 28 (35%) manifestaram presença de bactérias anaeróbicas estritas isoladas ou em associação com facultativas. Destas 28 amostras, *Propionibacterium granulosum* foi o agente mais freqüente (64,28%) entre as bactérias anaeróbicas estritas, seguido por *Bifidobacterium adolescentis* (17,85%), *Bacteróides sp* (10,71%), *Veillonella sp* (10,71%) e *Sarcina sp* (3,57%) (Tabelas 1 e 2).

Em 6 indivíduos (15%) foram isoladas bactérias anaeróbicas estritas de ambos os sacos conjuntivais, com concordância da mesma espécie (*P. granulosum*) em 4 indivíduos (10%).

Nas 71 amostras que apresentaram crescimento anaeróbico facultativo, o gênero encontrado foi o *Staphylococcus sp* presente em todas elas.

TABELA 1

Agentes anaeróbicos estritos ou facultativos mais freqüentemente isolados em 71 amostras positivas obtidas a partir de culturas de 80 casos conjuntivais normais (40 indivíduos)

Agente	nº amostras	%
<i>Staphylococcus sp</i>	64	(90,14)
<i>Propionibacterium granulosum</i>	18	(25,35)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	5	(7,04)
<i>Bacteróides sp</i>	3	(4,22)
<i>Veillonella sp</i>	3	(4,22)
<i>Sarcina sp</i>	1	(1,40)

TABELA 2

Incidência dos microorganismos isolados a partir de culturas dos sacos conjuntivais de 40 indivíduos normais (80 amostras)

AMOSTRAS SOMENTE COM BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS	
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	3
<i>Bacteróides sp</i>	1
<i>Sarcina sp</i>	1
AMOSTRAS SOMENTE COM BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FACULTATIVAS	
<i>Staphylococcus sp</i>	43
AMOSTRAS COM ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ESTRITAS E FACULTATIVAS	
<i>Staphylococcus sp</i> e <i>P. granulosum</i>	14
<i>Staphylococcus sp</i> e <i>Veillonella sp</i>	2
<i>Staphylococcus sp</i> e <i>Bacteróides sp</i>	2
<i>Staphylococcus sp</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1
<i>Staphylococcus sp</i> , <i>Veillonella sp</i> e <i>P. granulosum</i>	1
<i>Staphylococcus sp</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> e <i>P. granulosum</i>	1

DISCUSSÃO

O sucesso no isolamento de bactérias anaeróbicas estritas a partir de amostras clínicas depende de vários fatores que influenciam a viabilidade destes organismos, desde a técnica de coleta, transporte rápido e eficiente da amostra para laboratório, até a prática de subcultivo empregando técnicas indicadas para anaerobiose^{5, 15}.

O uso de cotonete alginatado faz-se necessário por ser uma fibra sintética não tóxica às bactérias anaeróbicas, ao contrário de fibras vegetais como o algodão que podem possuir uma pequena quantidade de lipoproteína inibitória, o que reduz sua utilidade na bacteriologia. O alginato de cálcio, que foi a fibra utilizada por nós, além de não ser tóxico às bactérias, é solúvel em hexametáfosfato de sódio, tornando os organismos, que se agregam as fibras pela ação capilar, mais facilmente recuperáveis em cultura¹¹ (Fig. 3).

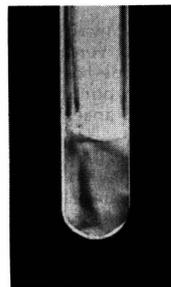


Fig. 3 — A Presença de colônias de bactérias aderidas ao "swab" alginatado. A utilização de hexametáfosfato de sódio facilita a recuperação destas colônias aderidas.

Nas primeiras 26 amostras, o uso de um meio não enriquecido para transporte revelou-se inadequado para o procedimento visto que todas estas amostras foram negativas. A substituição deste meio para o BHI — (PRAS)⁵ para o transporte, representou uma positividade de 37,5% nestes mesmos pacientes, considerando-se apenas a freqüência de bactérias anaeróbicas estritas encontrada.

Utilizamos a jarra de anaerobiose (Fig. 2) como método de cultura anaerobiótica, por ser a mais difundida em nosso meio, tecnicamente simples e de baixo custo. Outros métodos de cultura como as câmaras de anaerobiose e o método dos tubos seriados são de manuseio difícil e bastante dispendiosos. Tais métodos de anaerobiose comparados à jarra Gaspak®, não apresentam diferenças significativas em relação à positividade de cultura de anaeróbios^{13, 15}.

Foram utilizados meios seletivos para cultura anaeróbia por serem extremamente úteis na recuperação de microorganismos a partir de espécimes contendo crescimento misto de organismos anaeróbicos estritos e facultativos¹³. ROSENBLATT e cols., em 1973, afirma que a utilização de caldo de thioglicolato simples, em ensaios clínicos onde se procura isolar tanto bactérias anaeróbicas quanto aeróbicas, a partir de espécimes supostamente mistos, reduz a incidência de culturas positivas para anaeróbios.

A bactéria anaeróbia estrita mais comumente isolada foi o *Propionibacterium granulosum* presente em 22,5% do total de amostras. Em outros estudos^{8, 9, 10} porém, o *Propionibacterium acnes* foi o agente mais freqüentemente identificado. Contudo, pela grande incidência destes agentes na pele, estes, podem contaminar as amostras obtidas de sacos conjuntivais⁷. Não foi isolado nenhum *Propionibacterium acnes* de nossas amostras, e acreditamos que a coleta cuidadosa evitando-se o contato do cotonete com a margem palpebral e a não inclusão de indivíduos portadores de blefarites seborréicas ou acne em nossa amostragem possam ter influenciado neste resultado⁹. Os pacientes eram ainda orientados a evitar esfregar as pálpebras antes do exame.

MATUURA, em 1971, encontrou o *P. granulosum* em apenas uma amostra das 80 estudadas por ele⁸. Em outro estudo envolvendo 184 culturas de 92 olhos, seus autores identificaram o *P. granulosum* em apenas uma amostra⁹.

Ao contrário do observado nos sacos conjuntivais, as superfícies mucosas de outras regiões do organismo apre-

sentam outros microorganismos anaeróbios que predominam sobre as **Propionibactérias**, como os **Bacteróides** e **Bifidobactérias**¹⁴.

Isolamos o **Bifidobacterium adolescentis** em 5 amostras (6,25%). Nenhum dos trabalhos anteriores identificou esta bactéria a partir de espécimes obtidos de sacos conjuntivais normais. TABBARA, em 1984, isolou este microorganismo a partir de amostras obtidas na córnea de indivíduos normais¹².

Bactérias do gênero **Bacteróides** estiveram presentes em 3,75% do total de amostras, o mesmo acontecendo com **Veillonella** sp. Este último agente não havia sido isolado em outros trabalhos a partir da conjuntiva de olhos normais.

Contrariando outros estudos^{8, 9, 10}, isolamos cocos gram positivos anaeróbios em apenas uma amostra (**Sarcina** sp).

Na literatura, além destas bactérias identificadas por nós, outros anaeróbios estritos já foram isolados a partir de sacos conjuntivais normais como **Peptostreptococcus** sp, **Peptococcus** sp, **Eubacterium** sp, **Actinomyces** sp, **Clostridium** sp, **Arachnia** sp e **Lactobacillus** sp.

As variações encontradas na literatura (Quadro 1), são muitas. Segundo MATUURA⁸, sexo e idade não influenciariam nos resultados com o que discorda BROOK⁹. Dos 40 pacientes estudados por nós, 29 eram do sexo feminino (72,5%) e apresentaram 30,03% de amostras positivas, enquanto que entre os 11 pacientes do sexo masculino (27,5%), 45,45% apresentaram amostras positivas, diferença esta não significativa. Em relação à idade, no nosso estudo, foram examinados apenas pacientes em idade adulta, não sendo possível comparar este dado aos resultados obtidos por MATUURA⁸ e BROOK⁹.

As variações encontradas no estudo desta microbiota anaeróbia também podem sugerir que fatores geográficos, climáticos e de saturação de oxigênio atmosférico atuariam nestes resultados, porém tal consideração pode ser conjectural. BACHARACH não isolou nenhuma bactéria anaeróbia a partir de espécimes obtidos do saco conjuntival de pessoas normais em Israel.

Além da identificação de outros agentes anaeróbios estritos nesta pesquisa, o achado de **Veillonella** sp em nossas amostras, acrescenta um dado que nos leva a acreditar que o fundo de saco conjuntival constituiu-se realmente em um microambiente anaeróbio, visto que esta bactéria é extremamente sensível ao oxigênio, sendo utilizada no Laboratório de Bactérias Anaeróbias da Universidade de São Paulo, co-

mo controle de seus métodos de anaerobiose (comunicação pessoal ao autor por dois co-autores), ENM, MAAS).

A presente pesquisa não visa analisar se esta microbiota anaeróbia é transitória ou permanente, nem discutir o papel da mesma nas infecções oculares. Diversos trabalhos têm, cada vez mais, mostrado bactérias anaeróbias como agentes etiológicos de diferentes infecções oculares^{3, 5, 10}. Contudo o conhecimento desta microbiota normal deve colaborar para estabelecer critérios microbiológicos corretos ao se determinar tais agentes como responsáveis por algumas infecções oculares.

RESUMO

Amostras obtidas a partir de 80 casos conjuntivais de 40 indivíduos normais foram submetidas a exames microbiológicos para se determinar a presença ou ausência de flora bacteriana anaeróbia. Das 80 culturas realizadas, 71 (88,75%) continham pelo menos uma bactéria anaeróbia. Bactérias anaeróbias estritas foram obtidas em 35% (28/80) das culturas. Destas, o agente mais frequente foi o **Propionibacterium granulosum** presente em 64,28%. A seguir, **Bifidobacterium adolescentis** em 17,85%, **Bacteroides** sp em 10,71%, **Veillonella** sp em 10,71% e **Sarcina** sp em 3,57%. Nossos achados sugerem que o saco conjuntival normal constitui-se em um microambiente anaeróbio.

SUMMARY

Specimens from the conjunctival sac of 80 healthy eyes were cultured to determine the presence or absence of an anaerobic flora. Of the 80 cultures performed, 71 (88,75%) contained at least one anaerobic microorganism. Obligate anaerobes were recovered from 35% (28/80) of the cultures. **Propionibacterium granulosum** was the predominant obligate anaerobe encountered, present in 64,28% (18/28). **Bifidobacterium adolescentis** was present in 17,85%, **Bacteroides** sp in 10,71%, **Veillonella** sp in 10,71% and **Sarcina** sp 3,57%. Our findings suggest that the normal conjunctival sac is an anaerobic microenvironment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXENFELD, T. — **The bacteriology of the eye**. London, J. B. Bailliere, Tindall e Cox, 1908.
- BACHARACH, U.; GURERITCH, J.; LANDAU, J. — The flora of normal conjunctiva of healthy people in Israel. *Acta Med. Orient.*, 12: 10-13, 1953.
- BROOK, I. — Anaerobic and aerobic bacterial flora of acute conjunctivitis in children. *Arch. Ophthalmol.*, 98: 833-5, 1980.
- CROSS, S. L. — Gas-gangrene of the eye. *Lancet*, 2: 515-6, 1941.
- HOLDEMAN, L. V. & MOORE, W. E. C. — (eds.). **Anaerobic Laboratory manual: staff of the Anaerobic Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University**. 3. ed. Blacksburg, Virginia, 1975.
- KHORAZO, D. & THOMPSON, R. — Bacterial flora of the normal conjunctiva. *Arch. Ophthalmol.*, 18: 1114, 1935.
- LOCATHER-KHORAZO, D. & GUTIERREZ, E. H. — The bacterial flora of the healthy eye. In: LOCATHER-KORAZO, D. & SEGAL, B. C. (eds.) — **Microbiology of the eye**. St. Louis, C. V. Mosby, 1972, p. 13-23.
- MATUURA, H. — Anaerobes in the bacterial flora of the conjunctival sac. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 15: 116-24, 1971.
- McNATT, J.; ALLEN, S. D.; WILSON, L. A.; DOWELL Jr., V. R. — Anaerobic flora of the normal conjunctival sac. *Arch. Ophthalmol.*, 96: 1448-1450, 1978.
- PERKINS, R. E.; KUNOSEN, R. B.; PRATT, M. V.; LEIBOWITZ, H. M. — Bacteriology of normal and infected conjunctiva. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 147-9, 1975.
- RAPHAEL, S. — Coleta e exame de amostras para a investigação microbiológica. In LYNCH: **Técnicas de Laboratório**, 4ª ed., Ed. Manole, 1986, p. 516-539.
- RINSER, J. — Ocular Bacteriology — In: TABBARA, K. & HYN-DIUK, R. (eds.) — **Infections of the Eye**, 1ª ed., Little, Brown & Company, Boston, 1986, p. 140-143.
- ROSENBLATT, J. E.; FALLON, A.; FINEGOLD, S. M. — **Comparison of the methods for isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens**. *Appl. Microbiol.*, 25: 77-85, 1973.
- SMITH, L. D. S. — Anaerobes in the microflora of the human body in the pathogenic anaerobic bacteria. 2. ed., Springfield, Charles C. Thomas, 1975, p. 341-63.
- WATT, B.; COLLEC, J. G.; BROWN, R. — **Tests of performance of anaerobic jars**. *J. Clin. Pathol.*, 29: 234-236, 1976.

QUADRO 1

Comparação dos resultados obtidos por diferentes autores e países no isolamento de bactérias anaeróbias estritas a partir de culturas de sacos conjuntivais normais.

ORGANISMO	Porcentagem do total de culturas positivas			
	Japão Matuura e col. 1971	EUA Perkins e col. 1975	EUA Mc Natt e col. 1978*	Brasil Campos e col. 1989
Propionibacterium acnes	62,00%	43,80%	75,40%	—
Propionibacterium granulosum	1,40%	—	0,50%	64,20%
Peptostreptococcus sp	—	6,30%	4,90%	—
Bifidobacterium adolescentis	2,50%	—	—	17,85%
Bacteroides sp	25,00%	—	—	10,71%
Veillonella sp	—	—	—	10,71%
Sarcina sp	—	—	—	3,57%
Clostridium sp	1,25%	1,00%	—	—
Eubacterium sp	1,25%	1,00%	—	—
Lactobacillus sp	—	2,10%	—	—
Actinobacterium sp	1,25%	—	—	—

* Estudo realizado com 2 coletas em épocas diferentes considerando apenas a 1ª coleta para efeito comparativo.