

Laboratório de Anaeróbios

Bastonetes gram-negativos: ecologia, sistemática e fatores de virulência

Prof. Dr. Mario J. Avila-Campos

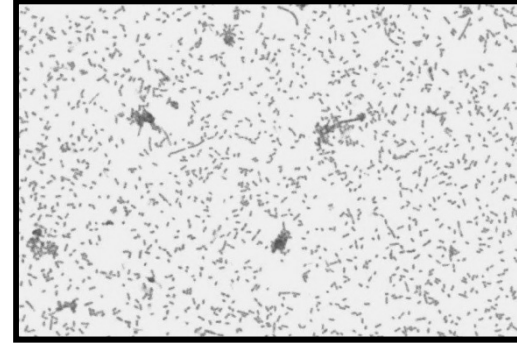
<http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac>

Gêneros bacterianos de importância na clínica

- Gênero *Porphyromonas* (assacarolíticos)
- Gênero *Prevotella* (sacarolíticos)
- Gênero *Fusobacterium*
- Gêneros *Bacteroides*
- Gêneros *Parabacteroides*
- Gênero *Mitsuokella*: *M. dentalis*
- Outros gêneros: *Selenomonas*; *Centipeda*;
Leptotrichia.

Características gerais

- Sem esporos, imóveis
- Alguns produzem pigmento marrom a negro, e fluorescência.
- Exigentes em termos atmosféricos e nutricionais (hemina e menadiona).
- Pertencem à microbiota residente bucal, intestinal e trato genito-urinário de humanos e animais.



**Feridas
cirúrgicas**

Bacteroides spp.
Prevotella spp.
Porphyromonas spp.
Fusobacterium spp.

Abscessos

**Microbiota
Bucal**

Animais

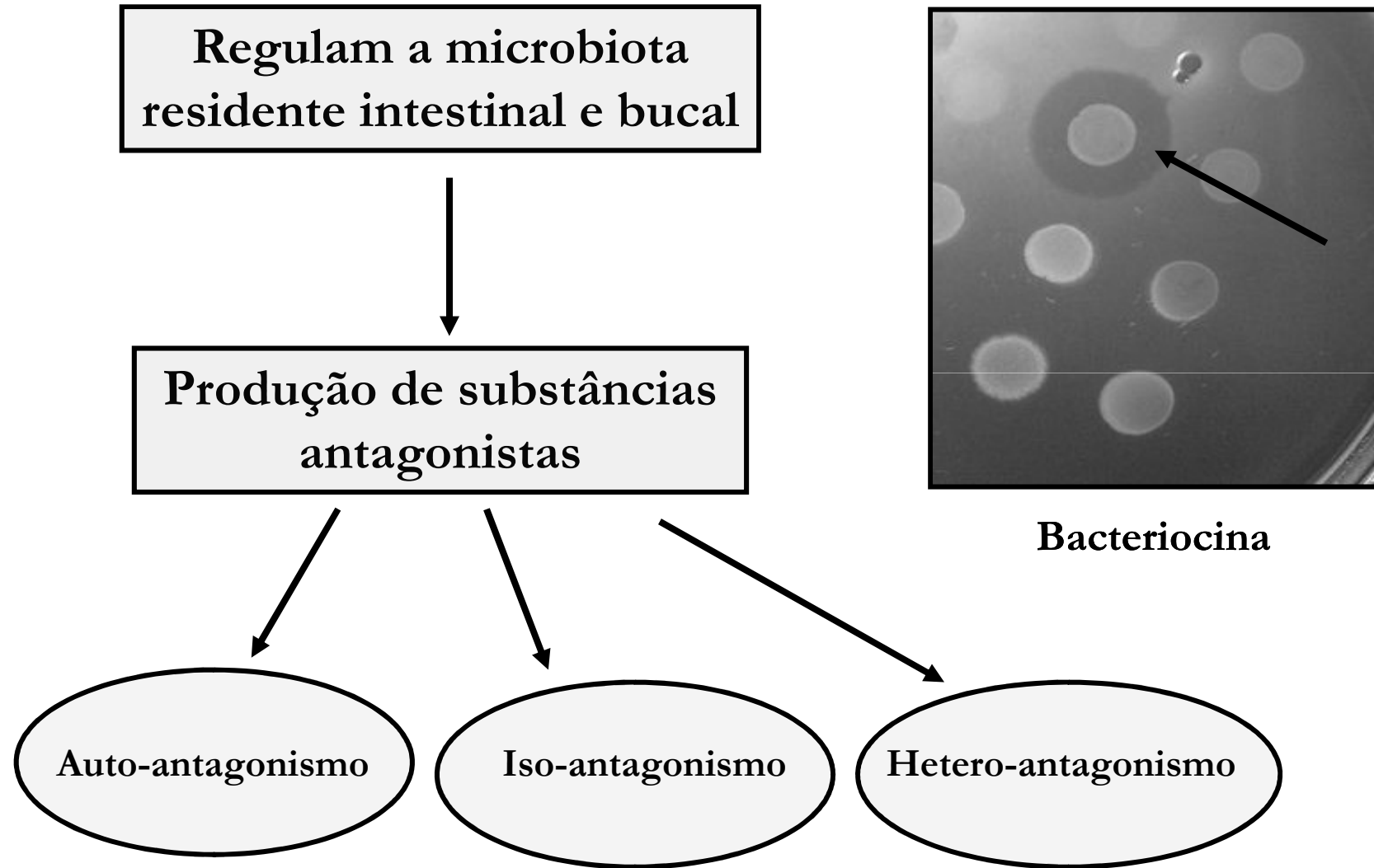
Humanos

**Microbiota
Intestinal**

Sangue

**Água contaminada
(esgoto)**

Aspectos ecológicos:



Gênero *Fusobacterium*

- Bactérias fusiformes, presentes no trato gastrointestinal
- Patogenicidade pouco eficiente
- Papel importante na formação do biofilme dental
- Espécies e sub-espécies dificulta a classificação taxonômica
- Espécies bucais implicadas em vários tipos de câncer

Gênero *Fusobacterium*

Ativação do Complemento



Hidrofobicidade



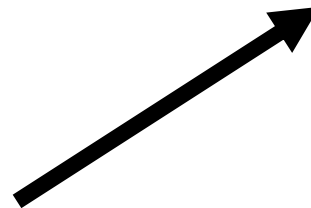
Fusobacterium spp.



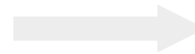
Estimulação de Linfócitos

Aderência aos tecidos do hospedeiro

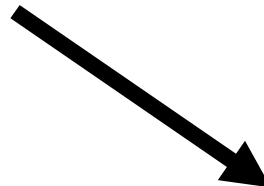
(adesinas e fímbrias)



Metabólitos tóxicos
(H₂S)



Hemolisinas
(alfa e beta)



Gênero *Fusobacterium*

F. alocis

F. necrophorum subsp. *funduliforme*

F. necrophorum subsp. *necrophorum*

F. nucleatum subsp. *animalis*

F. nucleatum subsp. *fusiformis*

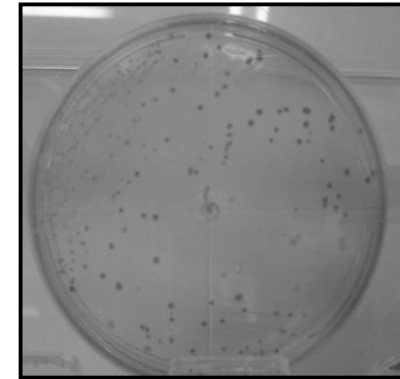
F. nucleatum subsp. *nucleatum*

F. nucleatum subsp. *polymorphum*

F. nucleatum subsp. *vicentii*

F. varium

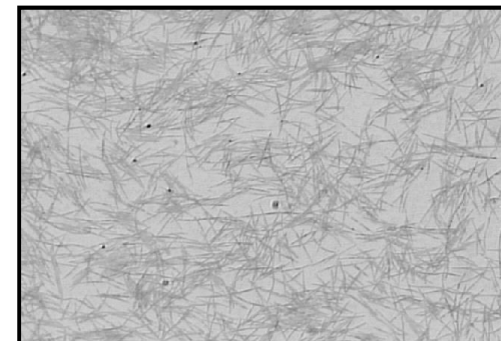
F. ulcerans



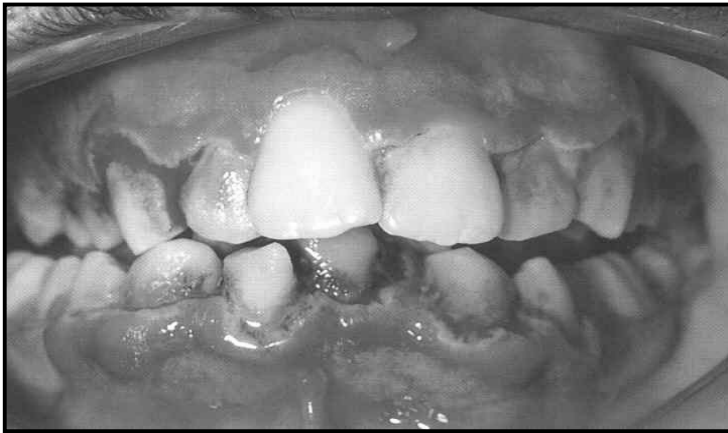
Ágar Omata-Disraely



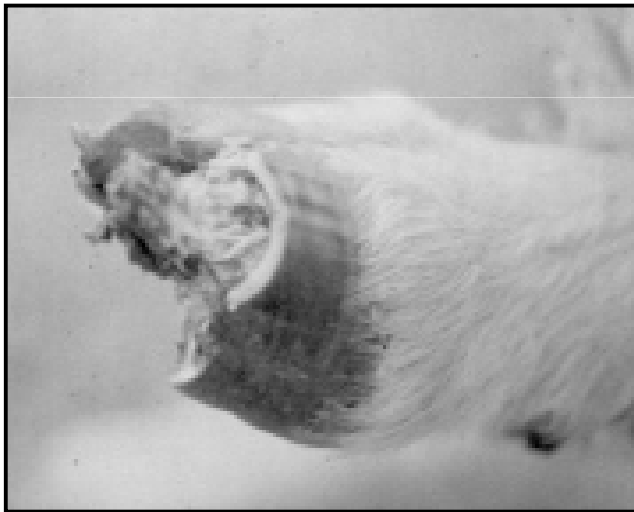
Ágar sangue



Algumas patologias do gênero *Fusobacterium*



Gingivite ulcero-necrosante (GUN)

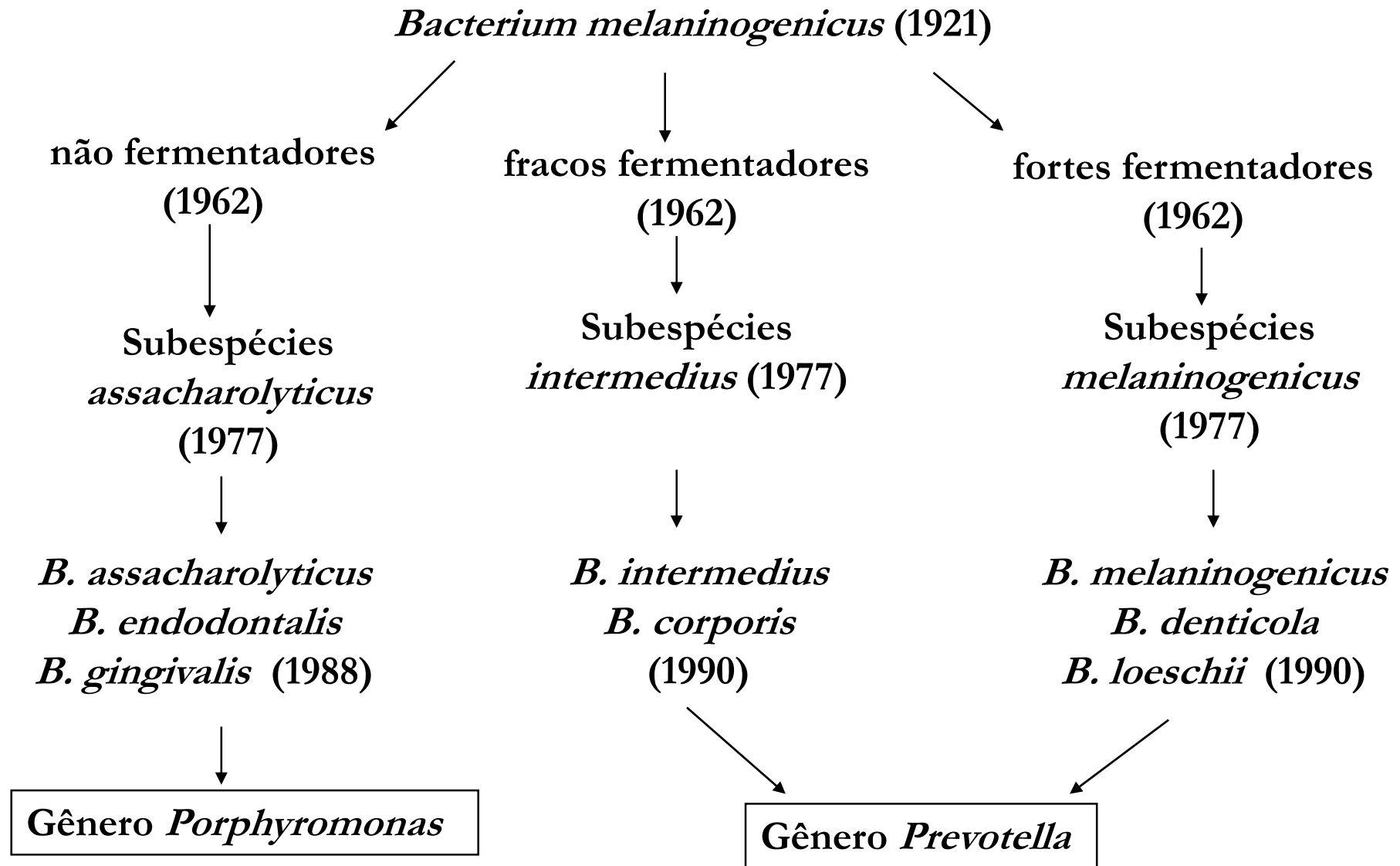


Pododermatite (caprinos e ovinos): *F. necrophorum* + *Dichelobacter nodosus*

Gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*

- Bactérias produtoras de pigmento negro
- Extremamente sensíveis à presença de oxigênio
- Produzem colônias fluorescentes
- Participam de infecções orais, extra-orais, intestinais e extra-intestinais

Anaeróbios pigmentados: Evolução taxonômica



Gêneros

Porphyromonas

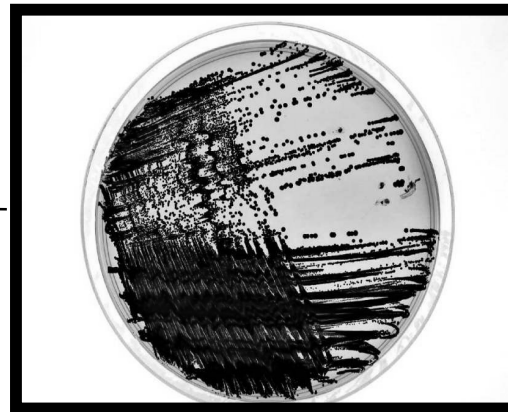
P. assacharolytica
P. endodontalis
P. gingivalis
P. salivosa
P. circumdentaria
P. canoris
P. cangingivalis
P. cansulci
P. crevioricanis
P. gingivicanis
P. gulae
P. macacae
P. levii

Laboratório de Anaeróbios

Prevotella

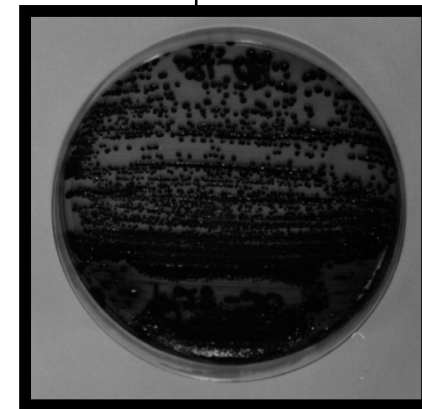
fracos fermentadores

P. corporis
P. intermedia (1992)
P. nigrescens (1992)
P. pallens (1998)



fortes fermentadores

P. melaninogenica
P. denticola
P. loescheii
P. tannerae

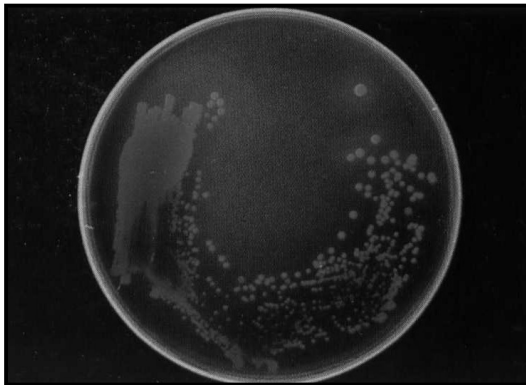


Jousimies-Somer (1995); Könönen et al. (1998); Fournier et al. (2001)

Espécies de *Porphyromonas* isoladas de humanos e animais

Humanos

P. asaccharolytica
P. endodontalis
P. gingivalis
P. catoniae



Animal

P. cangingivalis
P. canoris
P. cansulci
P. circumdentaria
P. crevioricanis
P. gingivicanis
P. levii
P. macacae
P. gulae
P. levii-like organisms
P. endodontalis-like organisms

Prevotella: Espécies pigmentadas e não pigmentadas

Pigmentados

P. corporis
P. denticola
P. intermedia
P. melaninogenica
P. nigrescens
P. tannera

Não Pigmentados

<i>P. bivia</i>	<i>P. buccae</i>
<i>P. buccalis</i>	<i>P. disiens</i> *
<i>P. heparinolytica</i> **	<i>P. oralis</i>
<i>P. oris</i>	<i>P. oulorum</i>
<i>P. veroralis</i>	<i>P. enoeca</i>
<i>P. zooglyphiformans</i> **	

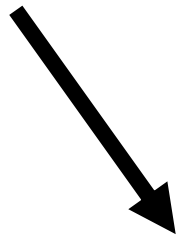
* UV vermelho-amarelado

** Reagrupados no gênero *Bacteroides*

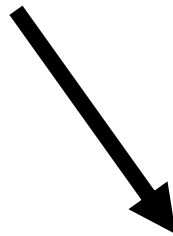
Fatores de virulência

Prevotella spp. e *Porphyromonas* spp.

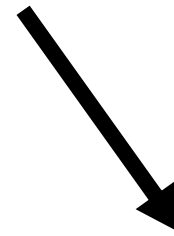
Adesinas*



Cápsula



Colagenase



Protease



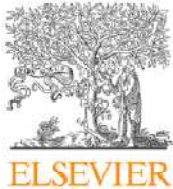
Edema e acúmulo de neutrófilos no sítio da infecção

*Fímbrias – *fimA* I, II, III, IV, V e VI

Porphyromonas gulae: Periodontite humana e canina



Anaerobe 17 (2011) 257–258



Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe



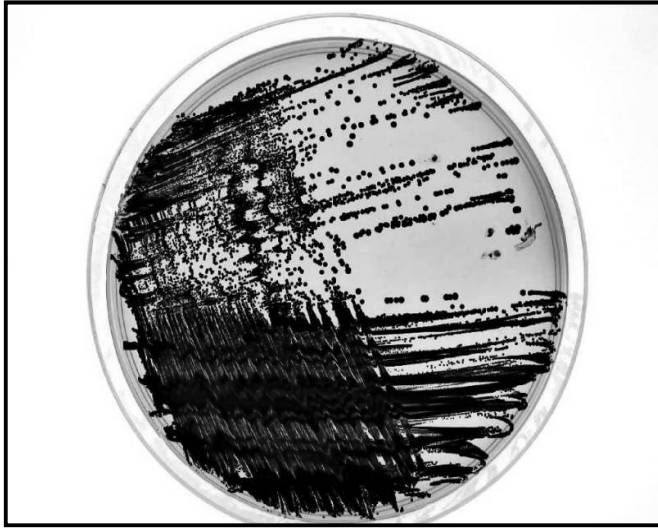
Note

Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis

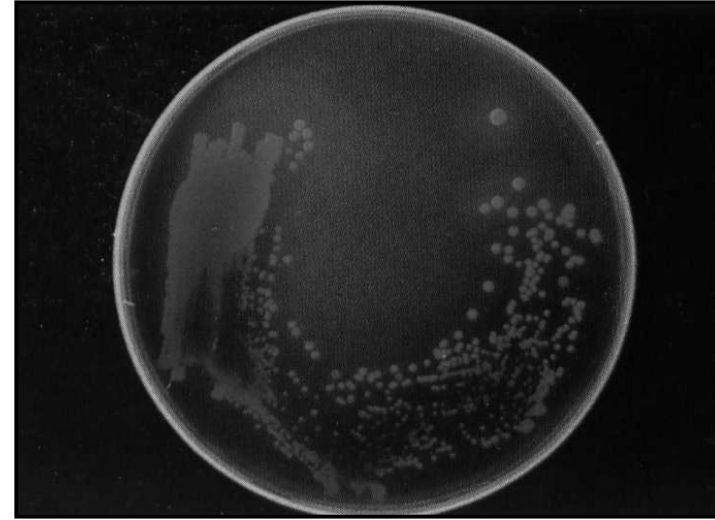
Gerusa Neyla Andrade Senhorinho^a, Viviane Nakano^a, Chengxu Liu^b, Yuli Song^b,
Sydney M. Finegold^{b,c,d}, Mario J. Avila-Campos^{a,*}

Laboratório de Anaeróbios

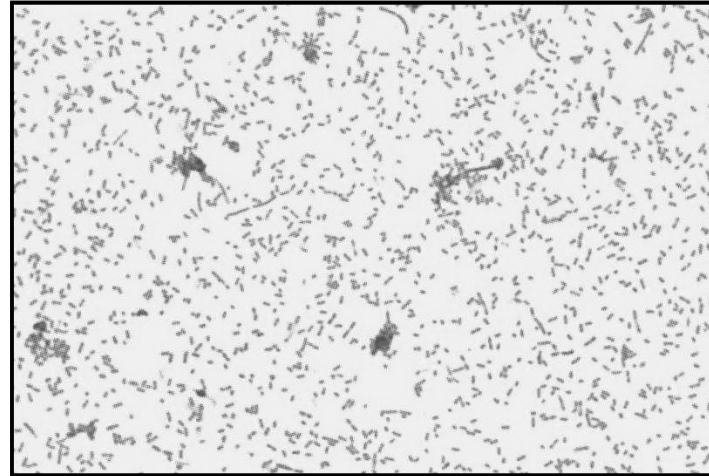
Prevotella spp. e *Porphyromonas* spp.



Cultura pura



Fluorescência



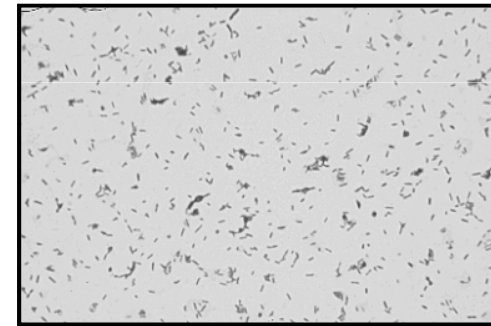
Laboratório de Anaeróbios

Gênero *Bacteroides* - Grupo *Bacteroides fragilis*

Família *Bacteroidaceae*

Gênero *Bacteroides*

Grupo *Bacteroides fragilis*

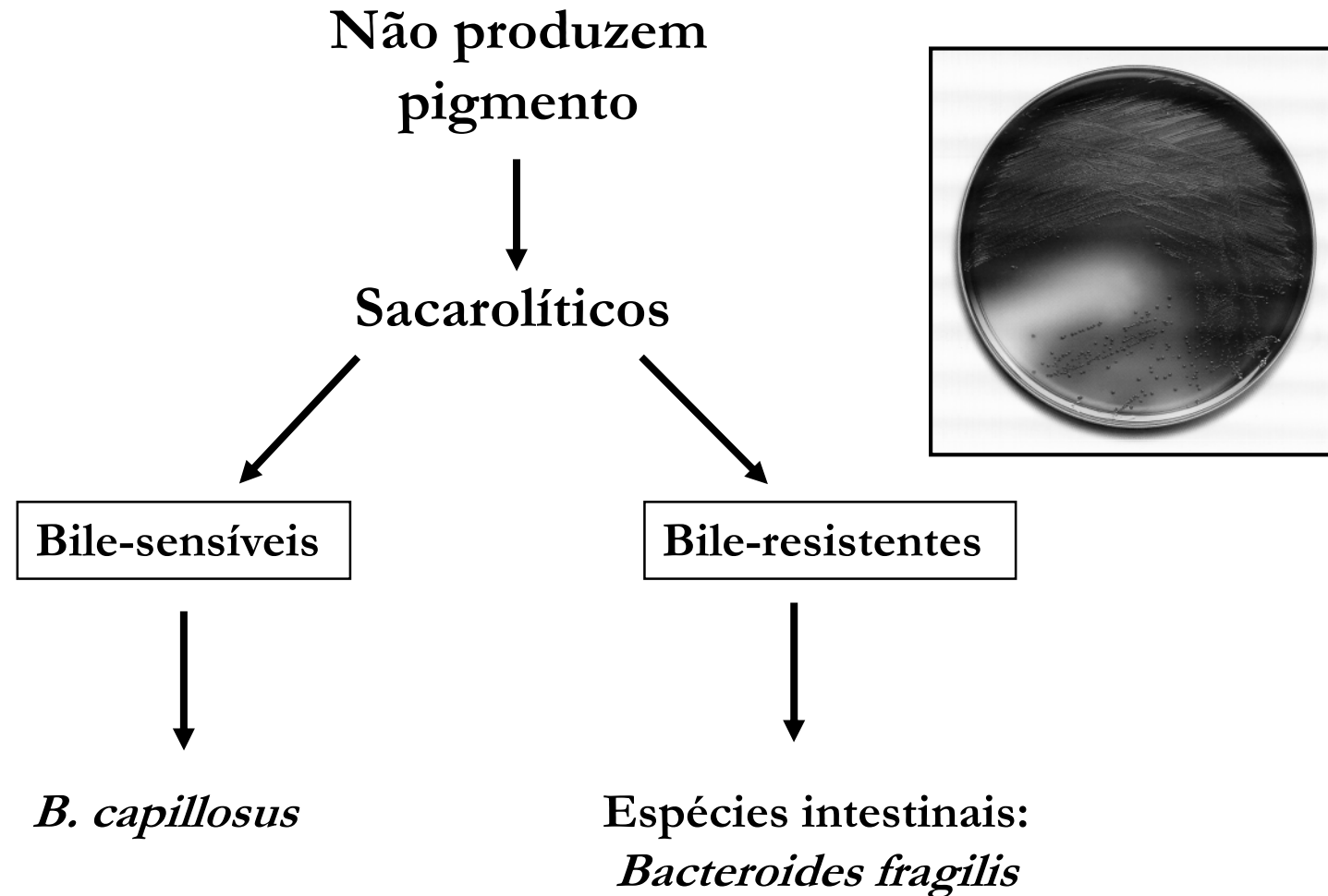


Espécies { *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. uniformis*, *B. caccae*,
B. thetaiotaomicron, *B. eggerthii*, *B. stercoris*, *B. distasonis*,
B. merdae.

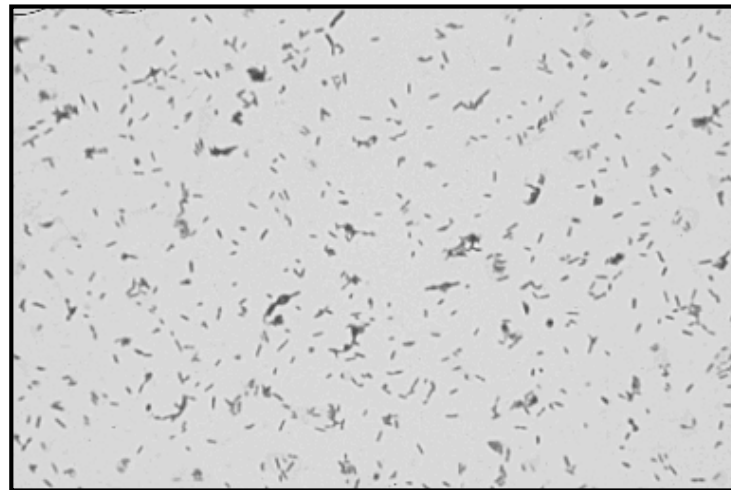
Gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*

- Pequenos bastonetes, anteriormente formaram parte do gênero *Bacteroides*
- Participação em infecções extra-intestinais, após cirurgias
- Gêneros filogeneticamente próximos

Família *Bacteroidaceae* - Gênero *Bacteroides*



Bacteroides fragilis



Laboratório de Anaeróbios

Bacteroides fragilis



Fascite necrosante



Abscesso hepático



Peritonite

Novas espécies do gênero *Bacteroides*

Song et al. (2004)

Bacteroides nordii

Bacteroides salyersae

Kitahara et al. (2005)

Bacteroides plebeius

Bacteroides coprocola

Song et al. (2005)

Bacteroides goldsteinii

Fenner et al. (2005)

*Bacteroides massiliensis**

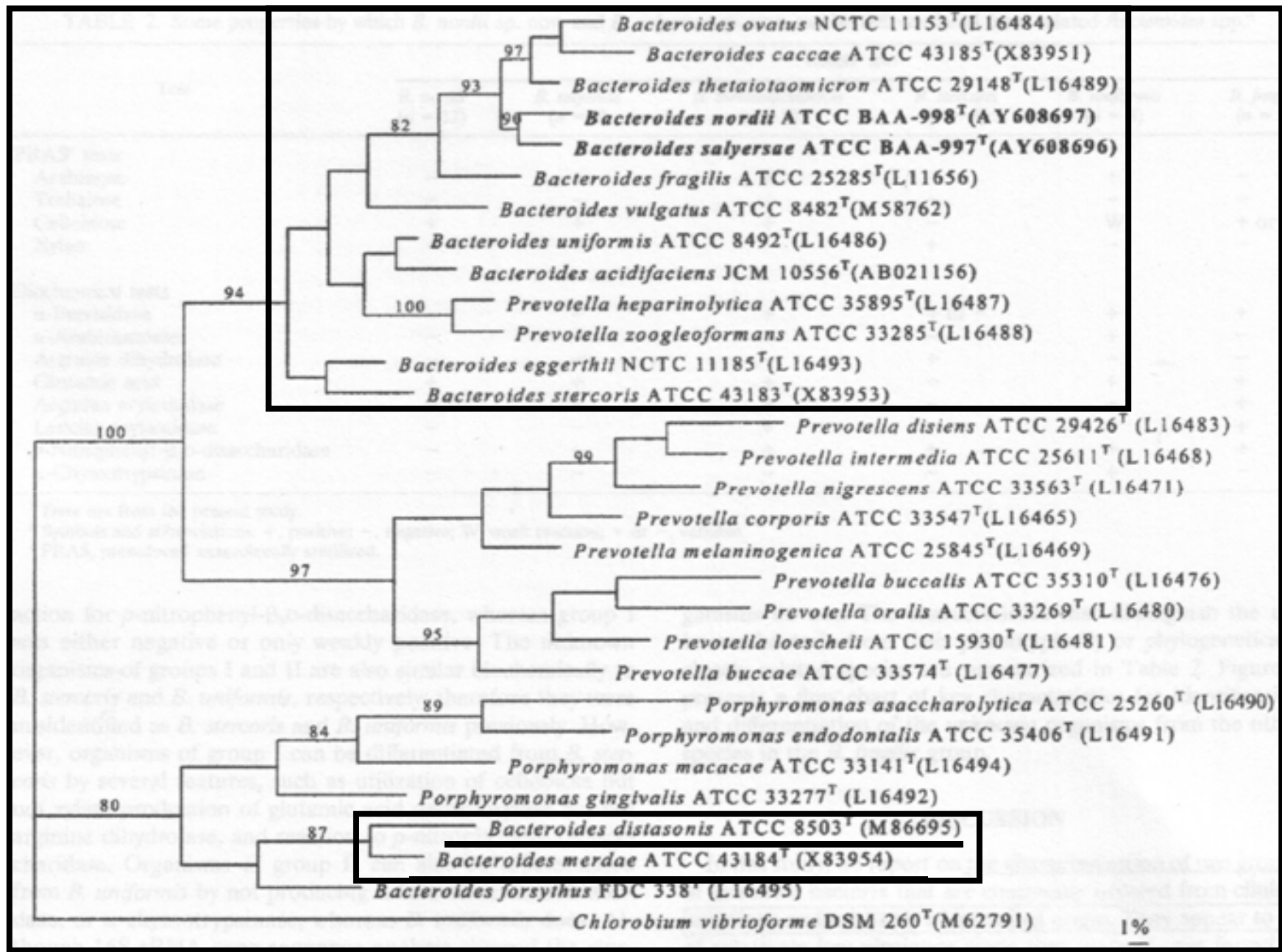
Bakir et al. (2006)

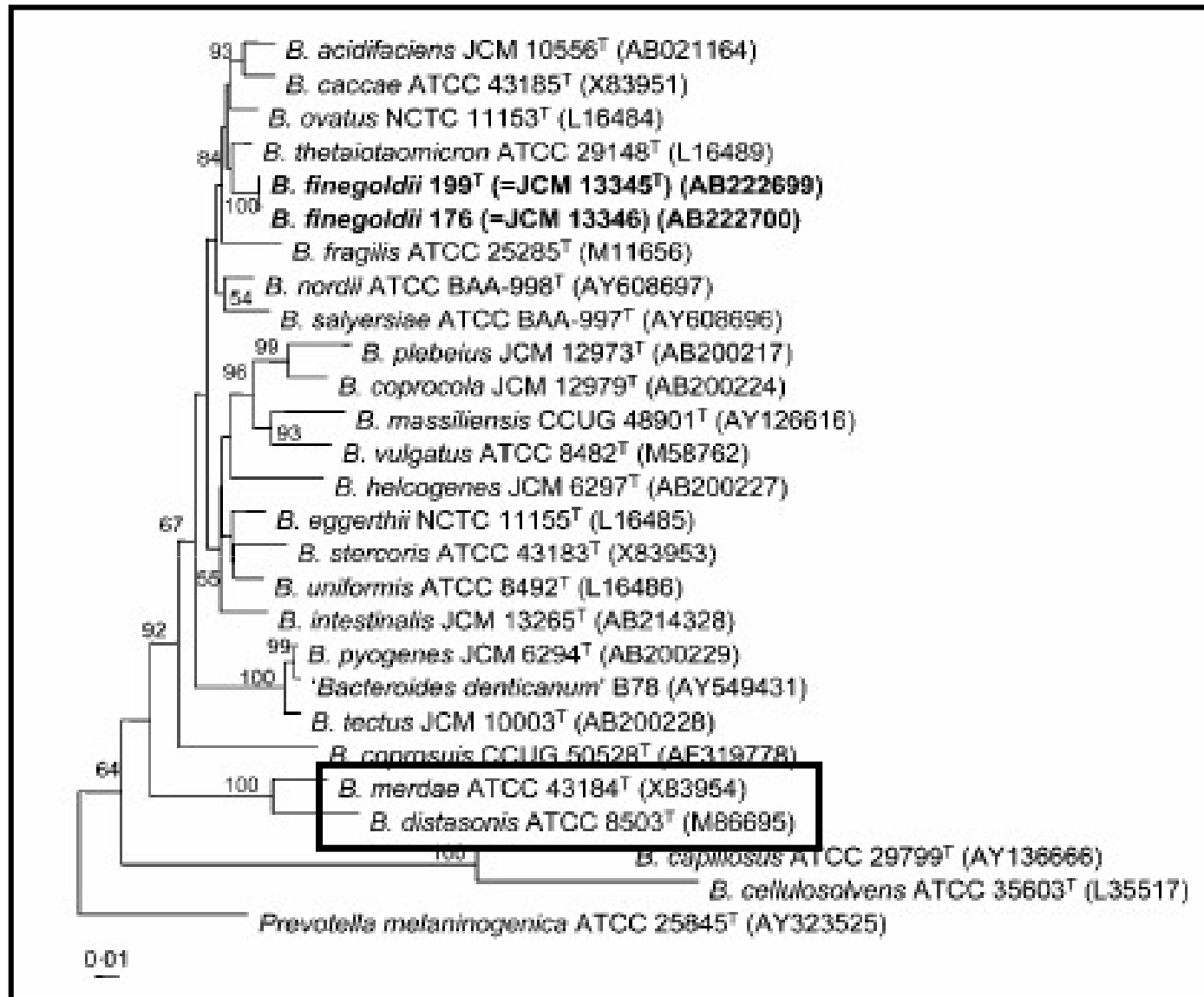
Bacteroides intestinalis

Bacteroides dorei

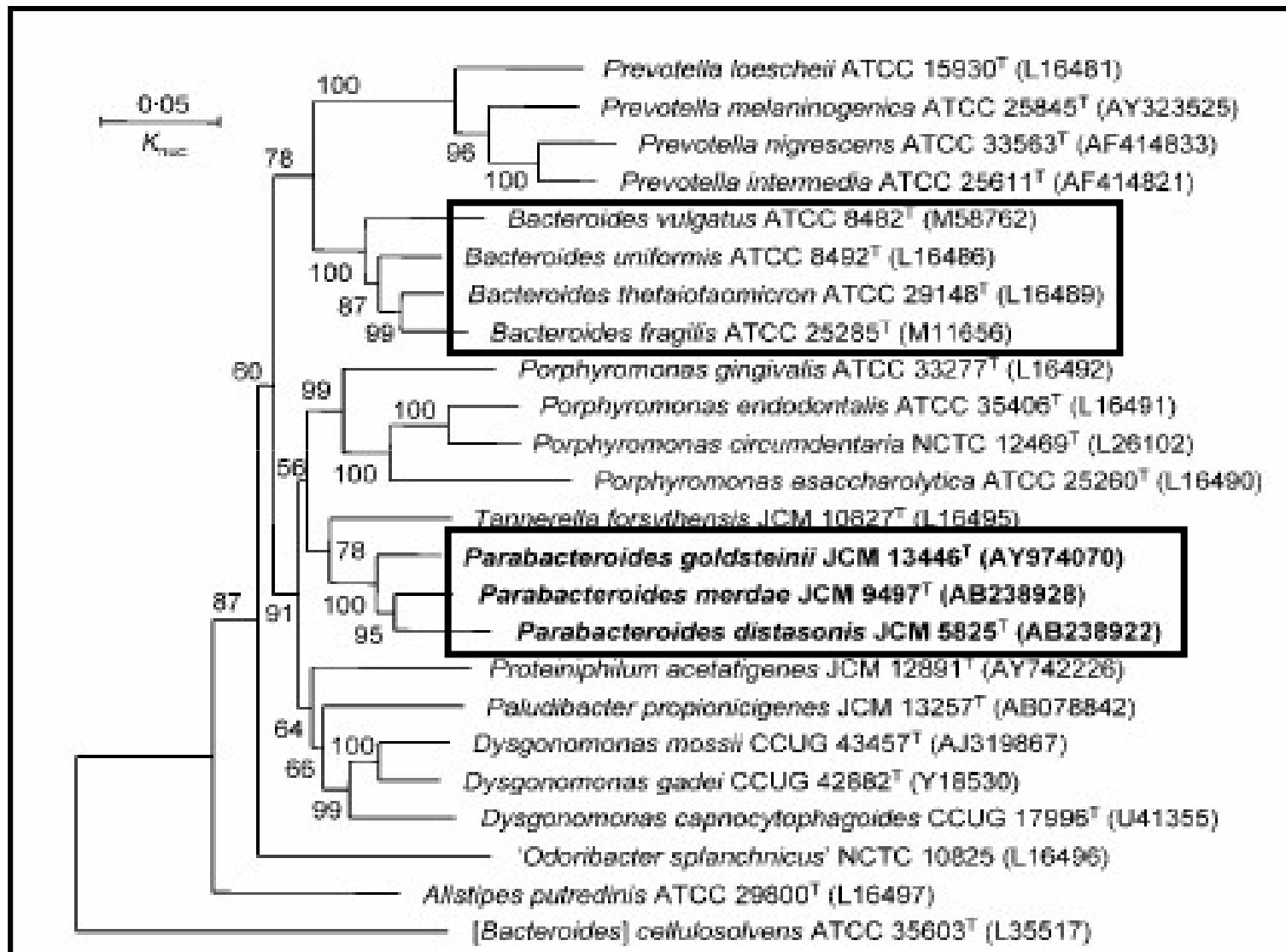
Bacteroides finegoldii

* Isolado de sangue de recém-nascido





Novo gênero *Parabacteroides*

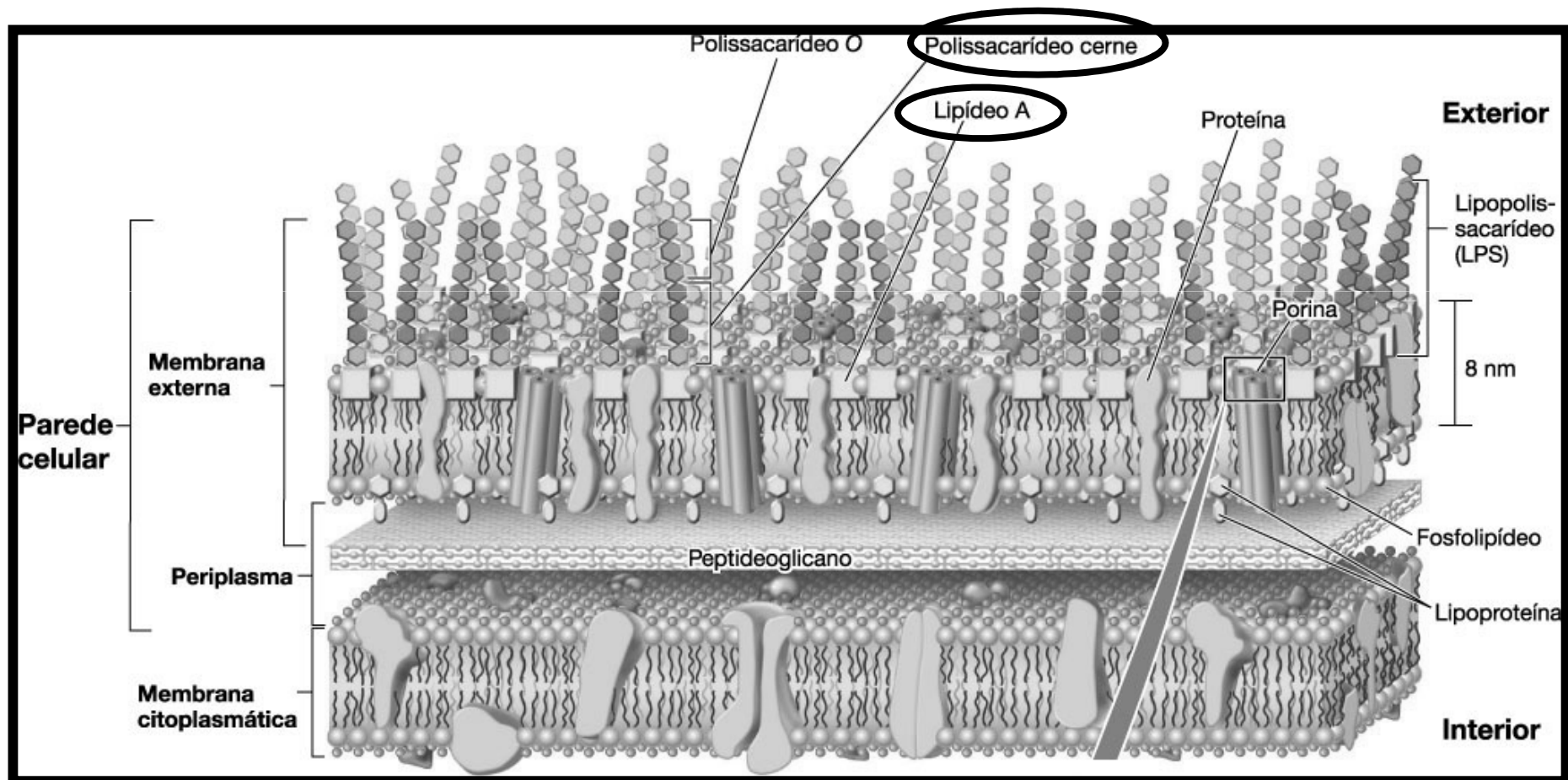


Principais fatores de virulência de *Bacteroides*

Estágio da infecção	Fator de virulência
ADESÃO	Cápsula polissacarídica Fímbrias Hemaglutininas
ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO/DANO TECIDUAL	Hemolisinas Neuraminidase Fragilisina (Toxina)
ANTIFAGOCITOSE	Cápsula polissacarídica Lipopolissacarídeo
PRODUTO DO METABOLISMO	Aminas

Componentes ausentes no LPS

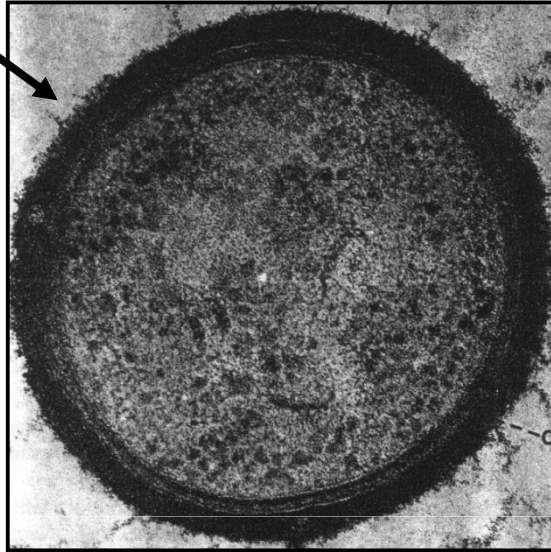
- 2-ceto-3-deoxioctanato (CDO) e heptose – polissacarídeo interno
- ácido 3-hidroxi-tetradecanóico – lipídio A



Tipos de cápsula reversível

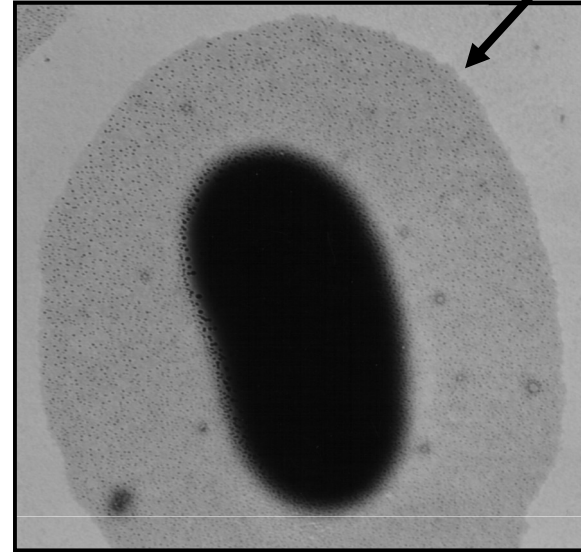
Fatores de Virulência

(120.000 X)



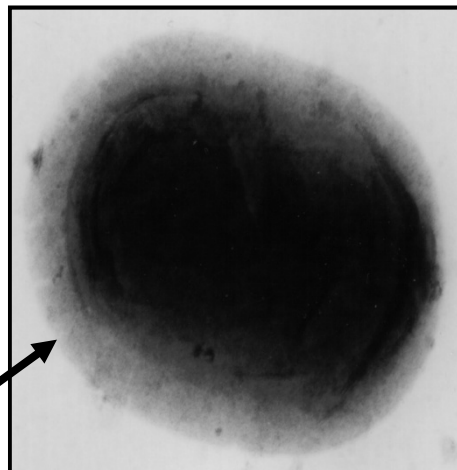
Camada eletrodensa

(27.400 X)



Grande

Pequena

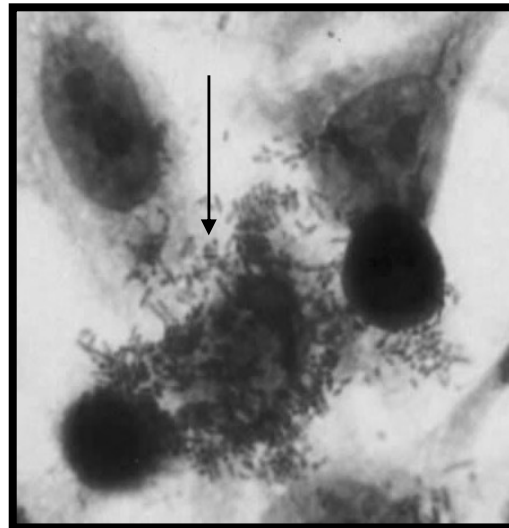


(52.000 X)

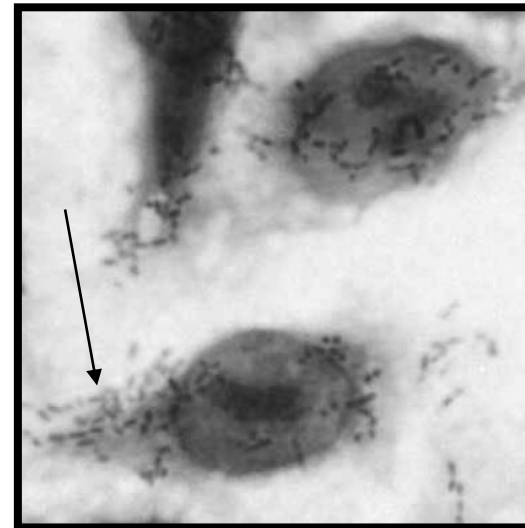
- Resistência ao soro
- Adesão
- Anti-fagocitose
- Formação de abscessos

Adesão de *Bacteroides* às células HEp-2

B. fragilis

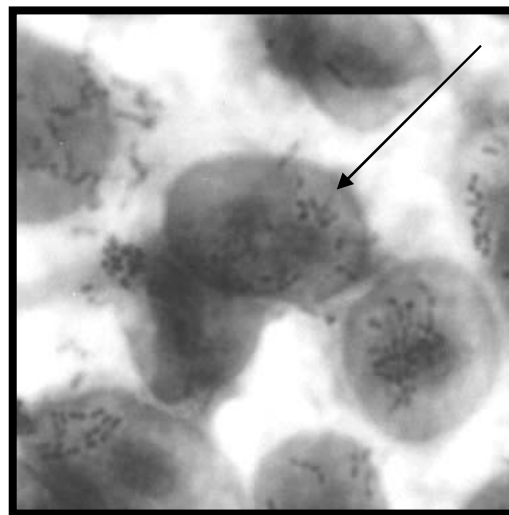


B. ovatus

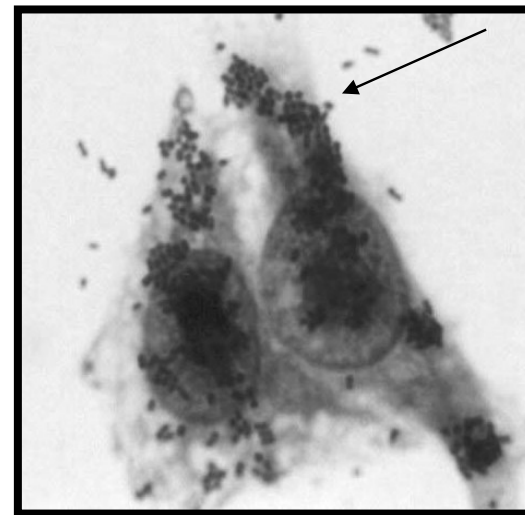


Padrão de adesão não definido

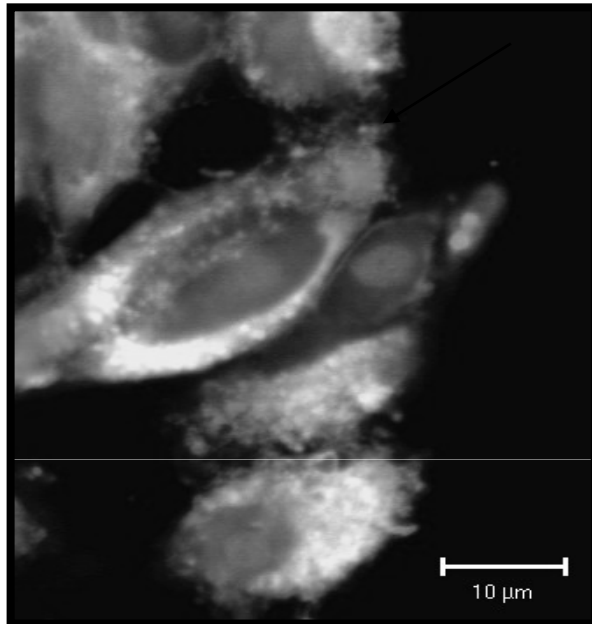
B. vulgatus



Adesão localizada
E. coli O127:H6



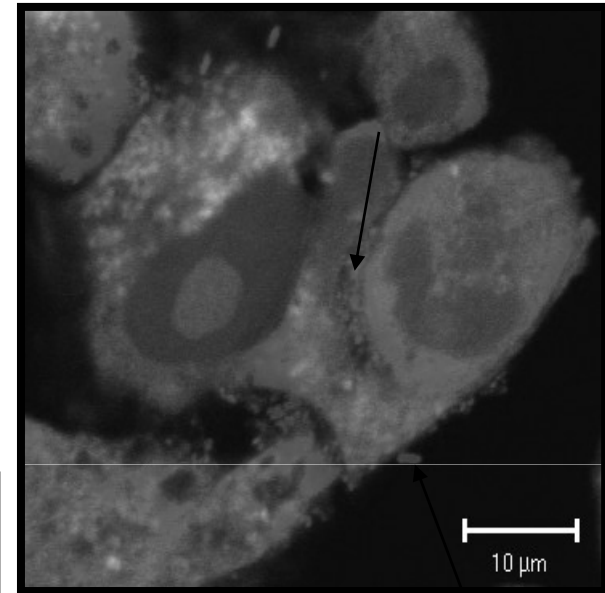
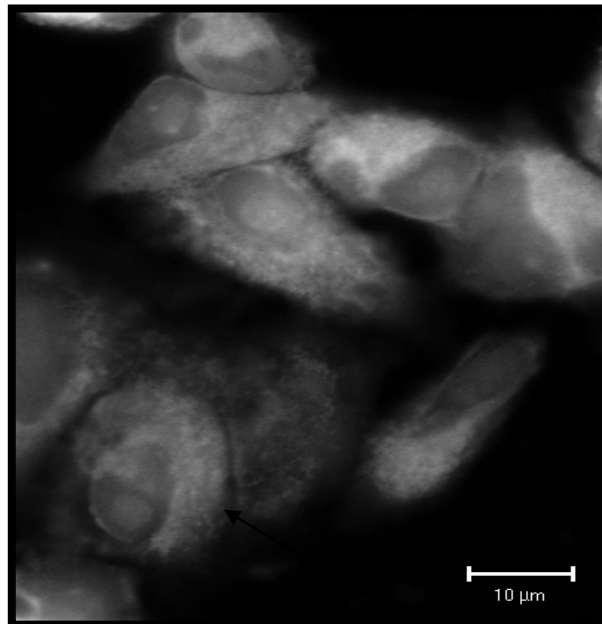
Invasão de *Bacteroides* e *Parabacteroides* às células HEp-2



B. fragilis

Microscopia
confocal

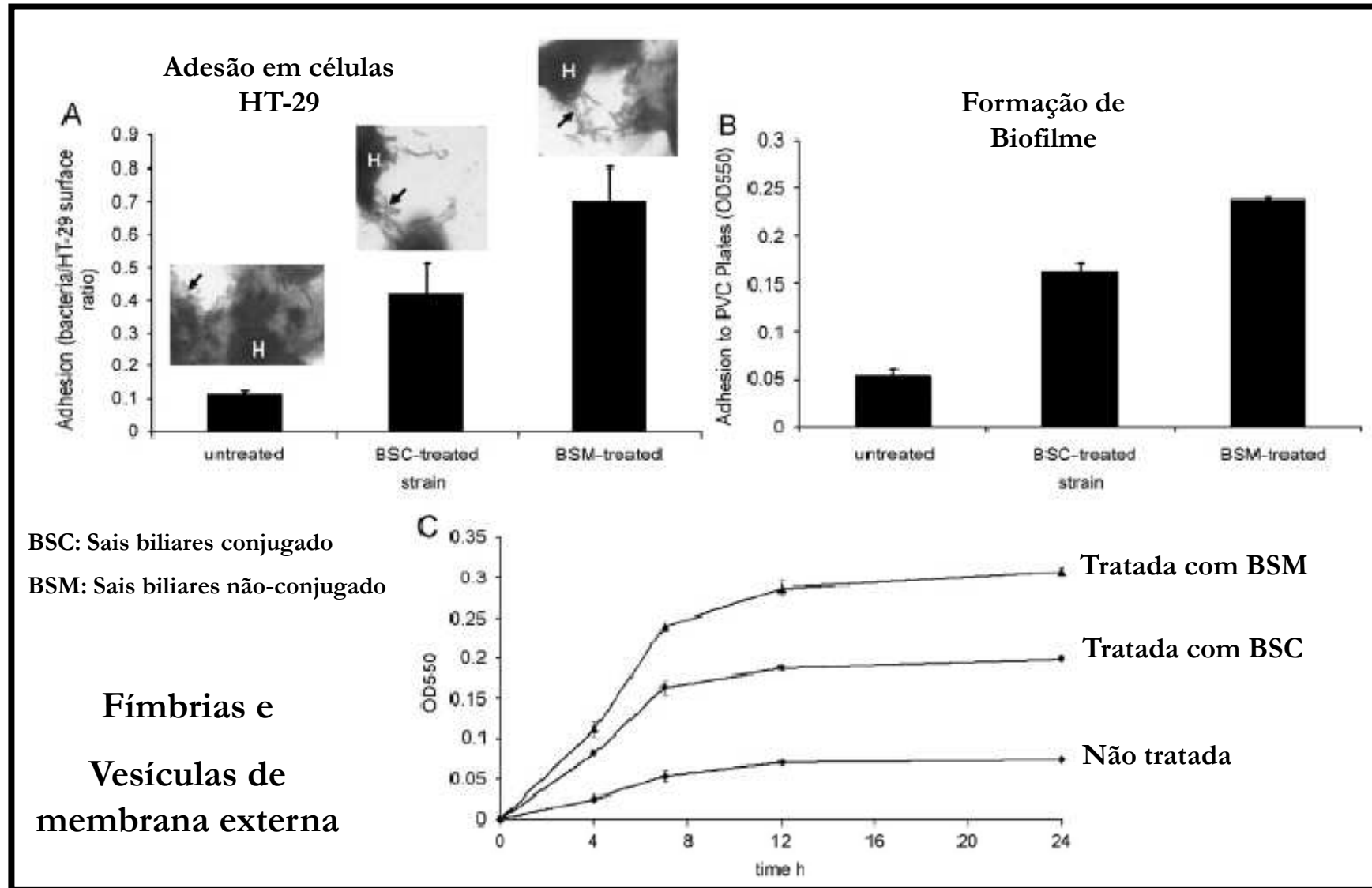
B. vulgatus



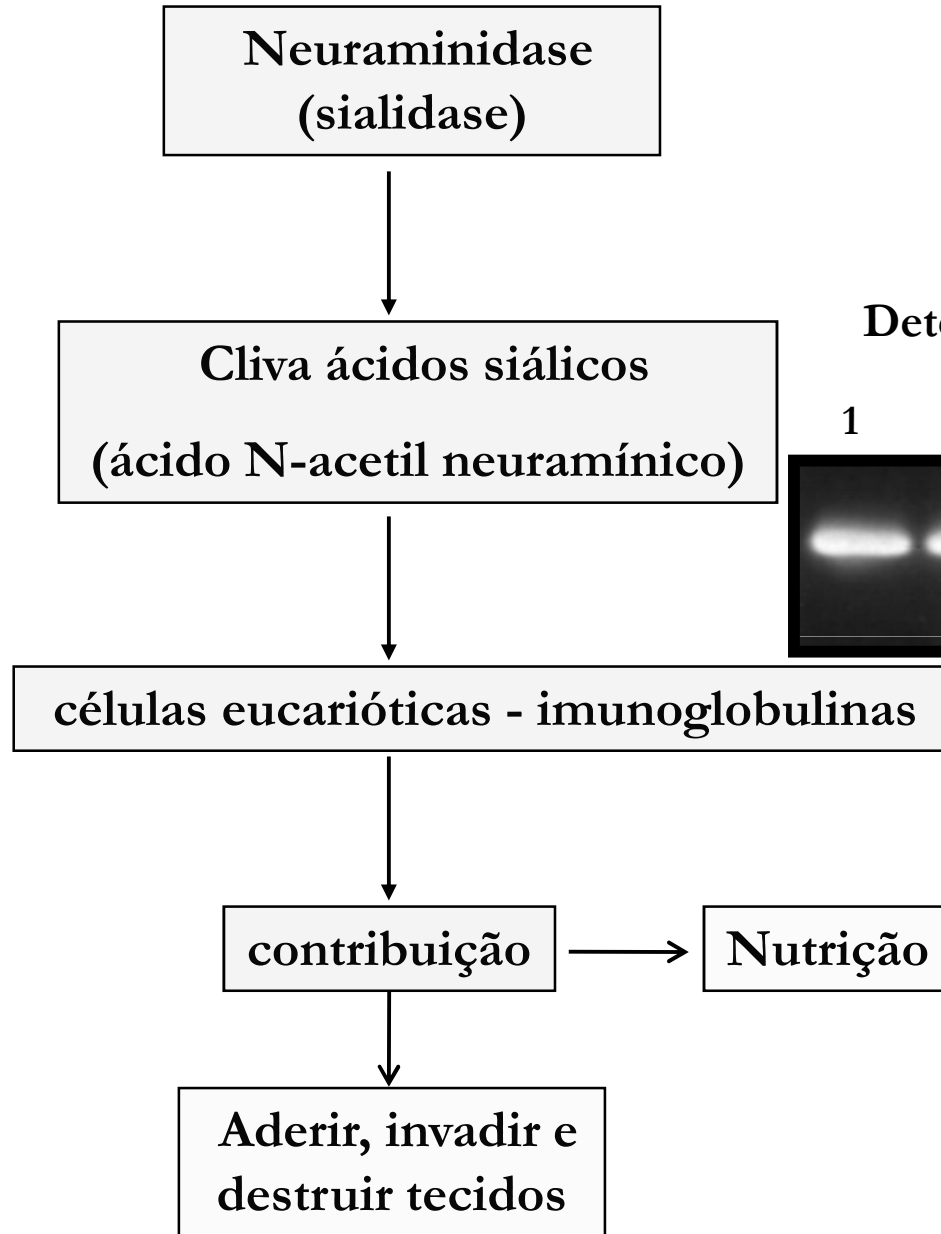
P. distasonis

DiOC: Iodeto diexil-oxacarbocianina (verde)
Marcador de Membrana Celular

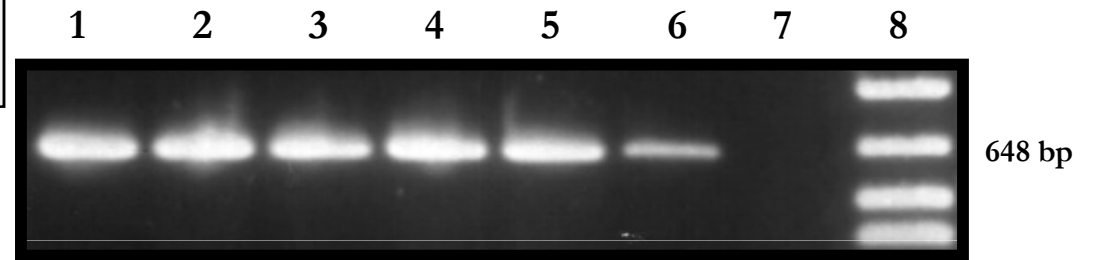
PI : Iodeto de Propídio (vermelho)
Marcador de DNA



Ác. ólico, glicocolato, taurocolato, quenodeoxicolato.



Detecção do gene *nanH* por Nested-PCR



nanH – Só a espécie *B. fragilis*

Neuraminidase e gene *nanH* em *B. fragilis*

Origem das Bactérias	Neuraminidase			
	Produção		Presença do gene	
	n	(%)	n	(%)
Diarreia (51)	42	(82,3)	29	(56,8)
Não diarreia (50)	43	(86)	37	(74)
TOTAL (101)	85	(84,1)	66	(65,3)

Enterotoxina



Bacteroides fragilis (ETBF)



Diarréia



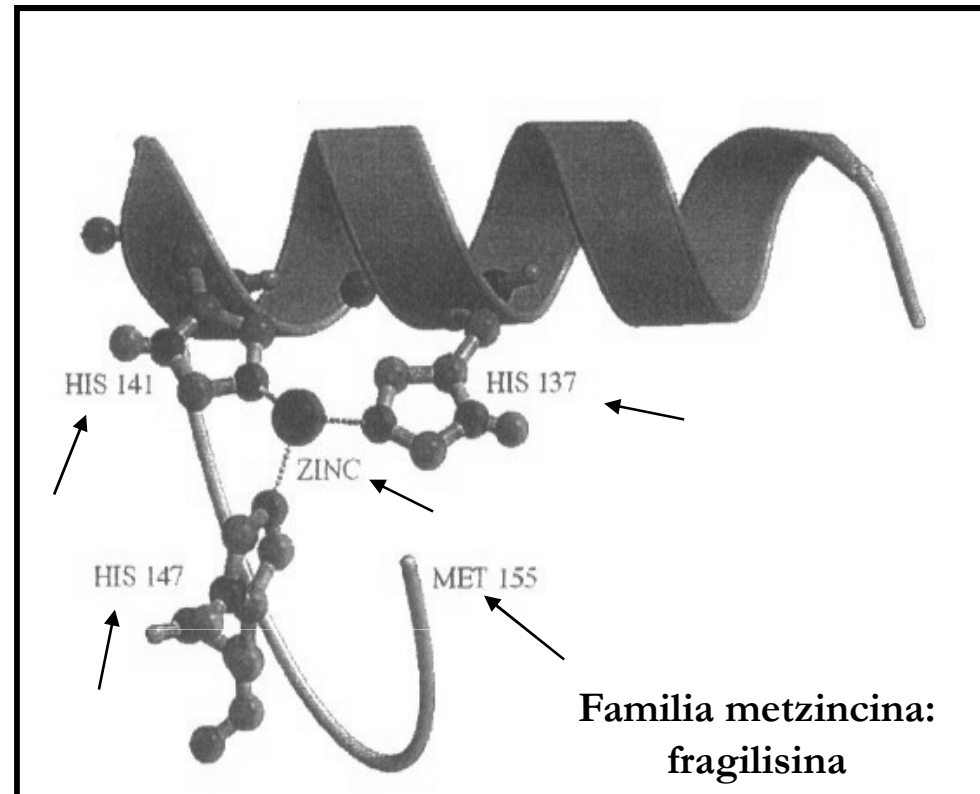
Animais (Myers et al., 1984)



Humanos (Myers et al., 1987)



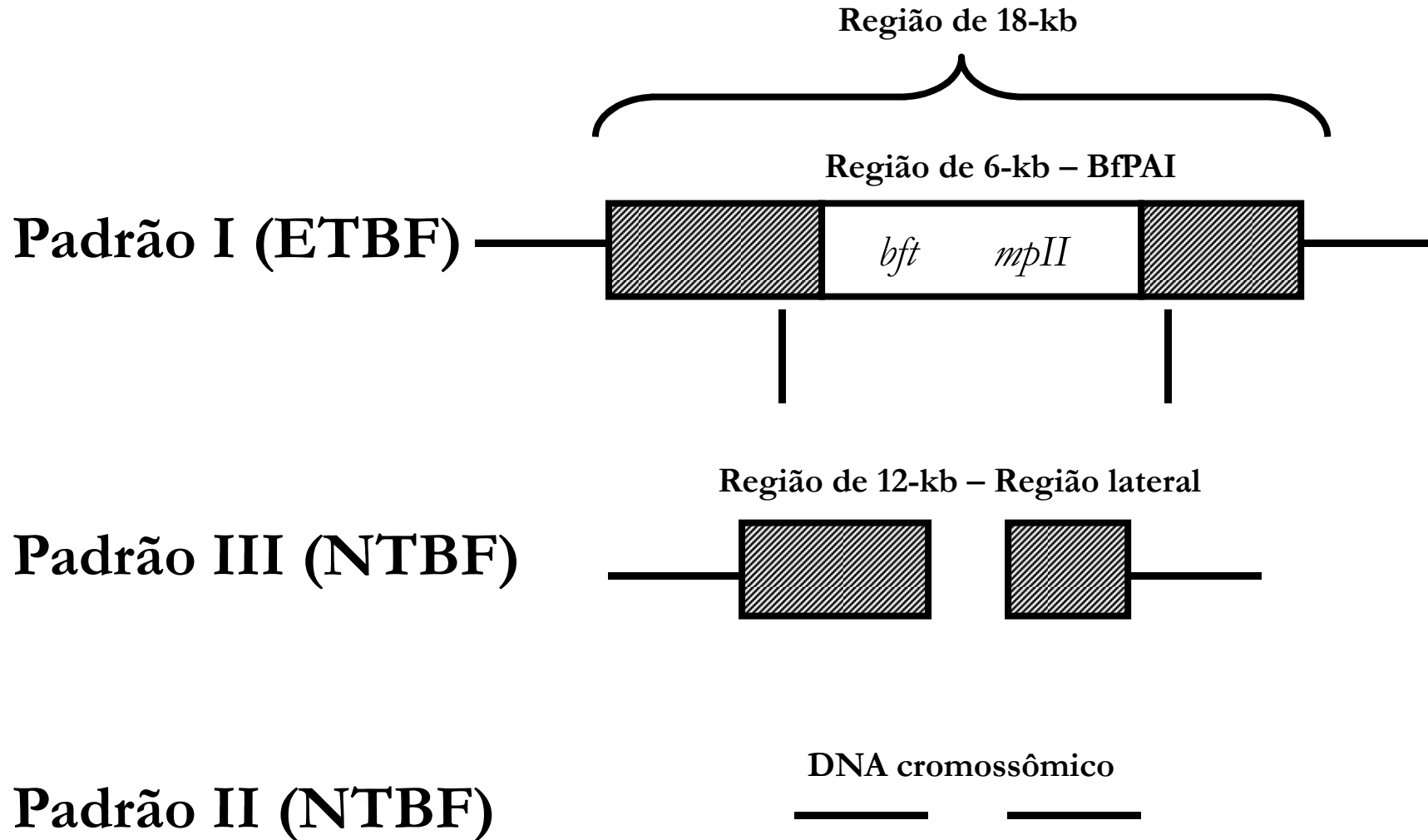
Metaloprotease



Zinco – estabiliza e potencializa
Histidina – essencial para o zinco
Metionina – integridade da ligação

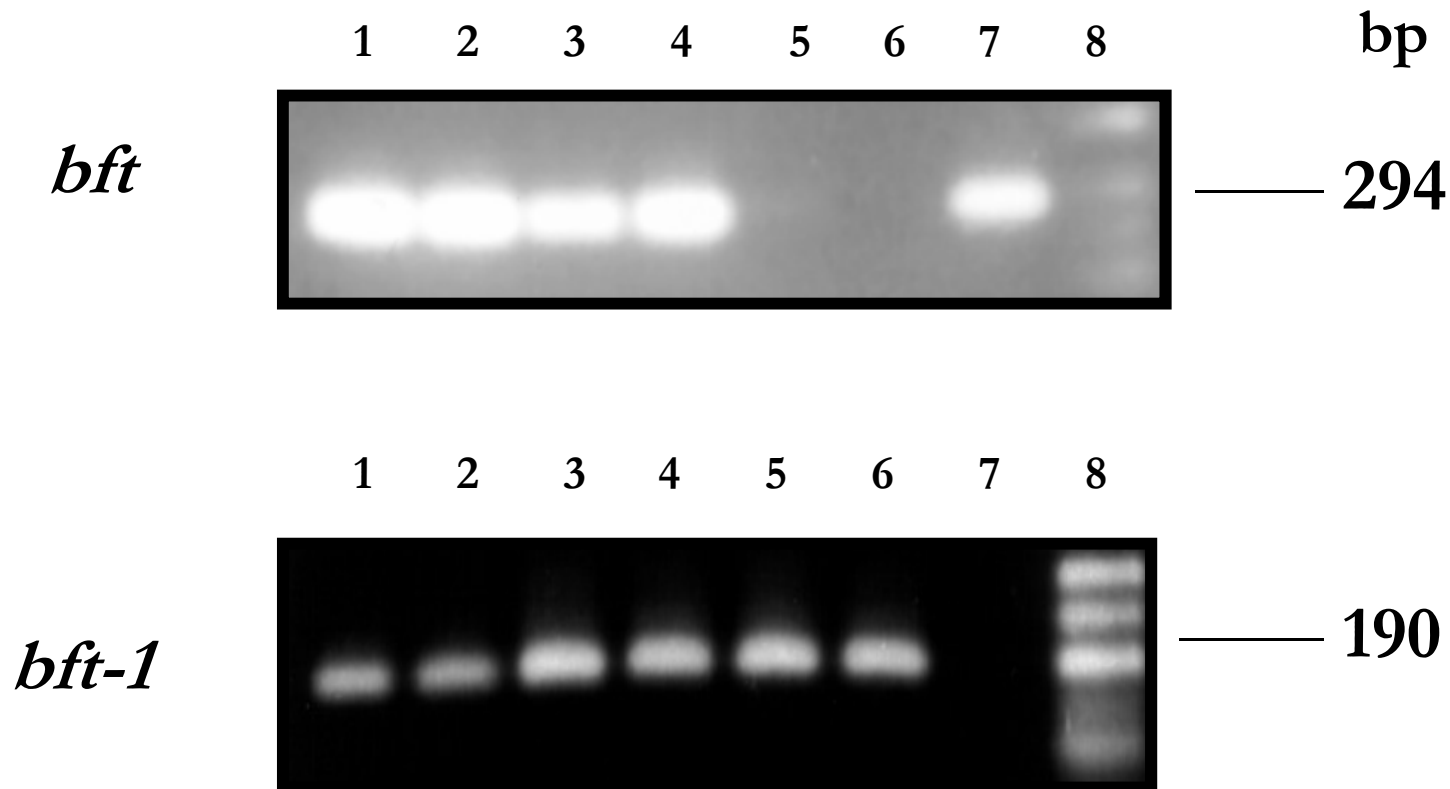
Moncrief et al. (1995); Obiso et al. (1997)

Populações genéticas de *Bacteroides fragilis*



Detecção do gene *bft* (PCR) e subtipos (Multiplex-PCR)

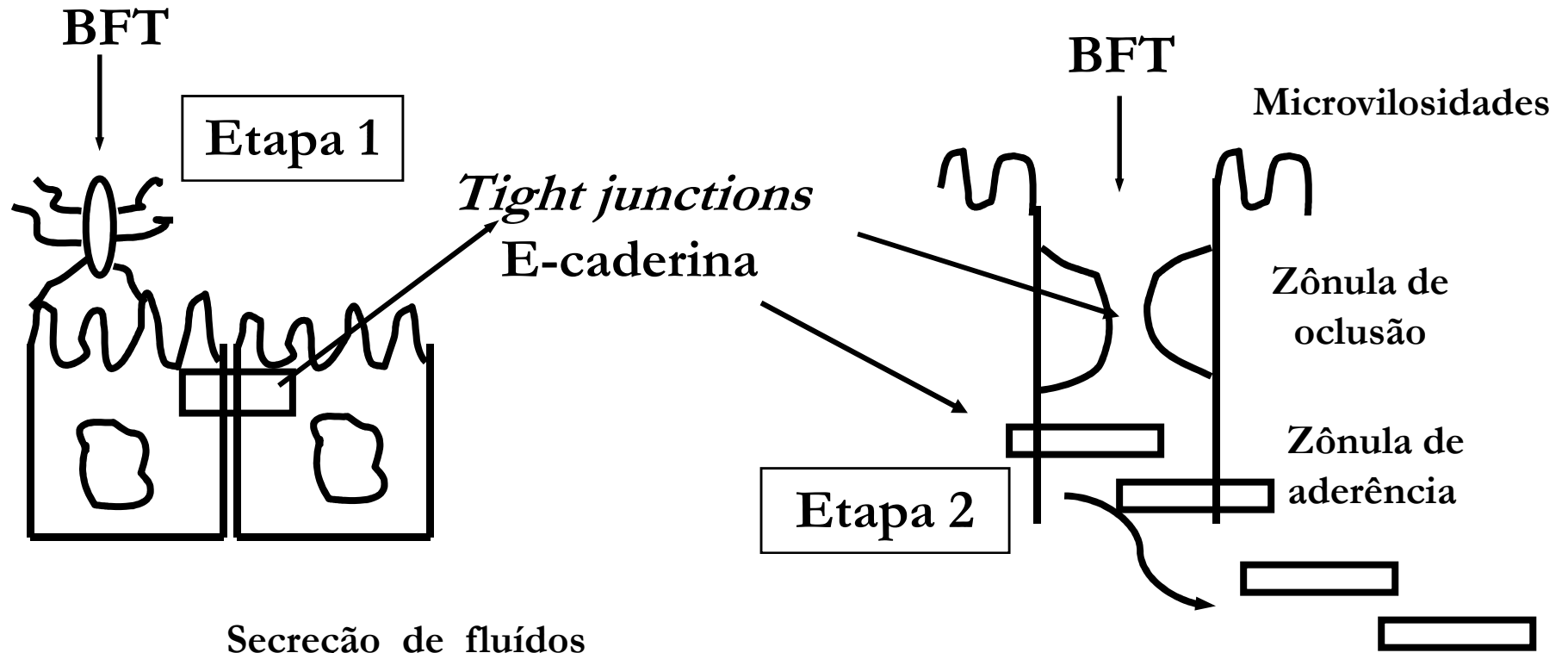
- Três subtipos: *bft-1*, *bft-2* e *bft-3*.



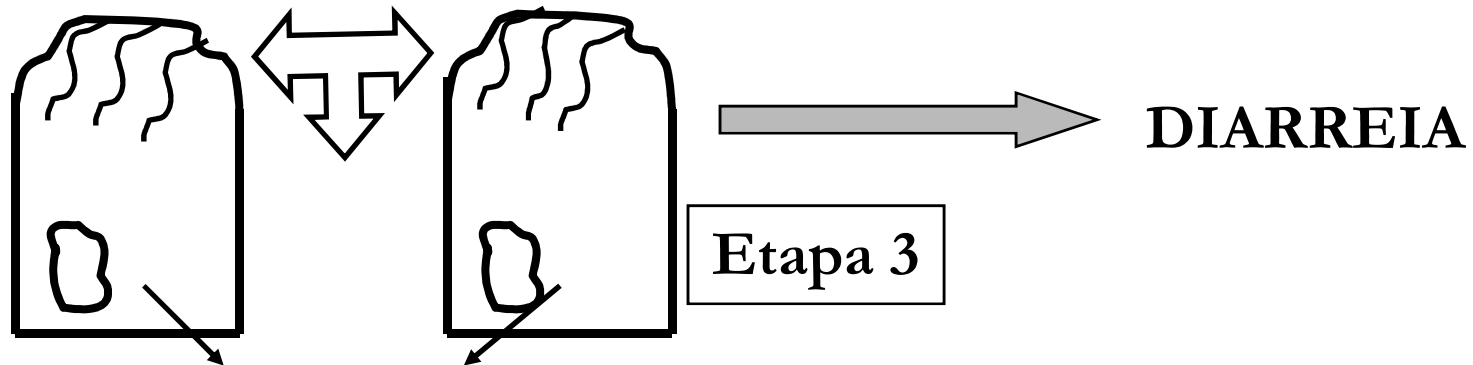
**Padrões genéticos *B. fragilis* não enterotoxigênico (NTBF)
de humanos (53) e bezerros (50)**

Bactérias (n)	Humanos		Animais	
	n	(%)	n	(%)
NTBF padrão II	33	(62,2)	40	(80)
NTBF padrão III	20	(37,7)	10	(20)
TOTAL	53	(100)	50	(100)

Mecanismo de ação da toxina in vivo



Secreção de fluídos



Sears (2001)

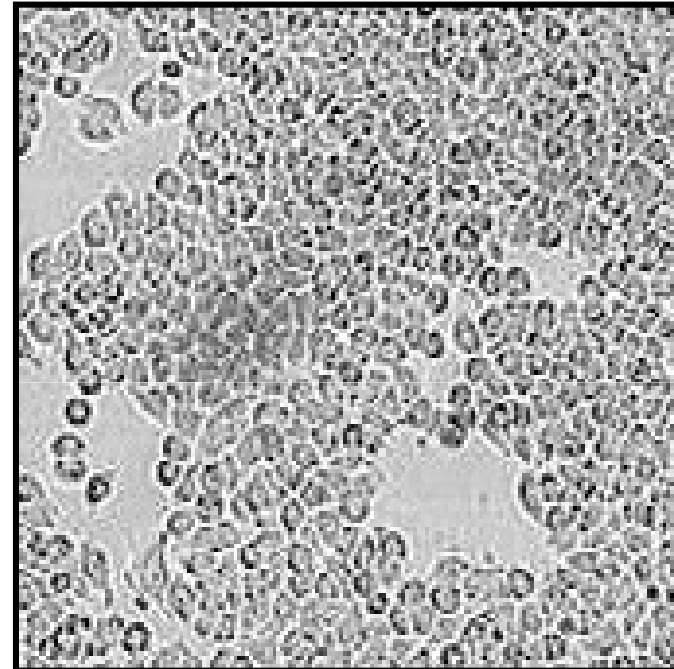
Citocinas (IL-8) – leucócitos – reação inflamatória – efeito secretor

Laboratório de Anaeróbios

Teste citotóxico de ETBF em células HT-29/C₁



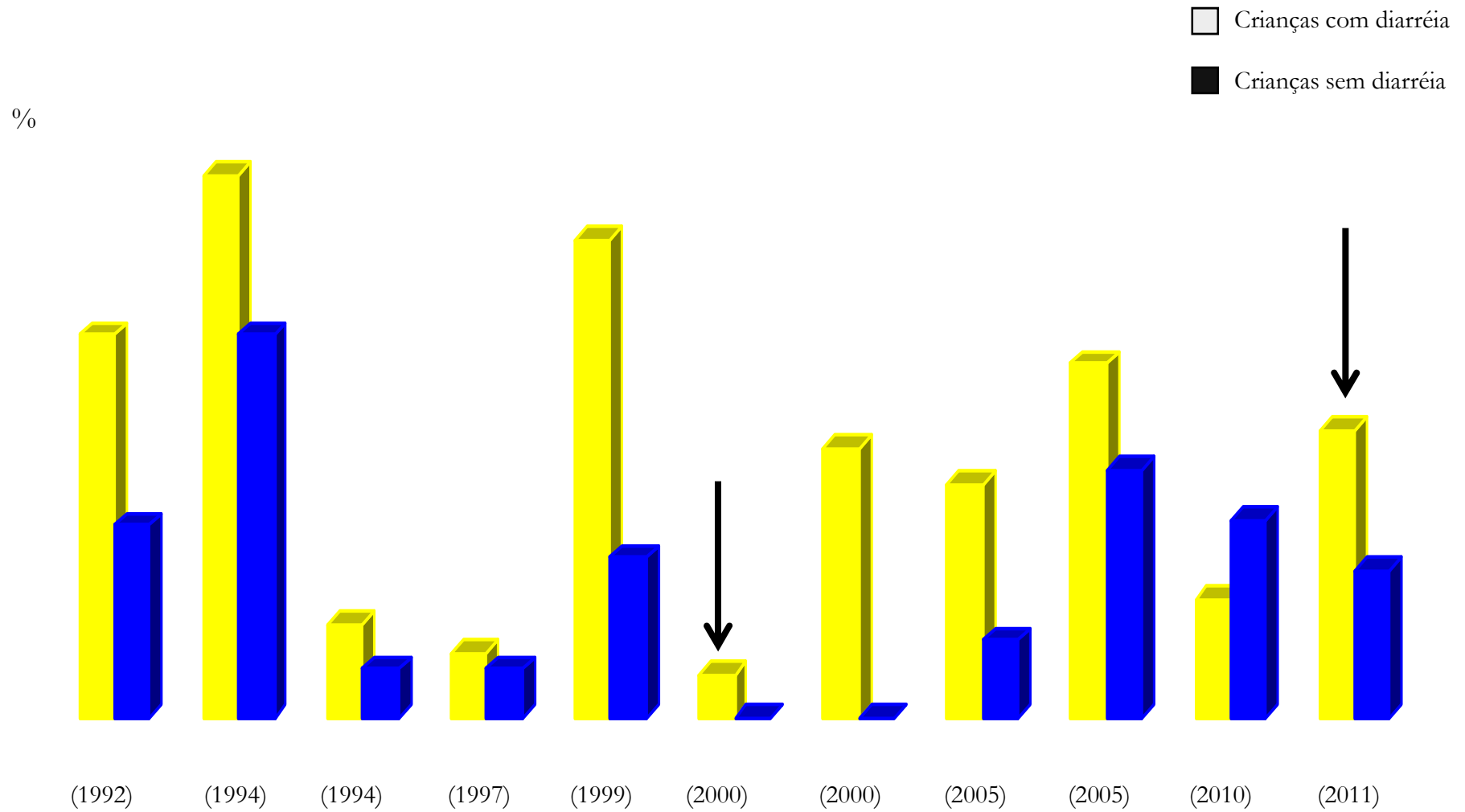
Controle



ETBF

Outras linhagens: Caco-2, T84

Distribuição mundial de organismos ETBF associados à diarreia infantil



Laboratório de Anaeróbios



Occurrence of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in calves and evaluation of their antimicrobial susceptibility

Fernanda S. Almeida, Viviane Nakano & Mario J. Avila-Campos

Table 1. Occurrence of members of the *Bacteroides fragilis* group isolated from calves with diarrhea (54) and without diarrhea (54)

Species	Calves with diarrhea [<i>n</i> (%)]	Calves without diarrhea [<i>n</i> (%)]
<i>B. vulgatus</i>	63 (50.8)	36 (39.1)
<i>B. fragilis</i>	27 (21.8)	41 (44.6)
<i>B. distasonis</i>	20 (16.2)	8 (8.7)
<i>B. thetaiotaomicron</i>	4 (3.2)	0
<i>B. eggerthii</i>	4 (3.2)	7 (7.6)
<i>B. ovatus</i>	2 (1.6)	0
<i>B. uniformis</i>	1 (0.8)	0
<i>B. caccae</i>	1 (0.8)	0
ETBF	2 (1.6)	0
Total	124	92

CURRENT MICROBIOLOGY Vol. 53 (2006), pp. 113–117
DOI: 10.1007/s00284-005-0321-6

**Current
Microbiology**

An International Journal

© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Evaluation of the Pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* Toxin Gene Subtypes in Gnotobiotic Mice

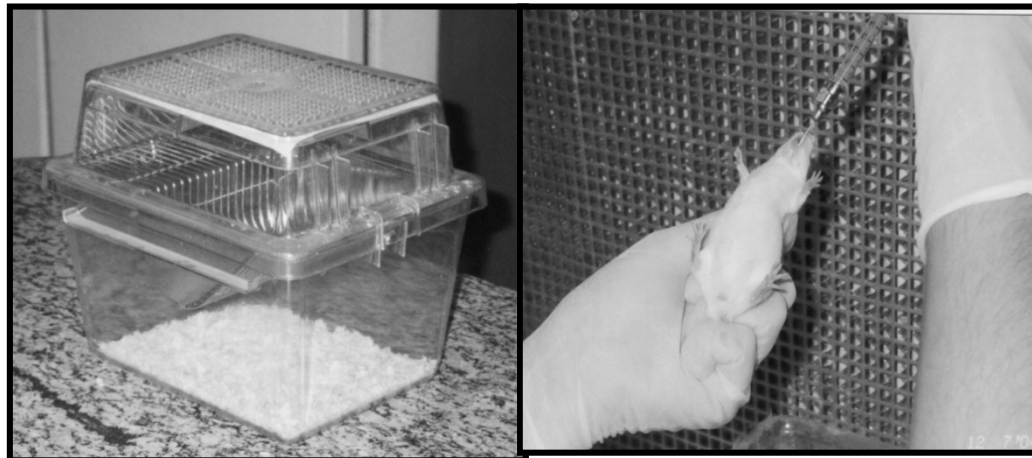
Viviane Nakano,¹ Danielle A. Gomes,² Rosa M. E. Arantes,³ Jacques R. Nicoli,² Mario J. Avila-Campos¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo São Paulo, SP, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Received: 21 September 2005 / Accepted: 10 April 2006

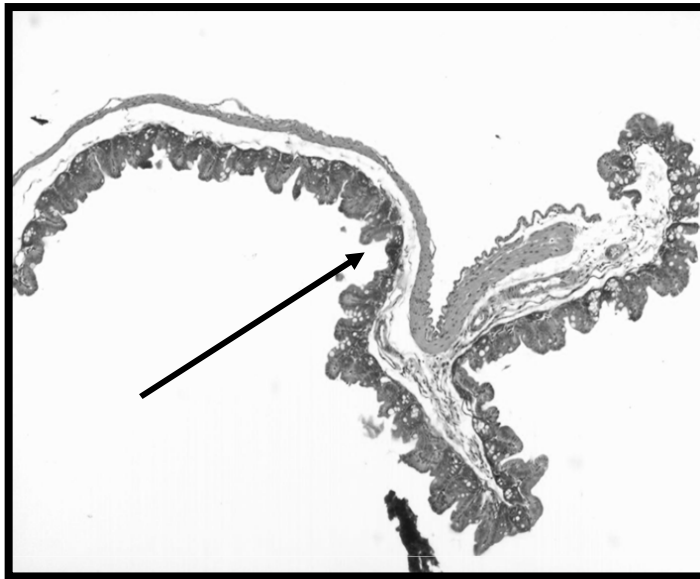


Inoculação intra-gástrica em camundongos isentos de germes

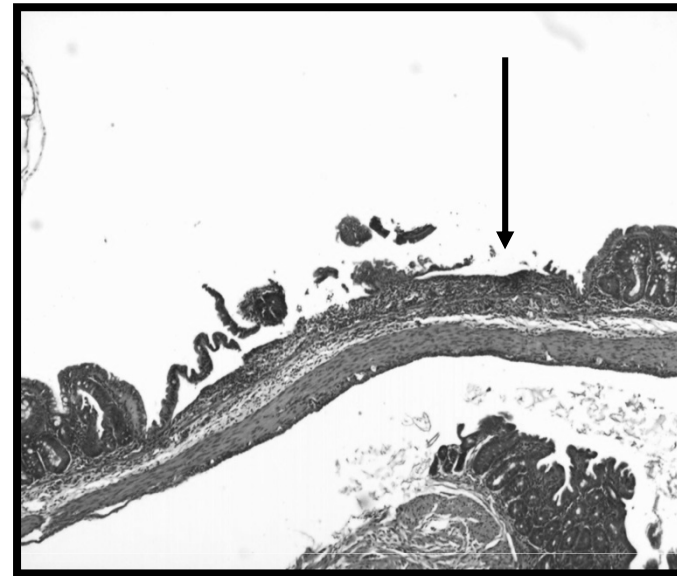


Colonização e patogenicidade de *B. fragilis* enterotoxigênicos

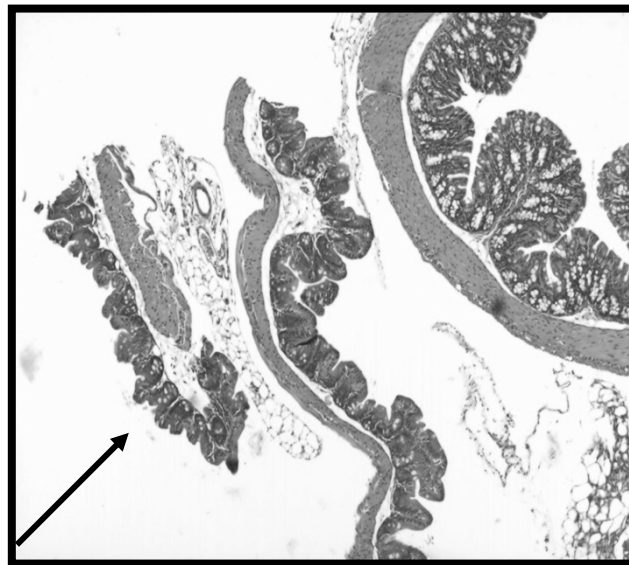
Aspectos histopatológicos do intestino grosso de camundongos



bft-1

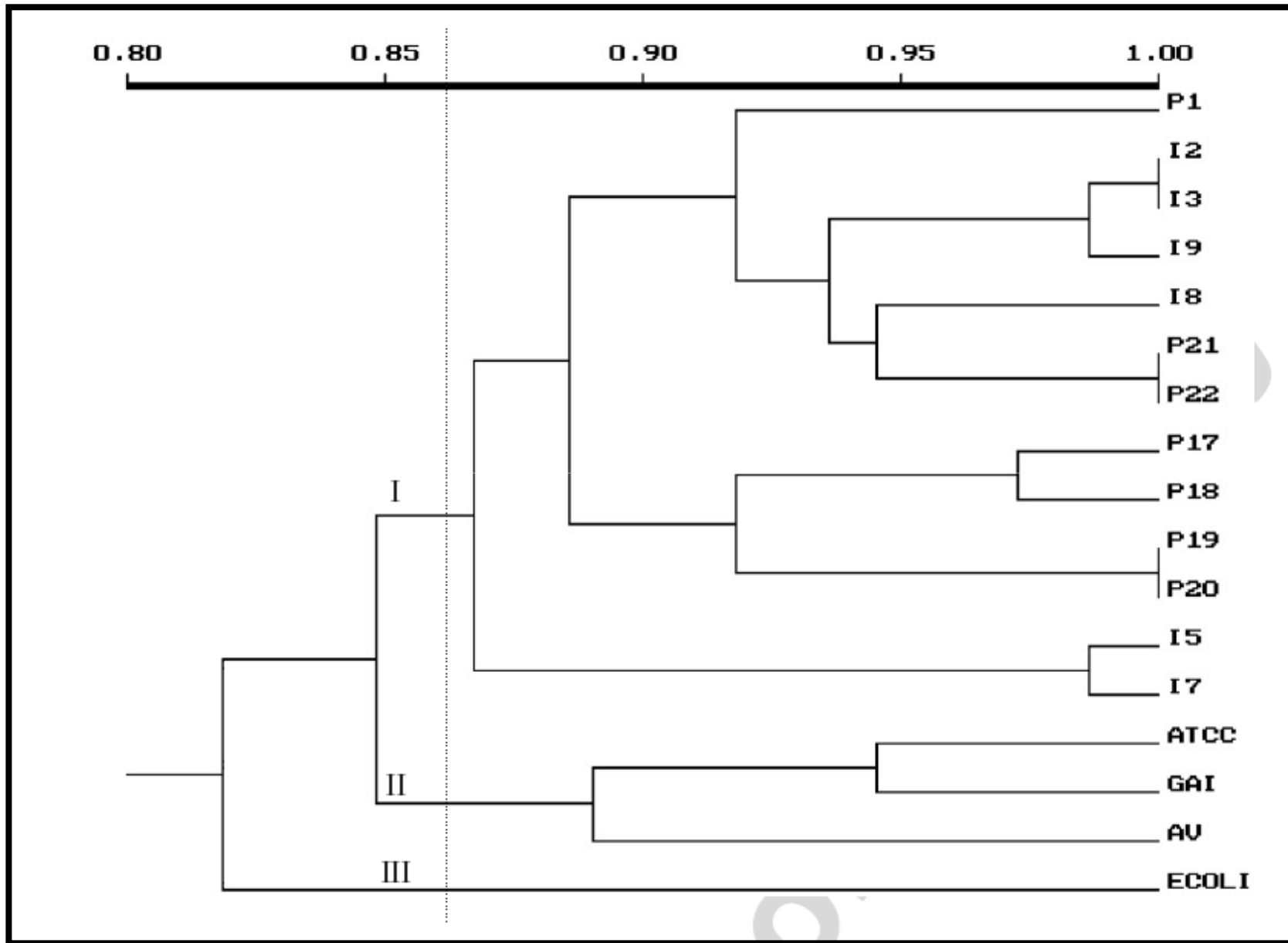


bft-2



Não ETBF

Diversidade genética de ETBF humanos (AP-PCR)

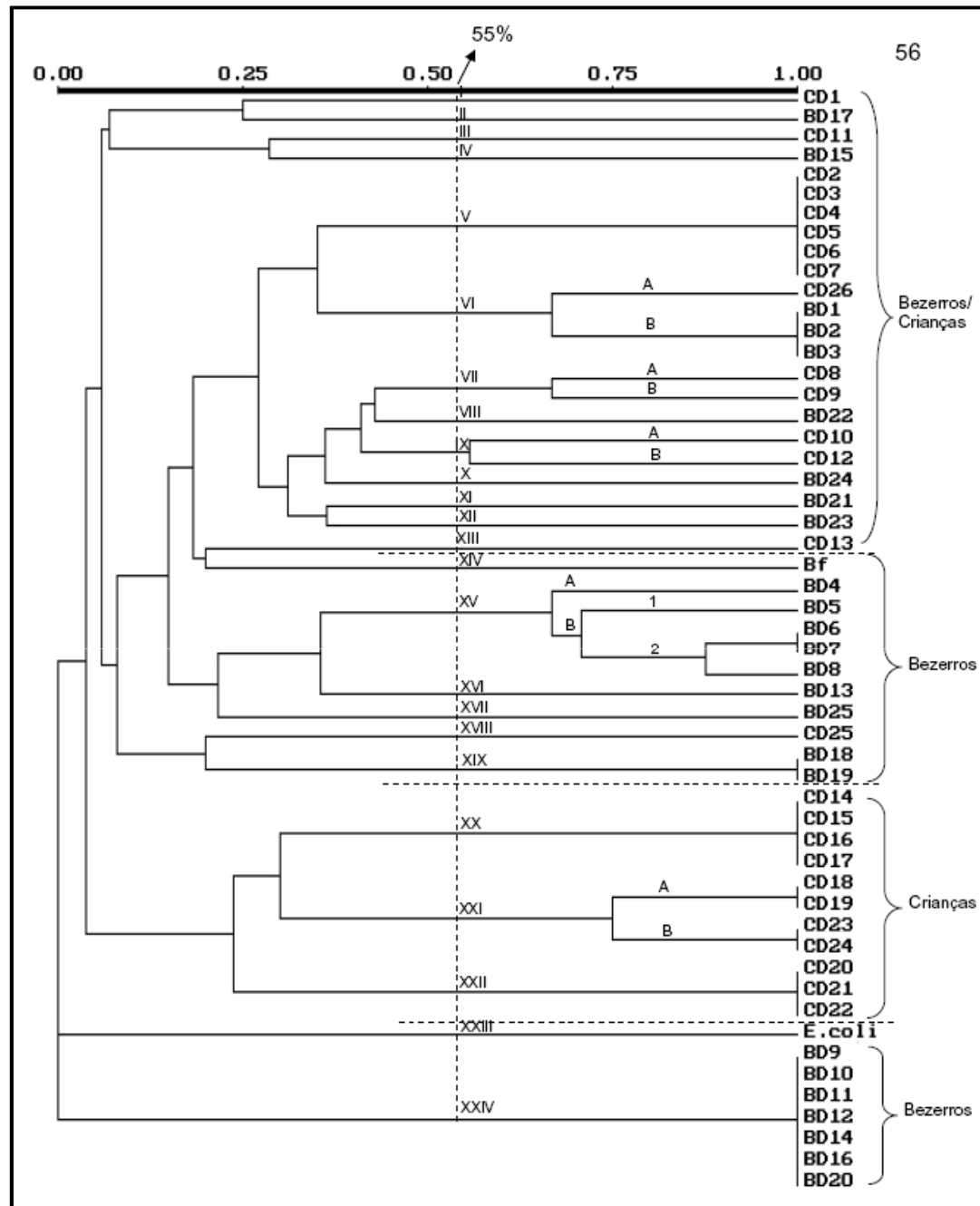


ATCC/GAI: *bft-2*

Laboratório de Anaeróbios

Nakano et al. (2007)

Diversidade genética de ETBF humanos e bezerros por AP-PCR



Conclusões

- Anaeróbios gram-negativos são predominantes e clinicamente mais relevantes como em infecções do trato gastrointestinal;
- São os mais resistentes a ação dos antimicrobianos (*Ex. Bacteroides*);
- Fenotípica e genotipicamente são altamente heterogêneos – reclassificação;