

**FERNANDA DOS SANTOS ALMEIDA**

**ESPÉCIES DO GRUPO *Bacteroides fragilis* EM BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA  
AGUDA: OCORRÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR**

**FERNANDA DOS SANTOS ALMEIDA**

**ESPÉCIES DO GRUPO *Bacteroides fragilis* EM BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA  
AGUDA: OCORRÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2007

**FERNANDA DOS SANTOS ALMEIDA**

**ESPÉCIES DO GRUPO *Bacteroides fragilis* EM BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA  
AGUDA: OCORRÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

São Paulo

2007

## DEDICATÓRIA

*À Deus, nosso eterno Pai, por toda a luz e por ter sido a minha força em todos os momentos da vida.*

*Aos meus queridos pais José e Maria Jurema pela formação que me deram, ensinando-me os mais importantes valores do ser humano: a firmeza do caráter, a honra e a honestidade. Aos meus avós (in memoriam) José Sebastião e Elisabeth, Carlos e Filina, pela força e dignidade com as quais superaram todos os desafios do caminho.*

*Ao meu marido Rodrigo, por toda a compreensão e pelo amor puro e verdadeiro que une nossos corações hoje e sempre.*

*À minha irmã Carla, meu cunhado Danilo e à minha sobrinha Maria Clara que veio iluminar ainda mais nossas vidas! Pela forte união que manteremos por toda a nossa jornada.*

*À todos os meus familiares pelo muito que me incentivaram a ultrapassar cada obstáculo sem jamais desistir da luta.*

*Obrigada! Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, pelo inestimável auxílio, amizade e constante aprendizado.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, pela orientação em minha Iniciação Científica, por sua colaboração no desenvolvimento do meu amor pela Ciência e pela Microbiologia.

Aos amigos de sempre Fernanda Franklin, Amanda Prado, Patrícia Prado, Patrícia Santana, Patrícia Freitas, Daniela Panebianco, Anne Chen, Cláudia Passoni, Márcia Niyshizawa, Tais Fukuta, Melissa Junta, Juliana de Oliveira, Liliana Rocha e Lauro Hassegawa que tornaram mais leves os momentos de dificuldades durante a execução deste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Anaeróbios Gerusa Neyla de Andrade Senhorinho e Taís Cristiane Wahasugui pelo apoio em todos os momentos e pelo muito que me ajudaram na superação dos obstáculos. Apesar da distância, vocês serão para sempre minhas grandes amigas.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios Amanda do Nascimento e Silva, Viviane Nakano, Sheila Alexandra Bellini Nishiyama, Alessandra da Mota Oliveira, Elessandra Maria Silvestro e Luiz Fernando Tomazinho pela experiência adquirida durante nossa convivência.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas pelos ensinamentos, empenho e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente à Zulmira Alves de Souza pela agilidade no apoio técnico e pelas palavras de carinho.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia, especialmente à Alice Shimabuku e Celso Pereira pelo atendimento e esclarecimentos prestados.

Às bibliotecárias e aos demais funcionários da Biblioteca do ICB pela eficiência e simpatia do trato conosco.

À Profa. Carla Prado pelas correções gramaticais da língua portuguesa e da língua inglesa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Processo N° 01/14139-3).

A todos, muito obrigada!

“...E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria...”

Primeira Epístola de São Paulo aos Coríntios

(13:2)

## RESUMO

ALMEIDA, F. S. Espécies do grupo *Bacteroides fragilis* em bezerros com e sem diarreia aguda: ocorrência, fatores de virulência e caracterização molecular. 2007. 94 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007\*\*

O grupo *Bacteroides fragilis* é atualmente constituído por oito espécies de bactérias gram-negativas, anaeróbias obrigatórias e não esporuladas, sendo a de maior destaque *B. fragilis*. Os fatores de virulência estão relacionados à capacidade de aderência, colonização, invasão tecidual e proteção bacteriana contra a resposta imunológica do hospedeiro. Foram analisadas 108 amostras fecais (54 de bezerros diarreicos e 54 de não diarreicos). Das 54 amostras diarreicas, 37 (68,5%) foram positivas para o grupo *B. fragilis*, isolando-se 124 bactérias. Das 54 não diarreicas, 21 (38,9%) foram positivas para este grupo, isolando-se 92 bactérias. Foi avaliada a produção de hemolisinas e hemaglutininas, resistência à temperatura, susceptibilidade ao soro, a antibióticos e a metais pesados. Analisamos também a presença de plasmídios e de genes mediadores da  $\beta$ -lactamase (*cepA* e *cfiA*), da produção da neuraminidase (*nanH*) e enterotoxina (*bft*) e, finalmente, foi determinada a similaridade genética entre as cepas de *B. fragilis*. A produção de hemolisina foi observada em 45 (36,3%) e em 77 (83,7%), respectivamente, das bactérias isoladas de bezerros diarreicos e não diarreicos. Apenas 16 (7,4%) isolados aglutinaram eritrócitos de carneiro, bezerro ou humano. A inibição da hemaglutinação foi observada quando a maltose foi usada (93,7%). Dentre os 124 isolados de diarreia, 96 (77,4%) resistiram a 60°C por 30 minutos e 69 (55,6%) por 60 minutos. Os isolados foram resistentes à ação do soro humano, de carneiro e de bovino. Todos os isolados foram sensíveis ao imipenem e metronidazol. Dos 216 isolados, 127 (58,8%) produziram  $\beta$ -lactamase e destes, 73 (57,5%) eram de bezerros diarreicos e 54 (42,5%) de não-diarreicos. A maioria dos isolados apresentou elevada resistência aos oito metais pesados utilizados, principalmente ao cloreto de chumbo e sulfato de níquel. Plasmídios foram detectados em 16 (7,4%) isolados com pesos moleculares de 5 a 11 kb. Após a cura, os isolados perderam pelo menos um elemento e foi observada a diminuição da resistência para amoxicilina, ampicilina, cefoxitina e sulfato de zinco. Dentre os 127 isolados resistentes aos agentes  $\beta$ -lactâmicos, em 25 (19,7%) isolados de bezerros diarreicos e em 33 (26,0%) de bezerros não diarreicos foi detectado o gene *cepA*. Este gene foi observado também nos plasmídios de 5,5 kb dos isolados Bc5j e Bd26e. O gene *cfiA* foi observado em 21 (16,5%) isolados de bezerros diarreicos e 16 (12,6%) de bezerros não diarreicos, mas não foi detectado em plasmídios. O gene *nanH* foi detectado em 47 (21,8%) isolados e o gene *bft* somente em dois isolados de duas amostras fecais diarreicas, e a produção da toxina confirmada por sua toxicidade característica em cultivo celular. A avaliação genética entre os *B. fragilis* mostrou a heterogeneidade dessas bactérias.

**Palavras-chave:** Diarreia; bezerros; grupo *B. fragilis*; bactérias anaeróbias; susceptibilidade a antimicrobianos.

---

\*\*Normas ABNT:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

## ABSTRACT

ALMEIDA, F. S. Species of the *Bacteroides fragilis* group in calves with and without diarrhea: occurrence, virulence factors and molecular characterization. 2007. 94 f. Doctor thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007\*\*

*Bacteroides fragilis* group is constituted by eight gram-negative, strictly anaerobic and non-spore-forming bacteria, being *B. fragilis* the main species. The virulence factors are related to the capacity of adherence, colonization, tissue invasion and bacterial protection against the host immune factors. One hundred eight fecal samples were analyzed (54 from diarrhea and 54 from non-diarrhea calves). Of the 54 diarrhea samples, 37 (68.5%) were positive to the *B. fragilis* group, being isolated 124 bacteria. Of the 54 non-diarrhea samples, 21 (38.9%) were also positive for the *B. fragilis* group, being isolated 92 bacteria. Hemolysin and hemagglutinin production, resistance to the temperature, susceptibility to the sera, antibiotics and heavy metals were evaluated. Also, the presence of plasmids genes of  $\beta$ -lactamase (*cfiA* e *cepA*), neuraminidase (*nanH*) and enterotoxin (*bft*) was analyzed, as well as the genetic similarity among the *B. fragilis* strains. The hemolysin production was observed in 45 (36.3%) and in 77 (83.7%) bacteria isolated from, respectively, diarrhea and non-diarrheic calves. Only 16 (7.4%) isolates agglutinated sheep, calf or human erythrocytes, and the hemagglutination inhibition was observed when maltose was used (93.7%). Among 124 diarrhea isolates, 96 (77.4%) were resistant to 60°C for 30 minutes and 69 (55.6%) for 60 minutes. The most of isolates was resistant to the human, sheep or bovine serum action. All the isolates were sensitive to the imipenem and metronidazole. Of the 216 isolates, 127 (58.8%) produced  $\beta$ -lactamase. From these, 73 (57.5%) belong to diarrhea and 54 (42.5%) non-diarrhea calves. Most of the isolates showed high resistance to the eight heavy metals used, mainly to the lead chloride and nickel sulfate. Plasmids were detected in 16 (7.4%) isolates with molecular weights from 5 to 11 kb. After the cure, the isolates lost at least an element and the resistance to amoxicillin, ampicillin, cefoxitin and zinc sulfate was decreased. Of the 127 isolates resistant to the  $\beta$ -lactams 25 (19.7%) diarrhea and 33 (26.0%) non-diarrhea isolates harbored the *cepA* gene. This gene was observed in 5.5 kb plasmids of the Bc5j and Bd26e strains. The *cfiA* gene was observed in 21 (16.5%) isolates from diarrhea and 16 (12.6%) isolates from non-diarrhea calves, but this gene was not detected in plasmids. The *nanH* gene was detected in 47 (21.8%) isolates and the *bft* gene only in two isolates from two fecal diarrhea samples, and the toxin production was confirmed by cytotoxic alterations. The genetic profile showed the heterogeneity among the *B. fragilis* tested.

**Key Words:** Diarrhea; calves; *B. fragilis* group; anaerobic bacteria; antimicrobial susceptibility.

---

\*\*Normas ABNT:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Nomenclatura e seqüência dos iniciadores utilizados na detecção de genes e suas respectivas temperaturas de anelamento. .... **42**
- TABELA 2. Distribuição das espécies do grupo *B. fragilis* isoladas de 37 bezerros com diarréia e de 21 bezerros sem diarréia, segundo a idade. .... **44**
- TABELA 3. Perfil de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (IHA) de 16 isolados pertencentes ao grupo *B. fragilis* de bezerros com e sem diarréia, em eritrócitos de carneiro, bezerro e humano. ....**45**
- TABELA 4. Susceptibilidade a 12 antibióticos de 216 bactérias do grupo *B. fragilis* isoladas de bezerros com e sem diarréia. .... **47**
- TABELA 5. Avaliação da produção de  $\beta$ -lactamase de 127 bactérias do grupo *B. fragilis* de bezerros com diarréia (73) e sem diarréia (54). .... **48**
- TABELA 6. Susceptibilidade a oito metais pesados de 216 bactérias do grupo *B. fragilis* isoladas de bezerros com e sem diarréia. ....**49**
- TABELA 7. Perfil plasmidial e sua relação com a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos analisados de 16 isolados de bezerros diarréicos e não diarréicos. ....**51**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Detecção do gene <i>bft</i> do DNA bacteriano de amostra fecal e de bactérias isoladas .....	46
FIGURA 2. Perfil plasmidial de <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos .....	50
FIGURA 3(A). Detecção do gene <i>cepA</i> no DNA cromossômico dos isolados do grupo <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos .....	52
(B). Detecção do gene <i>cepA</i> em plasmídios de 5,5 kb dos isolados do grupo <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos .....	52
(C). Detecção do gene <i>cfiA</i> no DNA cromossômico dos isolados do grupo <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos .....	50
FIGURA 4. Detecção do gene <i>nanH</i> nos <i>B. fragilis</i> isolados de bezerros diarréicos e não diarréicos .....	54
FIGURA 5. Perfil de amplificação dos DNA de <i>B. fragilis</i> isolados de bezerros diarréicos por AP-PCR. ....	54
FIGURA 6. Perfil de amplificação dos DNA de <i>B. fragilis</i> isolados de bezerros sadios por AP-PCR .....	55
FIGURA 7. Análise genotípica por AP-PCR de 28 isolados de <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos. ....	57
FIGURA 8. Análise genotípica por AP-PCR de 41 isolados de <i>B. fragilis</i> de bezerros não diarréicos.....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
<b>3.1 MICROBIOTA INTESTINAL RESIDENTE</b>	<b>19</b>
<b>3.2 GRUPO <i>Bacteroides fragilis</i></b>	<b>20</b>
3.2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS	20
3.2.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS	22
3.2.3 PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DO GRUPO <i>B. fragilis</i>	23
3.2.4 ESPÉCIES DE <i>Bacteroides fragilis</i> ENTEROTOXIGÊNICOS (ETBF)	25
<b>3.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DO GRUPO <i>B. fragilis</i></b>	<b>27</b>
3.3.1 ANTIBIÓTICOS	28
3.3.2 METAIS PESADOS	30
<b>3.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO GRUPO <i>B. fragilis</i> EM BEZERROS</b>	<b>31</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>4.1 ANIMAIS ANALISADOS</b>	<b>33</b>
<b>4.2 COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS</b>	<b>33</b>
<b>4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GRUPO <i>B. fragilis</i></b>	<b>33</b>
<b>4.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA</b>	<b>34</b>
4.4.1 PRODUÇÃO DE HEMOLISINA	34
4.4.2 REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (HA)	34
4.4.3 REAÇÃO DE INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (IHA)	35
4.4.4 SUSCEPTIBILIDADE AO SORO	35
4.4.5 RESISTÊNCIA À TEMPERATURA	36
4.4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE <i>B. fragilis</i> EM CÉLULAS HT-29/C1	36
4.4.7 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	37
4.4.8 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -LACTAMASE	37
4.4.9 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A METAIS PESADOS	37
<b>4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA</b>	<b>38</b>
4.5.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL PLASMIDIAL DE ESPÉCIES DO GRUPO <i>B. fragilis</i>	38
4.5.2 CURA PLASMIDIAL	38
4.5.3 DETECÇÃO POR PCR DOS GENES <i>cepA</i> E <i>cfiA</i> NOS DNA CROMOSSÔMICO E PLASMIDIAL	38
4.5.4 DETECÇÃO DO GENE <i>nanH</i> DA NEURAMINIDASE POR NESTED-PCR	39
4.5.5 DETECÇÃO POR PCR DO GENE <i>bft</i> EM <i>B. fragilis</i>	40
4.5.6 TIPAGEM DA ESPÉCIE <i>B. fragilis</i> POR AP-PCR	40
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>41</b>
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A superfície corporal e as cavidades naturais de mamíferos são colonizadas por organismos aeróbios, facultativos e anaeróbios estritos, formando parte da microbiota residente de cada ecossistema (HOOPER et al., 1998). Entretanto, essa microbiota em condições desfavoráveis pode produzir sérios processos infecciosos, podendo levar o hospedeiro à morte (HENTGES, 1993).

Dentre os organismos anaeróbios que predominam na microbiota residente dos mamíferos, podem-se destacar os bastonetes Gram-negativos, particularmente as espécies do gênero *Bacteroides*, ao qual pertence o grupo *Bacteroides fragilis* formado por bacilos Gram-negativos e não formadores de esporos. Atualmente, o grupo *B. fragilis* está constituído pelas espécies *B. caccae*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus* (SONG et al., 2004; SAKAMOTO; BENNO, 2006).

Recentemente, outras espécies foram incluídas no gênero *Bacteroides*. São elas: *B. nordii*, *B. salyersae*, *B. massiliensis*, *B. plebeius*, *B. coprola*, *B. finegoldii*, *B. dorei*, *B. intestinalis*, *B. barnesiae*, *B. salanitronis* e *B. gallinarum* (BAKIR et al., 2006; FENNER et al., 2005; JOHNSON, 1978; KITAHARA et al., 2005; LAN et al., 2006; SONG et al., 2004).

Dentro do grupo *B. fragilis*, a espécie *B. fragilis* é considerada a mais virulenta devido a sua participação em infecções oportunistas de natureza endógena, assim como em infecções extra-intestinais, urogenitais e bacteremias (SACK et al., 1994). Essa espécie também predomina nas infecções onde as bactérias anaeróbias estão presentes, apesar de sua baixa ocorrência na microbiota intestinal residente (HEDBERG; NORD, 1996).

Esse grupo microbiano é caracterizado pela produção de vários fatores de virulência, os quais podem proteger o microrganismo e alterar as defesas imunológicas do hospedeiro (GUZMAN; PLATE; PRUZZO, 1990). Dentre esses fatores, a produção de hemolisina constitui um importante mecanismo na destruição de hemácias e de fagócitos, inibindo a produção de linfócitos e imunoglobulinas (KUHN; KATHARIOU; GOEBEL, 1988).

Da mesma forma, essas espécies apresentam resistência característica à atividade bactericida do soro, assim como uma elevada atividade de hemaglutinação, que segundo a

literatura, participariam na severidade dos processos infecciosos em que estão envolvidas (OYSTON; HANDLEY, 1991).

A enzima neuraminidase cumpre a importante função de manutenção e disseminação dos microrganismos nos tecidos do hospedeiro. Assim, a produção dessa enzima por *B. fragilis* parece participar nos processos de adesão e colonização, da nutrição e da virulência dessas bactérias (BERRY et al., 1988).

As espécies do grupo *B. fragilis* são caracterizadas pela notável resistência às drogas antimicrobianas utilizadas na Clínica Médica Humana e Veterinária. Esse fenômeno torna-se preocupante na elaboração de um esquema terapêutico adequado para o tratamento de infecções por anaeróbios. No Brasil, a análise microbiológica e de susceptibilidade às drogas antimicrobianas e a íons metálicos de bactérias anaeróbias, não constitui rotina nas clínicas laboratoriais, sendo escassos os estudos nesta área (AVILA-CAMPOS et al., 1991; NAKANO, 2005).

Em estudo realizado por Hedberg e Nord (1996), relata-se a extraordinária resistência desses microrganismos aos diversos antibióticos, devido principalmente, à produção de enzimas que atuam na destruição ou inativação dessas drogas. Essa resistência abrange também metais pesados, os quais estão presentes nas indústrias, na agricultura, em hospitais e na composição de agentes quimioterápicos, sendo interessante também observar a ocorrência da associação de resistência a antibióticos e a metais pesados (AVILA- CAMPOS et al., 1991), que desempenha importante papel na seleção de microrganismos resistentes (RILEY; MEE, 1982). Esse fenômeno é observado pela presença de genes localizados no cromossomo ou em plasmídios, os quais podem ser transferidos por conjugação entre organismos da mesma espécie e entre espécies diferentes (SHOEMAKER et al., 2001).

O mecanismo de resistência mais importante observado em espécies do grupo *B. fragilis* é a produção de  $\beta$ -lactamase, que inativa os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A produção dessa enzima é mediada por genes agrupados nas classes A e B, sendo a classe A composta pelos genes *cepA*, que codifica a produção de cefalosporinases e penicilinases e *cfxA*, responsável pela inativação da cefoxitina, e a classe B, pelo gene *cfiA* atuante na degradação de carbapenêmicos (PARKER; SMITH, 1993).

Nesse contexto geral, as espécies que habitam a microbiota intestinal de humanos e animais representam uma significativa fonte de plasmídios que mediam a resistência aos antibióticos, e que podem ser transferidos para outros enteropatógenos (RASHTCHIAN; BOOTH, 1981).

A análise microbiológica da microbiota intestinal residente anaeróbia de animais domésticos, particularmente bovinos, também é escassa na literatura. Entretanto, sabe-se que bactérias do grupo *B. fragilis* podem participar da produção de diferentes processos infecciosos tais como abscessos, fístulas, peritonite, pleurite, nefrite, pneumonia, pericardite, endocardite, endometrite, mastite e diarreia (NICOLET, 1986).

Dentre os processos infecciosos que acometem os animais de produção, a ocorrência de diarreia constitui um sério problema econômico, causando severos prejuízos à pecuária nacional devido, principalmente, ao atraso no desenvolvimento e elevada mortalidade desses animais (MYERS et al., 1985). A diarreia é constituída por uma disfunção digestiva decorrente da ação de um agente irritante, que pode ser de natureza química, física ou infecciosa e se caracteriza por grande perda de líquidos e eletrólitos corporais, causando desidratação que, dependendo do grau, pode levar à perda de peso, podendo evoluir para um choque hipovolêmico e até mesmo a morte do animal (SMITH, 1993).

Segundo Myers et al. (1987) e Pantosti et al. (1997), algumas cepas de *B. fragilis* são capazes de produzir enterotoxina e são denominadas *B. fragilis* enterotoxigênicas (ETBF). A molécula dessa toxina, a fragilisina, é uma metaloproteína dependente de zinco, com peso molecular de 19.500 Da, com atividade proteolítica e estabilidade em pH entre 5 e 10 (MIYOSHI; SHINODA, 2000). Essa enterotoxina produz mudanças nos filamentos de actina que regulam a resposta secretora das células epiteliais intestinais, ocasionando a liberação e acúmulo de fluido, produzindo como consequência a diarreia (KOSHY; MONTROSE; SEARS, 1996). A sua produção é mediada pelo gene *bft*, o qual está contido na ilha de patogenicidade BfPAI (FRANCO et al., 1997).

A atividade enterotoxigênica de *B. fragilis* pode ser detectada pela ação tóxica em células HT-29/C1 do adenocarcinoma humano (PANTOSTI et al., 1994). Entretanto, sua detecção depende da quantidade e estabilidade da toxina produzida. Deve-se ressaltar que,

essa toxina é susceptível à degradação por proteases e à autodigestão (OBISO; BEVAN; WILKINS, 1997).

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento de cepas ETBF na ocorrência da diarreia em humanos e animais jovens como cordeiros (MYERS et al., 1984), bezerros, potros (MYERS; SHOOP; BYARS, 1987), coelhos (MYERS et al., 1989) e leitões (DUIMSTRA et al., 1991), tornando-se importante a avaliação epidemiológica das espécies desse grupo microbiano (SARMA et al., 2000).

## 2 OBJETIVOS

Considerando-se a importância deste grupo microbiano anaeróbico pela participação na microbiota intestinal residente humana e animal, por seu isolamento em diversos processos infecciosos, pela sua resistência às drogas antimicrobianas, e pela sua prevalência pouco conhecida nos casos de diarreia aguda em bezerros, o presente estudo teve como objetivos:

1. Isolar e identificar as espécies do grupo *B. fragilis* a partir das amostras fecais diarreicas e não diarreicas de bezerros;
2. Avaliar alguns fatores de virulência das espécies do grupo *B. fragilis* isoladas;
3. Avaliar a susceptibilidade aos antibióticos e aos metais pesados dessas espécies;
4. Caracterizar as cepas *B. fragilis* enterotoxigênicas; e
5. Caracterizar genotipicamente as cepas de *B. fragilis* isoladas.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MICROBIOTA INTESTINAL RESIDENTE

O corpo dos animais em condições normais é colonizado, quase em sua totalidade, por organismos que compõem a microbiota residente ou indígena, usualmente considerados inócuos. (HOOPER et al., 1998). No entanto, tem havido recentemente, um constante aumento na incidência de infecções produzidas por esses microrganismos. Perturbações dessa população microbiana, produzidas por distúrbios ecológicos ou imunológicos comprometem as defesas naturais do organismo hospedeiro, podendo culminar em severas infecções capazes de levar o hospedeiro à morte (HENTGES, 1993).

A microbiota residente representa uma barreira à invasão e proliferação de microrganismos patogênicos exógenos e oportunistas (HOOPER et al., 1998), através da produção de substâncias antagonistas (bacteriocinas), produção de metabólitos e produtos tóxicos (ácidos graxos voláteis e H<sub>2</sub>S), manutenção de baixo potencial de oxido-redução, além da depleção de nutrientes, necessários para a manutenção dos patógenos (BEZIRTZOGLU, 1997; DUNCAN; EDBERG, 1995; SAVAGE, 1977).

A microbiota intestinal do corpo humano e animal é constituída por comunidades de organismos aeróbios, facultativos e anaeróbios estritos, observando-se a predominância de anaeróbios Gram-negativos (ROTIMI; DUERDEN, 1981). Entre os anaeróbios, as espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Clostridium* são consideradas como os mais importantes potenciais patógenos. Dentre as espécies de *Bacteroides*, o grupo *B. fragilis* é claramente destacado, tanto em relação à frequência de isolamento em infecções, quanto por sua resistência a muitos agentes antimicrobianos (FINEGOLD; WEXLER, 1988; HENTGES, 1993). O seu grande potencial patogênico tem sido objeto de pesquisas e controvérsias, ainda não totalmente elucidadas (POXTON et al., 1997).

No cólon, o gênero predominante é o *Bacteroides*, sendo também encontrados os gêneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus* (DRASAR; DUERDEN, 1991).

Desde a década de 70, observam-se numerosos trabalhos que tratam da importância de espécies bacterianas anaeróbias obrigatórias em seres humanos (FINEGOLD, 1977; MARTIN, 1974). No entanto, existem limitadas informações a respeito desses microrganismos e suas implicações em animais. Hirsh; Biberstein e Jang (1979) observaram que as bactérias anaeróbias parecem desempenhar um importante papel na Medicina Veterinária. A partir da década de 1980, Myers et al., verificaram a semelhança dos quadros patológicos ocasionados por *B. fragilis* em seres humanos e em animais domésticos, na ocorrência de diarreia aquosa e não-hemorrágica, lesões intestinais primárias no intestino grosso, incluindo exfoliações das células epiteliais e hiperplasia das criptas intestinais.

Em 2005, Pathela et al. avaliaram a ocorrência de bactérias do grupo *B. fragilis* em animais de fazenda, sugerindo-se que esses animais, entre eles bovinos e frangos, poderiam atuar como fonte de infecção ou veículos para a transmissão dessas bactérias para o ser humano, principalmente, nas comunidades rurais.

### **3.2 GRUPO *Bacteroides fragilis***

#### **3.2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS**

A Família *Bacteroidaceae* compreende 13 gêneros, sendo *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas* os mais importantes devido à relativa facilidade com a qual desencadeiam infecções no organismo hospedeiro. As espécies do gênero *Bacteroides* são bacilos ou cocobacilos Gram-negativos pequenos e pleomórficos. Atualmente, a classificação taxonômica reúne no gênero *Bacteroides* espécies com conteúdo de 40-48 mol% de G + C, altamente fermentativas, fenotípica e genotipicamente semelhantes à espécie *B. fragilis* (SHAH; COLLINS, 1989; SHAH; GHARBIA, 1993; SONG et al., 2004).

A espécie *B. fragilis* foi descrita pela primeira vez por Veillon e Zuber (1898) como *Bacillus fragilis* sendo incluída no gênero *Bacteroides* por Castellani e Chalmers (1919). Em 1923, na primeira Edição do Manual Bergey de Determinação Bacteriológica, *B. fragilis* foi classificada como pertencente ao gênero *Bacteroides*, composto por bacilos anaeróbios obrigatórios, Gram-positivos e negativos e não formadores de esporos. Posteriormente, em 1937 Weiss e Rettger excluíram os organismos Gram-positivos do gênero.

Em 1974, no Manual Bergey de Determinação Bacteriológica, estudos morfológicos e fisiológicos realizados por Holdeman e Moore subclassificaram as espécies de *B. fragilis* em *B. fragilis* subsp. *vulgatus*, *B. fragilis* subsp. *distasonis*, *B. fragilis* subsp. *ovatus*, *B. fragilis* subsp. *thetaitaomicron*, *B. fragilis* subsp. *eggerthii* e *B. fragilis* subsp. *uniformis*. Posteriormente, com o desenvolvimento da tecnologia da biologia molecular, verificou-se que essas subespécies eram geneticamente distintas, voltando a vigorar a classificação como espécies do gênero *Bacteroides* (CATO; JOHNSON, 1976).

No Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (1984), o grupo *B. fragilis* foi localizado no gênero *Bacteroides* sendo constituído pelas espécies *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus*. Em 1986, Johnson e Harich identificaram três novas espécies que foram incorporadas ao grupo: *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris*. Segundo a classificação de Holdeman; Cato e Moore (1984), as bactérias do grupo *B. fragilis* são bacilos Gram-negativos, bile-resistentes, sacarolíticos e produzem ácidos acético e succínico como principais produtos do metabolismo da glicose.

Na 9ª edição do Manual Bergey de Determinação Bacteriológica de 1994, Holt et al. descreveram o gênero *Bacteroides* com 47 espécies, incluindo aquelas que integram o grupo *B. fragilis*. No entanto, estudos baseados no seqüenciamento de genes da região 16S rRNA, novos gêneros e espécies têm sido descritos e outros reclassificados, principalmente no gênero *Bacteroides*, o qual nos últimos anos vem sofrendo modificações significativas na sua taxonomia (JOUSIMIES-SOMER; SUMMANEN, 2002; SONG et al., 2004).

As novas espécies incorporadas ao gênero *Bacteroides* isolados na espécie humana incluem *B. nordii*, *B. salyersae*, *B. massiliensis*, *B. plebeius*, *B. coprola*, *B. finegoldii*, *B. dorei* e *B. intestinalis* (BAKIR et al., 2006; FENNER et al., 2005; KITAHARA et al., 2005; SONG et al., 2004). Outras três novas espécies, *B. barnesiae*, *B. salanitronis* e *B. gallinarum* foram isoladas a partir do ceco de galinhas (LAN et al., 2006).

Em relação às espécies *B. distasonis*, *B. merdae* e *B. goldsteinii* foram reclassificadas, respectivamente, como *P. distasonis*, *P. merdae* e *P. goldsteinii* após serem incorporadas ao gênero *Parabacteroides* (SAKAMOTO; BENNO, 2006).

### 3.2.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS

As espécies do grupo *B. fragilis* residem principalmente no cólon, são quimioheterotróficas e sacarolíticas, e seus principais produtos de fermentação são acetato, succinato, lactato e propionato (SALYERS, 1984; SHAH; GHARBIA, 1993). Certas enzimas de *B. fragilis* estão diretamente relacionadas à degradação de diferentes tipos de mucinas e polissacarídeos, como a neuraminidase (ou sialidase) e glicosidases, entre outras (BERG; LINDQVIST; NORD, 1980; BERG et al., 1983).

Embora o ecossistema intestinal contenha vários nutrientes, os requerimentos nutricionais das espécies do grupo *B. fragilis* são mínimos. Crescem em meios contendo carboidratos, amônia, hemina, vitamina B12, sais inorgânicos e agentes redutores (HOLDEMAN; CATO; MOORE, 1984; SALYERS, 1984). As espécies do grupo têm como característica especial a aerotolerância, ou seja, apesar de não crescerem na presença de oxigênio, podem sobreviver à sua exposição por tempos prolongados devido à presença de enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, que lhes conferem alta resistência à oxidação (BAUGHN; MALAMY, 2004; SALYERS, 1984; TALLY et al., 1977).

Essa particularidade torna *B. fragilis* a espécie de maior frequência de isolamento em infecções extra-intestinais (ROCHA et al., 1996), assim como em bacteremias, abscessos cerebrais e pulmonares, sinusites e otites, infecções intra-abdominais e do trato geniturinário, entre outras. Nesses casos, as infecções são causadas por fatores predisponentes, como a ruptura das mucosas e da pele, feridas e falhas do sistema imune do hospedeiro (FINEGOLD, 1995).

As bactérias anaeróbias têm importante papel nos contextos clínico e ecológico e sua habilidade e versatilidade de sobreviver em diversas condições, beneficiando o hospedeiro ou atuando como fonte de infecções proporciona-lhes a categoria de organismos anfíbios (DINIZ et al., 2000).

O isolamento de membros da microbiota residente, geralmente considerados oportunistas causando infecções graves, alerta para o fato de que esses microrganismos não podem ser desprezados. Ao contrário, é possível que tenham grande importância clínica para indivíduos cujo sistema imune, por qualquer motivo, esteja alterado (SOUZA; SCARCELLI,

2000). No que concerne aos animais, particularmente em neonatos, a maioria das infecções é causada por bactérias oportunistas que residem no próprio organismo hospedeiro, devido ao fato de que seu sistema imune ainda está em formação. Fatores como o abandono materno e a insuficiente ingestão de colostro levam à inanição e desnutrição, que quando associados à deficiente higiene ambiental abrem espaço para a elevada ocorrência dessas enfermidades (SMITH, 1993).

### 3.2.3 PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DO GRUPO *B. fragilis*

O potencial patogênico é determinado pelos mecanismos que as bactérias utilizam para o estabelecimento da enfermidade, como a capacidade de adesão às células epiteliais do organismo hospedeiro, invasão tecidual, resistência às defesas do hospedeiro, produção de metabólitos e danos teciduais (DUERDEN, 1994; SHARP, 1999).

A colonização bacteriana inicia-se com o processo de adesão que contribui para a sua permanência no organismo hospedeiro. A afinidade do microrganismo pela superfície celular é determinada por uma complexa interação de fatores específicos e não específicos que operam *in situ*, como barreiras físicas ocasionadas por muco, repulsão eletrostática entre a bactéria e a superfície epitelial, além da existência ou não de receptores celulares que permitam a adesão bacteriana (NAVAMAR et al., 1994; SHARP, 1999).

Espécies de *B. fragilis* se ligam às células epiteliais por estruturas como as fímbrias ou adesinas. Pruzzo; Guzmán e Dainelli (1989) observaram que certos tipos de adesinas podem estar associadas ao processo de hemaglutinação, comum em espécies do grupo *B. fragilis*.

Dessa forma, a propriedade de adesão tem sido avaliada por meio de testes de aglutinação em eritrócitos de diferentes espécies animais e também pela aderência a outras células, verificando-se que cepas virulentas de *B. fragilis* são mais hemaglutinantes que as não virulentas (NAVAMAR et al., 1991). Esse fenômeno pode estar condicionado à ocorrência de vários tipos de hemaglutininas nas cepas virulentas, favorecendo a adesão e colonização de sítios específicos no organismo hospedeiro (PRUZZO; GUZMÁN; DAINELLI, 1989).

De fato, observam-se diferenças significativas na ocorrência de aglutinação bacteriana entre eritrócitos das diversas espécies animais e em relação a diferentes tipos celulares, o que

sugere a possível existência de distintas estruturas moleculares envolvidas no processo de adesão (OYSTON; HANDLEY, 1991).

Após a aderência bacteriana às células do hospedeiro, observam-se mudanças estruturais e bioquímicas nessas células, culminando com a invasão bacteriana (BLISKA; GALAN; FALKOW, 1993). No entanto, a maioria das bactérias anaeróbias Gram-negativas não promove invasão e, portanto, o acesso aos tecidos ocorre por meio de traumas, hipóxia, ferida cirúrgica, neoplasias ou qualquer alteração que favoreça a entrada desses microrganismos ao organismo hospedeiro (DUERDEN, 1994).

As espécies do grupo *B. fragilis* podem ainda produzir enzimas extracelulares como hialuronidases, heparinases, proteases, DNAses, colagenases, neuraminidases e fosfolipases, capazes de promover hidrólise nos tecidos do hospedeiro, alterando a estrutura celular e destruindo as células tão eficientemente quanto às exotoxinas iniciando a infecção (DUERDEN, 1994; RUDEK; HAQUE, 1976; SHARP, 1999).

Outras estruturas como a cápsula polissacarídica, microcápsulas e proteínas da membrana externa podem estar associadas ao fenômeno da adesão bacteriana às células do hospedeiro, mas ainda não há uma definição precisa ao respeito dos mecanismos utilizados (OYSTON; HANDLEY, 1990; VEL et al., 1986).

Sabe-se, no entanto, que a cápsula polissacarídica atua protegendo as células bacterianas contra a fagocitose e protegendo-as da atividade do soro sanguíneo do hospedeiro (KASPER, 1976). Estudos realizados em modelos animais elucidaram a importância dessa estrutura como potencial indutor de abscessos, contribuindo de forma definitiva para a virulência das espécies do grupo *B. fragilis* (BABB; CUMMINS, 1978).

As neuraminidases ou sialidases desempenham importantes funções na manutenção das espécies de *B. fragilis* no hospedeiro promovendo um aumento da habilidade de adesão bacteriana e destruição tecidual, colaborando de forma decisiva para o incremento de sua virulência. Algumas adesinas parecem se ligar mais fortemente às células epiteliais pré-tratadas com neuraminidase colaborando assim para uma maior capacidade de adesão e de hemaglutinação (GODOY et al., 1993; GUZMAN; PLATE; PRUZZO, 1990).

Há evidências que essas enzimas têm também importante participação no crescimento e multiplicação das cepas de *B. fragilis* na medida em que provocam a hidrólise do ácido siálico, glicoproteínas, glicolipídios, oligossacarídeos e polissacarídeos presentes na superfície das células eucarióticas, sendo os seus substratos aproveitados na nutrição bacteriana (GODOY et al., 1993; RUSSO et al., 1990).

A espécie *B. fragilis* produz índices elevados de neuraminidases, o que é observado tanto in vivo quanto in vitro. A produção dessas enzimas é codificada pelo gene *nanH* que ainda não está completamente seqüenciado, mas a sua detecção é possível amplificando-se o gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR), inclusive diretamente de amostras clínicas (JOTWANI et al., 1995; KUWAHARA et al., 1996).

Por sua vez, estudos recentes têm mostrado que a produção de hemolisinas por *B. fragilis* ocasiona ação citotóxica com destruição da integridade da membrana dos leucócitos e eritrócitos, permitindo às bactérias que as produzem enfraquecer a defesa imunológica do hospedeiro e ter acesso ao ferro da hemoglobina, essencial para seu crescimento e manutenção, contribuindo assim para a colonização bacteriana no trato intestinal do organismo hospedeiro (GENCO; DIXON, 2001; ROWE; WEICH, 1994).

#### 3.2.4 ESPÉCIES DE *Bacteroides fragilis* ENTEROTOXIGÊNICOS (ETBF)

Os primeiros isolamentos de *B. fragilis* enterotoxigênicos (ETBF) ocorreram a partir de fezes diarréicas de animais como carneiros, porcos, potros e bezerras (MYERS et al., 1984; MYERS et al., 1985; MYERS; SHOOP; BYARS, 1987). As cepas produtoras de toxina eram mencionadas como *B. fragilis* com atividade de enterotoxina (BFEL). Posteriormente, observou-se a presença dessas cepas em seres humanos (MYERS et al., 1987).

Em 1989, em um estudo experimental, Myers et al. verificaram que 84% dos filhotes de coelhos morreram ou ficaram moribundos após a inoculação por via oral de  $5 \times 10^9$  UFC do ETBF, evidenciando a potência dessa toxina. A verificação da atividade biológica da enterotoxina de *B. fragilis* foi realizada inicialmente pelo teste da alça intestinal ligada de coelho. Essa toxina causa diarréia aquosa e não sanguinolenta (DUIMSTRA et al., 1991; MYERS; COLLINS; SHOOP, 1991).

Como os testes realizados em modelos animais são caros, complicados e limitados a um pequeno número de cepas por animal (Van TASSEL; LYERLY; WILKINS, 1992; WEIKEL et al., 1992), a detecção da enterotoxina passou a ser realizada in vitro utilizando-se o sistema de cultura de células epiteliais intestinais humanas carcinogênicas da linhagem HT-29/C1. Essas células, ao serem tratadas com o sobrenadante bacteriano contendo a toxina, perdem suas características morfológicas normais, tornando-se arredondadas e com bordas delimitadas (WEIKEL et al., 1992). A linhagem celular HT-29/C1 foi escolhida por mostrar-se mais sensível do que T-84 e Caco-2, sofrendo as alterações morfológicas características após 1 hora em contato com a enterotoxina e permanecendo nesse estado até 24 horas, sendo este processo reversível após 24-48 horas (WEIKEL et al., 1992).

Obiso; Bevan e Wilkins (1997) sugeriram que a enterotoxina de *B. fragilis* atua no rompimento da barreira paracelular epitelial por degradação proteolítica levando ao dano tecidual e acúmulo de fluidos, contribuindo para a patogênese da diarreia e de infecções extra-intestinais nos hospedeiros susceptíveis.

Sabe-se que *B. fragilis* pode sobreviver à exposição ao oxigênio por tempo prolongado (BAUGHN; MALAMY, 2004). Assim, esses microrganismos podem também ser transmitidos por água contaminada como esgoto doméstico não tratado. Em 1990, Shoop; Myers e Lefever relataram a presença de cepas ETBF em águas de esgoto, sugerindo uma provável fonte de contaminação ambiental e de disseminação do agente, colocando em risco a saúde da população.

Após o surgimento das cepas enterotoxigênicas, diversos trabalhos foram desenvolvidos no sentido de caracterizá-las. Em todos os estudos *B. fragilis* parece ser a única espécie do grupo *B. fragilis* produtora dessa toxina associada à diarreia em humanos e animais (MOORE; HOLDEMAN, 1974; MYERS et al., 1984; MYERS et al., 1987).

Trata-se de uma toxina extracelular que permanece ativa a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mas é instável a  $55^{\circ}\text{C}$ , sensível à proteinase K e resistente à tripsina e à quimotripsina (Van TASSEL; LYERLY; WILKINS, 1992). É classificada como uma metaloprotease de 20 KDa dependente de zinco e pertencente à Família das metzincinas (MONCRIEF et al., 1995; OBISO; BEVAN; WILKINS, 1997). Caracteriza-se por hidrolisar actina, tropomiosina, miosina e gelatina, mas não hidrolisa fibronectina, elastina e albumina.



A produção da toxina de *B. fragilis* (BFT) é codificada pelo gene *bft*, o qual consiste de uma seqüência de leitura aberta de 1191 nucleotídeos que codificam uma proteína de 397 aminoácidos (FRANCO et al., 1997; KLING et al., 1997). Foi relatado que, exclusivamente em cepas ETBF, o gene *bft* estaria presente em uma ilha de patogenicidade de 6 Kb denominada BfPAI (FRANCO et al., 1999; MONCRIEF et al., 1998). Assim, em 2002, Franco et al. verificaram que no genótipo das cepas ETBF existe uma região de 18 kb ancorada no DNA cromossômico, composta pela ilha (6 kb) e por segmentos laterais de DNA (12 kb) que auxiliam na expressão da atividade biológica da toxina.

Em 1997, Pantosti et al. descreveram a técnica de PCR para a identificação do gene *bft* em cultura pura ou diretamente das fezes. A cultura bacteriana pura mostrou-se mais sensível para a detecção da toxina em relação à detecção direta das fezes, pois o material fecal contém substâncias, tais como sais biliares que podem interferir na ação da enzima DNA polimerase. Assim, em todos os estudos epidemiológicos sobre cepas ETBF observa-se completa concordância entre as duas técnicas utilizadas para a detecção da toxina (cultura de células HT-29/C1 e PCR). Ambas as técnicas, portanto, servem como controle entre si (PANTOSTI et al., 1997).

### **3.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DO GRUPO *B. fragilis***

A eficácia dos antimicrobianos contra bactérias anaeróbias tem sido estudada desde a década de 50. Dentre esse grupo de bactérias, as espécies de *B. fragilis* se destacam por apresentarem o maior espectro de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica. Esse preocupante quadro vem se agravando constantemente, variando conforme a área geográfica e conduta terapêutica (SHOEMAKER et al., 2001). No Brasil, são poucas as instituições que monitoram a susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias anaeróbias, particularmente, às do grupo *B. fragilis*.

#### **3.3.1 ANTIBIÓTICOS**

As drogas comumente utilizadas no tratamento de infecções anaeróbias, incluindo aquelas ocasionadas por *B. fragilis* são  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, clindamicina, metronidazol e imipenem, entre outras. Sabe-se também que bactérias anaeróbias são naturalmente

resistentes aos aminoglicosídeos e às quinolonas (HEDBERG; NORD, 1996). Em 1966, Keusch e O'Connell relataram o primeiro caso de *Bacteroides* spp. resistentes à penicilina, acreditando-se que esses microrganismos têm grande capacidade para a aquisição de resistência a diferentes antimicrobianos.

Em 1983, Uzeda et al. verificaram o amplo espectro de atividade do metronidazol e clindamicina para a maioria das bactérias anaeróbias testadas, assim como a elevada frequência de resistência à penicilina G, ampicilina, amoxicilina, tetraciclina e eritromicina, principalmente entre as cepas do grupo *B. fragilis*. Já em 1996, Hedberg; Nord observaram que apenas metronidazol, clindamicina e imipenem apresentaram boa eficácia contra cepas de *B. fragilis*.

Recentemente, a escolha de drogas para o tratamento de infecções ocasionadas pelas bactérias do grupo *B. fragilis* tornou-se ainda mais limitada, devido ao aumento contínuo da resistência a quase todos os antibióticos utilizados para conter as infecções anaeróbias (SNYDMAN et al., 2002). Esse fenômeno ocorre, principalmente, devido à transferência de genes de resistência a certos antibióticos por conjugação, permitindo a disseminação de resistência a várias drogas, inclusive entre diferentes espécies bacterianas que habitam o trato intestinal (SHOEMAKER et al., 2001).

As espécies do grupo *B. fragilis* apresentam diversos mecanismos para escapar da ação das drogas, sendo a produção de  $\beta$ -lactamases um dos principais. Em 1955, Garrod conduziu o primeiro estudo sobre a produção de  $\beta$ -lactamases em cepas de *B. fragilis*, mas a primeira caracterização dessas enzimas ocorreu somente em 1973 por Anderson e Sykes.

As  $\beta$ -lactamases podem inativar os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por hidrólise do seu anel  $\beta$ -lactâmico (WILLIAMS, 1999). As bactérias podem também modificar a permeabilidade da membrana externa ou alterar as proteínas ligantes de penicilinas (PBP), dificultando a entrada e ação dessas drogas (PIDDOCK; WISE, 1987; RASMUSSEN et al., 1994).

Sabe-se que, em espécies de *B. fragilis*, a produção de  $\beta$ -lactamase é mediada por genes cromossômicos ou plasmidiais, como o gene *cepA* que codifica a produção de cefalosporinases e penicilinas e o gene *cfxA* que codifica para a hidrólise da cefoxitina, ambos pertencentes à classe A, além do gene *cfiA* que codifica a produção de

carbapenêmicos, pertencente à classe B (PARKER; SMITH, 1993; RASMUSSEN; GUZMAN; TALLY, 1990; ROGERS; PARKER; SMITH, 1993).

Entre as bactérias existe importante mobilidade genética que pode ser ampliada por meio de transposons, os quais transportam genes desde os plasmídios até o cromossomo e vice-versa. Esse processo permite a disseminação dos genes de resistência aos antibióticos para as diversas comunidades microbianas (WILLIAMS, 1999).

Em membros do grupo *B. fragilis*, o mecanismo de resistência para a clindamicina pode ocorrer através da metilação de uma ou duas adeninas do rRNA, evitando a ligação da droga aos ribossomos (MARSH et al., 1983; REIG et al., 1992). Outra hipótese é que os genes que conferem resistência à clindamicina e à tetraciclina, estariam localizados no mesmo transposon (SHOEMAKER; BARBER; SALYERS, 1989).

A resistência ao metronidazol vem surgindo em alguns países devido, principalmente, ao fato de ser o antibiótico de primeira escolha no tratamento de infecções por espécies do gênero *Bacteroides*. Dentre os mecanismos de resistência a essa droga destacam-se a alteração de proteínas de membrana, afetando a permeabilidade da droga, a redução da atividade das enzimas oxidoredutase e piruvato/ferredoxina e a redução da interação com o DNA bacteriano (MULLER, 1986; REYSSET; HAGGOURD; SEBALD, 1993).

A utilização das drogas antimicrobianas na Medicina Veterinária aumenta ainda mais a preocupação com a múltipla resistência de *B. fragilis*. Devido ao fato de que alguns antimicrobianos são utilizados como promotores de crescimento para animais de produção, a microbiota residente presente no trato gastrointestinal desses animais pode sofrer uma seleção espontânea de mutantes resistentes, transferindo essa condição a outras espécies, as quais podem ser transmitidas a outros animais ou ao ser humano (PHILLIPS et al., 2004).

### 3.3.2 METAIS PESADOS

Vários metais são considerados essenciais para o crescimento de organismos procarióticos e eucarióticos, desde que em baixas concentrações. Mercúrio, cádmio e chumbo não são essenciais para o crescimento celular, mas são extremamente tóxicos e muitas vezes biocidas, mesmo em baixas concentrações (TREVORS; STRATTON; GADD, 1986).

Os metais encontram-se distribuídos na natureza em pequenas concentrações, entretanto, com a intervenção do homem passam a serem encontrados como contaminantes ambientais (NRIAGU, 1988). A contaminação dos alimentos por metais pesados é uma antiga preocupação do homem, pois ao se alimentar com produtos de origem animal pode se contaminar com resíduos desses metais, visto que os animais estão sujeitos a inúmeras fontes de contaminação (PASCOE; BLANCHET; LINDER, 1996).

Na literatura existem poucos trabalhos mencionando a susceptibilidade de bactérias anaeróbias aos metais pesados, principalmente, em relação às espécies do grupo *B. fragilis*. No Brasil, Avila-Campos et al. (1991) analisaram a susceptibilidade de isolados do grupo *B. fragilis* em micos *Callithrix penicillata* ao mercúrio, observando-se praticamente 100% de resistência.

Em 2004, Nakano e Avila-Campos relataram que todas as bactérias do grupo *B. fragilis* estudadas em humanos, além de ampla resistência à maioria dos antibióticos testados, apresentaram também resistência ao chumbo e ao níquel. Esses estudos sugerem que *B. fragilis* possui capacidade de desenvolver múltipla resistência a diversos antimicrobianos.

Alguns trabalhos têm sugerido que a resistência aos íons metálicos seria mediada por genes plasmidiais (NAKAHARA et al., 1977; NOVICK; ROTH, 1968; WITTE et al., 1986). Esses plasmídios, interessante, poderiam também abrigar genes de resistência aos antibióticos (NAKAHARA et al., 1977). A transferência de genes de resistência a antibióticos e metais pesados, além de ocorrer entre diferentes comunidades microbianas, ocorre também entre as bactérias presentes no trato intestinal dos animais e humanos. Este fenômeno ainda não está completamente esclarecido, mas é possível que ocorra uma colonização acidental no homem pela microbiota do animal e vice-versa (SHOEMAKER; WANG; SALYERS, 1992).

### **3.4 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO GRUPO *B. fragilis* EM BEZERROS**

Dentro do sistema de criação de bovinos, os bezerros constituem a categoria mais susceptível à ocorrência de doenças. A diarreia em bezerros é, geralmente, resultante da interação entre agentes infecciosos (bactérias, toxinas, vírus, protozoários e parasitas) e

fatores não-infecciosos relacionados à alimentação, às condições de higiene dos criatórios, à densidade populacional e ao manejo (RENGIFO; BOTTEON; SILVA, 2006).

Historicamente, a diarreia tem sido apontada como uma das maiores causas de perdas econômicas em bovinos jovens de leite e corte (BUSATO et al., 1997; OXENDER; NEWMAN; MORROW, 1973). Em 1990, Kaneene e Hurd relataram que o custo global devido aos casos de doenças entéricas era equivalente a US\$ 33,46/bezerro/ano. House, em 1978, já estimava perdas econômicas da ordem de 95 milhões de dólares anuais com casos de diarreia.

Estudos realizados no Brasil apontam à diarreia como uma das enfermidades de maior ocorrência em bezerros e responsável por grandes prejuízos ao produtor, ocasionados pela mortalidade, gastos com tratamento e baixo desenvolvimento dos animais enfermos (PRADO; CRUZ; VIANA, 1997).

Os principais enteropatógenos reconhecidos como causadores de surtos de diarreia em bezerros são *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (GAY, 1965; ROBINSON, 1966), *Chlamydia* sp. (EUGSTER; STORZ, 1971), *Clostridium perfringens* (SONGER; MISKIMMINS, 2004), Adenovirus (BULMER; TSAI; LITTLE, 1975), Rotavirus, Coronavírus e *Cryptosporidium* (de LA FUENTE et al., 1999).

Apesar de todos os estudos referentes à diarreia de bezerros, o tratamento e controle dessa síndrome são difíceis e frustrantes porque a causa da diarreia não é determinada rapidamente e com a exatidão necessária (BENDALI et al., 1999; RADOSTITS et al., 1975). Geralmente, as técnicas utilizadas para a detecção dos agentes etiológicos envolvidos no processo diarreico são muito simples e não inclui métodos sofisticados para detecção de bactérias anaeróbias, o que certamente traria maiores informações quanto à ocorrência de outros possíveis agentes causadores da diarreia (AL-MASHAT; TAYLOR, 1983).

Dessa forma, a síndrome diarreica em bezerros permanece sem um diagnóstico preciso devido à sua complexa etiologia. A lista de microrganismos responsáveis por seu desencadeamento, provavelmente, continua incompleta (TZIPORI, 1981). A diarreia, ainda hoje, constitui um sério problema enfrentado pelos pecuaristas. A etiologia em muitos casos

pode estar associada ao *B. fragilis* enterotoxigênico e / ou a outros potenciais enteropatógenos.

O papel das bactérias anaeróbias como causadoras de sérias infecções em animais tem merecido mais atenção e preocupação dos pesquisadores no decorrer das décadas (ONDERDONK et al., 1979). Apesar disso, com exceção das infecções produzidas por clostrídios, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar infecções bacterianas anaeróbias naturalmente adquiridas em espécies animais (HIRSH et al., 1985).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS ANALISADOS**

Foram analisadas amostras fecais de 54 bezerros com diarreia aguda e de 54 bezerros não diarreicos, com idade entre sete e 90 dias, sem distinção de sexo e raça. Os bezerros diarreicos apresentaram aumento na fluidez e na frequência de defecações. Os animais pertenciam a cinco fazendas leiteiras situadas em regiões do interior do Estado de São Paulo: Fazenda 1, situada em Espírito Santo do Pinhal; Fazenda 2, em Cravinhos; Fazenda 3, em Jundiá; Fazenda 4, em Miguelópolis; Fazenda 5, em Onda Verde. Os bezerros ficavam confinados em abrigos individuais até 60 dias de vida em média, sendo posteriormente colocados em bezerreiros coletivos.

### **4.2 COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS**

As amostras fecais foram coletadas diretamente da região retal dos animais com auxílio de cotonetes esterilizados e transportadas em meio Cary-Blair (CARY; BLAIR, 1964), modificado pela adição de 0,5% de L-cisteína-HCl para posterior isolamento laboratorial. Após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório dentro do período de 48 horas para seu processamento.

### **4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GRUPO *B. fragilis* (FINEGOLD; CITRON, 1987; HOLDEMAN; MOORE, 1974; SUMMANEN et al., 1993)**

As amostras coletadas foram inoculadas em meio seletivo ágar *B. fragilis*-bile-esculina (BBE) e incubadas em condições de anaerobiose (90% N<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub>), a 37°C, por 72 horas. Após o tempo de incubação, colônias escuras características devido à hidrólise da esculina foram submetidas à caracterização morfológica colonial e celular pela coloração de Gram. Em seguida, foram repicadas sobre ágar sangue para obtenção de cultura pura e determinação do tipo respiratório dos isolados.

A identificação presuntiva foi realizada determinando-se a produção de catalase, H<sub>2</sub>S e indol, e a identificação definitiva das espécies pela fermentação dos açúcares arabinose,

ramnose, salicina, trealose e xilose em meio enriquecido com peptona-extrato de levedura (PY) e pelo uso do kit comercial RAPID ID 32A (bioMérieux). Todos os isolados identificados em cultura pura foram estocados em leite desnatado (10%) a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  e liofilizados.

#### **4.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA**

##### **4.4.1 PRODUÇÃO DE HEMOLISINA**

Placas contendo agar de soja tripcaseína (TSA), enriquecido com 5% de sangue de cavalo, foram inoculadas em duplicata com as cepas-teste utilizando-se o replicador de Steers (Cefar Ltda., São Paulo, SP) e transferindo-se aproximadamente um inóculo final de  $10^5$  células/ml. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. A formação de halos claros indicou a ocorrência de hemólise total.

##### **4.4.2 REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (HA) (FALKLER; HAWLEY, 1977)**

Foi realizada em placas de microtitulação com fundo em “V”, de 96 poços (Inlab) utilizando-se sangue de humano, de carneiro e de bezerro coletados em solução de Alsever (10%) e mantido até uma semana a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sangue humano foi coletado de um único doador sadio, do sexo masculino (A, Rh +). O sangue de carneiro e o de bezerro foram coletados de animais machos de aproximadamente três meses de idade e pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

Inicialmente os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina tamponada (PBS; pH 7,4), centrifugados a  $10.000 \times g$  por 5 minutos e ressuspensos na mesma solução até atingir a concentração final de 1%.

As células bacterianas foram cultivadas em caldo brain heart infusion (BHI) suplementado com extrato de levedura (0,5%) e incubadas (anaerobiose,  $37^{\circ}\text{C}$ , 48 horas). Foram então lavadas três vezes ( $10.000 \times g$ , por 10 minutos) e ressuspensas em PBS atingindo-se, aproximadamente,  $10^8$  bactérias / ml (escala 0,5 McFarland).

Após esse processo, foram adicionados às microplacas 50  $\mu\text{l}$  de suspensão bacteriana em diluições seriadas (1:1 até 1:10.000), em PBS, em base 2. Em seguida, adicionou-se a cada diluição 50  $\mu\text{l}$  da suspensão de eritrócitos. As misturas foram homogeneizadas e mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 1 hora, seguindo-se incubação por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . Como controle negativo de HA



foi misturado PBS e eritrócitos. O título de HA foi definido como o recíproco da maior diluição bacteriana que apresentou aglutinação dos eritrócitos.

#### 4.4.3 REAÇÃO DA INIBIÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO (IHA)

Foram preparadas soluções dos açúcares xilose, arabinose, galactose e manose, em PBS, atingindo-se uma concentração final de 60 mM. Para cada 99 ml de solução de carboidratos, era adicionado 1 ml de eritrócitos (10%) lavados, atingindo-se uma concentração final de 1%. Após as respectivas diluições bacterianas foram adicionados em cada poço 50 µl dos eritrócitos tratados com os respectivos carboidratos. Em seguida, as placas foram ligeiramente homogeneizadas e incubadas como na reação de HA. O título foi determinado como o recíproco da maior diluição capaz de inibir a HA. Como controle do teste foi utilizada a suspensão de 1% de eritrócitos em PBS com a bactéria-teste.

#### 4.4.4 SUSCEPTIBILIDADE AO SORO (SUNDQVIST; JOHANSSON, 1982)

Foi realizada utilizando-se soros de humano, de carneiro e de bezerro, os quais foram mantidos em alíquotas de 1 ml, a -20°C, até a realização dos testes. Os isolados foram crescidos em caldo BHI suplementado e os inóculos preparados para atingir aproximadamente  $10^8$  células/ml. Alíquotas de 0,1 ml da suspensão bacteriana foram misturadas com 0,1 ml do soro a ser testado (humano ou animal) e essa mistura foi incubada em condições de anaerobiose, a 37°C, por 4 horas. Após esse tempo, inoculou-se 0,1 ml dessa mistura com o auxílio do replicador de Steers em placas contendo ágar sangue suplementado e incubou-se em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Soros inativados pelo calor (56°C, 30 minutos) foram usados como controle.

#### 4.4.5 RESISTÊNCIA À TEMPERATURA

Os isolados foram cultivados em caldo BHI suplementado com extrato de levedura (0,5%) em condições de anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para tubos contendo 5 ml do mesmo meio e levados a banho-maria por 30 e 60 minutos, a 60°C, e por 10 minutos, a 100°C. Decorrido o tempo, os tubos foram incubados em

condições de anaerobiose, por 48 horas, a 37°C. A turvação do meio foi indicativa de crescimento bacteriano e interpretado como resistência ao calor. Tubos inoculados sem exposição ao calor foram incubados nas mesmas condições, como controle da viabilidade celular bacteriana.

#### 4.4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *B. fragilis* EM CÉLULAS HT-29/C1 (PANTOSTI et al., 1994)

Os isolados de *B. fragilis* foram crescidos em 5 ml de caldo BHI suplementado em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 14.000 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes foram estocados e conservados a -20°C, até o momento do uso. As amostras fecais também foram submetidas à detecção do gene *bft*. Cada amostra foi lavada duas vezes com água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada e processada conforme descrito acima.

Células HT-29/C1 foram cultivadas em meio mínimo essencial Eagle suplementado com glutamina (Gibco, Life Technologies Ltda., Brasil) e 10% de soro fetal inativado bovino (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), adicionando-se penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) e então incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por cinco dias. Essas células foram preparadas pelo Laboratório de Virologia sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edison Durigon.

As células crescidas em camadas celulares discretas foram inoculadas com 20 µl do sobrenadante de cada isolado bacteriano e as placas foram incubadas de 2 a 4 horas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, observando-se microscopicamente o efeito tóxico característico induzido pela toxina bacteriana. Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante da cultura da cepa *B. fragilis* enterotoxigênica ATCC 43858 e, como controle negativo, o sobrenadante da cultura de *B. uniformis*. As células foram observadas em microscópio óptico 100X e 200X (Leica), com câmara digital (Hitashi KP-D 581) acoplada ao microscópio e a imagem registrada através do programa Leica EWS 2100 Capture Station.

#### 4.4.7 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Foi determinada pelo método de diluição em ágar (SUTTER et al., 1979) em meio Wilkins & Chalgren e as drogas testadas foram: amoxicilina, ampicilina, aztreonam, cefoxitina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, imipenem, metronidazol, norfloxacin,

penicilina G e tetraciclina. Os antibióticos foram utilizados nas concentrações de 0,25 a 512 µg/ml e meios de cultura sem antibióticos foram utilizados como controle.

O inóculo foi preparado em caldo BHI suplementado ( $10^8$  células/ml) e as placas foram inoculadas, em duplicata, com o replicador de Steers ( $10^5$  células/ponto), sendo posteriormente incubadas em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de cada agente antimicrobiano capaz de inibir totalmente o crescimento macroscópico dos organismos.

#### 4.4.8 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA $\beta$ -LACTAMASE

A produção de  $\beta$ -lactamase foi verificada para os isolados resistentes a amoxicilina, ampicilina, cefoxitina e penicilina G utilizando-se o método da hidrólise da cefalosporina cromogênica (Nitrocefin, Oxoid Ltda., São Paulo, SP, Brasil) que permite a detecção de níveis basais da enzima. Dessa forma, uma gota de Nitrocefin foi colocada em contato com um fragmento de cada colônia bacteriana e incubada à temperatura ambiente por três minutos. A produção da enzima foi observada pela mudança da cor amarela para vermelha. A cepa produtora de  $\beta$ -lactamase *B. fragilis* ATCC 43858 foi usada como controle positivo.

#### 4.4.9 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A METAIS PESADOS

Foi determinada pelo método de diluição em ágar (SUTTER et al., 1979), em meio Wilkins & Chalgren. Os metais testados foram: bicloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), cloreto de chumbo ( $\text{PbCl}_2$ ), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), sulfato de cádmio ( $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). As concentrações dos metais utilizados foram de 0,25 a 512 µg/ml. A padronização do inóculo bacteriano, a inoculação, a incubação e interpretação da CIM foram realizadas como descrito anteriormente para os antibióticos. Meios sem metais pesados foram utilizados como controle.

### 4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA

#### 4.5.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL PLASMIDIAL DE ESPÉCIES DO GRUPO *B. fragilis*

A extração do DNA plasmidial foi realizada pela utilização de kits Perfect Plasmid MiniPrep System (Eppendorf). A partir de cada amostra de DNA obtida, alíquotas de 10 µl foram misturadas com 1 µl de corante de arraste e submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%) em tampão TBE 0,5X (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH 8,0) para verificação da pureza e presença de bandas plasmidiais. A corrida eletroforética foi realizada em fonte de corrente BioRad ajustada para 50 V por aproximadamente 4 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (EtBr) (0,5 µg/ml), em TBE (0,5X), visualizado e fotografado em transiluminador com luz UV (Kodak Digital Science System DC 120).

#### 4.5.2 CURA PLASMIDIAL

Todos os isolados que apresentaram bandas plasmidiais foram cultivados em caldo BHI contendo concentrações crescentes de EtBr (1 a 32 µg/ml) em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Em seguida, foram repicadas para ágar sangue e a pureza do cultivo foi verificada pela coloração de Gram. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C, por 48 horas e, posteriormente, oito clones de cada isolado foram crescidos em 3 ml de caldo BHI, realizando-se uma nova extração do DNA plasmidial. Alíquotas de 10 µl do DNA foram submetidas à eletroforese para verificar a presença ou ausência das bandas plasmidiais.

#### 4.5.3 DETECÇÃO POR PCR DOS GENES *cepA* E *cfiA* NOS DNA CROMOSSÔMICO E PLASMIDIAL (GUTACKER; VALSANGIACOMO; PIFFARETTI, 2000)

Células bacterianas resistentes a amoxicilina, ampicilina, cefoxitina e penicilina G foram testadas. Para a extração do DNA cromossômico, as células foram ressuspensas em 1ml de água ultra-pura esterilizada, homogeneizadas e fervidas por 10 min. e o sobrenadante (DNA) usado imediatamente ou estocado a -20°C até o momento do uso. Os DNA plasmidiais foram obtidos após a extração por kit Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf) e purificação pelo kit Concert Rapid Plasmid Purification Systems (Gibco Life Technologies).

Iniciadores específicos para a detecção das seqüências do gene *cepA* da classe A de β-lactamase e do gene *cfiA*, da classe B, foram utilizados (Tabela 1). As amplificações dos DNA cromossômico e plasmidial foram realizadas em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10X de tampão PCR (Gibco), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Gibco), 2,0 µl de cada dNTP (10 mM) (Gibco), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Gibco), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM),

10 µl de DNA (10 ng) e 7 µl de água destilada esterilizada. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2.400) programado para: um ciclo de 94°C (5 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 55°C (para *cepA*) e 56°C (para *cfiA*) (1 minuto) e um ciclo de 72°C (5 minutos).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com EtBr (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120).

#### 4.5.4 DETECÇÃO DO GENE *nanH* DA NEURAMINIDASE POR NESTED-PCR (KUWAHARA et al., 1996)

Todos os isolados do grupo *B. fragilis* foram avaliados quanto à detecção do gene responsável pela produção de neuraminidase. Os DNA foram obtidos como descrito no item 4.5.3. A detecção desse gene foi realizada por Nested-PCR com dois pares de iniciadores indicados na Tabela 1. A primeira amplificação foi realizada com os iniciadores F1 e R1 em volume final de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10X de tampão PCR (Gibco), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Gibco), 2,0 µl de cada dNTP (10 mM) (Gibco), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Gibco), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 10 µl de DNA (10 ng) e 7 µl de água ultra-pura esterilizada. O aparelho de PCR (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2.400) foi programado para um ciclo 94°C (5 minutos), 30 ciclos de 94°C (1 minuto), 62°C (1 minuto) e 72°C (3 minutos).

Para o Nested-PCR, 10 µl do produto amplificado foram adicionados à mistura com os iniciadores F2 e R2 (Tabela 1) e amplificado nas condições anteriormente mencionadas. Os produtos do Nested-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com EtBr (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV, com câmara Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120).

#### 4.5.5 DETECÇÃO POR PCR DO GENE *bft* EM *B. fragilis* (PANTOSTI et al., 1997)

Todos os isolados pertencentes ao grupo *B. fragilis* foram crescidos em 5 ml de caldo BHI suplementado em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 14.000 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes e sedimentos foram estocados separadamente e conservados a -20°C até o momento do uso. As amostras fecais também

foram submetidas à detecção do gene *bft*. Cada amostra foi lavada duas vezes com água ultra-pura esterilizada e processada conforme descrito acima.

Foram utilizados iniciadores específicos para a detecção da sequência do gene *bft* responsável pela produção da enterotoxina (Tabela 1). A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10X de tampão PCR (Gibco), 1,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Gibco), 1,0 µl de cada dNTP (10 mM) (Gibco), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5U) (Gibco), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 10 µl de DNA (10 ng) e 8,25 µl de água destilada esterilizada. A reação de amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2.400), programado para: um ciclo de 94°C (5 minutos); 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos), 72°C (30 segundos) e um ciclo de 72°C (5 minutos). Como controle positivo foi utilizada a cepa ETBF *B. fragilis* ATCC 43858 e como controle negativo, a mistura dos reagentes utilizada na reação de PCR com água ultra-pura esterilizada. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com EtBr (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120).

#### 4.5.6 TIPAGEM DA ESPÉCIE *B. fragilis* POR AP-PCR (ERIBE; OLSEN, 2000)

O DNA obtido de cada bactéria da espécie *B. fragilis* foi submetido à amplificação por PCR com iniciadores arbitrários. Foram utilizados cinco iniciadores: 5'- CAG GCC CTT C - 3'; 5'- TGC CGA GCT G -3'; 5'- AGT CAG CCA C -3'; 5'- AGC CAG CGA A -3'; 5'- AGG TGA CCG T -3' (Gibco Life Technologies).

A amplificação do DNA foi realizada em volumes finais de 25 µl contendo 8,75 µl de água ultra-pura esterilizada, 2,5 µl de tampão 10x PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 1,0 µl de dNTP (100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,25 µl de *Taq* DNA Polimerase (5 U) (Perkin-Elmer), 1,0 µl do respectivo iniciador (0,4 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) e 10,0 µl de cada DNA (15 ng). O aparelho de PCR (Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2.400) foi programado para um ciclo de 94°C (5 minutos), 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 42°C (2 minutos) e 72°C (2 minutos) e um ciclo de 72°C (10 minutos).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com EtBr (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak. Posteriormente, foram elaborados os dendrogramas relativos aos isolados da espécie *B. fragilis* provenientes de animais diarréicos e não diarréicos.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram analisados, quando necessário, por programas estatísticos adequados. Os dendrogramas foram construídos pelo programa bioestatístico Numerical Taxonomy Systems (NTSYS) (Applied Biostatistics, Inc. Versão 1.7), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Tabela 1. Nomenclatura e seqüência dos iniciadores utilizados na detecção de genes e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Genes	Seqüência de Iniciadores ( 5'→ 3')	T° anelamento	Referência
<i>cepA</i> (β-lactamase)	TTT CTG CTA TGT CCT GCC C ATC TTT CAC GAA GAC GGC	55°C	GUTACKER et al., (2000)
<i>cfiA</i> (β-lactamase)	ATG GTA CCT TCC AAC GGG CAC GAT ATT GTC GGT CGC	56°C	GUTACKER et al., (2000)
<i>nanH</i> (neuraminidase)	F1: TGG GTG GTT GCT GCC TGG ACA CA R1: TGT TCG GGT GAC CAA GTC ACA CC F2: CAT CCG GGT ATG GAT ATG AA R2: GTC GTA TTA GGA TTA GAG AA	62°C	KUWAHARA et al., (1996)
<i>bft</i> (ETBF)	GAC GGT GTA TGT GAT TTG TCT GAG AGA ATC CCT AAG ATT TTA TAA TCC CAA GTA	55°C	PANTOSTI et al., (1997)

## 6 RESULTADOS

Neste estudo foram analisadas 108 amostras fecais, sendo 54 derivadas de bezerros diarréicos e 54 de não diarréicos. Das 54 amostras diarréicas, 37 (68,5%) foram positivas para o grupo *B. fragilis*, isolando-se um total de 124 bactérias, enquanto das 54 amostras não diarréicas, apenas 21 (38,9%) foram positivas para este grupo, isolando-se 92 bactérias (Tabela 2). De cada amostra positiva foram analisadas, aleatoriamente, três a cinco colônias características, sendo isoladas no total 216 bactérias do grupo *B. fragilis*.

Na Tabela 2 é possível observar que em bezerros diarréicos, oito espécies do grupo *B. fragilis* foram encontradas. Nos bezerros sem diarreia foram observadas somente quatro espécies deste grupo. Ressalta-se também que a presença de ETBF foi verificada somente em bezerros diarréicos. É importante notar que *B. fragilis* e *B. vulgatus* foram as duas espécies mais frequentemente isoladas em ambos os grupos de bezerros analisados. Essas espécies foram observadas, em maior número, em bezerros com um mês de vida. Para bezerros de um a três meses de idade, *B. vulgatus* foi a espécie mais isolada, enquanto *B. fragilis* foi predominante em bezerros com menos de um mês de vida, como também em bezerros não diarréicos de um mês de idade.

Dos 124 isolados de fezes diarréicas, 45 (36,3%) e dos 92 isolados não diarréicos, 77 (83,7%) produziram  $\beta$ -hemólise. A produção de hemaglutinação foi observada somente em 13 (10,5%) dos 124 isolados de fezes diarréicas, dos quais oito aglutinaram somente hemácias humanas (títulos variando de 2 a 8) e cinco hemaglutinaram hemácias de bezerro (títulos de 2 a 32), sendo que destes últimos cinco isolados, dois aglutinaram também hemácias de carneiro (títulos de 4 a 8). Ainda é importante ressaltar que dos 124 isolados de fezes diarréicas, somente as espécies *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. distasonis* e *B. ovatus* tiveram essa capacidade hemaglutinante. Dentre os 92 isolados de fezes não diarréicas, somente três apresentaram capacidade hemaglutinante para hemácias de humanos (com títulos de 2 a 8) (Tabela 3).

Na mesma Tabela 3, também podem ser observados os títulos de inibição da hemaglutinação de cada isolado para os eritrócitos de carneiro, bezerro e humano. Dos açúcares utilizados, a maltose inibiu a hemaglutinação de 15 (93,7%) isolados, a galactose de cinco (31,2%) e arabinose e xilose de um mesmo isolado.



Tabela 2. Distribuição das espécies do grupo *B. fragilis* isoladas de 37 bezerros com diarreia e de 21 bezerros sem diarreia, segundo a idade.

	Idade dos bezerros				Total no. (%)
	<1 mês no. (%)	1 mês no. (%)	2 meses no. (%)	3 meses no. (%)	
<b>Bezerros diarréicos</b>					
<i>B. fragilis</i> *	14 (50,0)	3 (10,7)	2 (7,1)	9 (32,2)	28 (100,0)
<i>B. vulgatus</i>	10 (15,7)	23 (35,9)	13 (20,3)	18 (28,1)	64 (100,0)
<i>B. distasonis</i>	---	5 (25,0)	6 (30,0)	9 (45,0)	20 (100,0)
<i>B. eggerthii</i>	2 (50,0)	---	2 (50,0)	---	4 (100,0)
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1 (50,0)	---	2 (50,0)	1 (25,0)	4 (100,0)
<i>B. ovatus</i>	---	---	2 (100,0)	---	2 (100,0)
<i>B. uniformis</i>	---	---	1 (100,0)	---	1 (100,0)
<i>B. caccae</i>	---	---	---	1 (100,0)	1 (100,0)
Total	27 (21,8)	31 (25,0)	28 (22,6)	38 (30,6)	124 (100,0)
<b>Bezerros não diarréicos</b>					
<i>B. fragilis</i>	11 (26,8)	21 (51,2)	---	9 (22,0)	41 (100,0)
<i>B. vulgatus</i>	7 (19,4)	6 (16,7)	5 (13,9)	18 (50,0)	36 (100,0)
<i>B. distasonis</i>	1 (12,5)	2 (25,0)	1 (12,5)	4 (50,0)	8 (100,0)
<i>B. eggerthii</i>	---	3 (42,8)	---	4 (57,2)	7 (100,0)
Total	19 (20,7)	32 (34,8)	6 (6,5)	35 (38,0)	92 (100,0)

\* Das 28 bactérias da espécie *B. fragilis* isoladas de fezes diarréicas, duas foram ETBF, pertencentes a bezerros de 25 dias e de 3 meses de idade.

Todos os isolados testados foram resistentes à ação do soro bovino. Somente quatro isolados foram sensíveis à ação do soro humano, e um isolado ao soro caprino. Dentre os 124 isolados de bezerros diarréicos, 96 (77,4%) resistiram a 60°C por 30 minutos e 69 (55,6%) resistiram a essa temperatura por 60 minutos. Dentre os 92 isolados de bezerros não diarréicos, 63 (68,5%) resistiram a 60°C por 30 minutos e 50 (54,3%) resistiram à mesma temperatura por 60 minutos.

Tabela 3. Perfil de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (IHA) de 16 isolados pertencentes ao grupo *B. fragilis* de bezerros com e sem diarreia em eritrócitos de carneiro, bezerro e humano.

Espécies	Isolados	Título de HA/ IHA					
		Carneiro		Bezerro		Humano	
		HA	IHA	HA	IHA	HA	IHA
<b>Bezerros diarréicos (n = 13)</b>							
<i>B. fragilis</i>	Bd6d	---	---	---	---	8	2 (M)*
<i>B. distasonis</i>	Bd19c	---	---	---	---	2	2 (M)*
<i>B. distasonis</i>	Bd22b	---	---	---	---	4	2 (M)*
<i>B. vulgatus</i>	Bd15a	---	---	4	2 (M)*	---	---
<i>B. vulgatus</i>	Bd13b	---	---	---	---	8	2 (M)*
<i>B. vulgatus</i>	Bd17f	8	2 (G)*	8	2 (M)*	---	---
<i>B. vulgatus</i>	Bd21b	4	2 (G)*	32	2 (M, G)*	---	---
<i>B. vulgatus</i>	Bd24a	---	---	---	---	2	2 (M)*
<i>B. vulgatus</i>	Bd24d	---	---	2	2 (G)*	---	---
<i>B. vulgatus</i>	Bd28l	---	---	---	---	2	2 (M)*
<i>B. vulgatus</i>	Bd29a	---	---	2	2 (A, G, M, X)*	---	---
<i>B. vulgatus</i>	Bd33a	---	---	---	---	2	2 (M)*
<i>B. ovatus</i>	Bd17c	---	---	---	---	4	2 (M)*
<b>Bezerros não diarréicos (n=3)</b>							
<i>B. fragilis</i>	Bc5b	---	---	---	---	8	2 (M)*
<i>B. vulgatus</i>	Bc5l	---	---	---	---	2	2 (M)*
<i>B. vulgatus</i>	Bc12a	---	---	---	---	2	2 (M)*

\*(A) arabinose, (G) galactose, (M) maltose, (X) xilose.

Os isolados Bd9a e Bd10a de dois bezerros diarréicos foram identificados como *B. fragilis* enterotoxigênicos (ETBF) pela ação biológica da toxina produzida em cultura de células HT-29/C1, verificando-se o arredondamento celular característico. O gene *bft* (Figura 1) que codifica a produção da toxina foi detectado nas cepas Bd9a e Bd10a assim como em outras quatro amostras fecais diarréicas.

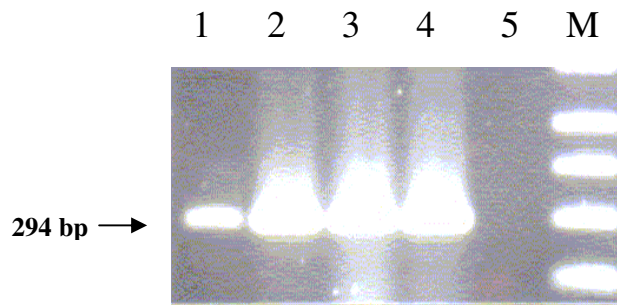


Figura 1. Detecção do gene *bft* do DNA bacteriano de amostra fecal e de bactérias isoladas. Coluna 1, amostra fecal (bezerro Bd29); colunas 2 e 3, *B. fragilis* Bd9a e Bd10a, respectivamente; coluna 4, *B. fragilis* ATCC 43858; coluna 5, *B. uniformis* (controle negativo); coluna M, 1 kb DNA ladder.

Os valores da CIM e porcentagens de resistência aos antibióticos são observados na Tabela 4 (Anexo 1). Imipenem e metronidazol foram eficazes contra todas as 216 bactérias. Observa-se ainda que os isolados de animais diarreicos apresentaram valores de resistência baixos à cefoxitina (6,5%) e à tetraciclina (5,7%) e, para os isolados de bezerros não diarreicos foi observada resistência baixa à clindamicina (3,3%). Os valores da CIM dos isolados testados para as drogas analisadas variaram de  $\leq 0,25$  a  $\geq 512$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

Das 216 bactérias analisadas, 190 (88,0%) foram resistentes à pelo menos um dos beta-lactâmicos testados (amoxicilina, ampicilina, cefoxitina e penicilina G). Destes, 127 produziam  $\beta$ -lactamase, sendo 73 (57,5%) provenientes de bezerros diarreicos e 54 (42,5%) de bezerros não diarreicos (Tabela 5).

De forma similar aos antibióticos, os 216 isolados mostraram valores da CIM para os metais pesados testados variando de  $\leq 0,25$  a  $\geq 512$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , assim como valores elevados de resistência para todos os metais analisados. A menor resistência ocorreu para o bicloreto de mercúrio nos isolados diarreicos e não diarreicos (26,8% e 34%, respectivamente). Os valores da CIM e porcentagem de resistência aos metais pesados estão apresentados na Tabela 6 (Anexo1).

Tabela 4. Susceptibilidade a 12 antibióticos de 216 bactérias do grupo *B. fragilis* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

Antibióticos	Faixa	CIM (µg/ml)		Resistência (%)	Faixas	CIM (µg/ml)		Resistência (%)
		50%	90%			50%	90%	
		<b>Isolados diarréicos (n = 124)</b>			<b>Isolados não diarréicos (n = 92)</b>			
Aztreonam	≤0,25 - ≥512	32	≥512	57,7	≤0,25 - ≥512	16	512	41,7
Amoxicilina	≤0,25 - ≥512	8	512	45,5	≤0,25 - ≥512	8	64	51,6
Ampicilina	≤0,25 - ≥512	8	128	67,5	≤0,25 - ≥512	32	512	60,4
Cefoxitina	≤0,25 - ≥512	8	≥512	6,5	≤0,25 - ≥512	8	64	25,3
Claritromicina	≤0,25 - ≥512	256	≥512	81,3	≤0,25 - ≥512	512	≥512	81,3
Clindamicina	≤0,25 - 64	≤0,25	32	25,2	≤0,25 - ≥512	≤0,25	1	3,3
Eritromicina	≤0,25 - ≥512	128	≥512	65,8	≤0,25 - ≥512	128	≥512	72,5
Imipenem	≤0,25 - 1	≤0,25	≤0,25	0	≤0,25 - ≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Metronidazol	≤0,25 - 16	≤0,25	16	0	≤0,25 - 16	4	16	0
Norfloxacina	≤0,25 - ≥512	128	≥512	62,6	≤0,25 - ≥512	64	512	65,9
Penicilina G	≤0,25 - ≥512	4	16	61,0	≤0,25 - ≥512	4	32	68,1
Tetraciclina	≤0,25 - 64	≤0,25	8	5,7	≤0,25 - 64	8	32	27,5

Pontos críticos dos antibióticos:

CLSI (2007): Amoxicilina, 8 µg / ml; Ampicilina, 1 µg / ml; Cefoxitina, 32 µg / ml; Clindamicina, 4 µg / ml; Imipenem, 8 µg / ml; Metronidazol, 16 µg / ml; Penicilina G, 1 µg / ml; Tetraciclina, 8 µg / ml.

NCCLS (1997): Aztreonam, 16 µg / ml; Claritromicina, 8 µg / ml; Eritromicina, 8 µg / ml; Norfloxacina, 16 µg / ml.

Tabela 5. Avaliação da produção de  $\beta$ -lactamase de 127 bactérias do grupo *B. fragilis* de bezerros com diarreia (73) e sem diarreia (54).

Isolados	Produção de $\beta$ -Lactamase %
<b>Bezerros diarréicos (n = 73)</b>	
<i>B. vulgatus</i> (n = 34)	46,6
<i>B. fragilis</i> (n = 17)	23,3
<i>B. distasonis</i> (n = 13)	17,8
<i>B. thetaiotaomicron</i> (n = 4)	5,5
<i>B. eggerthii</i> (n = 2)	2,7
<i>B. caccae</i> (n = 1)	1,4
<i>B. ovatus</i> (n = 1)	1,4
<i>B. uniformis</i> (n = 1)	1,4
<b>Bezerros não diarréicos (n = 54)</b>	
<i>B. vulgatus</i> (n = 21)	38,9
<i>B. fragilis</i> (n = 24)	44,4
<i>B. distasonis</i> (n = 4)	7,4
<i>B. eggerthii</i> (n = 5)	9,3

A presença de plasmídios foi verificada em 16 (7,4%) isolados, sendo oito de bezerros diarréicos e oito de não diarréicos. Esses isolados possuíam de 1 a 4 plasmídios, com pesos moleculares variando de 5,0 a 11,0 kb (Figura 2; Tabela 7).

Os isolados que abrigavam plasmídios foram submetidos ao tratamento com brometo de etídio (EtBr) e perderam pelo menos um elemento. Após o tratamento com EtBr, os plasmídios de 5 e 6 kb de dois isolados de fezes diarréicas foram perdidos, verificando-se a diminuição da resistência para cefoxitina (Bd6a), amoxicilina e ampicilina (Bd7a). Os isolados Bc5j de fezes sem diarreia e Bd26e de fezes diarréicas apresentavam um único plasmídio de 5,5 kb e, após seu tratamento com EtBr perderam esse elemento, sendo verificada a diminuição de sua resistência para cefoxitina (Tabela 7; Anexo 2). Por outro lado, somente o isolado Bd6a de um bezerro diarréico que perdeu os plasmídios de 5 e 6 kb mostrou a diminuição da resistência para sulfato de zinco (de 32 para  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$ ).

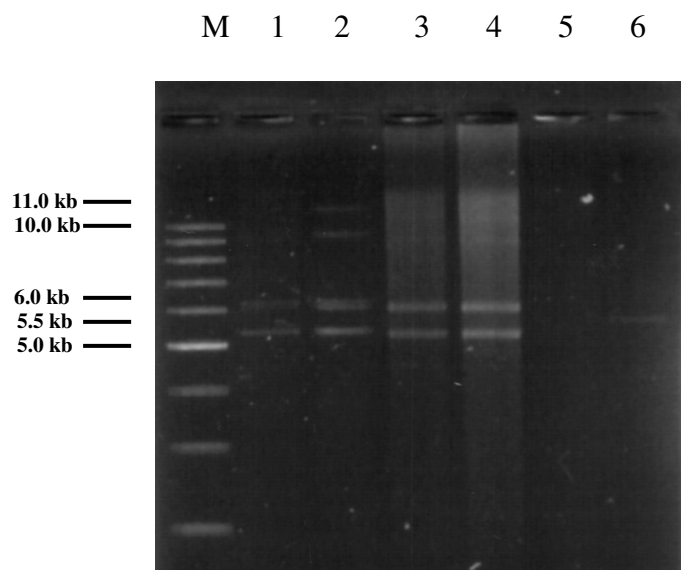


Figura 2. Perfil plasmidial de *B. fragilis* de bezerros diarréicos e não diarréicos. Coluna M, marcador de peso molecular Supercoiled; coluna 1, *B. fragilis* Bd6a; coluna 2, *B. fragilis* Bd6d; coluna 3, *B. fragilis* Bc20b; coluna 4, *B. fragilis* Bc20d; coluna 5, controle negativo; coluna 6, *B. fragilis* Bc5j.

Pelo método de PCR foi avaliada a presença dos genes *cepA* e *cfiA* que codificam a produção da  $\beta$ -lactamase. Das 216 bactérias testadas neste estudo, 190 mostraram resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, sendo que desses últimos, a produção de  $\beta$ -lactamase foi detectada em 127 isolados.

Dos 127 isolados produtores de  $\beta$ -lactamase, em 25 (19,7%) isolados de bezerros diarréicos e em 33 (26,0%) de bezerros não diarréicos foi detectado o gene *cepA* (Figura 3a). Adicionalmente, a presença do gene *cepA* foi verificada nos plasmídios de 5,5 kb (Figura 3b).

Por outro lado, o gene *cfiA* foi observado nos DNA cromossômicos de 21 (16,5%) isolados de bezerros diarréicos e 16 (12,6%) isolados de bezerros não diarréicos (Figura 3c). Esse gene *cfiA* não foi detectado em plasmídios.

A presença do gene *nanH* (Figura 4) foi observada em 19 (15,3%) isolados dentre os 124 de bezerros diarréicos e em 28 (30,4%) dentre os 92 de bezerros não diarréicos.

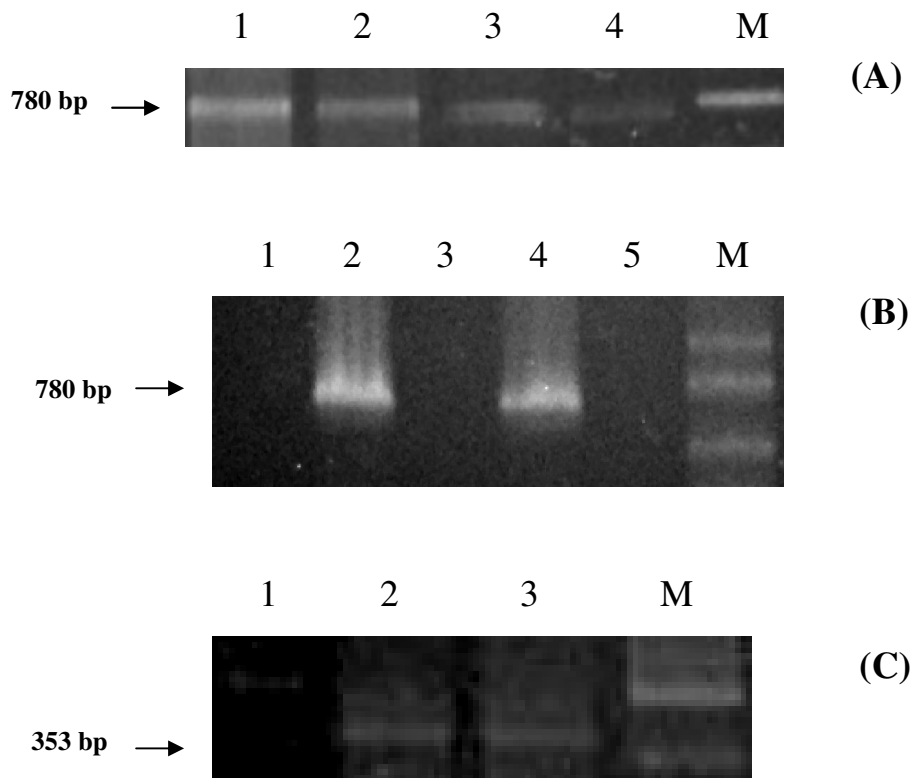


Figura 3. (A) Detecção do gene *cepA* no DNA cromossômico dos isolados do grupo *B. fragilis* de bezerros diarréicos e não diarréicos. Coluna 1, *B. vulgatus* Bc1c; coluna 2, *B. fragilis* Bd6d; coluna 3, *B. vulgatus* Bc11b; coluna 4, *B. vulgatus* Bc6a; coluna M, 1 kb plus DNA ladder.

(B) Detecção do gene *cepA* em plasmídios de 5,5 kb dos isolados do grupo *B. fragilis* de um bezerros diarréico e um não diarréico. Coluna 1, *B. fragilis* Bc5j (DNA cromossômico); coluna 2, *B. fragilis* Bc5j (plasmídio de 5,5 kb); coluna 3, *B. vulgatus* Bd26e (DNA cromossômico); coluna 4, *B. vulgatus* Bd26e (plasmídio de 5,5 kb); coluna 5, controle negativo; coluna M, 1 kb plus DNA ladder.

(C) Detecção do gene *cfiA* no DNA cromossômico dos isolados do grupo *B. fragilis* de bezerros diarréicos e não diarréicos. Coluna 1, controle negativo; coluna 2, *B. eggerthii* Bc11f; coluna 3, *B. vulgatus* Bd3d; coluna M, 1 kb plus DNA ladder.

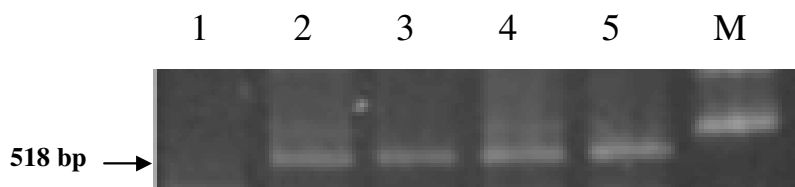


Figura 4. Detecção do gene *nanH* nos *B. fragilis* isolados de bezerros diarréicos e não diarréicos. Coluna 1, controle negativo; coluna 2, *B. fragilis* Bc14a; coluna 3, *B. fragilis* Bd2c; coluna 4, *B. fragilis* Bc16a; coluna 5, *B. fragilis* Bc16c; coluna M, 1 kb plus DNA ladder.

Tabela 6. Susceptibilidade a oito metais pesados de 216 bactérias do grupo *B. fragilis* isoladas de bezerros com e sem diarreia.

Metais Pesados	Faixa	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		Resistência (%)	Faixas	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		Resistência (%)
		50%	90%			50%	90%	
		<b>Isolados diarréicos (n = 124)</b>			<b>Isolados não diarréicos (n = 92)</b>			
Bicloreto de mercúrio	$\leq 0,25 - 32$	0,5	4	26,8	$\leq 0,25 - 64$	2	4	34
Cloreto de chumbo	$\leq 0,25 - \geq 512$	256	$\geq 512$	76,4	$\leq 0,25 - \geq 512$	512	$\geq 512$	81,3
Nitrato de prata	$\leq 0,25 - 32$	2	8	47,9	$\leq 0,25 - 64$	8	16	83,5
Sulfato de cádmio	$\leq 0,25 - \geq 512$	8	128	62,6	$\leq 0,25 - \geq 512$	8	32	61,5
Sulfato de cobre	$\leq 0,25 - 256$	16	128	63,4	$\leq 0,25 - 512$	64	256	84,6
Sulfato de ferro	$\leq 0,25 - \geq 512$	$\geq 512$	$\geq 512$	78	$\leq 0,25 - \geq 512$	$\geq 512$	$\geq 512$	84,6
Sulfato de níquel	$\leq 0,25 - \geq 512$	32	$\geq 512$	67,5	$\leq 0,25 - \geq 512$	128	$\geq 512$	93,4
Sulfato de zinco	$\leq 0,25 - \geq 512$	128	$\geq 512$	67,5	$\leq 0,25 - \geq 512$	128	$\geq 512$	75,8

Pontos críticos para todos os metais: 2  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (AVILA-CAMPOS et al., 1991).



Tabela 7. Perfil plasmidial e sua relação com a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos analisados de 16 isolados de bezerros diarréicos e não diarréicos.

Isolados	Amoxicilina (8*)		Ampicilina (1*)		Cefoxitina (32*)		Penicilina G (1*)		Plasmídios	
	I	C	I	C	I	C	I	C	Nº bandas	kb
<b>Bezerros diarréicos (n = 8)</b>										
<i>B. thetaiotaomicron</i> Bd2c	32	16	8	8	16	2	32	8	2	5; 6
<i>B. fragilis</i> Bd6a	32	8	16	16	4	2	16	8	4	5; 6; 10; 11
<i>B. fragilis</i> Bd6d	1	0,5	≤0,25	≤0,25	≥512	≤0,25	8	8	2	5; 6
<i>B. fragilis</i> Bd7a	≥512	0,5	≥512	≤0,25	≥512	≤0,25	16	≤0,25	2	5; 6
<i>B. vulgatus</i> Bd18b	64	2	32	1	32	1	4	2	2	5; 6
<i>B. vulgatus</i> Bd26c	128	32	0,5	0,5	2	1	8	8	2	5; 6
<i>B. vulgatus</i> Bd26e	128	32	64	32	256	4	128	64	1	5,5
<i>B. vulgatus</i> Bd31f	1	1	32	16	2	1	8	8	2	5; 6
<b>Bezerros não diarréicos (n = 8)</b>										
<i>B. fragilis</i> Bc5j	64	8	64	8	≥512	2	256	8	1	5,5
<i>B. fragilis</i> Bc10b	64	32	8	2	8	4	≤0,25	≤0,25	2	10; 11
<i>B. fragilis</i> Bc20b	64	4	16	2	8	1	16	8	2	5; 6
<i>B. fragilis</i> Bc20d	64	4	32	2	8	≤0,25	16	≤0,25	4	5; 6; 10; 11
<i>B. vulgatus</i> Bc6a	≥512	128	32	32	32	16	1	1	2	5; 6
<i>B. vulgatus</i> Bc6b	≥512	256	32	32	128	64	1	0,5	2	5; 6
<i>B. vulgatus</i> Bc7f	4	2	≤0,25	≤0,25	64	32	≤0,25	≤0,25	2	5; 6
<i>B. vulgatus</i> Bc11b	256	128	≤0,25	≤0,25	64	64	≤0,25	≤0,25	2	5; 6

I - CIM inicial das cepas com plasmídios;

C - CIM das cepas curadas;

\*Pontos críticos dos antibióticos:

CLSI (2007): Amoxicilina, 8  $\mu\text{g}$  / ml; Ampicilina, 1  $\mu\text{g}$  / ml; Cefoxitina, 32  $\mu\text{g}$  / ml; Clindamicina, 4  $\mu\text{g}$  / ml; Imipenem, 8  $\mu\text{g}$  / ml; Metronidazol, 16  $\mu\text{g}$  / ml; Penicilina G, 1  $\mu\text{g}$  / ml; Tetraciclina, 8  $\mu\text{g}$  / ml.

NCCLS (1997): Aztreonam, 16  $\mu\text{g}$  / ml; Claritromicina, 8  $\mu\text{g}$  / ml; Eritromicina, 8  $\mu\text{g}$  / ml; Norfloxacin, 16  $\mu\text{g}$  / ml.

Devido à importância da espécie *B. fragilis* em diversos processos infecciosos em humanos e animais, em nosso estudo, optamos por analisar a diversidade genética deste microrganismo pela utilização do AP-PCR, avaliando um total de 69 isolados de *B. fragilis*, sendo 28 de bezerros diarreicos e 41 de bezerros não diarreicos. Dentre os 28 isolados de bezerros diarreicos, dois eram enterotoxigênicos (ETBF). Cinco iniciadores arbitrários foram testados, mas somente um, OPA1 (5'-CAG GCC CTT C-3') produziu amplicons nítidos (Figuras 5 e 6).

Os 28 isolados de bezerros diarreicos foram divididos em 13 grupos (Figura 7) em distância genética de 50%. O grupo I foi subdividido em Ia e Ib. O subgrupo Ia abrigou os isolados Bd3c, Bd6a e Bd6b que apresentaram 100% de similaridade. Estes três isolados mostraram similaridade genética de aproximadamente 67% em relação ao subgrupo Ib, representado pela cepa Bd19d.

O grupo V subdividiu-se em Va e Vb. O subgrupo Vb, por sua vez, subdividiu-se em Vb1 e Vb2. O subgrupo Vb2 originou ainda os subgrupos Vb2i e Vb2ii. A similaridade genética entre esses grupos variou de aproximadamente 67% a 100%. As duas cepas enterotoxigênicas (ETBF) pertenciam ao grupo X, que originou o subgrupo Xa (cepa Bd9a) e Xb (cepa Bd10a) com 80% de similaridade genética entre si. Cada um dos grupos II, III, IV, VI, VII, VIII, IX e XI abrigava uma única cepa. Os grupos XII e XIII foram formados por nove cepas que não amplificaram nenhuma banda.

Os 41 *B. fragilis* de bezerros não diarreicos foram divididos em 16 grupos com 50% de similaridade (Figura 8). Os grupos I, II, III, VIII, X, XI, XIII e XV abrigavam cepas individuais. Os grupos IV, V, VI, VII, IX, XII e XIV subdividiram-se em outros grupos com similaridades variando de 50% a 100%. Entretanto, o grupo XVI agrupou 11 cepas que não amplificaram nenhuma banda.



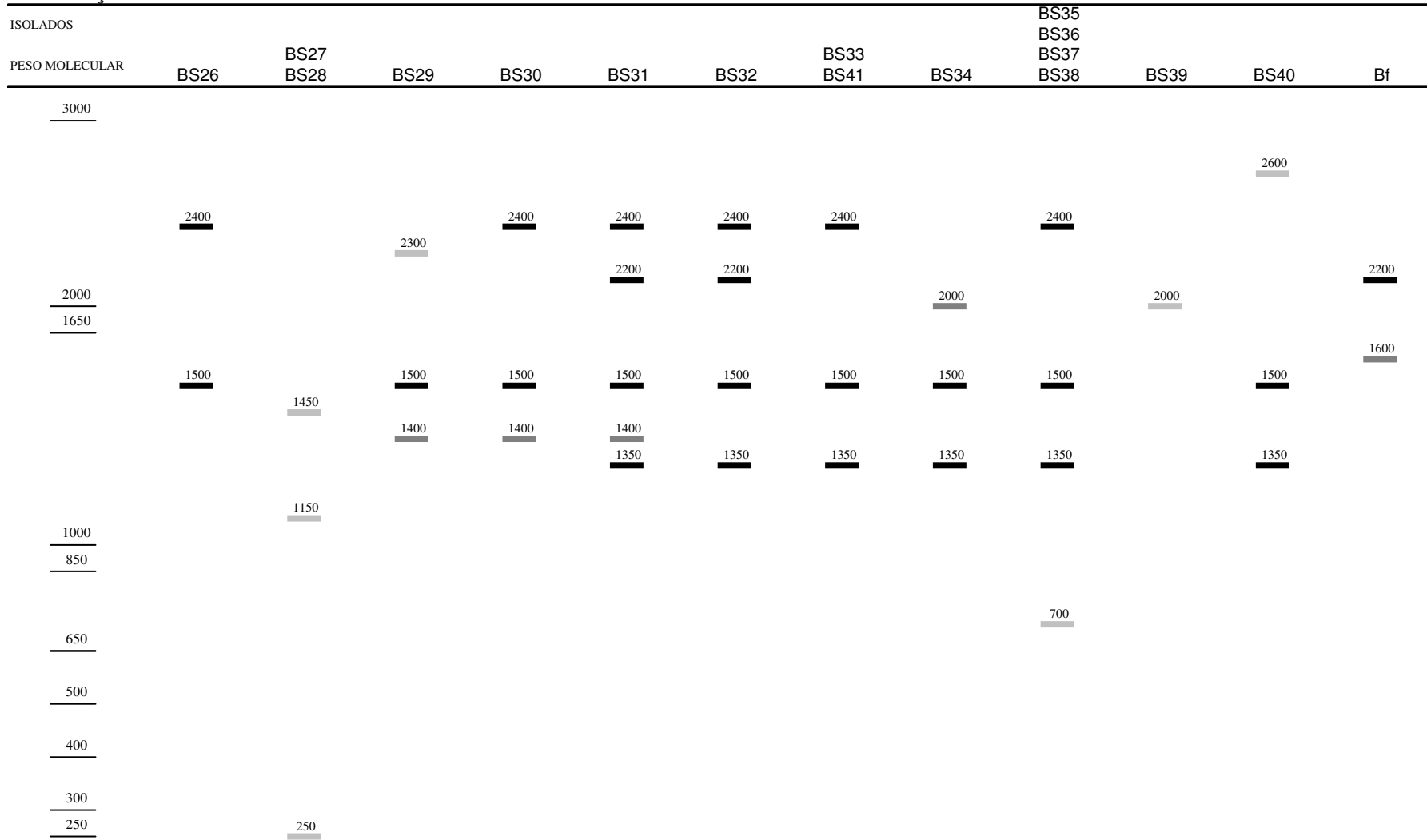
ISOLADOS

PESO MOLECULAR

	BS1	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8	BS9	BS10	BS11	BS12	BS13	BS14	BS16	Bf
<u>3000</u>	<u>3000</u>	<u>3000</u>	<u>3000</u>												
						<u>2500</u>			<u>2500</u>		<u>2500</u>				
	<u>2300</u>	<u>2300</u>	<u>2300</u>	<u>2300</u>	<u>2300</u>	<u>2300</u>			<u>2300</u>	<u>2300</u>	<u>2300</u>				
						<u>2200</u>	<u>2200</u>		<u>2200</u>	<u>2200</u>	<u>2200</u>			<u>2200</u>	<u>2200</u>
													<u>2100</u>		
<u>2000</u>															
<u>1650</u>	<u>1650</u>	<u>1650</u>	<u>1650</u>	<u>1650</u>	<u>1650</u>		<u>1650</u>		<u>1650</u>						
						<u>1600</u>	<u>1600</u>	<u>1600</u>	<u>1600</u>	<u>1600</u>	<u>1600</u>	<u>1600</u>		<u>1600</u>	<u>1600</u>
	<u>1550</u>													<u>1550</u>	
		<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>	<u>1500</u>			
		<u>1450</u>	<u>1450</u>												
										<u>1400</u>	<u>1400</u>		<u>1400</u>		
	<u>1150</u>		<u>1150</u>		<u>1150</u>										
<u>1000</u>	<u>1000</u>					<u>1000</u>					<u>1000</u>				
<u>850</u>		<u>850</u>				<u>850</u>									
	<u>800</u>			<u>800</u>	<u>800</u>										
								<u>700</u>	<u>700</u>	<u>700</u>	<u>700</u>			<u>700</u>	
<u>650</u>		<u>650</u>													
											<u>550</u>				
<u>500</u>															
	<u>450</u>		<u>450</u>												
<u>400</u>														<u>400</u>	
														<u>350</u>	
<u>300</u>		<u>300</u>	<u>300</u>												
<u>250</u>															

Continua...

Continuação



LEGENDA (BANDAS) **█** Forte **▬** Média **▬** Fraca

Figura 6. Perfil de Amplificação dos DNA de *B. fragilis* isolados de bezerros sadios por AP-PCR.

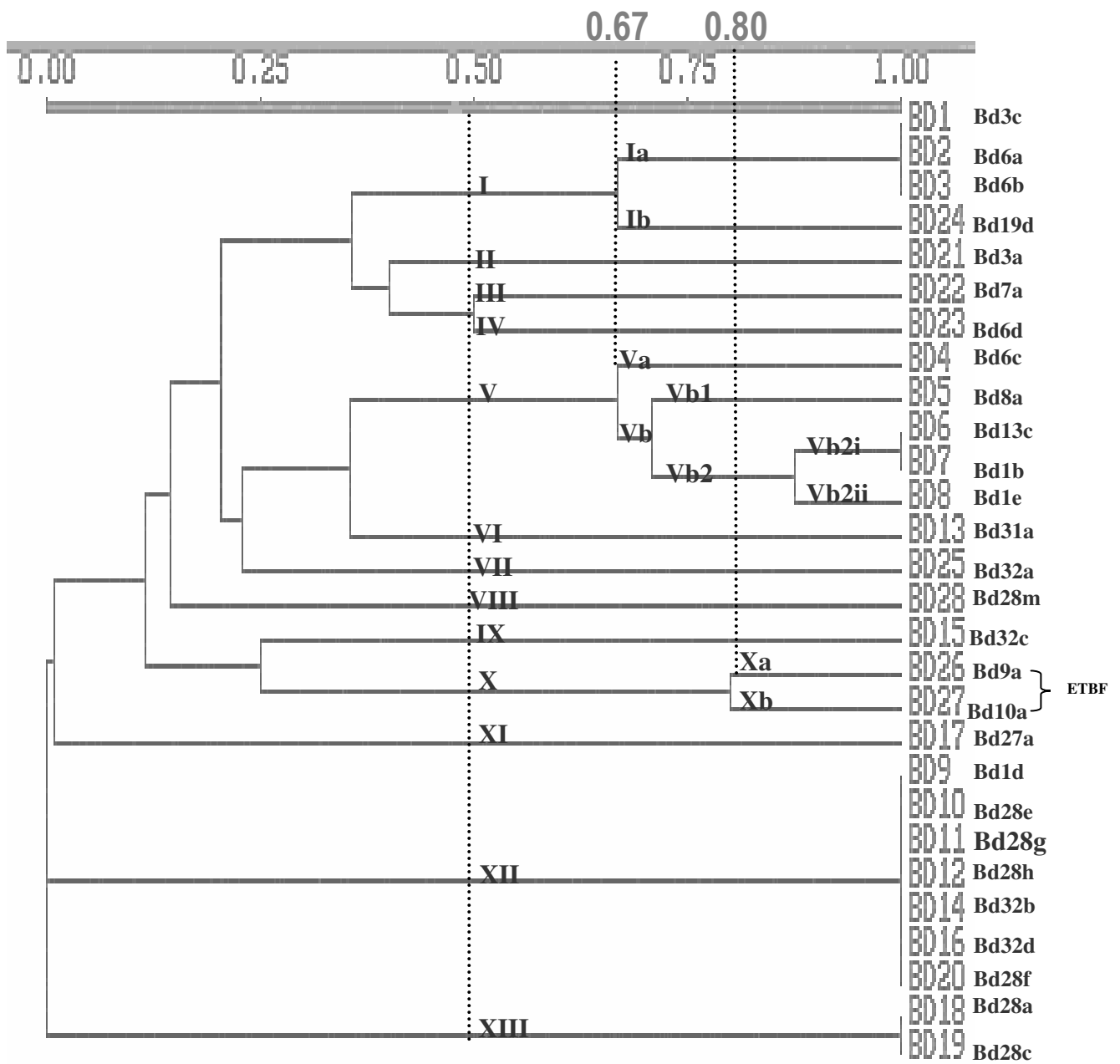


Figura 7. Análise genotípica por AP-PCR de 28 isolados de *B. fragilis* de bezerros diarréicos (Programa NTSYS; Coeficiente de Jaccard).

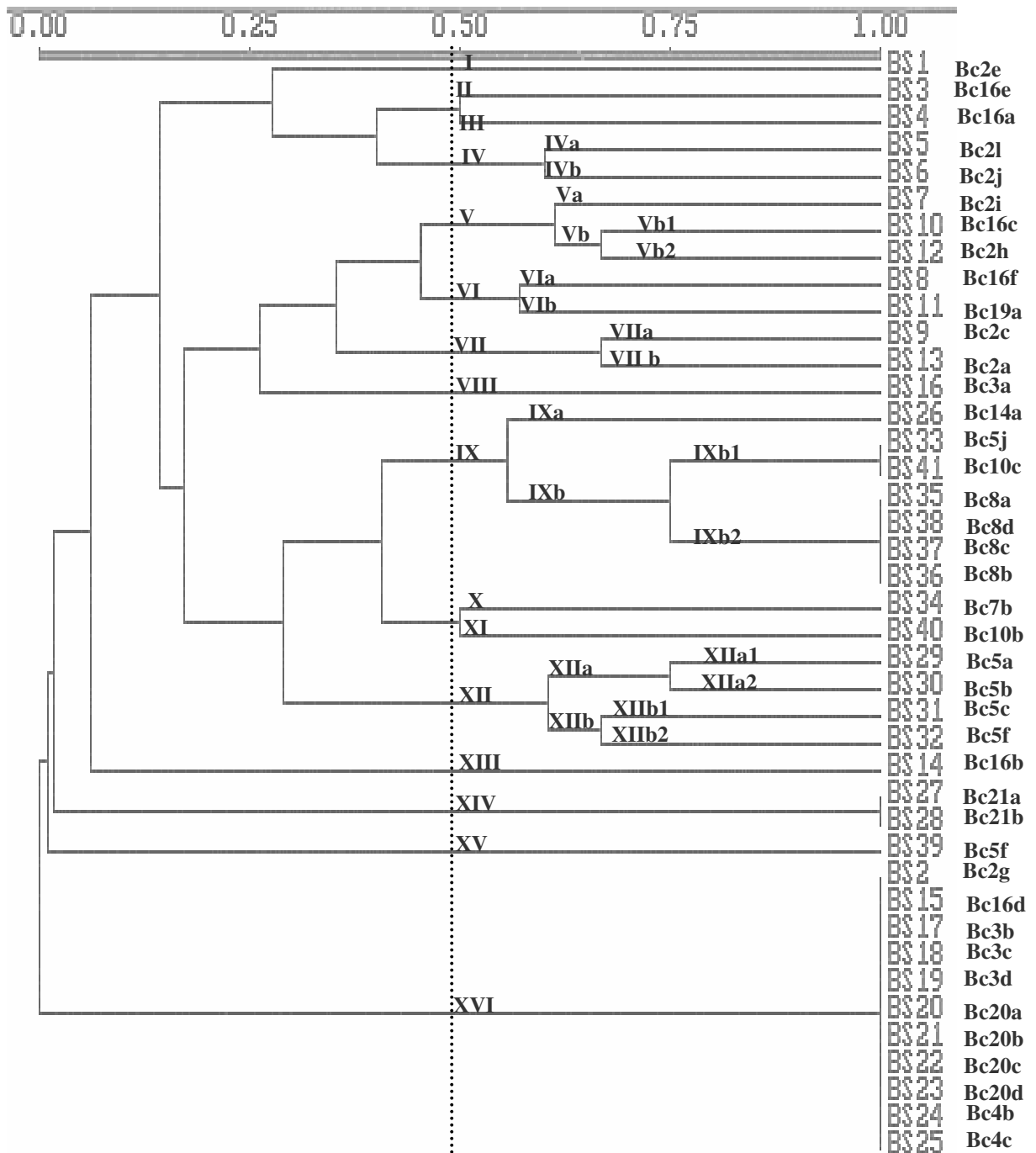


Figura 8. Análise genotípica por AP-PCR de 41 isolados da espécie *B. fragilis* de bezerros não diarreicos (Programa NTSYS; Coeficiente de Jaccard).

## 7 DISCUSSÃO

A participação de bactérias anaeróbias em diferentes processos infecciosos intra e extra-intestinais vem ganhando importância por seu frequente isolamento e por formarem parte da microbiota intestinal residente de humanos e animais (ONDERDONK et al., 1979). Uma vez dada a oportunidade para a diminuição da resistência do organismo hospedeiro, essa microbiota pode desencadear as mais diversas enfermidades infecciosas (HENTGES, 1993).

No Brasil, estudos relacionados à participação de bactérias anaeróbias em processos infecciosos em humanos e animais são pouco frequentes. Da mesma forma, a presença destas bactérias, particularmente as do grupo *B. fragilis* em animais de fazenda como bezerros, não tem sido avaliada.

A síndrome diarréica em bezerros é caracterizada por uma etiologia multifatorial, resultante da interação entre agentes infecciosos e não-infecciosos, relacionados à alimentação, às condições de higiene dos criatórios, densidade populacional e manejo. Historicamente, a diarréia tem sido apontada como uma das maiores causas de perdas econômicas em bovinos leiteiros e de corte. Apesar de todos os estudos referentes à diarréia em bezerros, o tratamento e controle desse processo são difíceis e frustrantes e, por isso, tem representado um desafio constante para técnicos e criadores. (BENDALI et al., 1999).

Em nosso estudo, bactérias do grupo *B. fragilis* foram observadas em ambos os grupos de bezerros analisados. Em bezerros diarréicos, a presença desses microrganismos foi de 68,5%, diferentemente de bezerros não diarréicos, com 38,9% dessas bactérias. Certamente essa diferença numérica indica a alteração da microbiota intestinal. Por outro lado, é sabido que os processos diarréicos em animais de fazenda podem ocorrer devido a fatores nutricionais, imunológicos, de estresse e ainda por bactérias, vírus, protozoários e vermes, o que se torna uma preocupação constante na clínica Médica Veterinária (de LA FUENTE et al., 1999; SOUZA; SCARCELLI, 2000).

É importante notar que o comportamento bioquímico e fisiológico das bactérias de origem animal analisadas neste estudo foi semelhante ao das bactérias deste grupo microbiano de origem humana, o que foi constatado em comparação a outros trabalhos em desenvolvimento no nosso laboratório (NAKANO, 2005).



Como observado na Tabela 2, as espécies *B. fragilis* e *B. vulgatus* foram as mais prevalentes em bezerros com e sem diarreia. A presença em ordem decrescente dessas bactérias foi *B. vulgatus* (100 isolados), *B. fragilis* (69 isolados) e *B. distasonis* (28 isolados). Devido à escassez de estudos que mostrem a prevalência das espécies do grupo *B. fragilis* no ecossistema intestinal de animais, tivemos como parâmetro comparativo o isolamento em humanos para os quais a literatura relata a seguinte ordem de isolamento: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus* e *B. distasonis*. Com estes dados pode-se sugerir a necessidade de estudos adicionais, visando à obtenção de uma melhor relação em termos numéricos da presença dessas espécies em cada microbiota analisada (NAKANO, 2005).

As bactérias do grupo *B. fragilis* se caracterizam pela produção de inúmeros fatores de virulência, assim como pela sua resistência a antibióticos e metais pesados, entretanto, a sua patogenicidade não está totalmente elucidada. Dentre esses fatores pode-se destacar a produção de hemolisinas que destroem células sanguíneas do hospedeiro, alterando dessa forma seu sistema imune (MENESTRINA et al., 2003). A produção de hemolisinas é mediada por genes cromossômicos e, segundo Robertson et al. (2006) existiriam no grupo *B. fragilis* aproximadamente dez genes diferentes envolvidos na sua produção.

Em nosso estudo observamos que 36,3% e 83,7% dos isolados de fezes diarreicas e não diarreicas, respectivamente, produziram  $\beta$ -hemólise. Esses resultados mostram uma possível alteração na produção da hemolisina em relação a isolados de origem humana, nos quais todas as bactérias do grupo *B. fragilis* produziam esta enzima, como descrito por Nakano e Avila-Campos (2004) e Oyston e Handley (1991).

O processo de hemaglutinação em bactérias anaeróbias, particularmente para espécies do grupo *B. fragilis*, é heterogêneo. Em nossos estudos, das 216 bactérias isoladas somente 16 (7,41%) tiveram capacidade de aglutinar hemácias de humano, bezerro e/ou carneiro (Tabela 3).

Dados sobre o processo de hemaglutinação em *B. fragilis* de origem animal são escassos na literatura. É interessante ressaltar que os nossos isolados aglutinaram em maior número hemácias humanas e em menor número hemácias de bezerros e carneiros. Entretanto, dois isolados de *B. vulgatus* (Bd17f e Bd21b) aglutinaram hemácias de bezerro e de carneiro.

Isso pode sugerir a presença de receptores específicos na superfície das hemácias dessas espécies animais comuns para estes *B. vulgatus* (OYSTON; HANDLEY, 1991).

Por outro lado, observou-se que o processo hemaglutinante da maioria dos isolados foi inibido após o tratamento dos eritrócitos de humanos e bezerros com maltose. Ainda, é interessante notar que a apenas a galactose inibiu a hemaglutinação de duas cepas para os eritrócitos de carneiro, e em menor grau, para os eritrócitos de bezerros, mas não para os eritrócitos humanos. Esses dados reforçam a hipótese de que receptores específicos comuns estejam presentes no sangue dos animais (bezerro e carneiro), diferentemente do sangue humano. Dessa forma, nossos resultados indicam a necessidade de maiores estudos para a avaliação da capacidade hemaglutinante do grupo *B. fragilis*, utilizando-se diferentes tipos sanguíneos do homem e dos animais.

Todas as bactérias analisadas neste estudo foram resistentes ao soro bovino e a maioria delas resistiu também ao soro humano e de carneiro. A resistência ao soro representa também alguma associação com a cápsula e/ou com a camada lipopolissacarídica, participando em conjunto da virulência desse grupo microbiano. É sabido que a atividade do soro constitui um importante fator de resistência do hospedeiro contra a invasão sistêmica pelos microrganismos (ROTIMI; EKE, 1984). Da mesma forma, a maioria dos isolados mostraram resistência à 60°C por 30 minutos e em alguns casos, por mais de 60 minutos, o que sem dúvida também colabora com o potencial patogênico dessas bactérias (SHARP, 1999).

Em nosso estudo, somente dois *B. fragilis* apresentaram capacidade de alterar a morfologia das células HT-29/C1 evidenciando a produção da enterotoxina, concordando com Weikel et al. (1992). Essas cepas ETBF também foram confirmadas por abrigarem o gene *bft* que media a produção dessa toxina. A presença desse gene foi ainda observada em quatro materiais fecais coletados de diferentes animais diarréicos, mas não se conseguiu o isolamento desses microrganismos. Este resultado sugere que, provavelmente, o ETBF esteve presente e seu DNA foi detectado pela reação de PCR.

A baixa prevalência de cepas ETBF (0,9%) em relação ao total de bactérias isoladas sugere que esses microrganismos não foram responsáveis pela diarreia nos bezerros analisados, e também que outros enteropatógenos bacterianos, virais ou parasitários, assim como fatores nutricionais poderiam ter sido a causa desses processos diarréicos. Devido à sua

importância clínica, apenas a presença das espécies do grupo *B. fragilis* foi determinada neste estudo.

Bactérias do grupo *B. fragilis* destacam-se por apresentarem o maior espectro de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica Humana e Veterinária (JOUSIMIES-SOMER et al., 2003). Os antibióticos utilizados na Medicina Humana pertencem às mesmas classes dos utilizados na Veterinária, com atuação semelhante. Sendo assim, o uso de antibióticos nas terapias humana e animal ou como promotores de crescimento para animais de produção pode favorecer a seleção de bactérias resistentes que podem contaminar as águas e o meio ambiente, além de poderem ser transmitidas a outros animais ou ao ser humano (AARESTRUP, 2000; PHILLIPS et al., 2004).

No gado bovino, o tratamento de processos infecciosos inclui  $\beta$ -lactâmicos (penicilina, ampicilina e cefalosporinas), tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina) e estreptomicina, entre outros (HIRSH et al., 1985).

Em *B. fragilis*, a produção da enzima  $\beta$ -lactamase constitui seu mais comum mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (ROGERS; PARKER; SMITH, 1993). Em estudo realizado com animais domésticos como bovinos, ovinos, caprinos, entre outros a enzima  $\beta$ -lactamase foi encontrada especialmente na espécie *B. fragilis* conferindo resistência à penicilina, ampicilina e cefalotina. Por outro lado, todos os isolados foram sensíveis à clindamicina e ao metronidazol (HIRSH et al., 1985).

Em nosso estudo foi observada elevada resistência dessas bactérias frente aos 12 antibióticos testados. A maioria dos isolados produziu a enzima  $\beta$ -lactamase, inativando a ampicilina, amoxicilina e cefoxitina e penicilina G. Todos os isolados apresentaram sensibilidade ao metronidazol e imipenem, drogas comumente utilizadas no combate de infecções humanas produzidas por anaeróbios, concordando com Paula et al. (2004).

É importante notar que nos isolados de fezes diarréicas, a menor resistência (5,7%) foi observada para a tetraciclina e nos isolados de fezes não diarréicas, a menor resistência (3,3%) foi observada para a clindamicina. Esses dados podem estar relacionados à baixa utilização da clindamicina no tratamento de infecções no gado bovino (JOUSIMIES-SOMER; PYORALA; KANERVO, 1996) e à proibição do uso de tetraciclina como promotores de

crescimento para esses animais no Brasil (Portaria Ministerial n. 193, de 12 de maio de 1998). Por outro lado, a ausência de genes responsáveis pela resistência a essas drogas seria outro fator importante na ocorrência da sensibilidade bacteriana (SHOEMAKER; BARBER; SALYERS, 1989).

A resistência ao metronidazol vem surgindo em algumas regiões do mundo devido, principalmente, ao fato de ser o antibiótico de primeira escolha no tratamento de infecções por *Bacteroides* (ALDRIGDE et al., 2001). Assim, verifica-se a necessidade da escolha de drogas alternativas para o tratamento de infecções produzidas por bactérias anaeróbias, especialmente por *B. fragilis* (SNYDMAN et al., 2002).

Existem ainda poucas informações quanto à susceptibilidade de *B. fragilis* aos metais pesados. Vários metais são considerados essenciais para o crescimento de organismos, desde que em baixas concentrações. No entanto, alguns como mercúrio, cádmio e chumbo mesmo em baixas concentrações se tornam tóxicos (TREVORS; STRATTON; GADD, 1986).

Não se pode descartar a possibilidade de que a contaminação de animais de criação por metais pesados possa resultar em uma cadeia trófica comprometida. Dessa forma, ao utilizar produtos e subprodutos de origem animal na sua alimentação, o homem e outros animais podem se contaminar com resíduos tóxicos desses metais (PASCOE; BLANCHET; LINDER, 1996).

Beveridge (1989) investigou a incorporação de metais pesados pela superfície celular bacteriana no solo e na água concluindo que essa interação é inevitável e que a incorporação dos íons metálicos ocorre pela interação com o LPS de cada organismo, sofrendo grandes variações entre gêneros e espécies.

Em nosso estudo, todos os isolados apresentaram níveis elevados de resistência aos metais pesados testados, principalmente, ao sulfato de níquel e cloreto de chumbo, concordando com Nakano e Avila-Campos (2004) que relataram resistência das bactérias do grupo *B. fragilis* de origem humana a esses compostos. Esses dados podem estar relacionados à contaminação ambiental, tais como pasto e solo, que por sua vez contaminam o gado bovino com resíduos desses metais.

Particularmente em bovinos, o contato com o chumbo é fator de alto risco à saúde, causando alterações orgânicas importantes, modificando seu desempenho produtivo, podendo ocasionar abortos e alterações do sistema reprodutivo desses animais (MARÇAL et al., 2001).

A elevada concentração de bactérias e de nutrientes faz do ambiente intestinal um sítio propício para a ocorrência da transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos entre as bactérias endógenas (SHOEMAKER et al., 2001). Nesse contexto, as espécies de *B. fragilis*, presentes em altas concentrações no trato intestinal de humanos e de animais podem representar uma significativa fonte de plasmídios (RASHTCHIAN; BOOTH, 1981).

Os plasmídios observados nas bactérias isoladas neste estudo (5, 5.5, 6, 10 e 11 kb) são diferentes daqueles observados em cepas de origem humana (1.8, 2.7, 2.8, 3.8, 4.4, 5, 6.4, 7.8 e 8.9 kb) (NAKANO et al., 2004). Sabe-se que as espécies do gênero *Bacteroides* apresentam plasmídios de baixo peso molecular, considerados como crípticos (RASHTCHIAN; BOOTH, 1981). A presença desses plasmídios também de baixo peso molecular encontrados em nossos isolados sugere a possível ocorrência de contaminação cruzada entre os animais e os criadores, ou ainda, que as espécies desse gênero abriguem naturalmente esses plasmídios (SHOEMAKER; WANG; SALYERS, 1992).

A produção de  $\beta$ -lactamases em *B. fragilis* é principalmente mediada pelos genes *cepA* e *cfiA*. Ambos os genes foram observados no DNA cromossômico (PESTANA et al. 1999). Entretanto, em nosso estudo, o gene *cepA* foi também observado nos plasmídios de 5,5 kb.

A presença desses elementos genéticos tem sido verificada em bactérias anaeróbias de interesse clínico Humano e Veterinário. Em nosso estudo, após o tratamento das bactérias que possuíam plasmídios com EtBr houve a perda desses elementos. Particularmente, a perda de plasmídios de 5,5 kb, ocasionou notável diminuição da resistência à cefoxitina (de 256 para 4  $\mu\text{g/ml}$  e de  $\geq 512$  para 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Os plasmídios de 5 e 6 kb também ocasionaram sensível redução da resistência bacteriana ao sulfato de zinco (de 32 para  $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ ), o que sugere a provável participação desses elementos na resistência a esse íon metálico, concordando com Wallace; Bradley e Rogolsky (1981).

Segundo Guzman; Plate e Pruzzo (1990), algumas espécies de *B. fragilis* são capazes de produzir a enzima neuraminidase, que promove um aumento da virulência bacteriana causando hidrólise do ácido N-acetil neuramínico de glicoproteínas, glicolipídios, oligossacarídeos e polissacarídeos, presentes na superfície das células eucarióticas, assim como em imunoglobulinas e componentes do complemento (RUSSO et al., 1990).

A produção da neuraminidase é mediada pelo gene *nanH*. A presença desse gene foi observada tanto em isolados de fezes diarréicas (15,3%) quanto de fezes não diarréicas (30,4%). Vale ressaltar que a maioria dos isolados que abrigavam o gene *nanH* pertenciam à espécie *B. fragilis*, concordando com os dados de Godoy et al. (1993). A detecção do gene *nanH* vem sendo utilizada pela maioria dos pesquisadores como ferramenta para a identificação de *B. fragilis*, uma vez que somente essa espécie apresentaria o gene (JOTWANI et al., 1995). Entretanto, em nosso estudo observamos a presença desse gene em outras espécies como em *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus*, concordando com Kuwahara et al. (1996).

A diversidade de microrganismos vem sendo analisada utilizando-se métodos moleculares como AP-PCR, REP-PCR e Eletroforese de Campo Pulsado, entre outros (MORAES et al., 1999; VALLIM et al., 2002). Em nosso estudo, a genotipagem da espécie *B. fragilis* foi avaliada pelo AP-PCR, observando-se 13 agrupamentos bacterianos derivados de fezes diarréicas e 16 agrupamentos derivados de fezes não diarréicas. Esse resultado denota a heterogeneidade das cepas da espécie *B. fragilis*, concordando com Martirosian et al. (1997).

Sarma et al. (2000) analisando espécies desse grupo microbiano isoladas de equinos diarréicos verificaram elevada similaridade genética (75 a 100%) das cepas testadas. Em nosso estudo foi observada elevada similaridade entre as duas cepas ETBF (80%). De forma semelhante, um estudo realizado em nosso laboratório por Nakano (2005) aplicando o mesmo método de genotipagem observou oito agrupamentos para espécies do grupo *B. fragilis* isoladas de crianças com e sem diarreia, sendo que as 13 cepas ETBF ficaram agrupadas com 87% de similaridade entre si. Com isso observa-se que a aplicação do AP-PCR é de grande utilidade na discriminação de bactérias da mesma espécie e de origens diversas (ERIBE; OLSEN, 2000; MORAES et al., 1999).

Finalmente, devemos lembrar que o processo diarréico em bezerros jovens (até três meses de idade) constitui um sério problema econômico produzindo prejuízos à pecuária de um país, particularmente para aqueles em desenvolvimento como o Brasil. Sendo assim, estudos adicionais são necessários visando-se determinar meios rápidos e eficazes para o diagnóstico da diarreia nesses animais.

## 8 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos em nosso estudo pode-se concluir que:

1. As espécies do grupo *B. fragilis* formam parte da microbiota intestinal residente dos animais analisados;
2. A maioria dos isolados produziu os fatores de virulência aqui estudados;
3. A maioria dos isolados foi resistente à maior parte dos antibióticos e metais pesados analisados;
4. As cepas ETBF parecem não ter participação no processo diarréico em bezerros;
5. As cepas de *B. fragilis* isoladas são geneticamente heterogêneas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. **APMIS**, v. 108, p. 5-48, 2000. Suppl.
- ALDRIDGE, K. E.; ASHCRAFT, D.; CAMBRE, K.; PIERSON, C. L.; JENKINS, S. G.; ROSENBLATT, J. E. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 45, p. 1238-1243, 2001.
- AL-MASHAT, R. R.; TAYLOR, D. J. Bacteria in enteric lesions of cattle. **Vet. Rec.**, v. 112, p. 5-10, 1983.
- ANDERSON, J. D.; SYKES, R. B. Characterisation of a  $\beta$ -lactamase obtained from a strain of *Bacteroides fragilis* resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics. **J. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 201-206, 1973.
- AVILA-CAMPOS, M. J.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; CHARTONE-SOUZA, E.; CISALPINO, E. O. Population stability in species of the *Bacteroides fragilis* group, under mercuric chloride action. **Rev. Microbiol.**, v. 22, p. 93-96, 1991.
- BABB, J. L.; CUMMINS, C. S. Encapsulation of *Bacteroides* species. **Infect. Immun.**, v. 19, p. 1088-1091, 1978.
- BAKIR, M. A.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M.; MATSUMOTO, M.; BENNO, Y. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 1639-1643, 2006. Parte 7.
- BAUGHN, A. D.; MALAMY, M. H. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. **Nature**, v. 427, p. 441-444, 2004.
- BENDALI, F.; SANAA, M.; BICHET, H.; SCHELCHER, F. Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. **Vet. Res.**, v. 30, p. 509-522, 1999.
- BERG, J. O.; LINDQVIST, L.; ANDERSSON, G.; NORD, C. E. Neuraminidase in *Bacteroides fragilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 75-80, 1983.
- BERG, J. O.; LINDQVIST, L.; NORD, C. E. Purification of glycoside hydrolases from *Bacteroides fragilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 40, p. 40-47, 1980.
- BERRY, A. M.; PATON, J. C.; GLARE, E. M.; HANSMAN, D.; CATCHESIDE, D. E. A. Cloning and expression of the pneumococcal neuraminidase gene in *Escherichia coli*. **Gene.**, v. 71, p. 299-305, 1988.
- BEVERIDGE, T. J. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 43, p. 147-171, 1989.

BEZIRTOGLOU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v. 3, p. 173-177, 1997.

BLISKA, J. B.; GALÁN, J. E.; FALKOW, S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. **Cell**, v. 73, p. 903-920, 1993.

Brasil. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 193, de 12 de maio de 1998**. Aprova o regulamento técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1125>. Acesso em 18/abr/07.

BULMER, W. S.; TSAI, K. S.; LITTLE, P. B. Adenovirus infection in two calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 166, p. 233-238, 1975.

BUSATO, A.; HOFER, D.; LENTZE, T.; GAILLARD, C.; BURNENS, A. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. **Vet. Microbiol.**, v. 69, p. 251-263, 1999.

CARY, S. G.; BLAIR, E. B. New transport medium for shipment of clinical specimens. I. Fecal specimens. **J. Bacteriol.**, v. 88, p. 96-98, 1964.

CASTELLANI, A.; CHALMERS, A. J. **Manual of Tropical Medicine**. 3rd ed. New York: Williams Wood & Co., 1919, p. 959-960.

CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *B. vulgatus*: designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v. 26, p. 230-237, 1976.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2007. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, 7nd ed., Approved Standard M11-A7. CLSI, Wayne, P. A., U. S., v. 27, nº2 – CLSI CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.

De LA FUENTE, R.; LUZÓN, M.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; GARCÍA, A.; CID, D.; ORDEN, J. A.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 179-185, 1999.

De UZEDA, M.; FERREIRA, M. C. S.; ALMEIDA, A. E. C. C.; OTTO, S. S. Diagnóstico bacteriológico das infecções anaeróbias. **A Folha Médica**, v. 86, p. 383-389, 1983. Suppl. 1.

DINIZ, C. G.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R. Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistant *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2419-2423, 2000.

DRASAR, B. S.; DUERDEN, B. I. Anaerobes in the normal flora of man. In: **Anaerobes in Human Disease**, London: Arnold, 1991, p. 162-179.

- DUERDEN, B. I. Virulence factors in anaerobes. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. S253-S259, 1994. Suppl. 4.
- DUIMSTRA, J. R.; MYERS, L. L.; COLLINS, J. E.; BENFIELD, D. A.; SHOOP, D. S.; BRADBURY, W. C. Enterovirulence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in gnotobiotic pigs. **Vet. Pathol.**, v. 28, p. 514-518, 1991.
- DUNCAN, H. E.; EDBERG, S. C. Host-microbe interaction in the gastrointestinal tract. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, p. 85-100, 1995.
- ERIBE, E. R.; OLSEN, I. Strain differentiation in *Bacteroides fragilis* by RAPD and Dendron computer-assisted gel analysis. **APMIS**, v. 108, p. 676-684, 2000.
- EUGSTER, A. K.; STORZ, J. Effect of colostral antibodies on the pathogenesis of intestinal chlamydial infections in calves. **Am. J. Vet. Res.**, v. 32, p. 711-718, 1971.
- FALKLER, W. A.; HAWLEY, C. E. Haemagglutinating activity of *Fusobacterium nucleatum*. **Infect. Immun.**, v. 15, p. 230-238, 1977.
- FENNER, L.; ROUX, V.; MALLET, M. N.; RAOULT, D. *Bacteroides massiliensis* sp. nov., isolated from blood culture of a newborn. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 1335-1337, 2005. Parte 3.
- FINEGOLD, S. M. Anaerobic infections in humans: an overview. **Anaerobe**, v. 1, p. 3-9, 1995.
- FINEGOLD, S. M. Therapy for infections due to anaerobic bacteria: an overview. **J. Infect. Dis.**, v. 135, p. S25-S29, 1977. Suppl. 1.
- FINEGOLD, S. M.; CITRON, D. M. Gram negative nonsporing forming anaerobic bacilli. In: LENNETTE, E. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 3rd ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1987, p. 431-439.
- FINEGOLD, S. M.; WEXLER, H. M. Therapeutic implications of bacteriologic findings in mixed aerobic-anaerobic infections. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 611-616, 1988.
- FRANCO, A. A.; CHENG, R. K.; CHUNG, G. T.; WU, S.; OH, H. B.; SEARS, C. L. Molecular evolution of the pathogenicity island of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 6623-6633, 1999.
- FRANCO, A. A.; CHENG, R. K.; GOODMAN, A.; SEARS, C. L. Modulation of *bft* expression by the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island and its flanking region. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 1067-1077, 2002.
- FRANCO, A. A.; MUNDY, L. M.; TRUCKSIS, M.; WU, S.; KAPER, J. B.; SEARS, C. L. Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1007-1013, 1997.

GARROD, L. P. Sensitivity of four species of *Bacteroides* to antibiotics. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 1529-1531, 1955.

GAY, C. C. *Escherichia coli* and neonatal disease of calves. **Bacteriol. Rev.**, v. 29, p. 75-101, 1965.

GENCO, C. A.; DIXON, D. W. Emerging strategies in microbial haem capture. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 1-11, 2001.

GODOY, V. G.; DALLAS, M. M.; RUSSO, T. A.; MALAMY, M. H. A role for *Bacteroides fragilis* neuraminidase in bacterial growth in two model systems. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4415-4426, 1993.

GUTACKER, M.; VALSANGIACOMO, C.; PIFFARETTI, J. C. Identification of two genetic groups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis: distribution of antibiotic resistance (*cfiA*, *cepA*) and enterotoxin (*bft*) encoding genes. **Microbiology**, v. 146, p. 1241-1254, 2000.

GUZMÁN, C. A.; PLATÉ, M.; PRUZZO, C. Role of neuraminidase-dependent adherence in *Bacteroides fragilis* attachment to human epithelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 71, p. 187-192, 1990.

HEDBERG, M.; NORD, C. E. Antimicrobial-resistant anaerobic bacteria in human infections. **Med. Microbiol. Lett.**, v. 5, p. 295-304, 1996.

HENTGES, D. J. The anaerobic microflora of the human body. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p. S175-180, 1993. Suppl. 4.

HIRSH, D. C.; BIBERSTEIN, E. L.; JANG, S. S. Obligate anaerobes in clinical veterinary practice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 10, p. 188-191, 1979.

HIRSH, D. C.; INDIVERI, M. C.; JANG, S. S.; BIBERSTEIN, E. L. Changes in prevalence and susceptibility of obligate anaerobes in clinical veterinary practice. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 186, p. 1086-1089, 1985.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. Taxonomy of anaerobes: present state of the art. Review. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, p. S3-S10, 1984. Suppl. 1.

HOLDEMAN, L. V.; MOORE, W. E. C. *Genus I. Bacteroides Castellani and Chalmers 1919*. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (Ed.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1974, p.385-404.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual Determinative Bacteriology**. 9th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1994, p. 5-18.

HOOPER, L. V.; BRY, L.; FALK, P. G.; GORDON, J. I. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **BioEssays**, v. 20, p. 336-343, 1998.

HOUSE, J. A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 173, p. 573-576, 1978.

JOHNSON, J. L. Taxonomy of the *Bacteroides*. I. Deoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v. 28, p. 245-256, 1978.

JOHNSON, J. L.; HARICH, B. Ribosomal ribonucleic acid homology among species of the genus *Bacteroides*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 71-79, 1986.

JOTWANI, R.; KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K.; UENO, K. Detection of *Bacteroides fragilis* in clinical specimens by Polymerase Chain Reaction amplification of the neuraminidase gene. **Current Microbiol.**, v. 31, p. 215-219, 1995.

JOUSIMIES-SOMER, H. R.; SUMMANEN, P. H.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S. M.; GHARBIA, S. E.; SHAH, H. N. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic Gram-negative bacteria. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2003, v. 1, p. 880-901.

JOUSIMIES-SOMER, H.; PYORALA, S.; KANERVO, A. Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, p. 157-160, 1996.

JOUSIMIES-SOMER, H.; SUMMANEN, P. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding Spirochetes). **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. S17-S21, 2002. Suppl. 1.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Prev. Vet. Med.**, v. 8, p. 127-140, 1990.

KASPER, D. L. The polysaccharide capsule of *Bacteroides fragilis* subspecies *fragilis*: immunochemical and morphologic definition. **J. Infect. Dis.**, v. 133, p. 79-87, 1976.

KEUSCH G. T.; O'CONNELL, C. J. The susceptibility of *Bacteroides* to the penicillins and cephalothin. **Am. J. Med. Sci.**, v. 251, p. 428-432, 1966.

KITAHARA, M.; SAKAMOTO, M.; IKE, M.; SAKATA, S.; BENNO, Y. *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 2143-2147, 2005. Parte 5.

KLING, J. J.; WRIGHT, R. L.; MONCRIEF, J. S.; WILKINS, T. D. Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 279-284, 1997.

KOSHY, S. S.; MONTROSE, M. H.; SEARS, C. L. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrate actin rearrangement in response to the metalloprotease toxin of *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5022-5028, 1996.

- KUHN, M.; KATHARIOU, S.; GOEBEL, W. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 79-82, 1988.
- KUWAHARA, T.; AKIMOTO, S.; UGAI, H.; KAMOGASHIRA, T.; KINOCHI, T.; OHNISHI, Y. Detection of *Bacteroides fragilis* by PCR assay targeting the neuraminidase-encoding gene. **Lett. App. Microbiol.**, v. 22, p. 361-365, 1996.
- LAN, P. T.; SAKAMOTO, M.; SAKATA, S.; BENNO, Y. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 2853-2859, 2006. Parte 12.
- MARÇAL, W. S.; GASTE, L.; LIBONI, M.; PARDO, P. E.; NASCIMENTO, M. R.; HISASI, C. S. Concentration of lead in mineral salt mixtures used as supplements in cattle food. **Experim. Toxicol. Pathol.**, v. 53, p. 7-9, 2001.
- MARSH, P. K.; MALAMY, M. H.; SHIMELL, M. J.; TALLY, F. P. Sequence homology of clindamycin resistance determinants in clinical isolates of *Bacteroides* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 23, p. 726-730, 1983.
- MARTIN, W. J. Isolation and identification of anaerobic bacteria in the clinical laboratory. A 2-year experience. **Mayo Clin. Proc.**, v. 49, p. 300-308, 1974.
- MARTIROSIAN, G.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; MEISEL-MIKOLAJCZYK, F.; VERBRUGH, H. PCR ribotyping and arbitrarily primed PCR for the comparison of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from two Polish university hospitals. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 3, p. 102-108, 1997.
- MENESTRINA, G.; SERRA, M. D.; COMAI, M.; CORAIOLA M.; VIERO, G.; WERNER, S.; COLIN, D. A.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Ion channels and bacterial infection: the case of  $\beta$ -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. **FEBS Lett.**, v. 552, p. 54-60, 2003.
- MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 91-98, 2000.
- MONCRIEF, J. S.; DUNCAN, A. J.; WRIGHT, R. L.; BARROSO, L. A.; WILKINS, T. D. Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity islet of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1735-1739, 1998.
- MONCRIEF, J. S.; OBISO, R. Jr.; BARROSO, L. A.; KLING, J. J.; WRIGHT, R. L.; VAN TASSEL, R. L.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 175-181, 1995.
- MOORE, W. E.; HOLDEMAN, L. V. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 27, p. 1450-1455, 1974.
- MORAES, S. R.; GONÇALVES, R. B.; MOUTON, C.; SELDIN, L.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. *Bacteroides fragilis* isolates compared by AP-PCR. **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 257-263, 1999.

MULLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem. Pharmacol.**, v. 35, p. 37-41, 1986.

MYERS, L. L.; COLLINS, J. E.; SHOOP, D. S. Ultrastructural lesions of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in rabbits. **Vet. Pathol.**, v. 28, p. 336-338, 1991.

MYERS, L. L.; FIREHAMMER, B. D.; SHOOP, D. S.; BORDER, M. M. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 241-244, 1984.

MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; BYARS, T. D. Diarrhea associated with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in foals. **Am. J. Vet. Res.**, v. 48, p. 1565-1567, 1987.

MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; COLLINS, J. E.; BRADBURY, W. C. Diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in infant rabbits. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2025-2030, 1989.

MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; FIREHAMMER, B. D.; BORDER, M. M. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 1344-1347, 1985.

MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; STACKHOUSE, L. L.; NEWMAN, F. S.; FLAHERTY, R. J.; LETSON, G. W.; SACK, R. B. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 2330-2333, 1987.

NAKAHARA, H.; ISHIKAWA, T.; SARAI, Y.; KONDO, I.; KOZUKUE, H.; MITSUHASHI, S. Mercury resistance and R plasmids in *Escherichia coli* isolated from clinical lesions in Japan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 11, p. 999-1003, 1977.

NAKANO, V. **Avaliação fenotípica e genotípica de alguns fatores de virulência e de susceptibilidade a antimicrobianos de espécies do grupo *Bacteroides fragilis***. 160 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo, 2005.

NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Survey of antimicrobial susceptibility patterns of the bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from the intestinal tract of children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 319-324, 2004.

NAKANO, V.; PADILLA, G.; MARQUES, M. V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Plasmid-related  $\beta$ -lactamase production in *Bacteroides fragilis* strains. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 843-846, 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS 1997. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, 4th ed., Approved Standard M11-A4. NCCLS, Villanova, P. A., U. S.

NAVAMAR, F.; MARIAN, A.; VERWEIJ-VAN VUGHT, J. J.; MacLAREN, D. M. A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1431-1435, 1991.

NAVAMAR, F.; VAN DER BIJL, M. W.; APPELMELK, B. J.; de GRAAFF, J.; MACLAREN, D. M. The role of neuraminidase in hemagglutination and adherence to colon WiDr cells by *Bacteroides fragilis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 393-396, 1994.

NICOLET, J. Bacilos anaerobios Gramnegativos. In: **Compendio de Bacteriología Medica Veterinaria**. 1 ed. Zaragoza: Acribia, 1986, p. 111.

NOVICK, R. P.; ROTH, C. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 95, p. 1335-1342, 1968.

NRIAGU, J. O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environ. Pollut.**, v. 50, p. 139-161, 1988.

OBISO, R. J. Jr, R. J.; BEVAN, D. R.; WILKINS, T. D. Molecular modeling and analysis of fragilysin, the *Bacteroides fragilis* toxin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. S153-S155, 1997. Suppl. 2.

ONDERDONK, A. B.; KASPER, D. L.; MANSHEIM, B. J.; LOUIE, T. J.; GORBACH, S. L.; BARTLETT, J. G. Experimental animal models for anaerobic infections. **Rev. Infect. Dis.**, v. 1, p. 291-301, 1979.

OXENDER, W. D.; NEWMAN, L. E.; MORROW, D. A. Factors influencing dairy calf mortality in Michigan. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 162, p. 458-460, 1973.

OYSTON, P. C. F.; HANDLEY, P. S. Surface components of *Bacteroides fragilis* involved in adhesion and haemagglutination. **J. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 51-55, 1991.

OYSTON, P. C. F.; HANDLEY, P. S. Surface structures, haemagglutination and cell surface hydrophobicity of *Bacteroides fragilis* strains. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p. 941-948, 1990.

PANTOSTI, A.; CERQUETTI, M.; COLANGELI, R.; D'AMBROSIO, F. Detection of intestinal and extra-intestinal strains of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by the HT-29 cytotoxicity assay. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 191-196, 1994.

PANTOSTI, A.; MALPELI, M.; WILKS, M.; MENOZZI, M. G.; D'AMBROSIO, F. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2482-2486, 1997.

PARKER, A. C.; SMITH, C. J. Genetic and biochemical analysis of a novel ambler class A  $\beta$ -lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. **Antimicrob. Ag. Chem.**, v. 37, p. 1028-1036, 1993.

PASCOE, G. A.; BLANCHET, R. J.; LINDER, G. Food chain analysis of exposures and risks to wildlife at a metals-contaminated wetland. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 30, p. 306-318, 1996.

PATHELA, P.; HASAN, K. Z.; ROY, E.; ALAM, K.; HUQ, F.; SIDDIQUE, A. K.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-associated diarrhea in children 0-2 years of age in rural Bangladesh. **J. Infect. Dis.**, v. 19, p. 1245-1252, 2005.



PAULA, G. R.; FALCÃO, L. S.; ANTUNES, E. N. F.; AVELAR, K. E. S.; REIS, F. N. A.; MALUHY, M. A.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. Determinants of resistance in *Bacteroides fragilis* strains according to recent Brazilian profiles of antimicrobial susceptibility. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 24, p. 53-58, 2004.

PESTANA, A. C. N. R.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. Plasmid-related resistance to clindamycin and penicillin G in a *Bacteroides vulgatus* strain. **Anaerobe**, v. 5, p. 447-449, 1999.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; GROOT, B. D.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Antimicrob. Chem.**, v. 53, p. 28-52, 2004.

PIDDOCK, L. J. V.; WISE, R. Cefoxitin resistance in *Bacteroides* species: evidence indicating two mechanisms causing decreased susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 19, p. 161-170, 1987.

POXTON, I. R.; BROWN, R.; SAWYER, A.; FERGUSON, A. The mucosal anaerobic gram-negative bacteria of the human colon. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. S111-S113, 1997. Suppl. 2.

PRADO, E.; CRUZ, F. E. R.; VIANA, F. C.; TORRES, A. M. C.; REIS, D. L. Problemas sanitários do rebanho de leite: percepção dos criadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.**, v. 49, p. 19-29, 1997.

PRUZZO, C.; GUZMÁN, C. A.; DAINELLI, B. Incidence of hemagglutination activity among pathogenic and non-pathogenic *Bacteroides fragilis* strains and role of capsule and pili in HA and adherence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 59, p. 113-118, 1989.

RADOSTITS, O. M.; RHODES, C. S.; MITCHELL, M. E.; SPOTSWOOD, T. P.; WENKOFF, M. S. A clinical evaluation of antimicrobial agents and temporary starvation in the treatment of acute undifferentiated diarrhea in newborn calves. **Can. Vet. J.**, v. 16, p. 219-227, 1975.

RASHTCHIAN, A.; BOOTH, S. J. Stability in *Escherichia coli* of an antibiotic resistance plasmid from *Bacteroides fragilis*. **J. Bacteriol.**, v. 146, p. 121-127, 1981.

RASMUSSEN, B. A.; GLUZMAN, Y.; TALLY, F. P. Cloning and sequencing of the class B  $\beta$ -lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 34, p. 1590-1592, 1990.

RASMUSSEN, B. A.; YANG, Y.; JACOBUS, N.; BUSH, K. Contribution of enzymatic properties, cell permeability, and enzyme expression to microbiological activities of  $\beta$ -lactams in three *Bacteroides fragilis* isolates that harbor a metallo- $\beta$ -lactamase gene. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 2116-2120, 1994.

REIG, M.; FERNÁNDEZ, M. C.; BALLESTA, J. P. G.; BAQUERO, F. Inducible expression of ribosomal clindamycin resistance in *Bacteroides vulgatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 639-642, 1992.

- RENGIFO, S. A.; BOTTEON, R. C. C. M.; SILVA, R. A. Enfermidades de maior frequência em bezerros leiteiros. **Revista do CFMV**, v.12, p. 17-31, 2006.
- REYSSET, G.; HAGGOURD, A.; SEBALD, M. Genetics of resistance of *Bacteroides* species to 5-nitroimidazole. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p. S401-S403, 1993. Suppl. 4.
- RILEY, T. V.; MEE, B. J. Susceptibility of *Bacteroides* spp. to heavy metals. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 22, p. 889-892, 1982.
- ROBERTSON, K. P.; SMITH, C. J.; GOUGH, A. M.; ROCHA, E. R. Characterization of *Bacteroides fragilis* hemolysins and regulation and synergistic interactions of HlyA and HlyB. **Infection Immun.**, v. 74, p. 2304-2316, 2006.
- ROBINSON, R. A. Salmonellosis in young calves. **N. Z. Vet. J.**, v. 14, p. 33-39, 1966.
- ROCHA, E. R.; SELBY, T.; COLEMAN, J. P.; SMITH, C. J. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 6895-6903, 1996.
- ROGERS, M. B.; PARKER, A. C.; SMITH, C. J. Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 37, p. 2391-2400, 1993.
- ROTIMI, V. O.; DUERDEN, B. I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **J. Med. Microbiol.**, v. 14, p. 51-62, 1981.
- ROTIMI, V. O.; EKE, P. I. The bactericidal action of human serum on *Bacteroides* species. **J. Med. Microbiol.**, v. 18, p. 355-363, 1984.
- ROWE, G. E.; WELCH, R. A. Assays of hemolytic toxins. **Methods Enzymol.**, v. 235, p. 657-667, 1994.
- RUDEK, W.; HAQUE, R. U. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 458-460, 1976.
- RUSSO, T. A.; THOMPSON, J. S.; GODOY, V. G.; MALAMY, M. H. Cloning and expression of the *Bacteroides fragilis* TAL2480 neuraminidase gene, *nanH*, in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 2594-2600, 1990.
- SACK, R. B.; ALBERT, M. J.; ALAM, K.; NEOGI, P. K. B.; AKBAR, M. S. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 960-963, 1994.
- SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 1599-1605, 2006. Parte 7.
- SALYERS, A. A. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 38, p. 293-313, 1984.

SARMA, P. N.; TANG, Y. J.; PRINDIVILLE, T. P.; OSBORNE, P. D.; JANG, S.; SILVA, J. Jr.; COHEN, S. H. Genotyping of *Bacteroides fragilis* isolates from stool specimens by arbitrarily-primed-PCR. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 37, p. 225-229, 2000.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SHAH, H. N.; COLLINS, M. D. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 39, p. 85-87, 1989.

SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. Ecophysiology and taxonomy of *Bacteroides* and related taxa. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p. S160-S167, 1993. Suppl. 4.

SHARP, S. E. Commensal and pathogenic microorganisms of humans. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1999, p. 23-32.

SHOEMAKER, N. B.; BARBER, R. D.; SALYERS, A. A. Cloning and characterization of a *Bacteroides* conjugal tetracycline-erythromycin resistance element by using a shuttle cosmid vector. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 1294-1302, 1989.

SHOEMAKER, N. B.; VLAMAKIS, H.; HAYES, K.; SALYERS, A. A. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 561-568, 2001.

SHOEMAKER, N. B.; WANG, G. R.; SALYERS, A. A. Evidence for natural transfer of a tetracycline resistance gene between bacteria from the human colon and bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1313-1320, 1992.

SHOOP, D. S.; MYERS L. L.; LEFEVER, J. B. Enumeration of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in municipal sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2243-2244, 1990.

SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. 1 ed. São Paulo: Manole, 1993, p. 303-314.

SNYDMAN, D. R.; JACOBUS, N. V.; McDERMOTT, L. A.; RUTHAZER, R.; GOLDSTEIN, E. J. C.; FINEGOLD, S. M.; HARRELL, L. J.; HECHT, D. W.; JENKINS, S. G.; PIERSON, C.; VENEZIA, R.; RIHS, J.; GORBACH, S. L. National survey on the susceptibility of *Bacteroides Fragilis* group: report and analysis of trends for 1997-2000. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. S126-S134, 2002. Suppl. 1.

SONG, Y. L.; LIU, C. X.; McTEAGUE, M.; FINEGOLD, S. M. "*Bacteroides nordii*" sp. nov. and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5565-5570, 2004.

SONGER, J. G.; MISKIMMINS, D. W. *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. **Anaerobe**, v. 10, p. 239-242, 2004.

SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arq. Inst. Biol.**, v. 67, p. 275-281, 2000.

SUMMANEN, P.; BARON, E. P.; CITRON, D. M.; STRONG, C.; WEXLER, H. M.; FINEGOLD, S. M. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 5nd ed. [S.l]: Star Publishing Company, 1993.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E. Bactericidal effect of pooled human serum on *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 90, p. 29-36, 1982.

SUTTER, V. L.; BARRY, A. L.; WILKINS, T. D.; ZABRANSKY, R. J. Collaborative evaluation of a proposed reference dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 16, p. 495-502, 1979.

TALLY, F. P.; GOLDIN, B. R.; JACOBUS, N. V.; GORBACH, S. L. Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of clinical significance. **Infect. Immun.**, v. 16, p. 20-25, 1977.

TREVORS, J. T.; STRATTON, G. W.; GADD, G. M. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. **Can. J. Microbiol.**, v. 32, p. 447-464, 1986.

TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. **Vet. Rec.**, v. 108, p. 510-515, 1981.

VALLIM, D. C.; OLIVEIRA, I. C. M.; ANTUNES, E. N. F.; FERREIRA, E. O.; MORAES, S. R.; PAULA, G. R.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. Evaluation of genetic relatedness of *Bacteroides fragilis* strains isolated from different sources by AP-PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis assays. **Anaerobe**, v. 8, p. 192-199, 2002.

Van TASSEL, R. L.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D. Purification and characterization of an enterotoxin from *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.**, v. 60 p. 1343-1350, 1992.

VEILLON, A.; ZUBER, A. Recherches sur quelques microbes strictment anaérobies et leur role en pathologie. **Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.**, v. 10, p. 517-545, 1898.

VEL, W. A. C.; NAVAMAR, F.; MARIAN, A.; VERWEIJ-VAN VUGHT, J. J.; PUBBEN, A. N. B.; MACLAREN, D. M. Haemagglutination by the *Bacteroides fragilis* group. **J. Med. Microbiol.**, v. 21, p. 105-107, 1986.

WALLACE, B. L.; BRADLEY, J. E.; ROGOLSKY, M. Plasmid analyses in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and other *Bacteroides* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 14, p. 383-388, 1981.

WEIKEL, C. S.; GRIECO, F. D.; REUBEN, J.; MYERS, L. L.; SACK, R. B. Human colonic epithelial cells, HT29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alter their morphology. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 321-327, 1992.

WEISS, J. E.; RETTGER, L. F. The Gram-negative *Bacteroides* of the Intestine. **J. Bacteriol.**, v. 33, p. 423-434, 1937.

WILLIAMS, J. D. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 12, p. S3-S7; discussion, p. S26-S27, 1999. Suppl. 1.

WITTE, W.; GREEN, L.; MISRA, T. K.; SILVER, S. Resistance to mercury and to cadmium in chromosomally resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 29, p. 663-669, 1986.