

Renata Ferreira Boente

**“Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Genes de Resistência
nos Gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*”**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
AGOSTO DE 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Boente, Renata Ferreira

Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Genes de Resistência nos Gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*/Renata Ferreira Boente- Rio de Janeiro, 2008
XIV, 51

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2006.

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Referências bibliográficas: 44-51

1. *Bacteroides* 2. *Parabacteroides* 3. β - lactâmicos 4. macrolídeos 5. tetraciclina 6. metronidazol I. Domingues, Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Genes de Resistência nos Gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*.

Renata Ferreira Boente

**“Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Genes de Resistência nos Gêneros *Bacteroides*
e *Parabacteroides*”**

Rio de Janeiro, 14 de Agosto de 2008

(Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, PhD, UFRJ)

(Beatriz Meurer Moreira, PhD, UFRJ)

(Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho, PhD, UFRJ)

(Geraldo Renato de Paula, PhD,UFF)

(Ângela Christina Dias de Castro, PhD,UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Biologia de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do(a) Prof(a) Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização do mesmo. A seguir algumas frases ou expressões que marcaram o período:

“Caraca! Esse *hairpin* é violento”

Ivi Christina depois que viu o *hairpin* formado pelo *primer* confeccionado pela Lili.

“A Regina pediu se eu vou tirar

férias”. Heidi falando uma língua própria. Neste caso, pediu é o mesmo que perguntou.

“Tô com aquela sensação de que

isso não vais dar certo”. Eu e minhas premonições. Quase sempre certas a propósito.

“A gente tem que marcar uma reunião pra decidir o que fazer na

Califórnia” Livia fazendo a programação a ser seguida durante o Congresso da *Anaerobe*.

“Você ainda não saiu daí?” Fernando

preocupado com o horário e com a minha segurança

“Você ainda não saiu daí?” Alice

preocupada com o horário e com a minha segurança .

“Você ainda não saiu daí, minha

filha?” Rosalia preocupada com o horário e com a minha segurança.

“Depois do casamento eu vejo” Laís

em seu momento “noiva neurótica”.

“Renatinha, posso abusar de você

mais uma vez?” Ilana, me pedindo pra ir no HU ou pra passar as amostras de *Clostridium difficile*.

“Que pessoa *nonsense*, né?” Regina,

orientadora *chic* mostrando sua compreensão da língua inglesa

“Gente, hoje tem trufa de limão, brigadeiro com coco e sem coco, ...”

Mariana e a doce música para os meus ouvidos.

“Desculpa, gente. Hoje não tem

trufa” Mariana me induzindo a uma crise de abstinência.

“Agora a PCR despinguelou” Karla

colocando em prática a expressão nova que aprendeu na viagem ao casamento da Laís.

“Je suis très fatigüe” Lili, depois de se tornar fluente em inglês, colocando seu francês em prática.

“Eu não sei o que eu faço. Não vai

dar tempo de fazer isso tudo” Priscila reclamando que não terminar os experimentos a tempo para a monografia

“Eu juro que não coloquei agar”

Rafael jurando que não colocou agar no meio que deveria ser líquido. Acho que ele pegou a base de BHI-ágar...

“Eu disse isso?” Renato tentando me

enganar insinuando que ele não disse que meu projeto de doutorado poderia ser sobre bombas de fluxo.

“Esqueci de trazer o CD do *Heroes*

pra você” Felipe me induzindo a uma crise de abstinência.

“Vocês já viram esse vídeo no

***Youtube?*”** Bruno, profundo conhecedor dos vídeos mais toscos da Internet.

“A gente tem marcar um

churrasquinho!”

Joaquim mostrando que nem só de trabalho vive a ciência

**“Faz quarenta dias que eu não
bebo... água. São tantas
doenças transmitidas pela
água! É cólera, dengue, febre
tifóide! Com tanto nome
estranho como dengue, cólera,
a febre é a que menos tifóide”
(Rafinha Basto)**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com esse trabalho:

- ☺ À Deus que estava bastante ocupado ajudando outras pessoas, mas conseguiu arrumar um tempinho pra me ajudar, valeu!!!
- ☺ Aos meus pais, avós, tia Rosa e família e Tia Nilza pelo incentivo (mesmo sem saber que diabos é Microbiologia), amor, compreensão e paciência.
- ☺ Ao Fernando, meu eterno amor, por me completar e me mostrar o quanto a Microbiologia é importante pra mim, Eu te amo muuuuuito!
- ☺ Às minhas amigas Dayane e Tatiana por terem se tornado minhas irmãs, por todos esses anos de amizade, alegrias, animações de velório... Não importava se estávamos longe ou perto vocês sempre estiveram em meus pensamentos. Eu amo vocês!!!!
- ☺ À prof. Maria Candida, Leandrino e Caetano que só esperaram eu entrar no laboratório para irem embora, mas que me fizeram me sentir em casa;
- ☺ À tia Regina Domingues pela oportunidade, apoio, conselhos e chocolates. Espero que tenha conseguido atingir as suas expectativas;
- ☺ Aos amigos do Laboratório de Biologia de Anaeróbios: Eliane Lili Ferreira pela companhia, músicas e risadas e as frases mais loucas misturando francês, inglês e português; Laís Lalá Falcão, a noiva neurótica, Karlinha que descobri ser uma irmã que eu não conhecia; Heidi Pauer minha companheira de Mestrado que também continuará comigo no Doutorado porque, afinal de contas, o que o chiclete gruda, nada mais pode desgrudar; Livia, a que tem 5 cérebros, ficarei feliz se o meu único cérebro ficar parecido com apenas um dos seus um dia; Rafael e suas musiquinhas; Priscila e seu jeitinho meigo que cativa todo mundo; Felipe e seu jeitinho desligado que diverte todo mundo; Bruno e os vídeos mais toscos do *Youtube* (como você acha esses vídeos bizarro??? Isso vale pra Karla também); Ilana, a mais nova funcionária pública!!! Já estou sentindo falta das suas “brigas” com a Heidi e das suas caronas emocionantes!!; Mariana e suas trufas

maravilhosas e mãe da mascotinha do lab, a lindinha da Alice; Natasha e Natacha as mais novas escravas do laboratório; Renato e suas explicações que sempre me deixam em dúvida, mas abrem meus olhos para novas abordagens; Joaquim, pela incrível paciência para com a minha pessoa, obrigada por tudo, em particular pelos MICs e pelos churrasquinhos; obrigada a todos vocês pela amizade, pelo aprendizado e pelos momentos de descontração;

- ☺ Às amigas Deyse DD Deysoca e Joyce que estão longe (mas só um pouquinho), obrigada por todos os bons momentos que vocês me proporcionaram, e que com certeza não vou esquecer;
- ☺ Aos amigos do Instituto: Dilma, Antônio, Orlando Helena, Iviiiiiiii, Marcos, o Morcegão, Fabíola Fabifola (*pbp*PCR seguida de RFLP), Cícera, Ricardo, Felipe (blue boy), Jaque e Semíramis, Safira, Luciana e Dona Ana;
- ☺ Às Safs Cristiane, Rayane, Mariana, Natália, Débora, Adriana, Karen, Ana Maria, Luisa e Marina pela amizade, carinho e pela descoberta do gene que mudou a minha vida!!!! Amo vocês!!!
- ☺ Ao Dr. Jean-Philippe Émond do Centre Hospitalier Intercommunal por ter cedido as cepas para os experimentos realizados neste trabalho.
- ☺ À Coordenação de ensino de Pós-Graduação na pessoa da coordenadora Thais Cristina Souto Padrón e ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes na pessoa da diretora Agnes Marie Sá Figueiredo.
- ☺ Àqueles que se foram antes do término do trabalho, mas que permanecerão sempre comigo;
- ☺ Às instituições de apoio à pesquisa: CNPq, CAPES, FAPERJ, PRONEX, FUJB.

RESUMO

RENATA FERREIRA BOENTE

“Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Genes de Resistência nos Gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*”

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

O perfil de susceptibilidade a cinco antimicrobianos foi determinado pelo método de diluição em ágar para 60 cepas de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis* isoladas da microbiota intestinal de indivíduos sadios ou de processos infecciosos de pacientes internados em dois hospitais do Rio de Janeiro (n = 42), Brasil, e de Paris, França (n = 18). Todas as cepas estudadas foram uniformemente susceptíveis ao metronidazol. A taxa de resistência de cepas de *Bacteroides* spp. a ampicilina, cefoxitina, tetraciclina e clindamicina foram 98,3%, 11,7%, 68,3% e 23,3%, respectivamente. Todas as cepas de *P. distasonis* foram resistentes a ampicilina. As taxas de resistência a cefoxitina, tetraciclina e clindamicina foram 37,5%, 87,5% e 50%, respectivamente. Os genes *ermF* e *nim* não foram detectados no gênero *Parabacteroides* e 37,5%, 12,5%, 12,5% e 87,5% destas cepas albergavam os genes *cepA*, *cfiA*, *cfxA* e *tetQ*, respectivamente. Os genes *cepA*, *cfiA*, *cfxA*, *tetQ*, *ermF* e *nim* foram detectados em 69,2%, 17,3%, 11,5%, 50%, 7,7% e 3,8% das cepas de *Bacteroides*, respectivamente. Dez cepas de *Bacteroides* e *Parabacteroides* foram positivas para a presença do gene *cfiA*, sendo submetidas ao teste-E para avaliação da susceptibilidade a imipenem e a amoxicilina-clavulanato. A taxa de resistência a imipenem e amoxicilina-clavulanato foi de 4,1% e 8,3%, respectivamente. O teste-E MBL revelou a presença de uma metalo- β -lactamase ativa. Essa característica está sendo descrita pela primeira vez no Brasil. O ensaio de AFLP-PCR revelou a presença de fragmentos de tamanho molecular esperado, porém, não foi possível analisar a seqüência deste na tentativa de detectar o elemento de inserção responsável pela ativação do gene *cfiA*. Os resultados enumerados justificam o constante monitoramento dos padrões de susceptibilidade e detecção de determinantes de resistência nos gêneros investigados.

Palavras-chave: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, metronidazol

Rio de Janeiro
Agosto 2008

ABSTRACT

Renata Ferreira Boente

“Perfil de Susceptibilidade e Detecção dos Genes de Resistência nos Gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*”

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Susceptibility to 5 antimicrobials was determined by agar dilution method for *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides distasonis* strains isolated from human intestinal microflora and clinical settings in two hospital in Rio de Janeiro, Brazil (n= 42) and in Paris, France (n= 18). All *Bacteroides* isolates were uniformly susceptible to metronidazole. The resistance rates to ampicillin, cefoxitin, tetracycline and clindamycin were 98.3%, 11.7%, 68.3% and 23.3%, respectively. All *P. distasonis* strains were resistant to ampicillin. Cefoxitin, tetracycline and clindamycin resistance rates were 37.5%, 87.5% and 50%, respectively. The *ermF* and *nim* genes were not found in the genus *Parabacteroides* and 37.5%, 12.5%, 12.5% and 87.5% of the *Parabacteroides* strains possessed *cepA*, *cfiA*, *cfxA* and *tetQ* genes, respectively. The genes *cepA*, *cfiA*, *cfxA*, *tetQ*, *ermF* and *nim* were found in 69.2%, 17.3% 11.5%, 50%, 7.7% and 3.8% of the *Bacteroides* strains, respectively. Ten strains of *Bacteroides* and *Parabacteroides*, positive for the presence of *cfiA* gene, were submitted to E-test with imipenem and amoxicillin-clavulanate. The resistance rate to imipenem was 12.5% and 8.3% to amoxicillin-clavulanate. The E-test MBL strip detected the presence of an active metallo- β -lactamase. This feature is for the first time described in Brazil. The AFLP-PCR assay detected the presence of an expected molecular weight fragment, however, it was not possible to analyse this sequence in order to detect the insertion element responsible for the activation of the *cfiA* gene. These results reinforce the importance of surveying susceptibility patterns and detection of resistance determinants.

Palavras-chave: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, β -lactams, macrolides, tetracyclines, metronidazole

Rio de Janeiro
Agosto 2008

INTRODUÇÃO	1
1) Resistência a Tetraciclina.....	5
2) Resistência a Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas.....	7
3) Nitroimidazóis	8
4) β -lactâmicos	10
OBJETIVOS	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
(1) Cepas bacterianas	13
(2) Condições de cultivo	13
(3) Manutenção das cepas	14
(4) Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	14
(4.1) Método de diluição em ágar	14
(4.1.1) Antimicrobianos	14
(4.1.2) Inóculo	14
(4.1.3) Meio de cultura e preparo das placas.....	14
(4.1.4) Inoculação	15
(4.1.5) Incubação	15
(4.1.6) Leitura e interpretação de resultados	15
(4.2) Método do teste Epsilométrico.....	16
(4.2.1) Antimicrobianos	16
(4.2.2) Inóculo	16
(4.2.3) Inoculação	16
(4.2.4) Leitura e interpretação de resultados	16
(5) Verificação da produção de metalo- β -lactamase (MBL)	17
(6) Detecção de determinantes de resistência.....	17
(6.1) Extração de DNA cromossômico.....	17
(7) Amplificação de determinantes de resistência por PCR.....	18
(8) Confeção da sonda para o gene <i>erm</i>	18
(8.1) Dosagem de DNA total por Espectrofotometria	19
(8.2) Purificação do produto da PCR.....	19
(8.3) Marcação da sonda	19
(8.4) DNA <i>Dot Blot</i>	20
(8.5) Hibridização	20
(8.6) Detecção Imunológica	21
(9) Seqüenciamento	21
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

Índice de Figuras e Tabelas

Tabela 1: Origem e identificação de cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> isolados de processos clínicos selecionadas para este estudo.....	26
Tabela 2: Identificação de cepas de <i>Bacteroides</i> spp e <i>Parabacteroides distasonis</i> isoladas de microbiota intestinal de indivíduos sadios.	23
Tabela 3: Genes de resistência pesquisados, seqüência de iniciadores, controles positivos e negativos utilizados nas reações de PCR e tamanho de fragmentos esperados.	28
Figura 1: Comparação entre a seqüência do gene <i>nimB</i> e a seqüência da cepa <i>Bacteroides fragilis</i> BA 4.4. As linhas verticais mostram bases de nucleotídeos idênticas. Linhas horizontais mostram lacunas entre as bases. A comparação foi realizada utilizando o programa BLAST ((www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).....	33
Figura 2: Comparação entre a seqüência do gene <i>nimD</i> e a seqüência da cepa <i>Bacteroides fragilis</i> 1426. As linhas verticais mostram bases de nucleotídeos idênticas. Linhas horizontais mostram lacunas entre as bases. A comparação foi realizada utilizando o programa BLAST ((www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).....	34
Figura 3: <i>Dot Blot</i> de cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> e <i>Parabacteroides distasonis</i> quanto a presença do gene <i>ermF</i> . [A]: controle positivo cepa <i>B. fragilis</i> 4720-3; [B]: BA 3.1; [C]: BA 4.4; [D]: BA 5.3.1; [E]: BA 5.3.2; [F]: BA 12.2; [G]: MF 7.9; [H]: MF 12.3; [I]: MF 13.3; [J]: MIA 24.1; [K]: 1426; [L]: 1428; [M]: 1429; [N]: 1438; [O]: MIA 24.3; [P]: MIA 24.4; [Q]: controle negativo <i>B. fragilis</i> ATCC 25285.....	35
Figura 4: Teste-E MBL para a presença de uma metalo β -lactamase na cepa BA 12.2 isolada de microbiota intestinal de humanos. A produção de MBL foi detectada pela redução em 8x da CIM do imipenem na presença do inibidor, EDTA.....	36
Tabela 4: Perfil de susceptibilidade de cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> isoladas de espécimes clínicos no período de 1980 a 2005.	32
Tabela 5: Perfil de susceptibilidade de cepas de <i>Bacteroides</i> spp. e isoladas de microbiota intestinal de indivíduos sadios obtidas no período de 1999 a 2001.....	33
Tabela 6: Perfil de susceptibilidade de cepas de <i>Parabacteroides distasonis</i> isoladas de microbiota intestinal de indivíduos sadios obtidas no período de 1999 a 2000.	34

Lista de Abreviaturas

5 – Ni = 5 – Nitroimidazóis

ACL = Amoxicilina - clavulanato

AFLP = *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AMP = Ampicilina

AP = fosfatase alcalina

ARDRA = *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

BA = Microbiota Intestinal de Indivíduos Sadios

BCIP = 5-bromo – 4 – cloro – 3 – indolil fosfato

BFT = *Bacteroides fragilis toxin*

BHI = *Brain – Heart Infusion*

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

cepA = determinante de resistência a cefalosporinas

cfiA = determinante de resistência a cefalosporinas e carbapenemas

CFU = Unidades formadoras de colônia

CFX = Cefoxitina

cfxA = determinante de resistência a cefoxitina

CHIV = *Centre Hospitalier Intercommunal – Villeneuve-Saint-Georges*

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CLN = Clindamicina

CLSI = *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CPC = Complexo polissacarídeo capsular

CTn = transposon conjugativo(conjugative transposon)

CTnDOT = conjugative transposon da Família DOT

DNA = ácido deoxirribonucléico(deoxyribonucleic Acid)

DO = Densidade ótica

EDTA = *Ethylenediaminetetracetic acid*

erm = *Erythromycin Ribosome Methylation* (determinante de resistência ao grupo MLS)

ETBF = *Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*

Grupo MLS = grupo Macrolídeo, Lincosamida e Estreptograminas B

HMCF = Hospital Municipal Cardoso Fontes

HUCFF = Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IMP = Imipenem

IS = seqüência de inserção(insertion sequence)
Kb = *kilobases*
LCE = Líquido cérebro – espinhal
MBL = metalo- β – Lactamase
MEC = Matriz Extracelular
MET = Metronidazol
MF = Microbiota Intestinal de Pacientes de Ambulatório
MFS = *Major Facilitator Superfamily*
MIA = Microbiota Intestinal de Pacientes de Ambulatório
NBT = *Nitroblue Tetrazolium Salt*
nim = determinante de resistência a nitroimidazóis
Pb = pares de base
PBPs = Proteínas ligantes de Penicilina (Penicillin binding proteins)
PCR = *Polimerase chain reaction*
PFGE = *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
PRAS = *Pre-Reduced Anaerobically Sterilized*
R – NHOH = radical hidroxialamino
R – NO = radical nitroso
R – NO₂ = radical nitro-aniônico
RAPD = *Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism*
rRNA = ácido ribonucléico ribossomal (ribossomal Ribonucleic acid)
SDS = *Sodium Dodecyl Sulphate*
tet = determinante de resistência a tetraciclina
TET = Tetraciclina

As bactérias anaeróbias têm assumido grande importância clínica nos últimos anos em decorrência de avanços nas técnicas de detecção e identificação deste grupo microbiano, sendo ratificado o envolvimento desses microrganismos em diversos processos infecciosos dos tratos respiratório, gastrointestinal e genital feminino atuando tanto como patógenos únicos quanto em associações com microrganismos facultativos (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). Nesse contexto, as espécies do gênero *Bacteroides* têm merecido uma atenção especial pela sua alta incidência de isolamento ou pelo seu perfil de resistência aos antimicrobianos (KOETH *et al.*, 2004).

O gênero *Bacteroides* é composto por espécies reconhecidas como pertencentes ao antigo “grupo *Bacteroides fragilis*”. Esse grupo era constituído inicialmente pelas espécies *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, sendo posteriormente adicionadas as espécies *B. eggerthii*, *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris* (LIU *et al.*, 2003). Recentemente, Sakamoto & Benno (2006), reclassificaram as espécies *B. distasonis* e *B. merdae* com base na composição de menaquinonas e análise genética do rRNA 16S. Um novo gênero foi proposto e estas espécies passaram a ser denominadas *Parabacteroides distasonis* e *Parabacteroides merdae*. Tais espécies são classificadas como bactérias anaeróbias estritas, na forma de bastonetes Gram negativos, não esporulados e resistentes à bile. São importantes componentes da microbiota anfibiótica de homens e animais, colonizando diversos sítios como a cavidade oral, o trato gastrointestinal e o trato genital feminino, participando efetivamente do metabolismo do hospedeiro através da produção de vitaminas essenciais, cofatores e ácidos graxos. As doenças infecciosas causadas por essas espécies ocorrem, geralmente, a partir de alterações nestes sítios anatômicos ocasionadas por traumas, cirurgias, uso de antimicrobianos e outras condições que podem interferir com o equilíbrio da microbiota (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

Alguns fatores de virulência têm sido descritos na tentativa de determinar o comportamento patogênico desses microrganismos. Entretanto, estes estudos têm se restringido principalmente à espécie *B. fragilis* devido a sua maior prevalência e importância clínica (KALKA – MOLL *et al.*, 2001).

Uma dos fatores mais bem estudados na espécie *B. fragilis* é a expressão de um complexo polissacarídico capsular (CPC) que possui a clássica função anti-fagocitária, além da capacidade de induzir a formação de abscessos intra-abdominais e promover a aderência a células do hospedeiro (PRUZZO, GUSMAN & RICHETTI, 1989). O CPC é composto por polissacarídeos distintos com diferentes propriedades antigênicas e que se mantêm juntos por interações iônicas (ONDERDONK *et al.*, 1977; SHAPIRO *et al.*, 1986). É importante ressaltar que a principal característica dos polissacarídeos capsulares de *B. fragilis* é a presença de grupos com cargas positivas e negativas em cada unidade repetitiva. Estes domínios específicos carregados (“zwitterions”) são essenciais para a atividade biológica destas moléculas, em especial no que diz respeito à indução de abscessos (KALKA – MOLL *et al.*, 2001). Estudos mais recentes realizados por Krinos e colaboradores em 2001, verificaram que *B. fragilis* é capaz de modular a apresentação destes antígenos de superfície em função de uma ampla combinação de polissacarídeos, possivelmente representando um importante fator na manutenção do microrganismo no hospedeiro.

A capacidade dos microrganismos em aderir a tecidos do hospedeiro é considerada como um fator determinante para o estabelecimento de processos de colonização e infecção (BEACHEY, 1981). Para *B. fragilis*, diversas estruturas de superfície também já foram descritas como possíveis adesinas (ONDERDONK *et al.*, 1977; HOFSTAD, 1992; PATRICK, 1993). As fimbrias parecem estar envolvidas em processos de hemaglutinação e adesão à células intestinais humanas (PRUZZO, DANIELLI, & RICHETTI, 1984; FERREIRA *et al.*, 1999), adesinas do tipo lectina já foram descritas para a espécie (ROGEMOND & GUINET, 1986), assim como ácido siálico e macromoléculas ricas neste açúcar foram identificados como possíveis receptores para estas adesinas (DOMINGUES *et al.*, 1992). Poucos estudos voltados para a análise da capacidade de aderência de cepas de *B. fragilis* aos componentes da matriz extracelular (MEC) foram realizados. Em 1994, Nagy, Manneke & Werner observaram que cepas pertencentes às espécies *B. fragilis* e *B. vulgatus* possuíam uma maior capacidade de aderência a fibronectina. Mais recentemente, em um estudo conduzido por nosso grupo, Ferreira e colaboradores (2006), identificaram uma proteína de membrana externa capaz de se ligar a laminina e esta se mostrou idêntica a uma proteína anteriormente descrita como ligadora de plasminogênio, a Bfp60 (SIJBRANDI *et al.*, 2005). Dessa forma, a possibilidade de interação bacteriana com o sistema fibrinolítico do hospedeiro pode provocar danos a componentes da MEC, incrementando o potencial de disseminação durante a infecção e em um segundo momento, possibilitar a formação de um

ambiente propício à multiplicação de bactérias anaeróbias (GOGUEN, HOE & SUBRAHMANYMYAM, 1995; LÄHTEENMÄKI, EDELMAN & KORHONEN, 2005).

A produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar diferentes componentes dos tecidos também vem sendo descrita como potencial fator de virulência de espécies do gênero, visto que tem se especulado sobre um possível papel dessas enzimas na nutrição e disseminação de cepas de *Bacteroides* no hospedeiro (BOTTA *et al.*, 1994).

Myers e colaboradores (1984; 1985), na década de 1980, descreveram uma proteína com propriedade enterotoxigênica como um novo fator de virulência para a espécie *B. fragilis*. Esta enterotoxina, denominada *Bacteroides fragilis toxin* – BFT, é uma metalo-protease dependente de zinco que altera a barreira paracelular através da clivagem das proteínas responsáveis pelas junções intercelulares entre as células epiteliais (MONCRIEF *et al.*, 1998). Os genes que codificam a BFT estão localizados em uma ilha de patogenicidade que alberga ainda o gene de uma segunda metalo-protease (MONCRIEF *et al.*, 1998). As cepas que possuem esta característica são denominadas ETBF (do inglês “enterotoxigenic *B. fragilis*”) e têm sido isoladas de seres humanos e de outros animais com processos diarreicos (MYERS *et al.*, 1984, 1985; PANTOSTI *et al.*, 1997). Atualmente, sabe-se que a BFT atua na degradação da E caderina, contribuindo para alterações na permeabilidade, inflamação e até no desencadeamento de câncer de cólon (WU *et al.*, 2003).

A epidemiologia da resistência aos antimicrobianos em cepas de *Bacteroides* isoladas de espécimes clínicos e da microbiota intestinal tem merecido um certo destaque, uma vez que esses microrganismos, podem ser responsáveis pela disseminação de determinantes de resistência (SALYERS, GUPTA & WANG, 2004). Além disso, cabe salientar a importância da detecção de cepas resistentes em amostras da microbiota intestinal humana visto que essas podem emergir como possíveis patógenos endógenos (SOUZA *et al.*, 2000). Dentre essas cepas, aquelas pertencentes à espécie *B. fragilis*, são as mais isoladas de espécimes clínicos obtidos, por exemplo, a partir de abscessos intra-abdominais e pélvicos, além de bacteremias, apesar da espécie representar um componente minoritário da microbiota intestinal de humanos (GIAMARELLOU, 2000). Já as espécies ditas “não-*fragilis*” são os componentes de maior concentração nas populações de microbiota do cólon.

O “grupo *B. fragilis*” é um grupo heterogêneo quanto à susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, especialmente aos β - lactâmicos e à clindamicina. A espécie *B. fragilis* permanece como a mais susceptível aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por anaeróbios. Recentemente, foi relatado, no entanto, um aumento na taxa de isolamento das espécies “não-*fragilis*” a partir de processos infecciosos, com notável aumento na percentagem de cepas pertencentes as espécies *B. uniformis* e *B. caccae* (SNYDMAN *et al.*, 1999; ALDRIDGE & O’BRIEN, 2002). Esses dados são relevantes tanto na escolha da terapia empírica quanto na epidemiologia de infecções, tendo em vista a maior prevalência de novas espécies (SNYDMAN *et al.*, 1999). O fenômeno da resistência aos antimicrobianos e a disseminação dos elementos genéticos associados a estes fenótipos têm se mostrado como um dos maiores problemas na clínica médica, limitando cada vez mais as opções terapêuticas.

Em um estudo multicêntrico de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *B. fragilis*, envolvendo países da Europa e os Estados Unidos (KOETH *et al.*, 2004), foi detectada a presença de cepas multi-resistentes ao imipenem, à clindamicina e à combinação de amoxicilina e ácido clavulânico. Neste estudo, foi possível observar ainda a presença de duas cepas resistentes ao metronidazol, considerado um dos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por anaeróbios.

Em estudo realizado em nosso laboratório, Souza e colaboradores (2000) analisaram comparativamente o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos no período de 1991 a 1998 e cepas isoladas de microbiota intestinal coletadas no mesmo período. Foi demonstrado que aproximadamente 27% das cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos e 41% das cepas isoladas de amostras de microbiota intestinal se mostraram resistentes a clindamicina. Todas as cepas isoladas de espécimes clínicos se mostraram resistentes à penicilina. Neste estudo também foi investigada a presença do gene *cfiA*, que confere resistência a carbapenemas e aos β -lactâmicos como a cefoxitina, sendo este detectado em 2 cepas isoladas de espécimes clínicos.

As espécies de *Bacteroides* têm sido consideradas, por muitos autores, instrumentos importantes no estudo dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos por apresentaram um grande espectro de mecanismos de resistência desenvolvidos contra os agentes antimicrobianos mais utilizados. Conjugado a problemática da resistência, esses microrganismos dispõem de uma gama considerável de elementos genéticos móveis

responsáveis pela disseminação de determinantes de resistência (WANG *et al.*, 2003; SALYERS, GUPTA & WANG, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006).

Com objetivo de introduzir ao leitor importantes aspectos da resistência nos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, considerações biológicas e epidemiológicas da resistência aos antimicrobianos utilizados nesse estudo serão apresentadas de forma sucinta.

1) Resistência a Tetraciclina

A tetraciclina, considerada inicialmente como uma droga promissora para tratamento de infecções anaeróbias, se mostrou ineficaz já no início da década de 1970, quando foram detectadas cepas de *Bacteroides* resistentes. Atualmente, praticamente todas as cepas avaliadas apresentam fenótipo de resistência à tetraciclina (SALYERS & SHOEMAKER, 1996; PAULA *et al.*, 2004). A entrada desta droga na célula ocorre em duas fases: difusão passiva através de poros hidrofílicos na membrana externa e transporte ativo através da membrana citoplasmática. Uma vez no interior da célula, o antimicrobiano se liga a subunidade 30S do ribossomo bacteriano e impede a ligação de aminoacil-tRNA ao seu sítio de ligação no ribossomo (ROBERTS, 1996). Estudos genéticos utilizando cepas de *Bacteroides* isoladas de microbiota humana têm mostrado que este gênero possui elementos conjugativos responsáveis pela transferência de genes (SALYERS & SHOEMAKER, 1992; SALYERS *et al.*, 1995) como os transposons conjugativos (CTn) da família CTnDOT, que carregam o gene de resistência a tetraciclina, *tetQ*. A excisão é estimulada por tetraciclina (CHENG *et al.*, 2001) e estudos anteriores identificaram quatro genes essenciais para este evento (STEVENS, SHOEMAKER & SALYERS, 1990; CHENG *et al.*, 2001). Um deles foi identificado como sendo uma integrase denominada *intDOT* localizado em uma extremidade do CTn. Os outros genes estão localizados em um *cluster* denominado *orf2c* localizado à jusante do gene da integrase. A expressão de *intDOT* parece ser constitutiva devido a ocorrência de eventos de integração na presença e ausência de tetraciclina (CHENG *et al.*, 2000). Dessa forma, os genes responsáveis pela excisão regulada do CTn estão localizados no *cluster orf2c*. Entretanto, outros genes parecem ser responsáveis pela regulação dos genes presentes no operon *orf2c*, sendo denominados *rteA*, *rteB* e *rteC* (STEVENS *et al.*, 1993). Na presença de tetraciclina, as proteínas RteA e RteB estimulam a expressão de *rteC*. Posteriormente, RteC atua como ativador para estimular a expressão de genes no operon *orf2c*. Finalmente, os produtos dos genes desta região suplementam a ação de IntDOT

permitindo a formação de um intermediário circular do CTnDOT. Após essa etapa, ocorre a transferência conjugativa deste intermediário circular à célula receptora. Em seguida, a forma circular é integrada ao cromossomo (WHITLE, SHOEMAKER & SALYERS, 2002; MOON *et al.*, 2005)

O gene *tetQ* codifica uma proteína citoplasmática que possui a seqüência de aminoácidos da porção N-terminal similar aos fatores de alongamento Tu e G. Tal proteína é capaz de tornar a maquinaria de síntese protéica do ribossomo resistente a ação da tetraciclina. As similaridades na seqüência de aminoácidos entre proteínas de proteção do ribossomo e os fatores de alongamento Tu e G sugerem que proteínas ribossomais podem atuar como fatores de alongamento resistentes a tetraciclina ou podem bloquear a ligação da tetraciclina ao ribossomo (ROBERTS, 1996).

Wang, Shoemaker e Salyers (2004), ao estudarem a regulação do operon *tetQ* em cepas do grupo *Bacteroides*, encontraram um segmento de RNAm de 130pb entre o sítio de início da transcrição e o primeiro possível códon de iniciação do gene *tetQ*. Análises dessa região revelaram um complexo “*hairpin*” imediatamente à montante do códon de iniciação da proteína TetQ. Essa estrutura provavelmente impede a ligação do RNAm ao sítio de ligação do ribossomo. Neste estudo também foi demonstrado que RNAm foi produzido independente da estimulação por tetraciclina, ou seja, tanto na presença quanto na ausência de tal antimicrobiano. Esses resultados apoiam a hipótese de que a regulação do operon é mediada por um mecanismo de atenuação da transcrição, onde possivelmente, a estimulação por tetraciclina leva o ribossomo a se mover mais lentamente ao longo da região líder (região entre o sítio de iniciação da transcrição e o códon de iniciação do gene *tetQ*, e então, de alguma forma, essa mobilidade alterada levaria a ruptura de uma região do “*hairpin*”, expondo o sítio de ligação ao ribossomo e, portanto, o mRNA do gene *tetQ* poderia ser traduzido.

Devido a sua alta concentração no cólon humano, as espécies do grupo *Bacteroides* parecem estar envolvidas na transferência horizontal de genes. Uma indicação deste evento é a observação de que quase todas as cepas de *Bacteroides* isoladas de processos infecciosos são resistentes a tetraciclina pela aquisição de um único gene, o *tetQ*, encontrado em um transposon conjugativo. Dessa forma, o gene *tetQ* é utilizado como marcador genético em estudos que visam detectar a transferência horizontal de genes entre espécies do grupo *Bacteroides* e outros gêneros (SHOEMAKER *et al.*, 2001; SALYERS, GUPTA & WANG, 2004).

2) Resistência a Macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas

Os componentes do grupo denominado MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas) compartilham sítios superpostos de ligação no centro peptidiltransferase (PTC) na subunidade 50S do ribossomo. A resistência aos macrolídeos confere resistência aos outros componentes do grupo (MOAZED & NOLLER, 1987). Interações entre os componentes do grupo MLS mostram que esses compostos se ligam aos domínios II e V do rRNA 23S, bloqueando a formação de ligações peptídicas (HANSEN, MAUVAIS & DOUTHWAITE, 1999; HANSEN, KIRPEKAR & DOUTHWAITE, 2001; POEHLSSGAARD & DOUTHWAITE, 2003). A clindamicina e a eritromicina, drogas usadas no tratamento de infecções por anaeróbios são representantes do grupo, sendo a primeira uma lincosamida e a segunda, um macrolídeo. Os percentuais de cepas resistentes à clindamicina e à eritromicina em diversos países tem variado drasticamente, sendo influenciado possivelmente pelo nível de consumo destes fármacos. Estudos têm constatado a elevação considerável destas taxas de resistência, o que torna essencial a aplicação de políticas rigorosas de vigilância (DUBREUIL *et al.*, 1992; WATANABE, UENO & KATO, 1992; HECHT, VEDATAM & OSMOLSKI, 1999).

Dois mecanismos distintos de resistência foram descritos. O primeiro deles se dá por uma bomba de efluxo codificada pelo gene *mefA*, primeiramente descrito em cepas de *Streptococcus pyogenes* (CLANCY *et al.*, 1996). Esse fenótipo descrito como fenótipo M, gera baixos níveis de resistência à eritromicina, porém, não leva à resistência à clindamicina. O segundo mecanismo é comumente encontrado entre as espécies de *Bacteroides*. Neste caso, uma metilase codificada pelo gene *erm* promove a metilação de um ou dois resíduos de adenina no RNAr 23S, num evento similar ao que ocorre em estafilococos com fenótipo de resistência a macrolídeos/lincosamídeos/estreptogramina B (MLS) (MARSH *et al.*, 1983).

O gene que codifica resistência à eritromicina, *ermF*, foi primeiramente associado ao gênero *Bacteroides* e gêneros relacionados (WANG *et al.*, 2003). O mesmo pode ser carregado em transposons conjugativos (CTns), como por exemplo CTnDOT, que além do gene *ermF* carrega o gene de resistência à tetraciclina, *tetQ*. Este transposon está amplamente disseminado no gênero *Bacteroides* e pode estar diretamente relacionado a eventos de transferência horizontal de genes (WANG *et al.*, 2003). Alguns estudos com cepas do gênero *Bacteroides*, identificaram o gene *ermF* como o determinante de resistência predominante para eritromicina (SHOEMAKER *et al.*, 2001; WHITTLE *et al.*, 2001).

No entanto, algumas cepas de *Bacteroides* apresentaram o gene *ermG*, previamente descrito em *Bacillus sphaericus*, uma bactéria Gram-positiva presente no solo (MONOD,

MOHAN & DUBNAU., 1987). A sequência de DNA do gene *ermG* detectado em cepas do gênero *Bacteroides* apresentou 99% de similaridade com a sequência descrita em *B. sphaericus* (COOPER, SHOEMAKER & SALYERS, 1996). Wang e colaboradores (2003), através de estudos moleculares detectaram CTns de aproximadamente 75Kb, carreando o gene *ermG* em cepas do gênero *Bacteroides* denominando-o CTnGERM1. Foi verificado que este elemento móvel não está relacionado aos CTns da família CTnDOT, visto que este CTn transfere o gene *ermG* independentemente do co-residente *tetQ*.

Paula e colaboradores (2004), através da técnica da reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR), detectaram o gene *ermF* em 11% das cepas resistentes à clindamicina analisadas. Essas cepas carreavam também o gene *tetQ* e provavelmente pertencem a família Tc^rErm^r. No entanto, em 16 cepas resistentes à clindamicina, não foi detectado o gene *ermF*. É possível que outros genes como *ermG* e *ermB*, também detectados no gênero *Bacteroides*, estivessem envolvidos nesse fenótipo (SHOEMAKER *et al.*, 2001).

3) Nitroimidazóis

Os 5-nitroimidazóis (5-Ni) (metronidazol, tinidazol e ornidazol) compõem um dos principais grupos de antimicrobianos utilizado no tratamento de infecções anaeróbias, pois apresentam uma excelente atividade, principalmente devido aos baixos percentuais de cepas resistentes detectados até o momento (< 5%) (DUBREUIL *et al.*, 1992; WATANABE, UENO & KATO, 1992; PATEY *et al.*, 1994). Os 5-Ni são pró-drogas inativadas que entram na célula por difusão simples e sua posterior ativação requer redução intracelular do grupo nitro resultando na produção de intermediários de vida curta: radicais nitro-aniônico(R-NO₂), nitroso (R-NO) e o hidroxilamino (R-NHOH). Acredita-se que o radical nitro-aniônico seja a molécula mais ativa, capaz de oxidar macromoléculas, particularmente o DNA, culminando com a quebra das fitas simples e duplas, sua subsequente degradação e morte celular (CHURCH & LAISHLEY, 1995; REYSSET, 1996). Os 5-Ni são estáveis somente sob condições anaeróbias, sendo prontamente inativados na presença de oxigênio (EDWARDS, 1993).

Em um estudo molecular foi demonstrado que o fenótipo de susceptibilidade reduzida ao metronidazol estava associado à presença de genes denominados *nim* (REYSSET, HAGGOLD & SEBALD, 1993; REYSSET, 1996). Foram identificados quatro genes relacionados a esse fenótipo em espécies de *Bacteroides*, três deles localizados em plasmídios mobilizáveis (*nimA*, *nimC* e *nimD*) e o quarto (*nimB*) mapeado no cromossomo (HAGGOLD

et al., 1994; TRINH *et al.*, 1995). Em 1997, Carlier e colaboradores, analisando propriedades fenotípicas de cepas resistentes e sensíveis ao metronidazol, sugeriram que os genes *nim* (A,B,C e D) codificam uma redutase que converte 4- ou 5- nitromidazóis a 4- ou 5- aminoimidazóis, impedindo desta forma a formação de radicais nitrosos tóxicos, os quais são essenciais para atividade antimicrobiana. Em 2000, Stubbs e colaboradores caracterizaram um novo gene através das técnicas de PCR e “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP), o qual exibiu 75% de similaridade com a seqüência do gene *nimB*, e passou a ser designado *nimE*. Recentemente, foi detectado o gene *nimE* no gênero *Veillonella*, apresentando 99,8% de similaridade com o gene descrito em *B. fragilis*. Tal estudo sugere que o gene esteja localizado em um plasmídio presente em poucas cópias na célula (MARCHANDIN *et al.*, 2004). Mais recentemente, um novo gene designado como *nimF*, apresentando 78% de similaridade com o gene *nimD*, foi descrito em uma cepa do grupo *B. fragilis* (LÖFMARK *et al.*, 2005). Em 2004, Gal e Brazier, detectaram um novo padrão de fragmento no RFLP, encontrando um novo gene *nim*, *nimG*, que compartilha 83% de similaridade com o gene *nimB* previamente descrito. A resistência ao metronidazol tem sido relatada na Europa (DUBLANCHET *et al.*, 1986), África (LUBBE, STANLEY & CHALKLEY, 1999) e mais recentemente nos EUA (SCHAPIRO *et al.*, 2004).

Em estudo realizado em nosso laboratório, foram detectadas 10 cepas de *Bacteroides* apresentando fenótipo de susceptibilidade reduzida a 5-Ni para as quais nenhum gene *nim* foi detectado. Além disso, no mesmo estudo, foi detectada uma cepa de *B. fragilis* carreadora do gene *nimB*, mas que não apresentava tal fenótipo, mostrando-se sensível a esses antimicrobianos. Tais resultados apontam para a importância da avaliação do perfil de resistência aos 5-Ni, já que uma provável iminência de cepas resistentes não pode ser descartada (VIEIRA *et al.*, 2005).

Acredita-se que os genes *nim* estejam “silenciosos” ou estão sendo expressos em níveis que permitam a célula sobreviver na presença de concentrações sub-inibitórias do antimicrobiano. Em *Bacteroides* spp., elementos IS (seqüência de inserção) têm sido envolvidos na modulação da expressão desses genes de resistência (SÓKI *et al.*, 2006).

Sóki e colaboradores (2006) analisaram cepas pertencentes ao gênero *Bacteroides* quanto a presença dos genes *nimA-E*, sua localização em plasmídios ou cromossomo e demonstração do elemento IS ativador. Neste estudo, não foi possível correlacionar um elemento IS específico para cada gene. Porém, um novo elemento IS provou estar associado exclusivamente com o gene *nimE* testado. Neste estudo foi possível observar ainda a presença

dos genes *nimA*, *nimC* e *nimD*, inicialmente associados a plasmídios, albergados no cromossomo.

4) β -lactâmicos

As espécies do “grupo *B. fragilis*” têm sido reconhecidas como as bactérias anaeróbias mais resistentes aos agentes antimicrobianos, principalmente aos β -lactâmicos, desde a década de 1970 (SOUZA *et al.*, 2000). Estes antimicrobianos inibem a síntese da parede celular bacteriana através da ligação às proteínas ligantes de penicilina (PBPs). As PBPs são enzimas responsáveis pelas etapas finais das ligações cruzadas da estrutura da parede celular (MIMS *et al.*, 1993). A inibição de uma ou mais destas enzimas essenciais resulta em acúmulo das unidades precursoras da parede celular, o que por sua vez induz a ativação do sistema autolítico da célula resultando em citólise (MIMS *et al.*, 1993). Dentre os principais tipos de estratégias de resistência aos β -lactâmicos entre as bactérias do gênero *Bacteroides* estão a presença de PBPs de baixa afinidade, decréscimo da permeabilidade da membrana externa e, principalmente, a produção de β -lactamases (NORD & HEDBERG, 1990; RASMUSSEN, BUSH & TALLY, 1997), sendo esta última usada pela maioria das cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos. Bactérias produtoras de β -lactamases secretam a enzima no espaço periplasmático onde são capazes de destruir os antibióticos β -lactâmicos, antes que estes alcancem as PBPs (WALSH, 2000). A maioria dessas enzimas são cefalosporinases constitutivas com atividade contra penicilinas e cefalosporinas de limitado e amplo espectro, inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (PARKER & SMITH, 1993) pertencentes a classe A de Ambler e codificadas pelo gene *cepA* presente no cromossomo ou, raramente, pelo gene *cfxA* (YAMAOKA *et al.*, 1990), detectado no transposon mobilizável Tn4555 (TRIBBLE, PARKER & SMITH, 1999).

Em 2007, Ferreira e colaboradores analisaram a associação entre a presença do Tn4555 e a disseminação do gene *cfxA* em cepas pertencentes aos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*. Neste estudo, foi possível detectar o elemento de transposição albergando o gene *cfxA* em cepas de *P. distasonis* e *B. vulgatus* através de ensaios de hibridização.

Por essa razão, os β -lactâmicos de escolha para o tratamento de infecções associadas a *B. fragilis* incluem combinações de β -lactâmicos/inibidores de β -lactamases, as carbapenemas e, eventualmente, a cefoxitina.

Entretanto, a produção de uma metalo- β -lactamase dependente de zinco por cepas de *B. fragilis* tem comprometido o uso clínico de cefalosporinas e carbapênicos. Esta enzima

codificada pelo gene *cfiA* presente no cromossomo bacteriano (THOMPSON & MALAMY, 1990) ou em plasmídios (BANDOY *et al.*, 1991) pertence ao grupo funcional 3 e é inibida por EDTA (THOMPSON & MALAMY, 1990). A expressão desta metalo- β -lactamase tem sido relatada em cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos nos EUA (CUCHURAL, MALAMY & TALLY, 1986), França (PODGLAJEN *et al.*, 1992) e Reino Unido (RASMUSSEN, GLUZMAN & TALLY, 1991). Tem sido demonstrado, no entanto, que um pequeno número de cepas de *B. fragilis* carregam o gene “silencioso” da metalo- β -lactamase o qual requer migração de uma seqüência de inserção (IS) à montante do gene para que este seja expresso (PODGLAJEN, BREUIL & COLLATZ, 1994).

Sóki e colaboradores (2004) realizaram um “*screening*” em cepas de *Bacteroides* resistentes a carbapenemas isoladas de fezes de indivíduos saudáveis e encontraram cepas de *B. fragilis* positivas para o gene *cfiA* por PCR, porém, estas não apresentavam a IS à montante do referido gene, sendo este inativo. Ainda assim, essas cepas apresentaram atividade meropenemase específica. Neste estudo foi detectada também a presença de uma cepa de *B. distasonis* (atual *P. distasonis*) que não albergava o gene *cfiA*, mas que apresentava atividade de meropenemase, sendo que esta se mostrava maior do que a apresentada pelas cepas positivas para o referido gene por PCR. Esses resultados levam a acreditar na existência de um novo mecanismo de ativação do gene *cfiA* ou de produção de uma nova carbapenemase.

Em estudo realizado pelo nosso grupo, Paula e colaboradores (2004) verificaram a distribuição de determinantes de resistência em cepas de *B. fragilis* isoladas de quadros de bacteremia, microbiota intestinal e trato genital feminino (TGF) no período de 1999-2000. Tal estudo evidenciou a presença do gene *cfiA* em 5% das cepas de um total de 99 cepas analisadas, sendo 40% dessas cepas isoladas de microbiota intestinal, 40% isoladas de TGF e 20% isoladas de bacteremia. Já o gene *cfxA* foi detectado em 24% das cepas das quais 12,5% albergavam também o gene *cfiA*. Esse genótipo mostrou-se igualmente distribuído dentre as fontes de isolamento.

A emergência de resistência a antimicrobianos entre bactérias anaeróbias, principalmente entre as espécies do gênero *Bacteroides* tem se apresentado como um dos maiores problemas na seleção da terapêutica. A compreensão dos mecanismos envolvidos nessa resistência e programas de monitoramento são estratégias que visam minimizar esse quadro e que justificam estudos constantes.

Objetivos

Em função da emergência da resistência aos antimicrobianos dentre as bactérias anaeróbias, principalmente dentre as espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, o objetivo deste estudo foi o de investigar os níveis de resistência aos principais antimicrobianos utilizados na terapia das infecções anaeróbias procurando apresentar os principais determinantes genéticos associados a tais padrões de resistência em cepas isoladas de espécimes clínicos e da microbiota intestinal. Os objetivos específicos deste estudo foram:

- (a) Determinar o perfil de susceptibilidade de cepas de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp. aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina, ampicilina, cefoxitina, clindamicina e metronidazol;
- (b) Detectar os principais determinantes de resistência associados à resistência aos antimicrobianos supracitados nas cepas em estudo através da técnica da PCR;
- (c) Determinar o perfil de susceptibilidade a imipenem e amoxicilina-clavulanato de cepas selecionadas de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp através do teste Epsilométrico.

(1) Cepas bacterianas

Foram analisadas 52 cepas pertencentes ao gênero *Bacteroides* e 8 cepas previamente identificadas como *Parabacteroides distasonis* (tabelas 1 e 2) pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Biologia de Anaeróbios (IMPPG/UFRJ), tendo estas sido isoladas de indivíduos sadios da comunidade e de pacientes internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCCF) e no Hospital Municipal Cardoso Fontes (HMCF), ambos localizados na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, no período de 1999 a 2005, bem como cepas isoladas de pacientes internados no Centre Hospitalier Intercommunal Villeneuve-Saint-George (CHIV), Paris, França, no período de 1999 a 2001, gentilmente cedidas pelo Dr. Jean-Philippe Émond.

(2) Condições de cultivo

As cepas foram reativadas em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”– Dflico) –PRAS (“Pre-Reduced Anaerobically Sterilized”) a partir de estoque em BHI-ágar inclinado, sendo incubadas por 24h a 37°C. Critérios de viabilidade e pureza foram utilizados, após semeadura em placas de ágar sangue suplementadas com vitamina K (menadione) (10 µg/mL, Sigma) e hemina (5 µg/mL, Sigma) (ASS). Após o período de incubação, em ambiente de anaerobiose (80% de N₂, 10% de H₂ e 10% de CO₂), as colônias foram repicadas para novo caldo BHI-PRAS, para avaliação morfo-tintorial pelo método de Gram, modificado por Kopeloff, e confirmação do tipo respiratório (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003)

Eventualmente, cepas com comportamento atípico foram estudadas quanto à capacidade de produção de indol, produção de catalase e fermentação de carboidratos, utilizando métodos convencionais empregando meios PRAS para identificação de espécie (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003) e a identificação foi confirmada utilizando o sistema API 20 A (BioMérieux, S.A., Marcy l’Etoile, França) seguindo as recomendações do fabricante.

(3) Manutenção das cepas

As cepas foram estocadas a -20°C em 10% de leite desnatado (Molico – Nestlé®) acrescido de 20% de glicerol (Vetec) e, durante os experimentos, foram mantidas através de repique de caldo BHI-PRAS para BHI-ágar inclinado (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

(4) Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

(4.1) Método de diluição em ágar

(4.1.1) Antimicrobianos

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos comercializados pela Sigma: Tetraciclina, Ampicilina, Cefoxitina, Clindamicina e Metronidazol para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de todas as cepas estudadas. O preparo das soluções estoques dos antimicrobianos bem como as concentrações atingidas pelos mesmos a partir da diluição do estoque, que variam de 2560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguiram as normas do CLSI (2007).

(4.1.2) Inóculo

As cepas foram cultivadas em caldo BHI-PRAS por 24h a 37°C . As células bacterianas foram diluídas em caldo Brucella (Becton Dickinson, Cockeysville, EUA) e a suspensão bacteriana ajustada a escala 0,5 de McFarland, que se correlaciona com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

(4.1.3) Meio de cultura e preparo das placas

Foi utilizado o meio de cultura Brucella-ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada diluição do antimicrobiano correspondeu a uma placa com 17mL de Brucella-ágar, 1 mL de sangue e 2 mL da diluição correspondente do antimicrobiano. A concentração final do antimicrobiano atingiu a faixa de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,015 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Além das placas com os antimicrobianos, foram preparadas 4 placas sem antimicrobianos como controles de crescimento bacteriano, atestando a qualidade e pureza do teste, antes e após a inoculação.

(4.1.4) Inoculação

As cepas em análise incluindo duas cepas padrão, *B. fragilis* ATCC 25285 e *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, foram incubadas, utilizando-se o replicador de Steers, da seguinte forma:

- (a) Inoculação de duas placas-controles para incubação em atmosfera de anaerobiose e aerobiose antes da inoculação das placas contendo antibiótico;
- (b) Inoculação das placas contendo as soluções de antimicrobianos, seguindo ordem crescente de concentração das soluções do antimicrobiano nas placas;
- (c) Inoculação de duas placas-controles para incubação em atmosfera de anaerobiose e aerobiose após a inoculação das placas contendo antibiótico.

(4.1.5) Incubação

As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em jarra (BBL®) em ambiente de anaerobiose, obtido através da remoção do ar atmosférico das jarras de anaerobiose, utilizando bombas de vácuo e lavagens sucessivas com mistura gasosa de 80% de N₂, 10% de H₂ e 10% de CO₂, retendo-se esta mistura nas jarras de anaerobiose (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). Duas das placas controle, utilizadas antes e após a inoculação das placas contendo antibiótico foram incubadas em ambiente de anaerobiose para confirmação da viabilidade e duas outras em aerobiose para avaliar a pureza das cepas testadas.

(4.1.6) Leitura e interpretação de resultados

Após 48h de incubação, foi realizada a leitura das placas inoculadas, utilizando-se como padrão de crescimento bacteriano as placas sem antimicrobiano incubadas em ambiente de anaerobiose. A CIM foi determinada como a concentração onde ocorreu a redução mais significativa do crescimento, o que pode se manifestar como uma completa inibição do crescimento ou uma diminuição acentuada do mesmo, ou seja, a presença de 2 a 3 colônias. As placas controle incubadas em aerobiose foram examinadas antes da determinação da CIM para cada cepa. Qualquer crescimento nessas placas indicativo de contaminação seguiu-se à repetição do teste. O mesmo procedimento foi feito quando a CIM das cepas padrão testadas, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, se encontrou fora da faixa de concentração estabelecida pelo CLSI (2007).

(4.2) Método do teste Epsilométrico

(4.2.1) Antimicrobianos

Foram utilizadas fitas de Teste-E (ABBIodisk, Solna, Suécia) com imipenem e amoxicilina-clavulanato para a determinação da CIM de cepas selecionadas segundo recomendações do CLSI (2007). A concentração final atingiu a faixa de 256µg/mL a 0,016 µg/mL.

(4.2.2) Inóculo

As cepas foram cultivadas em Brucella (Becton Dickinson, Cockeysville, EUA) ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro por 18h a 37° C. As células bacterianas foram diluídas em caldo Brucella e a suspensão bacteriana ajustada a escala 1 de McFarland, que se correlaciona com aproximadamente 3×10^8 UFC/mL.

(4.2.3) Inoculação

A inoculação foi realizada como auxílio de um *swab* que foi introduzido na suspensão do inóculo. O excesso de fluido foi removido pressionando-se o *swab* contra parede interna do tubo e, em seguida procedeu-se a semeadura em Brucella-ágar-sangue. Após o período de 15 minutos, necessário para que o excesso de inóculo fosse absorvido, uma fita de Teste-E correspondente a cada antimicrobiano utilizado foi posicionada na placa de maneira que os halos de inibição provocados pela diluição dos antimicrobianos no meio não se sobrepusessem. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em jarra (BBL®) em ambiente de anaerobiose. Após 48h de incubação, foi realizada a leitura das placas inoculadas com as cepas selecionadas.

(4.2.4) Leitura e interpretação de resultados

O valor da CIM foi determinado pelo ponto de inibição da elipse que intercepta a lateral da fita. Dessa forma, quando o crescimento ocorre ao longo da fita, nenhuma elipse é vista e o valor da CIM é relatado como maior (>) o maior valor na escala. Quando a elipse de inibição está abaixo da fita, o valor é relatado como menor que (<) o menor valor na escala. O teste E gera valores da CIM a partir de uma escala contínua e pode fornecer resultados entre as diluições convencionais utilizadas pelo CLSI. Dessa forma, o valor da CIM que esteve entre as diluições foi relatado como a maior concentração mais próxima. Para garantir a confiabilidade dos testes, as cepas padrão *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 foram utilizadas. Foi realizada ainda a contagem de colônias para verificar a densidade do inóculo em relação a células viáveis (CFU/mL). Esse teste

consistiu em diluir a suspensão de inóculo em 1:1000 e semear 1µL em meio Brucella agar sangue. Um inóculo aceitável forneceu entre 100 e 500 colônias, ou seja, 5×10^8 CFU/mL .

(5) Verificação da produção de metalo-β-lactamase (MBL)

A produção de MBL foi verificada usando a fita de Teste-E MBL. Essa fita é constituída de diferentes concentrações de imipenem compreendidas entre 4 e 256µg/mL. Na extremidade oposta, a fita é constituída de imipenem e EDTA em concentrações que variam de 1,0 a 64µg/mL. O inóculo foi preparado de acordo com o item 4.2.2 de Material e Métodos. Em seguida, o inóculo foi aplicado em meio de cultura Brucella-ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro com o auxílio de *swab* como descrito previamente no item 4.2.3 de Material e Métodos. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em jarra (BBL®) em ambiente de anaerobiose. Após 48h de incubação, foi realizada a leitura das placas inoculadas com as cepas selecionadas. A produção de MBL foi verificada quando ocorreu a redução de 8 vezes da CIM do imipenem na presença de seu inibidor (EDTA) (WALSH *et al.*, 2005)

(6) Detecção de determinantes de resistência

Todas as cepas foram avaliadas através da técnica de PCR para detecção dos seguintes determinantes de resistência: *tetQ* (proteína que confere proteção ao ribossomo, sítio alvo da tetraciclina), *cepA* (cefalosporinase constitutiva), *cfxA* (cefalosporinase presente em plasmídeos), *cfiA* (carbapenemase), *ermF* (metilase) e *nim* (redutase). Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

(6.1) Extração de DNA cromossômico.

O crescimento bacteriano foi obtido a partir de cultura incubada por 24h em caldo BHI-PRAS ou de colônias obtidas de placas de ágar sangue suplementado (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). O DNA foi extraído como descrito por Pitcher, Saunders & Owen, 1989. Brevemente, as células bacterianas foram ressuspensas em 100µL de tampão TE (10mM de Tris-HCl - Sigma; 1mM/1 EDTA - Sigma, pH 8,0) e foram lisadas em uma solução contendo 500µL de isotiocianato de guanidina (GibcoBRL – Life Technologies) a 5 M. As suspensões celulares agitadas, manualmente, foram incubadas à temperatura ambiente (TA) por 5 a 10min. Os lisados foram então resfriados no gelo, adicionando-se 250µL de acetato de amônio (Vetec) a 7,5 M, agitando-se

manualmente os tubos e em seguida, incubando-se por 10min (gelo). Uma solução de 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v - Vetec) foi adicionada e a mistura agitada. Em seguida, foi realizada centrifugação por 10min a 13000 xg. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado isopropanol (Vetec) gelado numa proporção de 0,54 vezes o volume final dos tubos, ou seja, aproximadamente 430µL. Os tubos foram, então, invertidos por 1min para misturar as soluções. O precipitado fibroso de DNA foi depositado no fundo do tubo por centrifugação a 7000 xg por 20s. O sedimento de DNA foi então lavado 5 vezes com etanol (Vetec) 70%. Os tubos permaneceram abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Finalmente, os sedimentos foram diluídos em 50µL de tampão TE pH 8,0.

(7) Amplificação de determinantes de resistência por PCR

Para a amplificação dos genes *tetQ*, *ermF*, *nim*, *cepA*, *cfxA* e *cfiA*, a mistura de reação foi preparada em um volume total de 25µL contendo 50ng de DNA, 10mM Tris/HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200µM de dNTP e 25µM de cada iniciador descrito a seguir e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies). Os iniciadores, controles positivos e controles negativos que foram utilizados no trabalho estão na tabela 3.

Todas reações de PCR foram realizadas em termociclador (Gene Amp® PCR System 9700) e após amplificação, 10µL de cada produto de PCR foram analisados em gel com 1% de agarose, através de eletroforese horizontal em tampão TBE (89 mM de Tris – Sigma, 89 mM de ácido bórico - Vetec, 2nM de Na₂ EDTA - Sigma, pH 8,25). Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de 0,5µg/ mL de brometo de etídio (Sigma) e os *amplicons* gerados visualizadas usando um transiluminador de luz UV. Um marcador de tamanho de fragmento de 100pb (GibcoBRL) foi aplicado em todo gel analisado.

(8) Confecção da sonda para o gene *erm*

Dados na literatura (SALYERS & AMABILE-CUEVAS, 1997; PAULA *et al.*, 2004) relatam a presença do fenótipo de resistência a clindamicina em cepas negativas quanto a presença do gene *ermF* em ensaios de PCR. Cepas com esse comportamento podem apresentar alterações na região de anelamento dos iniciadores . Dessa forma, foram realizados ensaios de hibridização na tentativa de detectar o gene *ermF* em cepas que apresentaram o fenótipo de resistência à clindamicina e ausência do determinante de resistência associado.

(8.1) Dosagem de DNA total por Espectrofotometria

Esse método foi inicialmente descrito por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). Resumidamente, após a extração, as amostras de DNA foram diluídas 50 vezes em tampão TE e dosadas em espectrofotômetro Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech nos comprimentos de onda 260nm e 280nm. Em 260nm é possível calcular a concentração de ácido nucléico na amostra, pois uma densidade ótica (DO) igual a 1 corresponde a aproximadamente a 50µg/mL de DNA. A taxa detectada entre as leituras de 260nm e 280nm (DO_{260}/DO_{280}) permite estimar a pureza do ácido nucléico.

(8.2) Purificação do produto da PCR

A referida sonda foi construída a partir da seqüência amplificada do gene *ermF* da cepa de *B. fragilis* 4720-3 (PAULA *et al.*, 2004), a qual alberga o referido gene. A primeira etapa foi a purificação direta do produto de PCR, que foi realizada com o *kit* comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) de acordo com o manual do fabricante. Resumidamente, foram aplicados 500µL de tampão de captura e 100µL do produto da PCR em uma minicoluna. Após homogeneização suave, a mistura foi centrifugada a 13000 xg por 30s. O material não retido pela coluna foi descartado e, após a adição de 500µL de tampão de lavagem, a minicoluna foi novamente centrifugada a 13000 xg por 30s. A minicoluna foi, então, transferida para um tubo de microcentrífuga. Após a adição de 50µL de tampão de eluição [TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA, 1 mM) pH 8,0], a minicoluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 min. Foi realizada uma nova centrifugação a 13000 xg por 1 min. O microtubo contendo o DNA purificado foi armazenado a – 20° C.

(8.3) Marcação da sonda

A marcação do fragmento da PCR com digoxigenina foi realizada segundo o *kit* comercial *DIG DNA Labeling and Detection* (Roche, Penzberg, Alemanha). O DNA obtido na purificação foi desnaturado por fervura durante 10 minutos e rapidamente resfriado em gelo. Ainda em gelo, foram adicionados 2µL de mix hexanucleotídeo 10X, 2µL de mistura dNTP 10X (dATP 1mM, dGTP 1mM, dCTP 1mM, dTTP 0,65mM, DIG-11-dUTP 0,35mM) e 1µL de enzima Klenow (2 U/µL). A mistura foi centrifugada brevemente e incubada por pelo menos, 60 min a 37°C. Dois microlitros de EDTA 0,2M pH 8,0 foram adicionados para cessar a reação.

Para precipitar o DNA marcado foram adicionados 2,5µL de LiCl 4M e 75µL de etanol pré-resfriado (-20°C). Após homogeneização, a mistura foi incubada por 30 minutos a -70°C ou 2h a -20°C. Após este período, foi realizada a centrifugação 10000xg por 15 min. O sedimento foi lavado com 50µL de etanol (70%) gelado, secado brevemente e dissolvido em 50µL de tampão TE. A sonda foi armazenada a -20°C até sua utilização. Para um controle da reação foram utilizados 5µL de DNA-controle, cedido pelo fabricante.

(8.4) DNA *Dot Blot*

Esse método foi inicialmente descrito por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). Resumidamente, a membrana de nylon Hybond N (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizada foi inicialmente umedecida em tampão SSC 10 X (NaCl 3M, Citrato de sódio 0,3M, pH 7) e seca a temperatura ambiente sobre um papel de filtro sob superfície plana. Em paralelo, as amostras de DNA de cepas selecionadas foram desnaturadas por fervura por 5 min e rapidamente resfriadas em gelo. Após a secagem da membrana, 4µL das amostras de DNA foram aplicados em pontos distintos. Para fixar o DNA na membrana, esta foi deixada a 80° C por 2h e logo após submetida a hibridização com a sonda marcada com digoxigenina (etapas descritas a partir do item 9) ou estocada a -20° C até o momento do uso.

(8.5) Hibridização

Vinte mililitros de tampão de pré-hibridização [5x SSC, N-laurilsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, solução de bloqueio 1%] foram pré-aquecidos para a temperatura de hibridização de 42°C em forno de hibridização *Hybridizer HB-3D* (Techne, São Paulo, Brasil) juntamente com a membrana por 30 minutos sob agitação suave. A sonda marcada (5 – 25 ng/mL) foi desnaturada por fervura durante 5 minutos, resfriada rapidamente em água gelada e adicionada ao tampão de hibridização pré-aquecido. Após incubação sob suave agitação por 18 horas, foram realizadas lavagens pós-hibridização: 2 lavagens de 5 minutos em abundância com 2x SSC e SDS 0,1%, em temperatura ambiente e 2 lavagens de 15 minutos em 0,1x SSC e SDS 0,1% sob agitação constante a 42°C em forno de hibridização *Hybridizer HB-3D*.

(8.6) Detecção Imunológica

Após a hibridização e lavagens de estringência, a membrana foi lavada brevemente (1-5 min) em tampão de lavagem [tampão ácido maleico pH 7,5 (ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M)], 3% Tween® (v/v) e, em seguida incubada por 30 minutos em 100mL de solução de bloqueio 1%. Posteriormente, a membrana foi incubada por 30 minutos em 20 mL de solução de anticorpos (conjugado anti-Digoxigenina-AP – 75u/mL). A membrana foi, então, lavada 2 vezes por 15 minutos com 100mL de tampão de lavagem e equilibrada 2-5 minutos em 200 mL de tampão de detecção (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl₂ 0,05M pH 9,5). Em seguida, foi incubada por 5 minutos em 10 mL de solução substrato-cor [nitroblue tetrazolium salt e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP) em tampão de detecção] preparada no momento do uso, e acondicionada em frasco escuro. O precipitado de coloração azul começou a se formar em 30 minutos e a reação se completou após 16 horas. A partir do momento em que as intensidades desejadas do *spot* foram alcançadas, a reação foi interrompida pela lavagem da membrana por 5 minutos com 50mL de água destilada. Uma amostra foi considerada positiva quanto à presença do gene *erm* quando apresentou um *spot* com coloração azul. Os resultados foram documentados pela fotocópia do filtro úmido ou por fotografia.

(9) Seqüenciamento

O DNA das amostras selecionadas foi purificado utilizando-se o *kit* comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) de acordo com o manual do fabricante (item 9.1 e 10.3). Após purificação, as amostras de DNA e uma alíquota dos iniciadores foram enviados para o Centro de Estudo do Genoma Humano, no Instituto de Biociências, na Universidade de São Paulo para seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com protocolo para o *MegaBACE 1000*, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (com *Thermo Sequenase II DNA Polimerase*). As seqüências foram analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12*.

Tabela 1: Origem e identificação de cepas de *Bacteroides fragilis* isolados de processos clínicos selecionadas para este estudo.

Cepas	Período de isolamento	Origem	País de origem	Local de isolamento
1424	2002	Líquido ascítico	França	CHIV
1425	2003	Secreção Purulenta	França	CHIV
1426	2003	Infecção Pélvica	França	CHIV
1427	2003	Bacteremia	França	CHIV
1428	2003	Bacteremia	França	CHIV
1429	2003	Bacteremia	França	CHIV
1430	2003	Abscesso	França	CHIV
1431	2003	Infecção urinária	França	CHIV
1432	2003	Líquido Peritoneal	França	CHIV
1433	2003	Líquido Ascítico	França	CHIV
1434	2003	Líquido Peritoneal	França	CHIV
1435	2003	Secreção Purulenta	França	CHIV
1436	2004	Secreção Purulenta	França	CHIV
1437	2004	Secreção Purulenta	França	CHIV
1438	2004	Apendicite	França	CHIV
1439	2004	Bacteremia	França	CHIV
1440	2004	Secreção Purulenta	França	CHIV
1441	2004	Líquido Peritoneal	França	CHIV
058109	1980	Infecção Intrabdominal	Brasil	HMCF
077225	1980	Infecção Intestinal	Brasil	HMCF
1384-B	1997	Bacteremia	Brasil	HMCF
1419	2001	Indeterminada	Brasil	HUCFF
1423	2004	Secreção Subcutânea	Brasil	HUCFF
1450	2005	Bacteremia	Brasil	HUCFF
1451	2005	Bacteremia	Brasil	HUCFF

Tabela 2: Identificação de cepas de *Bacteroides* spp e *Parabacteroides distasonis* isoladas de microbiota intestinal de indivíduos saudáveis.

Cepas	Período de isolamento	Espécie	Local de isolamento
BA 3.1	1999	<i>P. distasonis</i>	HUCFF
BA 3.2	1999	<i>B. caccae</i>	HUCFF
BA 4.1	1999	<i>B. distasonis</i>	HUCFF
BA 4.2	1999	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
BA 4.3	1999	<i>P. distasonis</i>	HUCFF
BA 4.4	1999	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
BA 4.5	1999	<i>B. distasonis</i>	HUCFF
BA 5.3.1	1999	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
BA 5.3.2	1999	<i>P. distasonis</i>	HUCFF
BA 11.3	1999	<i>B. uniformis</i>	HUCFF
BA 12.2	1999	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
BA 12.11	1999	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 7.1	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 7.3	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 7.5	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 7.9	2000	<i>P. distasonis</i>	HUCFF
MF 12.2	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 12.3	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 12.5	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 12.6	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 12.8	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 12.9	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 12.12	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 13.3	2000	<i>P. distasonis</i>	HUCFF
MF 13.11	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 14.8	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 17.3	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 17.7	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MF 17.10	2000	<i>P. distasonis</i>	HUCFF
MF 19.5	2000	<i>B. fragilis</i>	HUCFF
MIA 21.3	2001	<i>B. fragilis</i>	Lab. Sérgio Franco
MIA 23.4	2001	<i>B. fragilis</i>	Lab. Sérgio Franco
MIA 24.1	2001	<i>B. fragilis</i>	Lab. Sérgio Franco
MIA 24.3	2001	<i>B. fragilis</i>	Lab. Sérgio Franco
MIA 24.4	2001	<i>B. fragilis</i>	Lab. Sérgio Franco

Tabela 3: Genes de resistência pesquisados, seqüência de iniciadores, controles positivos e negativos utilizados nas reações de PCR e tamanho de fragmentos esperados.

Genes de resistência	Seqüência de iniciadores [referências]	Controles positivos	Tamanho do fragmento
<i>tetQ</i>	tetQ1: 5'-GGC TTC TAC GAC ATC TAT TA-3'; tetQ2: 5'-CAT CAA CAT TTA TCT CTC TG-3' [SHOEMAKER <i>et al.</i> , 2001]	4720-3 [PAULA <i>et al.</i> , 2004]	658pb [LENG <i>et al.</i> , 1997]
<i>ermF</i>	F1: 5'-CGG GTC AGC ACT TTA CTA TTG-3'; F2: 5'-GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG-3' [CHUNG <i>et al.</i> , 1999]	4720-3 [PAULA <i>et al.</i> , 2004]	433 pb [RASMUSSEN, ODELSON & MACRINA, 1986]
<i>nim</i>	nim3: 5'-ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG-3'; nim5: 5'-GCT TTC CCT GTC ATG TGC TC -3' [TRINH & REYSSET, 1996]	BF-8 [TRINH & REYSSET, 1996]	458 pb [VIEIRA <i>et al.</i> , 2005]
<i>cepA</i>	cepA1: 5'-TTT CTG CTA TGT CCTGCC C-3'; cepA2: 5'-ATC TTT CAC GAA GAC GGC -3' [GUTACKER <i>et al.</i> , 2000]	ATCC-22285 [GUTACKER <i>et al.</i> , 2004] 2000]	780 pb [PAULA <i>et al.</i> , 2004]
<i>cfiA</i>	cfiA1: 5'-CCA TGC TTT TCC CTG TCG CAG-3'; cfiA2: 5'-GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC-3' [PODGLAJEN <i>et al.</i> , 1992]	AA10 [AVELAR <i>et al.</i> , 2003]	747 pb [WALSH <i>et al.</i> , 2005]
<i>cfxA</i>	cfxA1: 5'-GCT CAA ACA GAT AGT TTT AT -3'; cfxA2: 5'-GAG CTC ACA ATG ATG TTG CC -3' [AVELAR <i>et al.</i> , 2003]	Es36.2 [FERREIRA <i>et al.</i> , 2007]	333 pb [FERREIRA <i>et al.</i> , 2007]

(3.1) Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade a ampicilina, cefoxitina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina foram realizados em todas as cepas pelo método de diluição em agar. As taxas de resistência de *Bacteroides* spp. a tetraciclina, clindamicina, ampicilina e cefoxitina foram 68,3%, 23,3%, 98,3% e 11,7%, respectivamente. Os resultados estão resumidos nas tabelas 4 e 5. Todas as cepas se mostraram uniformemente susceptíveis ao metronidazol. Todas as cepas clínicas provenientes do CHIV, França, se mostraram resistentes à ampicilina e susceptíveis à cefoxitina e metronidazol. As taxas de resistência à clindamicina e tetraciclina foram 16,6% e 77,7%, respectivamente. Uma cepa de *B. fragilis* apresentou susceptibilidade reduzida ao metronidazol com CIM = 8mg/mL. Por outro lado, as cepas clínicas coletadas no HUCFF, Rio de Janeiro, foram susceptíveis a cefoxitina e clindamicina. Todas as cepas se mostraram resistentes a ampicilina e 42,8% foram resistentes a tetraciclina. Uma cepa de *B. fragilis* ainda apresentou susceptibilidade reduzida ao metronidazol com CIM = 8mg/L.

As cepas isoladas de microbiota intestinal mostraram taxas de resistência de 62,9%, 25,9%, 96,3% e 14,8% a tetraciclina, clindamicina, ampicilina e cefoxitina, respectivamente. Duas cepas de *B. fragilis* mostraram susceptibilidade reduzida ao metronidazol (CIM = 4 mg/L e 16 mg/L).

Todas as cepas de *P. distasonis* se mostraram resistentes à ampicilina e susceptíveis ao metronidazol. As taxas de resistência à clindamicina, tetraciclina e cefoxitina foram 50%, 87,5% e 37,5%. Os resultados estão resumidos na tabela 6.

(3.2) Ensaio da PCR

Trinta e seis cepas de *Bacteroides* spp., sendo 14 isoladas de microbiota e 22 isoladas de processos clínicos albergavam o gene *cepA* (tabelas 4 e 5). Entretanto, uma cepa isolada de microbiota que albergava o referido gene se mostrou susceptível a ampicilina. Cinco cepas, sendo três isoladas de quadros clínicos coletadas no CHIV e duas cepas isoladas de microbiota intestinal de indivíduos sadios albergavam o gene *cfxA* porém, essas cepas apresentaram CIM < 64mg/L para cefoxitina. Vinte e nove cepas foram negativas para o gene *cepA*, sendo que destas, dez cepas, nove isoladas de microbiota intestinal e apenas um cepa isolada de líquido ascítico coletada no CHIV, carregavam o gene *cfiA*. O gene *tetQ* foi detectado em 33 cepas, sendo 14 isoladas de microbiota intestinal e 12 isoladas de quadros

clínicos. Destas, uma cepa isolada de secreção purulenta se mostrou susceptível a tetraciclina (CIM < 0,25 mg/L) e outra cepa isolada de microbiota apresentou perfil intermediário de resistência com CIM = 8 mg/L. Dez cepas resistentes a tetraciclina sendo quatro cepas isoladas de microbiota e seis cepas isoladas de quadros clínicos testadas foram negativas para a presença do gene *tetQ*. De 14 cepas resistentes a clindamicina, apenas três cepas isoladas de processos infecciosos coletadas no CHIV foram positivas para o gene *ermF*. Ainda, uma cepa susceptível a clindamicina (CIM = 0,5mg/L) albergava o referido gene. Quatro cepas, sendo duas isoladas de microbiota intestinal e duas isoladas de quadros clínicos mostraram susceptibilidade reduzida ao metronidazol (CIM 4 a 16 mg/L), mas apenas uma cepa isolada de processos infecciosos albergavam o gene *nim* identificado como *nimD* por seqüenciamento (Figura 1). Em contrapartida, uma cepa isolada de microbiota susceptível ao metronidazol (CIM = 1 mg/L) foi positiva para o gene *nim* pela metodologia da PCR. O seqüenciamento deste gene o classificou como *nimB* (Figura 2).

Três cepas de *P. distasonis* albergavam o gene *cepA* e mostraram resistência a ampicilina (CIM > 2 mg/L). De cinco cepas negativas para o gene *cepA*, apenas uma foi positiva para o gene *cfiA*. Apenas uma cepa foi resistente a cefoxitina porém, o gene *cfxA* foi detectado em uma cepa susceptível (CIM = 16mg/L). O gene *tetQ* foi detectado em sete cepas sendo todas resistentes a tetraciclina (CIM = 16- 32 mg/L). Quatro cepas se mostraram resistentes a clindamicina, mas o gene *ermF* não foi detectado. O gene *nim* não foi detectado em nenhuma cepa de *Parabacteroides*.

(3.3) Hibridização do gene *ermF*

De 14 cepas resistentes a clindamicina, apenas três cepas clínicas provenientes do CHIV foram positivas quanto à presença do gene *ermF* pela metodologia da PCR. Uma cepa isolada de infecção pélvica carreadora do gene *ermF* e que se mostrou susceptível a clindamicina também foi utilizada neste ensaio. Na tentativa de confirmar este resultado, o ensaio de hibridização utilizando uma sonda preparada a partir da cepa de *B. fragilis* 4720-3 (usado como controle positivo do gene *ermF* na metodologia da PCR foi realizada em cepas isoladas de microbiota. Porém, o gene não foi detectado em nenhuma dessas cepas (Figura 3).

(3.4) Produção de MBL

Baseado nos ensaios de PCR, 24 cepas selecionadas foram separadas em três grupos de acordo com (i) a presença do gene *cfiA* (n = 11), (ii) resistência a cefoxitina e ausência do gene *cfiA* (n = 2) e (iii) perfil de susceptibilidade intermediária a cefoxitina e ausência do gene *cfiA* (n = 11). Estas cepas foram submetidas a testes de susceptibilidade a imipenem e amoxicilina-clavulanato (amox-clav) através da metodologia do teste-E. A resistência a imipenem foi observada apenas no grupo de cepas positivas para a presença do gene *cfiA* apresentando taxa de resistência de 9,1%. Uma cepa se mostrou resistente ao imipenem com CIM = 64mg/L e apresentou ainda, perfil intermediário de resistência a amox-clav. A taxa de resistência a amox-clav para todos os grupos analisados foi 8,3%. A cepa resistente a imipenem foi submetida à detecção de MBL ativa através da metodologia do teste-E (AB Biodisk). Um resultado positivo no teste-E é indicado quando ocorrer uma redução em 8x na CIM do imipenem na presença do inibidor EDTA.

As fitas de teste-E MBL confirmaram a presença de uma enzima funcional sendo que a CIM diminui de 64 mg/L para < 1 mg/L na presença do inibidor (Figura 4).

```

1426 5      AATTGTTG-C-ACAGAAG-AAGCGTTG-CATTCTTGAACGGATGACAAACGGGACGTTGG
60
      |||
nimD 1577  AATTGTTGCCAACAGAAGAAAGCGTTGCCATTCTTGAACGGATGACAAACGGGACGTTGG
1636
1426 61      CTCTTCATGGGGATGACGGCTATCCGTATGCCGTCCCTGTCAGTTATGTATATGCCGATG
120
      |||
nimD 1637  CTCTTCATGGGGATGACGGCTATCCGTATGCCGTCCCTGTCAGTTATGTATATGCCGATG
1696
1426 121     GCAAAATTTACTTCCACAGTGCCATGCAAGGGCACAAA-GTGGATGCCATCCTGCGGAAT
179
      |||
nimD 1697  GCAAAATTTACTTCCACAGTGCCATGCAAGGGC-CAAAGTGGATGCCATCCTGCGGAAT
1755
1426 180     GACAAGGTCTCGTTCTGCGTAGTGGAGCAGGATGAGGTCAAGCCGGCCGAGTTTACCACC
239
      |||
nimD 1756  GACAAGGTCTCGTTCTGCGTAGTGGAGCAGGATGAGGTCAAGCCGGCCGAGTTTACCACC
1815
1426 240     TATTTTCGGAGCGTGATAGTCTTTGGCAAGGCCCGCATACTGACCGAACGAGAACGAAAA
299
      |||
nimD 1816  TATTTTCGGAGCGTGATAGTCTTTGGCAAGGCCCGCATACTGACCGA-CGAGAACGAAAA
1874
1426 300     ACGAAATGCCTTAAACCTGCTGGCCGACAAGTATTCGCATGGCGAAGCGGGCATGGAGGC
359
      |||
nimD 1875  ACGAAATGCCTTAAACCTGCTGGCCGACAAGTATTCGCATGGCGAAGCGGGCATGGAGGC
1934
1426 360     TGAAATGGCCAAAGGGTTCAATCATTTGCTGATGATAGAAATCACAGTAGAGCACATGAC
419
      |||
nimD 1935  TGAAATGGCCAAAGGGTTCAATCATTTGCTGATGATAGAAATCACAGTAGAGCAGATGAC
1994

```

Figura 1: Comparação entre a seqüência do gene *nimD* e a seqüência da cepa *Bacteroides fragilis* 1426. As linhas verticais mostram bases de nucleotídeos idênticas. Linhas horizontais mostram lacunas entre as bases. A comparação foi realizada utilizando o programa BLAST ((www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

```

BA 4.4 1      CAATTATTG-C-ACAGAAGAAAGCGTTG-CATCCTTGAAAGGATGACGAACGGAACATTG
57
      |
nimB 821      CAATTATTGCCAACAGAAGAAAGCGTTGCCATCCTTGAAAGGATGACGAACGGAACATTG
880
      |
BA 4.4 58     GCTCTTCATGGGGACGATGGTTACCCGTATGCCGTTCCCATCAGTTATGTATATGCTGAT
117
      |
nimB 881      GCTCTTCATGGGGACGATGGTTACCCGTATGCCGTTCCCATCAGTTATGTATATGCTGAT
940
      |
BA 4.4 118    GGCAAAATATATTTCCATAGTGCCATGAAAGGTCATAAAGTGGATGCCATTTTGCAGAAT
177
      |
nimB 941      GGCAAAATATATTTCCATAGTGCCATGAAAGGTCATAAAGTGGATGCCATTTTGCAGAAT
1000
      |
BA 4.4 178    GACAAGGTATCATTCTGCGTGGTAGAACAGGATGACATCAGACCGTCTGAGTTTACCACT
237
      |
nimB 1001     GACAAGGTATCATTCTGCGTGGTAGAACAGGATGACATCAGACCGTCTGAGTTTACCACT
1060
      |
BA 4.4 238    TACTTTCGAAGTGTGATAGTCTTTGGCAAAGCCCACATATTGACGGATGAACTCGAAAAA
297
      |
nimB 1061     TACTTTCGAAGTGTGATAGTCTTTGGCAAAGCCCACATATTGACGGATGAACTCGAAAAA
1120
      |
BA 4.4 298    CGTGTGCTTTGGGTTTATTGGCAGACAAGTATTCGTATGGCGAAGCTGGCATGGAGGCT
357
      |
nimB 1121     CGTGTGCTTTGGGTTTATTGGCAGACAAGTATTCGTATGGCGAAGCTGGCATGGAGGCT
1180
      |
BA 4.4 358    GAAATAGCCAAAGGGTCAATCATTTGTTAATAGTGAAAATTGCAATTGAGCACATGACA
417
      |
nimB 1181     GAAATAGCCAAAGGGTCAATCATTTGTTAATAGTGAAAATTGCAATTGAGCATATTACA
1240
      |
BA 4.4 418    GGCA 421
      |
nimB 1241     GGCA 1244

```

Figura 2: Comparação entre a seqüência do gene *nimB* e a seqüência da cepa *Bacteroides fragilis* BA 4.4. As linhas verticais mostram bases de nucleotídeos idênticas. Linhas horizontais mostram lacunas entre as bases. A comparação foi realizada utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

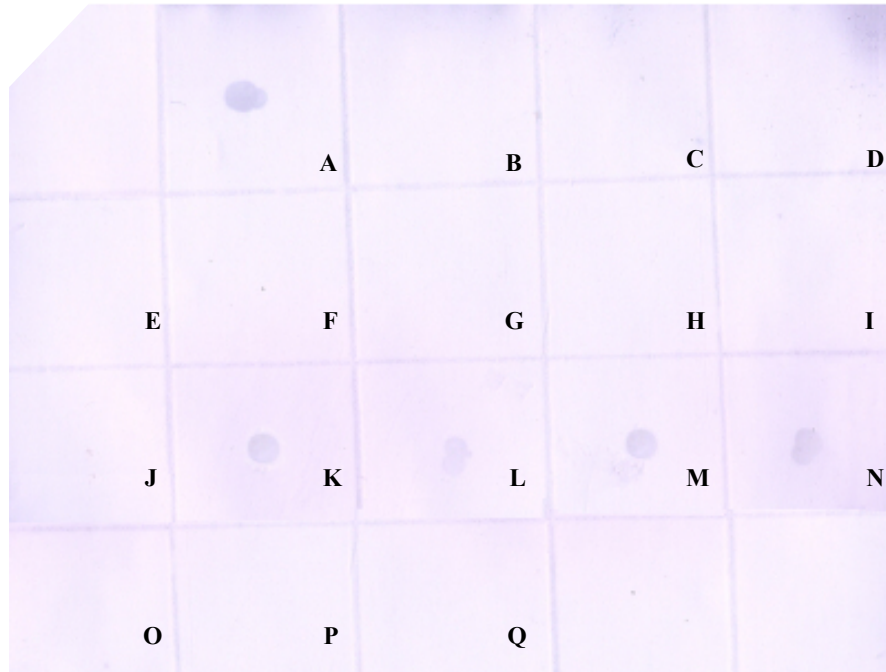


Figura 3: *Dot Blot* de cepas de *Bacteroides fragilis* e *Parabacteroides distasonis* quanto a presença do gene *ermF*. [A]: controle positivo cepa *B. fragilis* 4720-3; [B]: BA 3.1; [C]: BA 4.4; [D]: BA 5.3.1; [E]: BA 5.3.2; [F]: BA 12.2; [G]: MF 7.9; [H]: MF 12.3; [I]: MF 13.3; [J]: MIA 24.1; [K]: 1426; [L]: 1428; [M]: 1429; [N]: 1438; [O]: MIA 24.3; [P]: MIA 24.4; [Q]: controle negativo *B. fragilis* ATCC 25285.

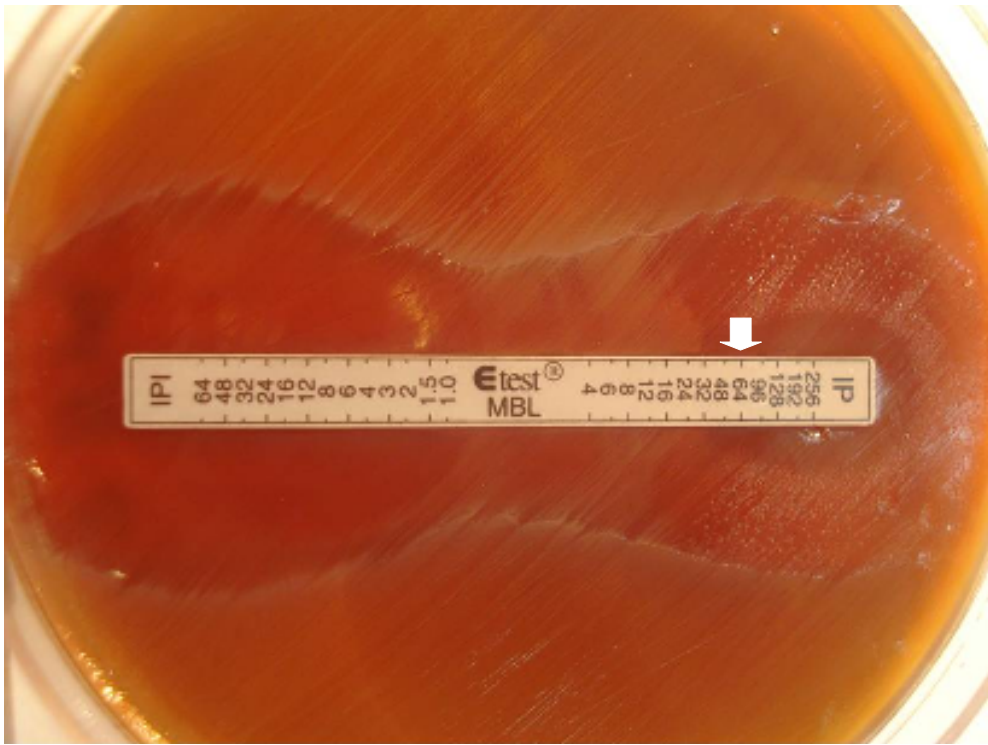


Figura 4: Teste-E MBL para a presença de uma metalo β -lactamase na cepa BA12.2 isolada de microbiota intestinal de humanos. A produção de MBL foi detectada pela redução em 8x da CIM do imipenem na presença do inibidor, EDTA. A seta branca representa o valor da CIM para imipenem apresentada pela cepa BA12.2.

Tabela 4: Perfil de susceptibilidade de cepas de *Bacteroides fragilis* isoladas de espécimes clínicos no período de 1980 a 2005.

Cepas	Ano	Origem	País	cepA	cfxA	cfiA	tetQ	ermF	nim	MET ^a	CLN	TET	CFX	AMP	IMP	ACL
1434	2003	Líquido peritoneal	França	-	-	-	-	-	-	1	0,5	32 ^b	8	32	16	8
1425	2003	Secreção purulenta	França	+	-	-	-	-	-	1	1	1	16	32	ND ^d	ND
1427	2003	Bacteremia	França	+	-	-	-	-	-	1	1	32	16	16	ND	ND
1431	2003	Infecção urinária	França	+	-	-	-	-	-	1	< 0,25	1	8	32	ND	ND
1433	2003	Líquido ascítico	França	+	-	-	-	-	-	1	1	128	16	8	ND	ND
1435	2003	Secreção purulenta	França	+	-	-	-	-	-	1	0,5	32	16	16	ND	ND
1437	2004	Secreção purulenta	França	+	-	-	-	-	-	1	1	< 0,5	16	16	ND	ND
1441	2004	Líquido peritoneal	França	+	-	-	-	-	-	2	0,5	32	8	16	ND	ND
1424	2002	Líquido ascítico	França	+	+	-	-	-	-	1	2	32	32 ^c	32	ND	ND
1432	2003	Líquido peritoneal	França	+	-	-	+	-	-	1	1	32	8	8	ND	ND
1436	2004	Secreção purulenta	França	+	-	-	+	-	-	1	1	32	8	16	ND	ND
1439	2004	Bacteremia	França	+	-	-	+	-	-	0,5	1	32	8	32	ND	ND
1440	2004	Secreção purulenta	França	+	-	-	+	-	-	1	< 0,25	< 0,25	16	8	ND	ND
1428	2003	Bacteremia	França	+	-	-	+	+	-	0,5	> 256	256	16	16	ND	ND
1429	2003	Bacteremia	França	+	-	-	+	+	-	2	> 256	32	16	32	ND	ND
1430	2003	Abscesso	França	+	+	-	+	-	-	1	0,5	32	16	> 256	ND	ND
1438	2004	apendicite	França	+	+	-	+	+	-	1	> 256	32	8	256	ND	ND
1426	2003	Infecção pélvica	França	+	+	+	+	+	+	8	0,5	32	16	8	ND	ND
077225	1980	Infecção intestinal	Brasil	+	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0,5	4	32	ND	ND
058109	1980	Infecção intraabdominal	Brasil	+	-	-	-	-	-	8	0,5	0,5	8	16	ND	ND
1419	2001	Indeterminada	Brasil	+	-	-	-	-	-	1	2	0,5	32	32	0,125	0,5
1423	2004	Secreção subcutânea	Brasil	+	-	-	-	-	-	1	0,5	1	8	16	ND	ND
1451	2005	Bacteremia	Brasil	-	-	-	+	-	-	0,125	0,25	32	1	128	ND	ND
1384-B	1997	Bacteremia	Brasil	+	-	-	+	-	-	1	2	32	8	4	ND	ND
1450	2005	Bacteremia	Brasil	+	-	-	+	-	-	1	0,25	32	32	32	0,25	0,5

a- CIMs em mg/L

b- Números em vermelho: CIMs que indicam resistência;

c- Números em azul: CIMs que indicam padrão intermediário de resistência;

d- ND = Não determinado

Breakoints (mg/L): MET – Metronidazol (S: ≤8, I: 16, R: ≥ 32); CLN – Clindamicina (S: ≤2, I: 4, R: ≥ 8); TET – Tetraciclina (S: ≤4, I: 8, R: ≥ 16); CFX – Cefoxitina (S: ≤16, I: 32, R: ≥ 64); AMP – Ampicilina (S: ≤0,5, I: 1, R: ≥ 2); IMP – Imipenem (S: ≤4, I: 8, ≥ 16); ACL – Amoxicilina-clavulanato (S: ≤4, I: 8, ≥ 16). (CLSI, 2005).

Tabela 5: Perfil de susceptibilidade de cepas de *Bacteroides* spp. isoladas de microbiota intestinal de indivíduos sadios obtidas no período de 1999 a 2001.

Cepas	Ano	Espécie	cepA	cfxA	cfxA	terQ	ermF	nim	MET ^a	CLN	TET	CFX	AMP	IMP	ACL
MF 7.1	2000	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	2	32 ^b	2	64	ND ^d	ND
MF 12.6	2000	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-	-	-	0,5	1	0,5	16	16	ND	ND
MF 12.12	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	4 ^c	0,5	8	16	32	ND	ND
MF 12.5	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	0,5	2	0,5	32	16	0,5	0,5
MF 12.2	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	0,5	0,5	1	16	16	ND	ND
MF 13.11	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	0,5	1	0,5	16	8	ND	ND
MF 17.7	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	2	2	0,5	16	16	ND	ND
MF 14.8	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	0,5	0,5	32	8	16	ND	ND
MF 17.3	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	-	-	2	1	0,5	16	16	ND	ND
BA 12.11	1999	<i>B. fragilis</i>	-	-	-	-	-	-	1	2	32	64	4	4	0,5
MF 7.3	2000	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	-	-	-	1	1	32	2	32	ND	ND
MF 7.5	2000	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	-	-	-	1	1	8	32	32	0,125	0,25
MF 12.8	2000	<i>B. fragilis</i>	+	+	-	-	-	-	1	1	1	16	8	ND	ND
MF 12.9	2000	<i>B. fragilis</i>	+	+	-	-	-	-	0,5	2	0,5	32	1	1	1
MF 12.3	2000	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	+	-	-	0,5	> 256	32	32	4	0,5	0,5
MIA 21.3	2001	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	+	-	-	0,5	1	32	8	8	ND	ND
MIA 24.1	2001	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	+	-	-	0,5	> 256	32	16	64	ND	ND
MIA 24.3	2001	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	+	-	-	1	> 256	64	16	64	ND	ND
MIA 24.4	2001	<i>B. fragilis</i>	+	-	-	+	-	-	0,5	64	32	16	64	ND	ND
BA 4.2	1999	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	+	-	-	1	1	32	64	8	1,5	8
BA 12.2	1999	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	+	-	-	1	> 256	16	64	64	8	8
BA 5.3.1	1999	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	+	-	-	16	> 256	16	64	64	ND	16
MF 19.5	2000	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	+	-	-	0,5	1	32	64	4	0,5	1,0
MIA 23.4	2001	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	+	-	-	1	1	32	16	4	1	2
BA 4.4	1999	<i>B. fragilis</i>	-	-	+	+	-	+	1	8	32	32	16	1	16
BA 11.3	1999	<i>B. uniformis</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	16	32	32	0,25	1
BA 3.2	1999	<i>B. caccae</i>	-	-	+	+	-	-	1	1	32	32	4	2	2

a- CIMs em mg/L

b- Números em vermelho: CIMs que indicam resistência;

c- Números em azul: CIMs que indicam padrão intermediário de resistência;

d- ND = Não determinado

Breakpoints (mg/L): MET – Metronidazol (S: ≤8, I: 16, R: ≥ 32); CLN – Clindamicina (S: ≤ 2, I: 4, R: ≥ 8); TET – Tetraciclina (S: ≤ 4, I: 8, R: ≥ 16); CFX – Cefoxitina (S: ≤ 16, I: 32, R: ≥ 64); AMP – Ampicilina (S: ≤ 0,5, I: 1, R: ≥ 2); IMP – Imipenem (S: ≤4, I: 8, ≥ 16); ACL – Amoxicilina-clavulanato (S: ≤4, I: 8, ≥ 16) (CLSI, 2005).

Tabela 6: Perfil de susceptibilidade de cepas de *Parabacteroides distasonis* isoladas de microbiota intestinal de indivíduos saudáveis obtidas no período de 1999 a 2000.

Cepas	Ano	Espécie	cepA	cfxA	cfiA	tetQ	ermF	nim	MET ^a	CLN	TET	CFX	AMP	IMP	ACL
MF 17.10	2000	<i>P. distasonis</i>	+	-	-	-	-	-	1	1	0,5	16	32	ND ^d	ND
BA 3.1	1999	<i>P. distasonis</i>	-	-	-	+	-	-	1	8 ^b	16	32 ^c	4	0,25	4
BA 4.1	1999	<i>P. distasonis</i>	-	-	-	+	-	-	1	2	16	64	8	0,25	0,25
BA 5.3.2	1999	<i>P. distasonis</i>	-	-	-	+	-	-	2	16	16	32	4	4	0,25
MF 13.3	2000	<i>P. distasonis</i>	-	+	-	+	-	-	0,5	> 256	32	16	4	ND	ND
BA 4.5	1999	<i>P. distasonis</i>	-	-	+	+	-	-	1	2	16	64	8	2	4
BA 4.3	1999	<i>P. distasonis</i>	+	-	-	+	-	-	1	4	32	32	4	2	2
MF 7.9	2000	<i>P. distasonis</i>	+	-	-	+	-	-	1	32	16	32	4	0,25	0,25

a- CIMs em mg/L

b- Números em vermelho: CIMs que indicam resistência;

c- Números em azul: CIMs que indicam padrão intermediário de resistência;

d- ND = Não determinado

Breakpoints (mg/L): MET – Metronidazol (S: ≤8, I: 16, R: ≥ 32); CLN – Clindamicina (S: ≤2, I: 4, R: ≥ 8); TET – Tetraciclina (S: ≤4, I: 8, R: ≥ 16); CFX – Cefoxitina (S: ≤ 16, I: 32, R: ≥ 64); AMP – Ampicilina (S: ≤ 0,5, I: 1, R: ≥ 2); IMP – Imipenem (S: ≤4, I: 8, ≥ 16); ACL – Amoxicilina-clavulanato (S: ≤4, I: 8, ≥ 16) (CLSI, 2005).

As bactérias anaeróbias são comumente encontradas como agentes de infecções polimicrobianas em humanos com taxas de incidência variando de 4% a 50%, porém, o isolamento deste grupo de microrganismos não é incluído na rotina de muitos laboratórios e hospitais. Desde que testes de susceptibilidade não são freqüentemente realizados, exceto para amostras isoladas de sítios estéreis (sangue, LCE, etc), é importante definir o perfil de susceptibilidade predominante em uma dada região ou em determinado hospital (KOETH *et al.*, 2004). O reconhecimento de um agente antimicrobiano com eficácia conhecida quando há a necessidade de tratamento empírico de uma infecção com grande probabilidade da presença de anaeróbios torna-se importante (FELEKE & FORLENZA, 1991). Nos últimos anos, os anaeróbios têm mostrado aumento dos níveis de resistência aos antimicrobianos (BAQUERO & REIG, 1992; LEE, CHONG & YEONG, 1996). Assim, a realização de estudos regulares de vigilância assume caráter de grande relevância.

Atualmente, o tratamento empírico de infecções com grande probabilidade da presença de anaeróbios envolve o uso de agentes antimicrobianos de amplo espectro ou terapia mista com uma droga eficaz contra um anaeróbio facultativo conhecido ou suspeito e uma droga eficaz contra anaeróbios estritos (HARDMAN & LIMBIRD, 1996). Algumas drogas como clindamicina e metronidazol têm como alvo específico anaeróbios estritos. Tais drogas são eficazes contra anaeróbios, mas a clindamicina não tem efeito sobre bacilos Gram negativos anaeróbios facultativos e o metronidazol é especialmente inativo contra a maioria das classes bacterianas. Essas drogas são geralmente administradas em combinação com aminoglicosídeos ou cefalosporinas. β -lactâmicos são freqüentemente eficazes contra ambos anaeróbios, estritos e facultativos, mas são também freqüentemente inativados por bactérias produtoras de β -lactamases. Como a maioria das bactérias anaeróbias estritas é produtora de β -lactamases, especialmente *Bacteroides*, *Prevotella* e algumas espécies de *Fusobacterium* (NORD, 1986), é indicado o uso de antimicrobianos não β -lactâmicos se um destes gêneros estiver envolvido ou sugere-se a inclusão de um inibidor de β -lactamase como ácido clavulânico, sulfobactam ou tazobactam, em combinação com um β -lactâmico amplamente eficaz (APPELBAUM, SPANGLER & JACOBS, 1990), por exemplo, a combinação feita por amoxicilina/ácido clavulânico, que mantém atividade *in vitro* excepcional contra patógenos do trato respiratório (KOETH *et al.*, 2004). Uma alternativa terapêutica seria o uso de

carbapenemas, uma classe de β -lactâmicos que inclui o imipenem, meropenem e que se mostram eficazes contra bactérias anaeróbias estritas e facultativas e que geralmente não são inativadas por β -lactamases (KOETH *et al.*, 2004).

Agentes antimicrobianos podem afetar a microbiota anfibiótica quando são usados inadequadamente, quando não são completamente absorvidos após administração oral ou excretados na saliva, bile ou muco (HEIMDAH, KAGER & NORD, 1985). Para a microbiota anfibiótica atuar como reservatório de genes de resistência, os componentes desta população devem ser capazes de adquirir genes de resistência tanto de microrganismos transitórios quanto de microrganismos que colonizam os mesmos nichos e transmiti-los a microrganismos que colonizam determinada área. Desde que uma variedade de bactérias do solo, dos alimentos e da microbiota da cavidade oral, sem mencionar do trato respiratório superior ou patógenos intestinais, transitam através do cólon, a transferência de genes de resistência para as espécies de *Bacteroides* ou anaeróbios Gram negativos no cólon requer uma série de eventos que permitam a transferência entre diferentes gêneros e filos (SALYERS & SHOEMAKER, 1996).

Como mencionado anteriormente, a indicação do quanto os genes de resistência podem se espalhar entre anaeróbios que fazem parte da microbiota é a observação de que praticamente 100% de cepas de *Bacteroides* isoladas de quadros clínicos é atualmente resistente à tetraciclina pela aquisição de um único gene de resistência, o *tetQ* (SHOEMAKER *et al.*, 2001)

Arzese, Tomaseting e Botta (2000) pesquisando a transferência de genes entre cepas de *Bacteroides* e *Prevotella*, isoladas de diferentes fontes, encontraram cepas de *P. intermedia* isoladas de espécimes clínicos e microbiota oral resistentes à tetraciclina e que carregavam o gene *tetQ*, utilizando iniciadores que amplificavam uma região conservada dentro do referido gene. Neste mesmo estudo, a incidência de cepas de *Prevotella ermF*-positivas parece contribuir, juntamente com espécies de *Bacteroides*, para a persistência da resistência aos antibióticos e disseminação para outros microrganismos através de elementos conjugativos.

No presente estudo, a taxa de resistência à tetraciclina (68, 3%) foi homogênea entre cepas clínicas e de microbiota. Este resultado é consistente com a observação de que 26 cepas albergavam o gene *tetQ*, sendo 14 cepas isoladas de microbiota. De 12 cepas isoladas de

processos clínicos, nove foram coletadas no CHIV da França. Porém, o gene *tetQ* não foi detectado em dez cepas resistentes a tetraciclina. Estes resultados sugerem a existência de determinantes de resistência a tetraciclina não relacionados ao *tetQ*. Três tipos de mecanismos de resistência adquirida a tetraciclina têm sido descritos. O mais comum é mediado por proteínas de efluxo de tetraciclina pertencentes a família MFS (do inglês “*Major Facilitator Superfamily*”). Os genes de efluxo, *tet*, codificam uma proteína associada a membrana que reconhece e exporta o antimicrobiano para fora da célula. Dessa forma, a concentração intracelular de tetraciclina é diminuída protegendo a maioria dos ribossomos. Determinantes genéticos de bombas de efluxo de tetraciclina foram descritos em espécies anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas e podem conferir resistência a tetraciclina e doxiciclina. Um segundo mecanismo de resistência corresponde a expressão de proteínas de proteção ao ribossomo. Estas proteínas são encontradas no citoplasma bacteriano e protegem o ribossomo da ação da tetraciclina *in vitro* e *in vivo*. Esse mecanismo confere resistência a tetraciclina, doxiciclina e minociclina e ainda possui homologia com fatores de alongamento sugerindo a ligação destas proteínas ao ribossomo. Esta ligação altera a conformação do ribossomo e previne a ligação do antimicrobiano ao seu sítio no ribossomo. Onze genes que codificam proteínas de proteção ao ribossomo foram descritos sendo três deles, *tetQ*, *tetM* e *tet36* detectados no gênero *Bacteroides*. Mais recentemente, foi descrito um mecanismo de inativação enzimática da tetraciclina. Neste mecanismo, dois genes foram descritos, *tet37*, detectado inicialmente em bactérias da microbiota oral e o gene *tetX*, detectado em dois transposons, Tn4351 e Tn4400 associados ao gênero *Bacteroides*. Apesar da presença do gene *tetQ*, duas cepas isoladas de microbiota e de secreção purulenta se mostraram susceptíveis a tetraciclina, com CIM de 8mg/L e 0,25mg/L, respectivamente. Esses resultados sugerem a presença de mutações em determinadas regiões do “*hairpin*” formado entre o promotor do gene *tetQ* e o códon de iniciação que poderiam, na presença de tetraciclina, impedir a movimentação adequada do ribossomo pelo mRNA prevenindo a síntese da proteína TetQ, essencial a resistência ao antimicrobiano (ROBERTS, 2003). O gene *tetQ* está, geralmente, associado com transposons conjugativos nos quais o gene *ermF* também está alocado (SALYERS, GUPTA & WANG, 2004).

O determinante *ermF* é geralmente responsável pela resistência a antimicrobianos do grupo macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B em *B. fragilis* (RASMUSSEN, ODELSON & MACRINA, 1994). Neste trabalho, a taxa de resistência a clindamicina foi de 25,9 % para as cepas de *Bacteroides* spp. coletadas em hospitais da região metropolitana do Rio de

Janeiro. Em estudos prévios realizados por nosso grupo, a taxa de resistência variou entre 18,2 a 37% (DE ALMEIDA & UZEDA, 1987; CARVALHO, MOREIRA & FERREIRA, 1997; SOUZA *et al.*, 2000; AVELAR *et al.*, 2003; PAULA *et al.*, 2004). Em estudo multicêntrico envolvendo 16 hospitais em diferentes regiões da França, a taxa de resistência a clindamicina para espécies do “grupo *Bacteroides fragilis*” alcançou 28,3% utilizando como “*breakpoint*” o valor de CIM > 2mg/L (SINGER *et al.*, 2008). Neste estudo foi sugerido o uso deste antimicrobiano em combinação com rifampicina apenas após antibiograma e em dada situação que o microorganismo seja sensível simultaneamente aos dois antimicrobianos. Foi sugerido, ainda que o uso de clindamicina deve ser evitado para o tratamento empírico de processos infecciosos onde microrganismos anaeróbios sejam suspeitos.

A taxa de resistência a clindamicina apresentada pelas cepas isoladas do CHIV no presente estudo foi de 16,6%. Por outro lado, em sete cepas de *Bacteroides* spp resistentes a clindamicina coletadas no Rio de Janeiro, este gene não foi detectado pela PCR. Relatos mostram a presença de fenótipo de resistência a clindamicina na ausência do gene em ensaios da PCR. Este comportamento é provavelmente atribuído a modificações na região de anelamento dos iniciadores (SALYERS & AMÁBILE-CUEVAS, 1997; PAULA *et al.*, 2004). Neste caso, o resultado foi confirmado com a hibridização usando uma sonda preparada a partir de uma cepa de *B. fragilis*. Entretanto, o gene não foi detectado em nenhuma dessas cepas. É possível que cepas resistentes a clindamicina e que, no entanto, não albergam o gene *ermF*, sejam carreadoras de genes relacionados como os genes *ermB* e *ermG* previamente descritos para a espécie (GUPTA *et al.*, 2003, WANG *et al.*, 2003). Em 2005, Ueda e colaboradores detectaram dezesseis homólogos de operons de bombas de efluxo do sistema MexAB-OprM de resistência a múltiplas drogas em *B. fragilis*. Este sistema denominado BmeABC 1-16 consiste em uma proteína de fusão ou acessória, BmeA (homólogo a MexA), um componente protéico de membrana citoplasmática que funciona como transportador, BmeB (homólogo a MexB) e uma proteína de membrana externa que forma canais, BmeC (homólogo a OprM). Este sistema de efluxo pode acomodar fluoroquinolonas e β -lactâmicos e pode conferir resistência intrínseca a ciprofloxacina. Mais recentemente, Pumbwe e colaboradores (2007), isolaram uma cepa de *B. fragilis* que apresentava dois genes *bmeB* (*bmeB9* e *bmeB15*) operando simultaneamente. Estes genes estavam sendo significativamente superexpressos contribuindo para a resistência a clindamicina. Estes dados sugerem a existência de outros mecanismos de resistência a clindamicina não associados a presença de genes *erm*, visto que estes determinantes parecem não ser circulantes no Brasil (PAULA *et*

al., 2004). Entretanto, uma cepa isolada de infecção pélvica coletada no CHIV se mostrou sensível a clindamicina na presença do determinante *ermF*. É possível que este gene não esteja sendo expresso pela ausência de um promotor fornecido por uma IS localizada à montante do gene (RASMUSSEN, ODELSON & MACRINA, 1987).

Os nitroimidazóis, dentre eles o metronidazol, permanecem como as drogas mais eficazes contra bactérias anaeróbias, particularmente, no tratamento de doenças infecciosas envolvendo espécies do grupo *Bacteroides* (DINIZ *et al.*, 2003). O metronidazol é prescrito em diferentes concentrações de acordo com a etiologia da infecção, mas em todos os esquemas terapêuticos, o droga atinge a concentração sérica de pelo menos 4 µg/mL (KATZUNG, 1998). Dados epidemiológicos sugerem que essa variação terapêutica no uso do metronidazol pode ser um dos principais fatores que contribuem para os diferentes níveis de susceptibilidade reduzida observados em microrganismos isolados em diferentes áreas geográficas. Tem sido proposto que o aumento da susceptibilidade reduzida relatado em países desenvolvidos pode também estar relacionado ao uso de metronidazol no tratamento de doenças por protozoários. A alta prevalência de microrganismos resistentes isolados de trato genital feminino pode estar relacionada ao uso de metronidazol no tratamento de vaginite bacteriana e outras infecções do trato genital. No entanto, geralmente devido à falta de informação obtida de pacientes, alguns desses estudos não mostra associação direta entre esse fenômeno e o uso prévio do metronidazol (JENKS, LABIGNE & FERRERO, 1999).

No Brasil, já foram descritas cepas apresentando susceptibilidade reduzida ao metronidazol (CIM = 4 a 16 µg/mL) (PAULA *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2006). Estudos multicêntricos realizados na França mostram que a resistência a metronidazol (CIM > 4mg/L) varia de 3,5 a 4,7% (BEHRA-MILLET *et al.*, 2003; SINGER *et al.*, 2008). De acordo com o “*breakpoint*” utilizado nestes estudos, as cepas isoladas de processos infecciosos coletadas no CHIV, inicialmente susceptíveis ao metronidazol, apresentam taxa de resistência ao metronidazol alterada para 5,5%. No presente estudo, também foi possível detectar quatro cepas de *B. fragilis* apresentando susceptibilidade reduzida a esse antimicrobiano sendo duas destas isoladas de microbiota com CIM = 4mg/L e 16mg/L, e duas cepas isoladas de infecção pélvica e infecção intraabdominal com CIM = 8mg/L. Foi possível associar o fenótipo de susceptibilidade reduzida (CIM = 8 mg/mL) com a expressão dos genes *nim* apenas na cepa isolada de infecção pélvica. Esses resultados sugerem a existência de mecanismos alternativos envolvidos no perfil de susceptibilidade destas cepas. Mecanismos como redução da captação

de metronidazol, atividade reduzida da nitroreductase ou ainda atividade reduzida da piruvato:ferredoxina oxireductase têm sido sugeridos (GAL & BRAZIER, 2004). Por outro lado, o ensaio da PCR permitiu a detecção de genes *nim* em uma cepa de *B. fragilis* isolada de microbiota intestinal susceptível ao metronidazol com CIM = 1 mg/ mL. O sequenciamento permitiu a caracterização do determinante genético detectado nestas cepas como *nimD* e *nimB*, respectivamente. É possível que estes genes não estejam sendo expressos devido a ausência de um promotor localizado à montante da seqüência, geradas pela inserção de um elemento IS nesta região (LÖFMARK *et al.*, 2005). Estudos anteriores detectaram a presença de sub-populações *nim*-positivas com fenótipo inicialmente susceptível ao metronidazol. Porém, após exposição prolongada a este antimicrobiano foram divididas em uma população de fenótipo instável, revertido ao fenótipo inicial durante o crescimento na ausência de metronidazol, e em uma população com fenótipo de resistência que permaneceu mesmo durante o crescimento na ausência do antimicrobiano. Desta forma, é possível que mutações que levem a expressão do gene *nim*, inicialmente “silencioso”, possam ocorrer em processos clínicos. Conseqüentemente, níveis clinicamente relevantes de resistência ao metronidazol seriam alcançados, culminando na falha terapêutica (GAL & BRAZIER, 2004; LÖFMARK *et al.*, 2005). O tratamento com metronidazol pode levar a efeitos adicionais a seleção de cepas resistentes, como o aumento da virulência demonstrado por Diniz e colaboradores (2005).

A maioria dos *B. fragilis* é naturalmente resistente a muitas penicilinas e cefalosporinas. Cepas apresentando resistência a esses antimicrobianos produzem β -lactamases cromossômicas da classe A codificadas pelo gene *cepA*. Essas enzimas exibem predominantemente atividade de cefalosporinase, e freqüentemente são inibidas por inibidores de β -lactamases (EDWARDS & GREENWOOD, 1992; AVELAR *et al.*, 2003). Apenas uma cepa de *B. fragilis* isolada de quadros clínicos no Brasil e duas cepas provenientes da França foram negativas para o referido gene pelo ensaio da PCR. Entretanto, 50% das cepas resistentes a ampicilina isoladas do trato intestinal albergavam o gene *cepA*. Todas as cepas clínicas se mostraram susceptíveis a cefoxitina enquanto a taxa de resistência a este agente antimicrobiano foi de 18,5% entre cepas isoladas da microflora. Por outro lado, o gene *cfxA* foi detectado em três cepas clínicas provenientes do CHIV, França, e em outras três cepas isoladas da microbiota. Uma cepa carreando o gene *cfxA* se mostrou resistente a amoxicilina-clavulanato (CIM = 16 mg/L). Esses resultados sugerem que a cefalosporinase codificada pelo gene *cfxA* está sendo expressa em diferentes níveis, embora mecanismos como alteração

nas PBPs, penetração reduzida do antibiótico através da membrana externa ou ação de outras β - lactamases não possam ser excluídos (AVELAR *et al.*, 2003).

Testes de susceptibilidade a imipenem e amoxicilina-clavulanato foram realizados em cepas que albergavam o gene *cfiA* pelo ensaio da PCR. Dez cepas sendo nove isoladas de microbiota e apenas uma isolada de processos infecciosos foram testadas. Uma cepa isolada de microbiota intestinal, BA12.2, se mostrou resistente a imipenem (CIM = 32mg/L) e mostrou susceptibilidade reduzida a amoxicilina-clavulanato (CIM= 8mg/L). No evento da resistência aos carbapenemas, o gene *cfiA* pode estar “silencioso” ou ser expresso em vários níveis, e ainda requerer a inserção de um elemento IS que permite a expressão deste gene dependendo das variações na estrutura do promotor formado (EDWARDS *et al.*,1999). É possível que as outras cepas analisadas apresentem fenótipo susceptível ao imipenem devido a ausência de um promotor fornecido pela IS. Estudos multicêntricos de vigilâncias conduzidos por uma rede de laboratórios franceses (MORY *et al.*, 1998; BEHRA-MILLET *et al.*, 2003; SINGER *et al.*, 2008) demonstraram que a resistência a imipenem e amoxicilina-clavulanato permanece rara no grupo *B. fragilis* com resultados similares observados no Brasil (PAULA *et al.*, 2004).

Metronidazol, imipenem e amoxicilina-clavulanato permanecem eficazes contra *P. distasonis*. Entretanto, todas as amostras testadas se mostraram resistentes a ampicilina. Apenas uma cepa se mostrou a cefoxitina, mas não albergavam o gene *cfxA*. Por outro lado, uma cepa se mostrou susceptível (CIM = 16 mg/L) a cefoxitina na presença do gene *cfxA*. Estes resultados sugerem que o gene *cfxA* está sendo expresso em vários níveis ou outros mecanismos como alteração de porinas e de permeabilidade devem ser levados em consideração. A transferência da resistência a cefoxitina entre espécie de *Bacteroides* e *Parabacteroides* tem sido associada a presença de um transposon mobilizável Tn4555. Em estudos prévios o gene *cfxA* foi detectado neste transposon por “Southern Blotting” em *P. distasonis* (AVELAR *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007). Todas as cepas resistentes a tetraciclina albergavam o gene *tetQ* pela PCR. Devido a alta concentração no cólon humano, espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* podem estar envolvidas em eventos de transferência horizontal de genes. Uma indicação desse evento é a observação de que a maioria das cepas pertencentes a esses gêneros isoladas de processos infecciosos são resistentes a tetraciclina pela aquisição de um único gene, *tetQ*, presente em um transposon conjugativo. Neste caso, o gene *tetQ* é utilizado como marcador genético na tentativa de detectar transferência horizontal de genes entre espécies de *Bacteroides* e *Parabacteroides* e

outros gêneros (SALYER, GUPTA & WANG, 2004; SHOEMAKER *et al.*, 2001). Apesar do fato de que 50% das cepas de *P. distasonis* sejam resistentes a clindamicina, o gene *ermF* não foi detectado. A ausência desse gene observada nos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* sugere que o gene *ermF* não é circulante no Brasil. Outro mecanismo como a expressão de bombas de efluxo está sendo atribuída à resistência a clindamicina em *B. fragilis* (PUMBWE, SKILBECK & WEXLER, 2008).

O presente estudo foi capaz de identificar cepas resistentes a imipenem na presença do gene *cfiA*. Essa foi a primeira vez que tais cepas foram isoladas no Brasil. É importante ainda identificar a presença de genes *nim* em cepas da microbiota e isoladas de processos infecciosos. Altos níveis de resistência a metronidazol podem ser induzidos por cepas *nim*-positivas, sendo este antimicrobiano utilizado no tratamento empírico de infecções causadas por anaeróbios. O aumento da resistência de *Bacteroides* spp e *Parabacteroides distasonis* demonstrada neste estudo enfatiza a importância da vigilância da resistência, incluindo em cepas isoladas da microbiota visto que esses microorganismos podem emergir como patógenos oportunistas.

- ✓ Foram detectados determinantes genéticos associados a resistência à β -lactâmicos, clindamicina, tetraciclina e metronidazol em cepas isoladas de microbiota intestinal de indivíduos saudáveis. Esses resultados demonstram a possível atuação da microbiota como reservatório de gene de resistência.
- ✓ O presente estudo foi capaz de identificar uma cepa de *B. fragilis* (BA12.2) resistente a imipenem que alberga o gene *cfiA* e apresenta a metalo- β -lactamase ativa. Foi a primeira vez que uma cepa apresentando tais características foi isolada de microbiota intestinal de indivíduos saudáveis no Brasil.
- ✓ Foi possível identificar a presença de genes *nim* em cepas isoladas de microbiota intestinal e infecção pélvica proveniente do CHIV. A detecção de cepas que alberga tal gene é importante desde que a resistência a metronidazol pode ser induzida em cepas positivas para o gene *nim* e este antimicrobiano é usado no tratamento de infecções por anaeróbios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIDGE, K.E. & O'BRIEN, M. **In Vitro Susceptibilities of the *Bacteroides fragilis* Group Species: Change in Isolation Rates Significantly Affects Overall Susceptibility Data.** J. Clinical Microbiol., Nov, 4349-4352, 2002.
- APPEULBAUM, P.C.; SPANGLER, S.K. & JACOBS, M.R. **β -Lactamases production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcilin, ticarcilin-clavulanate, cefoxitinm, imipenem and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers.** Anticob. Agents Chemother., 34, 1546-1450, 1990.
- ARZESE, A.R.; TOMASETING, L. & BOTTA, G.A. **Detection of *tetQ* and *ermF* antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans.** J. Antimicrob. Chemother., 45, 577-582, 2000.
- AVELAR, K.E.S., OTSUKI, K., VINCENTE, A.C.P., VIEIRA, J.M.B.D., PAULA, G.R., DOMINGUES, R.M.C.P., FERREIRA, M.C. **Presence of the *cfxA* gene in *Bacteroides distasonis*.** Research Microbiol., 154, 369-374, 2003.
- BANDOH, K.; MUTO, Y.; WATANABE, K.; KATOH, N. & UENO, K. **Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*.** Antimicrob. Agents Chemother., 35, 371-372, 1991.
- BAQUERO, F. & REIG, M. **Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain.** Europ. Jounal Clinical Microbiol. Infect. Dis., 11, 1016-1020, 1992.
- BEACHEY, E.H. **Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface.** J. Infect. Dis., 143, 325-345, 1981.
- BEHRA-MIELLET, J.; CALVET, L.; MORY, F.; MULLER, C.; CHOMARAT, M.; BÉZIAN, M.C.; BLAND, S.; JUVENIN, M.E.; FOSSE, T.; GOLDSTEIN, F.; JAULHAC, B. & DUBREUIL, L. **Antibiotic resistance among Gram-negative bacilli: lessons from a French multicentric survey.** Anerobe, 9, 105-111, 2003.
- BOTTA, G.A.; ARZESE, A.; MINISINI, R. & TRANI, G. **Role structural and extracellular virulence factor in Gram-negative anaerobic bacteria.** Clin. Infec. Dis., 18 (suppl 4), S260-264, 1994.
- CARLIER, J.P.; SELIER, M.; RAGER, M.N. & REYSSET, G. **Metabolism of a 5-nitromidazole susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*.** Antimicrob. Agents Chemother., 41, 1495-1499, 1997.
- CARVALHO, C.B.M.; MOREIRA, J.L.B. & FERREIRA, M.C.S. **Survey of *Bacteroides fragilis* group susceptibility patterns in Brazil.** In: J. Antimicrob. Agents. 8, 115-120, 1997.
- CHENG, Q.; PASKIET, B.J.; SHOEMAKER, N.B.; GARDNER, J.F. & SALYERS, A.A. **Integration and excision of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT.** J. Bacteriol., 182, 4035-4043, 2000.
- CHENG, Q.; SUTANTO, Y.; SHOEMAKER, N.B.; GARDNER, J.F. & SALYERS, A.A.. **Identification of genes required for the excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposon.** Mol. Microbiol., 41, 625-632, 2001.
- CHUNG, W.O.; YOUNG, K.; LENG, Z. & ROBERTS, M.C. **Mobile elements carrying *ermF* and *tetQ* genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria.** J. Antimicrob. Chemother., 44, 329-35, 1999.
- CHURCH, D.L. & LAISHLEY, E.J. **Reduction of metronidazole by hydrogenase from clostridia.** Anaerobe., 1, 81-92, 1995.
- CLANCY, J.; PETITPAS, J.; DIB-HAJJ, F.; YUAN, W.; CRONAN, M.; KAMATH, A.V.; BERGERON, J. & RETSEMA, J.A. **Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefa*, from streptococcus pyogenes.** Mol. Microbiol., 22(5), 867-79, 1996.

Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria (M11- A7). 2007.

COOPER, A.J.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **The erythromycin resistance gene from the *Bacteroides* conjugal transposon Tc^r Em^r 7856 is nearly identical to *ermG* from *Bacillus sphaericus*.** Antimicrob. Agents Chemother., 40, 506-508, 1996..

CUCHURAL, G.J.; JR, MALAMY, M.H. & TALLY, F.P. **β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*.** Antimicrob. Agents Chemother., 30, 634-638, 1986.

DE ALMEIDA, A.E.C.C. & UZEDA, M. **Susceptibility to five antimicrobial agents of strains of the *Bacteroides fragilis* group isolated in Brazil.** Antimicrob. Agents Chemother., 31, 617-618, 1987.

DINIZ, C.G.; ARANTES, R.M.; CARA, D.C.; LIMA, F.L.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R. & FARIAS, L.M. **Enhanced pathogenicity of susceptible strains of *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole.** Microb. Infect., 5, 19-26, 2005.

DOMINGUES, R.M.; CAVALCANTI, S.M.; ANDRADE, A.F. & FERREIRA, M.C. **Sialic acid as receptor of *Bacteroides fragilis* lectin-like adhesions.** Zentralbl. Bakteri., 277, 340-344, 1992.

DUBLANCHET, A.; CAILLON, J.; EMOND, J.P.; CHARDON, N.H. & DURGEON, H.B. **Isolation of *Bacteroides fragilis* strains with reduced sensitivity to 5-nitroimidazoles.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 1094-1099, 1986.

DUBREUIL, L.; BREUIL, J.; DUBLANCHET, A. & SEDALLIAN, A. **Survey of the susceptibility patterns of *Bacteroides fragilis* group strains in France from 1977 to 1992.** Eur. J. clin. Microb. Infect. Dis. 11, 1094-1099, 1992.

EDWARDS, D.I. **Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms I. Mechanisms of action.** J. Antimicrob. Chemother., 31, 9-20, 1993.

EDWARDS, R. & GREENWOOD, D. **An investigation of β -lactamases from clinical isolates of *Bacteroides* species.** J. Med. Microbiol., 36, 89-95, 1992.

EDWARDS, R.; HAWKYARD, C.V.; GARVEY, M.T. & GREENWOOD, D. **Prevalence and degree of expression of the carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* in Nottingham, UK.** J. Antimicrob. Chemother., 43, 273-276, 1999.

FELEK, G & FORLENZA, S. **Anaerobic infections: the basis for primary care physicians.** Postgraduated medicine., 89, 221-234, 1991.

FERREIRA R.; ALEXANDRE, M.C.F.; ANTUNES E.N.F.; PINHÃO A.T.; MORAES, S.R.; FERREIRA, M.C.S. & DOMINGUES, R.M.C.P. **Expression of *Bacteroides fragilis* virulence markers *in vitro*.** J. Med. Microbiol., 48, 999-1004, 1999.

FERREIRA, E.O.; LOBO, L.A.; PETRÓPOLIS, D.; AVELAR, K.E.S.; FERREIRA, M.C.; FILHO, S.C.F. & DOMINGUES, R.M.C.P. **A *Bacteroides fragilis* surface glycoprotein mediates the interection between the bacterium and the extracellular matrix component laminin-1.** Research. Microbiol. 157, 960-966, 2006.

FERREIRA, L.Q.; AVELAR, K.E.S.; VIEIRA, J.M.B.D.; PAULA, G.R.; COLOMBO, A.P.V.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C.S. **Association Between the *cfxA* Gene and Transposon Tn4555 in *Bacteroides distasonis* Strains and Other *Bacteroides* Species.** Curr. Microbiol., 54, 348–353, 2007.

FERREIRA, M.C.S.; DOMINGUES, R.M.C.P & UZEDA, M. In: Manual de Bacteriologia de Anaeróbios., Rio de Janeiro, Brasil, 2003.

GAL, M.& BRAZIER, J.S. **Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants.** J. Antimicrob. Chemother., 54, 109-116, 2004.

GIAMARELLOU, H. **Anaerobic infections therapy.** Int. J. Antimicrob. Agents., 16, 341-346, 2000.

GOGUEN, J.D.; HOE, N.P. & SUBRAHMANYMYAM, Y.V. **Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches.** Infect. Agents. Dis., 4(1), 47-54, 1995.

GUPTA, A.; VLAMAKIS, H.; SHOEMAKER, N. & SALYERS, A.A. **A New Bacteroides Conjugative Transposon That Carries an ermB Gene.** Appl. Environ. Microbiol., 69 (11), 6455-6463, 2003.

GUTACKER, M.; VALSANGIACOMO, C. & PIFFARETTI, J.C. **Identification of twogroups in Bacteroides fragilis by multilocus enzyme electrophoresis:distribution of antibiotic resistance (cfiA, cepA) and enterotoxin (bft)encoding genes.** Microbiology., 146,1241-54, 2000.

HAGGOUD, A.; REYSSET G.; AZEDDOUG H. & SEBALD M. **Nucleotide Sequence Analysis of Two 5-Nitroimidazole Resistance Determinants from Bacteroides Strains and of a New Insertion Sequence Upstream of the two Genes.** Antimicrob. Agents and Chemother., May, 1047-1051, 1994.

HANSEN, L. H.; KIRPEKAR, F. & DOUTHWAITE, S. **Recognition of nucleotide G745 in 23S ribosomal RNA by the rrmA methyltransferase.** J. Mol. Biol., 310, 1001-1010, 2001.

HANSEN, L. H.; MAUVAIS, P. & DOUTHWAITE, S. **The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA.** Mol. Microbiol., 31, 623-631, 1999.

HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edn. McGraw-Hill professional, New York, NY, USA, 1996.

HEIMDAHL, A. ; KAGER, L. & NORD, C.E.. **Changes in the oropharyngeal and colon microflora in relation to antimicrobial concentrations in saliva and feces.** Scand. J. Infect., Dis. Suppl., 44, 52-58, 1985.

HETCH, D.W.; VEDANTAM, G. & OSMOLKI, J.R. **Antibiotic resistance among anaerobes: What does it mean?** Anaerobe., 5, 421-429, 1999.

HOFSTAD, T. **Virulence factors in anaerobic bacteria.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 1044-1048, 1992.

JENKS, P.J.; LABIGNE, A. & FERRERO, R.L. **Exposure to metronidazole in vivo readily induces resistance in Helicobacter pylori and reduces the efficacy of eradication therapy in mice.** Antimicrob. Agents Chemother., 43, 777-781, 1999.

JOUSIMIES-SOMER, H.R.; SUMMANEN, P.; CITRON, D.M.; BARON, E.J.; WEXLER, H.M. & FINEGOLD, S.M. **Preliminary Identification Methods.** In: Anaerobic Bacteriology Manual, 6^o ed. Belmont, CA: Star Publishing Company, 2002.

KALKA – MOLL, W.M.; WANG, Y.; COMSTOCK, L.E.; GONZALEZ, S.E.; TZIANABOS, A.O. & KASPER, D.L. **Immunochemical and biological characterization of three capsular polysaccharides from a single Bacteroides fragilis strain.** Infect. Immun., 69, 2339-2644, 2001.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**, in: Guanabara Koogan (Ed.), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998, pp 566.

KOETH, L.M.; GOOD, C.E.; APPELBAUM, P.C.; GOLDSTEIN, E.J.C., RODLOFF, A.C.; CLAROS, M.; DUBREUIL, L.J. **Surveillance of susceptibility patterns in 1297 Europeans and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobials agents.** J. Antimicrob. Chemother., 53, 1039-1044, 2004.

KRINOS, C.M.; COYNE, M.J., WEINACHT, K.G., TZIANABOS, AO., KASPER, D.L. & COMSTOCK, L.E. **Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions.** Nature., 414, 555-558, 2001.

LÄHTEENMÄKI, K.; EDELMAN, S. & KORHONEN, T.K. **Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion.** Trends Microbiol., 13, 79-85, 2005.

- LEE, K.; CHONG, Y. & JEONG, S.H. **Emerging resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in South Korea.** *Clinical Infect., Dis 2, (Suppl. 1), S73-77, 1996.*
- LENG, Z.; RILEY, D.E.; BERGER, R.E.; KRIEGER, J.N. & ROBERTS, M.C. **Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant *tetQ*.** *J. Antimicrob. Chemother., 40, 551-559, 1997.*
- LIU, C.; SONG, Y.; McTEAGUE M, M.; VU A.W.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S.M. **Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group – and – species – specific primers.** *FEMS Microbiol. Lett., May, 222 (1), 9 – 16, 2003.*
- LÖFMARK, S.; FANG, H.; HEDBERG, M. & EDLUND, C. **Inducible Metronidazole Resistance and *nim* genes in Clinical *Bacteroides fragilis* group isolates.** *Antimicrob. Agents Chemother., Mar, 1253-1256, 2005.*
- LUBBE M.M.; STANLEY, K. & CHALKLEY L.J. **Prevalence of *nim* genes in anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa.** *FEMS Microb. Letters., 172, 79-83, 1999.*
- MARCHANDIN, H.; JEAN-PIERRE, H.; CAMPOS, J.; DUBREUIL, L.; TEYSSIER, C. & JUMAS-BILAK, E. ***nimE* Gene in metronidazole-Susceptible *Veillonella* sp. strain.** *Antimicrob. Agents Chemother., 48, 3207-3208, 2004.*
- 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., 23, 726-730, 1983.*
- MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROIT, I.M.; WAKELIN, D. & WILLIAMS, R. **Antimicrobial Agents.** In: *Medical Microbiology.* 1st ed, London, Mosby Europe, 35.5-35.20, 1993.
- MOAZED, D. & NOLLER, H.F. **Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyltransferase region of 23S ribosomal RNA.** *Biochemie., 69, 879-884, 1987.*
- 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., 66, 1735-1739, 1998.*
- MONOD, M.; MOHAN, S., & DUBNAU, D. **Cloning and analysis of *ermG*, a new macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from *Bacillus sphaericus*.** *J. Bacteriol., 169, 340-350, 1987.*
- MOON, K.; SHOEMAKR, N.B.; GARDNER, J.F. & SALYERS, A.A. **Regulation of excision gens of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT.** *J. Bacteriol., 16 (187), 5732-5741, 2005.*
- MORY, F.; LOZNIIEWSKI, A.; BLAND, S.; SEDALLIAN, A.; GROLLIER, G.; GIRARD-PIPAU, F.; PARIS, M.F. & DUBREUIL, L. **Survey of anaerobic susceptibility patterns: a French multicentre study.** *Int. J. Antimicrob. Agents., 10(3), 229-36, 1998.*
- MYERS, L.L.; FIREHAMMER, B.D.; SHOOP, D.S. & BORDER, M.M. **Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves.** *J. Infect. Dis., 152, 1344-1347, 1985.*
- MYERS, L.L.; FIREHAMMER, B.D.; SHOOP, D.S. & BORDER, M.M. ***Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal in newborn lambs.** *Infect. Immun., 44, 241-244, 1984.*
- NAGY, E.; MANNCKE, B. & WERNER, H. **Fibronectin and vitronectin binding of *Bacteroides fragilis* and eight other species of the genus.** *Zentralbl. Bakteri., 281, 235-239, 1994.*
- NORD, C.E. & HEDBERG, M. **Resistance to β -lactams antibiotics in anaerobe bacteria.** *Rev. Infec., Dis. 12 (suppl. 2), S231-234, 1990.*
- NORD, C.E. **Mechanisms of beta-lactams resistance in anaerobic bacteria.** *Rev. Immunfect. Dis. 8 (Suppl 5): S543 – S548, 1986.*

- ONDERDONK, A.B.; KASPER, D.L.; CISNEROS, R.L. & BARLETT, J.G. **The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* as a virulence factor: comparison of the pathogenic potential of capsulated and unencapsulated strains.** J. Infect. Dis., 136, 82-89, 1977.
- PANTOSTI, A.; MENOZZI, M.G.; FRATE, A.; SANFILIPPO, L.; D'AMBROSIO, F. & MALPELI, M. **Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and toxin in stool samples from adults and children in Italy.** Clin. Infect. Dis., 24, 12-16, 1997.
- PARKER, A.C. & SMITH, C.J. **Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A β -lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species.** Antimicrob. Agents chemother., 37, 1028-1036, 1993.
- PATEY, O.; VARON, E.; PRAZUCK, T.; PODGLAJEN, I.; DUBLANCHET, A.; DUBREUIL, L. & BREUIL, J. **Multicenter survey in France of the antimicrobial susceptibility of 416 blood culture isolates of the *Bacteroides fragilis* group.** J. Antimicrob. Chemother., 33, 1029-1034, 1994.
- PATRICK, S. **The virulence of *Bacteroides fragilis*.** Rev. Med. Microbiol., 4, 40-49, 1993.
- PAULA R.G.; 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.** Inter. J. Antimicrob. Agents., 24, 53-58, 2004.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A. & OWEN, R.J. **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** Letters Appl. Microbiol., 8, 151-156, 1989.
- PODGLAJEN, I.; BREUIL, J. & COLLATZ, E. **Insertion of a novel DNA sequence, IS1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of rbapenemase resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*.** Molecular Microbiol., 12, 105-114, 1994.
- PODGLAJEN, I.; BREUIL, J.; BORDON, F.; GUTMANN, L. & COLLATZ, E. **A silent carbapenemase gene in strains of *Bacteroides fragilis* can be expressed after a one-step mutation.** FEMS Microbiol. Lett., 70, 21-30, 1992.
- POEHLGAARD, J. & DOUTHWAITE, S. **Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome.** Curr. Opin. Investig. Drugs., 4, 140-148, 2003.
- PRUZZO, C.; DANIELLI, B. & RICETTI, M. **Piliated *Bacteroides fragilis* strains adhere to epithelial cells and more sensitive to phagocytosis by human neutrophils than nonpiliated strains.** Infect. Immun. 43, 189-194, 1984.
- PRUZZO, C.; GUSMAN, C.A. & RICETTI, M. **Incidence of haemagglutination activity among pathogenic and non-pathogenic *Bacteroides fragilis* strains and role of capsule and pili in haemagglutination and adherence.** FEMS Microbiol. Lett., 59, 113-118, 1989.
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A. & WEXLER, H.M. **Presence of Quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*.** Microb. Ecol. Jan 11 [Epub ahead of print], 2008.
- PUMBWE, L.; WAREHAM, D.W.; ADUSE-OPOKU, J.; BRAZIER, J.S. & WEXLER, H.M. **Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*.** Clin. Microbiol. Infect., 13(2),183-9, 2007.
- RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. & TALLY, F.P. **Antimicrobial Resistance in Anaerobes.** Clinical Infect. Dis., 24, (suppl 1), 5110-20, 1997.
- RASMUSSEN, B.A.; GLUZMAN, Y. & TALLY, F.P. ***Escherichia coli* chromosomal mutations that permit direct cloning of the *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase gene *ccrA*.** Molecular Microbiol., 5, 1121-1129, 1991.

- RASMUSSEN, J.L.; ODELSON, D.A. & MACRINA, F.L. **Complete nucleotide sequence of insertion element IS4351 from *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol., 169, 3573-3580, 1994.
- RASMUSSEN J.L.; ODELSON D.A. & MACRINA F.L. **Complete nucleotide sequence and transcription of *ermF*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacteroides fragilis***. J. Bacteriol., 168,(2), 523-533, 1986.
- REYSSET, G. **Genetics of 5-Nitroimidazole Resistance in *Bacteroides* Species**. Anaerobe., 2, 59-69, 1996.
- REYSSET, G.; HAGGOURD, A. & SEBALD, M. **Genetics of resistance of *Bacteroides* species to 5-nitroimidazole**. Clin. Infect. Dis., 16, S401-S403, 1993.
- ROBERTS, M.C. **Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes**. Anaerobe., 9, 63-69, 2003.
- ROBERTS, M.C. **Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution**. JMS Microbiol. Rev. 19: 1-24, 1996.
- ROGEMOND, V. & GUINET, R.M. **Lectinlike adhesions in the *Bacteroides fragilis* group**. Infect. Immun. 53, 99-102, 1986.
- SAKAMOTO, M. & BENNO, Y. **Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb nov., *Parabacteroides goldsteinii* gen. nov., comb nov., *Parabacteroides merdae* gen. nov., comb nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 1599-1605, 2006.
- SALYERS, A.A. & AMÁBILE-CUEVAS, C.F. **Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?** Antimicrob. Agents Chemother., 41(11), 2321-2325, 1997.
- SALYERS, A.A. & SHOEMAKER, N.B. **Chromosomal gene transfer elements of the *Bacteroides* group**. Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis., 11, 1032-1038, 1992.
- SALYERS, A.A. & SHOEMAKER, N.B. **Resistance Gene transfer in Anaerobes: New Insights, New Problems**. Clinical Infect., Dis; 23 (Suppl 1): S36-43, 1996.
- SALYERS, A.A.; GUPTA, A. & WANG, Y. **Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes**. TRENDS Microbiol., 12 (9), 412-416, 2004.
- SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; STEVENS, A.M. & LI, L.Y. **Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements**. Microbiol. Rev., 4 (59), 579-590, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHAPIRO, J.M.; GUPTA, R.; STEFANSSON, E.; FANG, F.C. & LIMAYE, A.P. **Isolation of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* carrying the *nimA* nitroreductase gene from a patient in Washington State**. J. Clin. Microbiol., 42, 4127 - 4129, 2004.
- SHAPIRO, M.E.; KASPER, D.L.; ZALEZNIK, D.F.; SPRIGGS, S.; ONDERDONK, AB. & FINBERG, R.W. **Cellular control of abscess formation: role of T cells in the regulation of abscess formed in response to *Bacteroides fragilis***. J. Immunol., 137, 341-346, 1986.
- SHOEMAKER, N.B.; VLAMMAKIS, H.; HAYES, K. & SALYERS, A.A. **Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and other genera in the human colon**. Appl. Environ. Microbiol., 67, 561-568, 2001.
- SINGER, E.; CALVET, L.; MORY, F.; MULLER, C.; CHOMARAT, M.; BÉZIAN, M.-C.; BLAND, S.; JUVENIN, M.-E.; DRUGEON, H.; FOSSE, T.; GOLDSTEIN, F.; JAULHAC, B.; MONTEIL, H.; MARCHANDIN, H.; JEAN-PIERRE, H. & DUBREUIL, L. **[Monitoring of antibiotic resistance of Gram negative anaerobes]**. Med. Mal. Infect., 38 (5), 256-263, 2008.

- SJIBRANDI, R.; BLAAUWEN, T.D.; TAME, J.R.H.; OUDEGA, B.; LUIRINK, J. & OTTO, B.R. **Characterization of an iron-regulated alpha-enolase of *Bacteroides fragilis***. *Microb. Infect.*, 7, 9- 18, 2005.
- SNYDMAN, D.R.; JACOBUS, N.V.; MCDERMOTT, L.A.; SUPRAN, S.; CUCHURAL, JR.; FINEGOLD, S. HARREL, L.; HECHT, D.W.; IANNINI,P.; JENKINS, S.; CARL PIERSON, RIHS, J.; GORBACH, L. **Multicenter Study of In Vitro Susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group, 1995 to 1996, with Comparison of Resistance Trends from 1990 to 1996**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Oct, 2417-2422, 1999.
- SÓKI, J.; EDWARDS, R.; URBÁN, E.; FODOR, E.; BEEF, Z. & NAGY, E. **Screening of isolates from faeces for carbapenem-resistant *Bacteroides* strains; existence of strains with novel types of resistance mechanisms**. *Inter. J. Antimicrob. Agents.*, 24, 450-454, 2004.
- SÓKI, J.; GAL, M.; BRAZIER, J.S.; ROTIMI, V.O.; URBÁN, E.; NAGY, E. & DUERDEN, B.I. **Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains**. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57, 212-220, 2006.
- SOUZA, W.G.S.; AVELAR, K.E.S.; ANTUNES, E.N.F.; ANTUNES, L.C.M.; LOBO, L.A.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C.S. **Resistance profile of *Bacteroides fragilis* isolated Brazil. Do they shelter the *cfiA* gene?** *J. Microbiol. Chemother.*, 45, 475-781, 2000.
- STEVENS, AM.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **The region of a *Bacteroides* conjugal chromosomal tetracycline resistance element which is responsible for production of plasmidlike forms from unlinked chromosomal DNA might also be involved in transfer of the element**. *J. Bacteriol.*, 172, 4271-4279, 1990.
- STEVENS, AM.; SHOEMAKER, N.B.; LI, L.Y. & SALYERS, A.A. **Tetracycline regulation of genes on *Bacteroides* conjugative transposon**. *J. Bacteriol.*, 175, 6134-6141, 1993.
- STUBBS S.L.J.; BRAZIER J.S.; TALBOT P.R. & DUERDEN B.I. **PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of *Bacteroides* spp. And Characterization of Nitroimidazole Resistance Genes**. *J. Clin. Microbiol.*, Sept, 3209-3213, 2000.
- THOMPSON, J.S. & MALAMY, M.H. **Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* β -lactamase II**. *J. Bacteriol.*, 172, 2584-2593, 1990.
- TRIBBLE, G.D.; PARKER, AC. & SMITH, C.J. **Genetic structure and transcriptional analysis of a mobilizable, antibiotic resistance transposon from *Bacteroides***. *Plasmid.*, 42, 1-12,1999.
- TRINH, S. & REYSSET, G. **Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp.** *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2078-2084, 1996.
- TRINH, S.; HAGGOU, A.; REYSSET, G. & SEBALD, M. **Plasmids pIP419 and pIP 421 from *Bacteroides*: 5- nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements**. *Microbiol.*, 141, 927-935, 1995.
- UEDA, O.; WEXLER, H.M.; HIRAI, K.; SHIBATA, Y.; YOSHIMURA, F. & FUJIMURA, S. **Sixteen homologs of the Mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis***. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (7), 2807-2815, 2005.
- VIEIRA, J.M.B.D.; BOENTE, R.F.; MIRANDA, K.R.; AVELAR, K.E.S.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C.S. **Reduced susceptibility to nitroimidazoles among *Bacteroides* species in Brazil**. *Current. Microbiol.*, 52, 27-32, 2005.
- WALSH, C. **Molecular mechanism that confer antimicrobial drug resistance**. *Nature.*, 406, 775-781, 2000.
- WALSH, T.R.; ONKEN, A.; HALDORSEN, B.; TOLEMAN, M.A & SUNDSFJORD, A. **Characterization of a carbapenemase-producing clinical isolate of *Bacteroides fragilis* in Scandinavia: genetic analysis of a unique insertion sequence**. *Scand. J. Infect. Dis.*, 37, 676-679, 2005.

WANG, Y., WANG, G.R., SHELBY, A., SHOEMAKER, N.B., SALYERS, A.A. **A newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnERM1, contains genes also found in Gram-positive bacteria.** A. Environ. Microbiol., 69, 4595-4603, 2003.

WANG, Y.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **Regulation of *Bacteroides* Operon controls Excision and transfer of the conjugative transposon.** CTnDOT. J. Bacteriol. 186, 2548-2557, 2004.

WATANABE, K.; UENO, K. & KATO, N. **In vitro susceptibility of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in Japan.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 1069-1073, 1992.

WHITTLE, G.; HUND, B.D.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT.** App. Environ. Microbiol., 67, 3844-3495, 2001.

WHITTLE, G.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, AA. **The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes.** Cell Mol. Life Sci., 59, 2044-2054, 2002.

WU, S., MORIN, P.J., MAOUYO, D., SEARS, C.L. ***Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation.** Gastroenterology.. 124(2), 392-400, 2003.

YAMAOKA, K.; WATANABE,K.; MUTO, Y.; KATOH, N.; UENO, K. & TALLY, F.P. **R-plasmid mediated transfer of β -lactams resistance in *Bacteroides fragilis*.** J. Antimicrob., 43, 1302-1306, 1990.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)