

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**“Padrões de Enterovirulência e Análise de
Sequências em Múltiplos *loci* em Estudo Taxonômico
de *Bacteroides fragilis*”**

KARLA RODRIGUES MIRANDA

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Karla Rodrigues Miranda

“Padrões de Enterovirulência e Análise de Sequências em Múltiplos *loci* em Estudo Taxonômico de *Bacteroides fragilis*”



Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências (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 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Miranda, Karla Rodrigues

“Padrões de Enterovirulência e Análise de Sequências em Múltiplos *loci* em Estudo Taxonômico de *Bacteroides fragilis*”/Karla Rodrigues Miranda - Rio de Janeiro, 2009

xviii, 92

Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Referências bibliográficas: f 110

1. *Bacteroides fragilis* 2. enterovirulência 3. marcadores genéticos 4. MLSA 5. virulência

I. Domingues, Regina Maria Cavalcanti Pilotto. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. “Padrões de Enterovirulência e Análise de Sequências em Múltiplos *loci* em Estudo Taxonômico de *Bacteroides fragilis*”

Karla Rodrigues Miranda

**“Padrões de Enterovirulência e Análises de Sequências em Múltiplos *loci*
em Estudo Taxonômico de *Bacteroides fragilis*”**

Rio de Janeiro, 14 de Agosto de 2009

Aprovada por:

(Prof^a. Katia Regina Neto dos Santos, PhD, UFRJ)

(Prof. João Ramos da Costa Andrade, PhD, UERJ)

(Prof^a. Renata Martins do Souto, PhD, UFRJ)

(Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza, PhD, UFRJ)

(Prof. Walter Martin Roland Oelemann, 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 da Prof^ª. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

AGRADECIMENTOS

Ao final de longos dez anos de instituição, gostaria de agradecer a todos que, de certa forma, contribuíram para a realização de mais uma importante etapa em minha vida.

Primeiramente a Deus, pela força em todos os momentos, sem a qual não conseguiria ultrapassar as inúmeras barreiras encontradas durante esse período.

A minha mãe, meus irmãos e meus sobrinhos (é, fiquei pra titia...) pelo apoio, compreensão e todos os momentos de alegria.

Aos meus eternos cachorrinhos e ao gatinho (não sei por que todo mundo acha que é gata) pela companhia.

A Prof^ª. Regina Domingues, a matriarca da grande família anaeróbia, a amiga distraída com jeito de mãezona, pelo imenso carinho, paciência, conselhos e dedicação. Pesquisadora exemplar capaz de ter excelentes ideias para os inúmeros projetos em semáforos fechados, obras, congestionamentos e nas salas de espera. Muito mais amiga do que orientadora, possui sempre palavras de incentivo (lado Regina auto-ajuda) para qualquer pessoa (é, ela não tem critério). É realmente impossível encontrar alguém que somente vê o lado bom das pessoas como a Prof^ª. Regina. A pessoa mais amada e querida por onde passa, que por tudo isso e muito mais possui um número recorde de alunos por m².

A Prof^ª. Maria Candida Ferreira, a matriarca que saiu do mundo anaeróbio para fazer grandes obras de arte, pelo carinho e por me fazer não desistir de ingressar no doutorado.

A equipe do Laboratório Biologia de Anaeróbios: minha irmãzinha Renatinha Boente, sempre com seu jeito doce de ser; Heidi “Chiclets e titia” Pauer, que apesar de não saber sorrir e pelo aparente mau humor (é tudo fachada!) é uma grande amiga; Prof^ª. Dra. Eliane “Lili” Oliveira, a internacional que ajuda a todos sempre; Ilana “cabeçuda” Teruszkin Balassiano, amiga de longa data e estressada mor; Livia “Prof^ª. Adjunta III, orientadora e noiva do ano” Ferreira, menina talentosa de cinco cérebros e que tem o dom de orientar todos os alunos de iniciação científica; Mariana “mãe da Alice e vetgirl” Dias, a cativante e adorável amiga, cria da Livia, que só poderia ser tão talentosa quanto; Felipe “Lost” Teixeira, mais uma cria da Livia e que diz chegar por volta das 8h quase todos os dias (aham...); Natasha Médici, a menina maluquinha; Lais Falcão “Antunes”, a qual não sabia ter atividade revisora bibliográfica tão eficiente; Renato Geraldo de Paula, sempre com suas ideias e perguntas que confundem todo mundo; Rafael Peixoto, “Spit Fight do Recreio” (ou

algo parecido que ele vive repetindo); Danielle Secco (não, ela não é parente da Deborah); Rosane e Leticia, que com certeza passaram mais tempo nos ônibus do que no laboratório; os novinhos Alexandre Murad e Carolina Moutinho, que apesar do pouco tempo de contato já demonstraram serem pessoas excelentes.

Ao querido Joaquim dos Santos Filho, patrimônio do laboratório, pelo carinho e amizade de sempre.

Aos que fizeram parte dessa equipe: André Torres, Bruno Dias, Eduardo Antunes, Deyse Vallim, Joyce Brito, Priscilla Zonzini e Gabriel Gomes pela boa convivência.

Aos bravos camundonguinhos queridos, os quais fizeram parte da última etapa, a qual não imaginava o quanto pudesse ser difícil.

A Kátia Avelar pela ajuda com o seu constante bom humor.

A Prof^ª. Clarissa Palatnik, por aceitar para estágio um número considerável de alunos, de uma mesma turma, do primeiro período de graduação, sendo essa a primeira vez que pude vivenciar a experiência de trabalhar em laboratório.

A Prof^ª. Maria Teresa Romanos, por todos os ensinamentos na área de Virologia no meu segundo estágio de iniciação científica.

A Prof^ª. Angela Castro, por me aceitar durante minha transição da Virologia para a Microbiologia Médica. Agradeço pelos “puxões de orelha” e me ensinar a ser menos dependente.

A Prof^ª. Renata Rabello, com a qual pude conviver durante a realização da monografia, pela amizade nesse período. Foi aguardando sua apresentação da Jornada de Pós-Graduação que me encantei pelos projetos realizados no laboratório da Prof^ª. Regina.

Ao Prof. Walter Oelemann, o revisor alemão de 2 metros de altura, pela enorme ajuda, apoio e carinho sempre constantes. A altura intimida, mas corresponde ao tamanho da bondade dele.

A Prof^ª. Kátia Santos pelo carinho, conselhos e apoio em todos os momentos.

A equipe do Laboratório de Infecções Hospitalares, Carol, Eliezer, Fred, Fernandinha, Gustavo “paizão do ano”, Ricardo, Cristiane, Milena pela boa convivência.

A equipe do Laboratório de Cocos I, Ivi, Ana Beatriz, Tatiana, Prof. Leslie, Natalia, Ligia, Marquinhos e Helena pela amizade.

Ao Prof. Sérgio Fracallanza, exemplo de amor a profissão e versão masculina da Prof^ª. Regina, por aceitar fazer parte tanto da defesa de Mestrado como agora na defesa de Doutorado e pelo carinho de sempre.

Ao Prof. Andrade, super gentil, por aceitar compor a banca de Doutorado.

A Renata Martins, por aceitar participar da banca de Doutorado de forma tão repentina. Obrigada pela constante ajuda e por ser uma pessoa tão atenciosa.

Aos amigos Camille Moura e Felipe Cruz por todos os momentos agradáveis e imensamente divertidos ao longo dos últimos anos. É impressionante como me identifiquei com alguma peculiaridade de cada uma dessas duas pessoas tão diferentes entre si e por isso tão incríveis.

Aos amigos do bloco A: o inusitado “coorientador” Felipe Piedade e as tenistas Natalia Iório e Roberta “Bebeta” Caboclo (atleta também do remo) que conhecem bem a mais simples fórmula de combate ao estresse: bom humor, bom papo, cloreto de magnésio e latinhas de fermentados.

Aos amigos do IMPPG: Angélica Miranda, Giseli Costa, Naira Elane, Márcia Francisco (muito obrigada pela máquina!!!!), Cícera Carvalho, Silvana Alves, Valéria e Dennis Girão (o casal mais fofo que conheço), Shirlei Faria (a eficiência em pessoa), Semíramis Castro, Raquel Neves, Jacqueline Martins, Marlei, Marquinhos, Filó, Fabfola, Jaqueline, Sr. Luiz, Fernando, Marcos Dornellas, Flávio (irmão do coração), Orlando e Antônio pela ajuda e pelos momentos divertidos.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia Médica, Prof^ª. Ana Paula Colombo, Prof. Marco Miguel, Prof^ª. Marcia Giambiagi, Prof. Rafael Duarte, Prof^ª. Bernadete Teixeira, Prof^ª. Beatriz Meurer, Prof. Armando Borges e Prof^ª. Lucia Teixeira pelos ensinamentos e por serem sempre acolhedores com os alunos dessa instituição.

A Dilma Santana Cayres pela constante e enorme boa vontade e atenção na biblioteca.

A coordenação da pós-graduação do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, representado anteriormente pela Prof^ª. Thais Souto-Padrón e atualmente pela Prof^ª. Ana Paula Colombo.

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, representado pela Prof^ª. Agnes Marie de Sá Figueiredo; e demais docentes da instituição;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/Pronex) pelo suporte financeiro.

À Deus

*“I have not failed 700 times. I have not failed once.
I have succeeded in proving that those 700 ways will not work.
When I have eliminated the ways that will not work,
I will find the way that will work.”*
Thomas Edison

RESUMO

Karla Rodrigues Miranda

“Padrões de Enterovirulência e Análises de Sequências em Múltiplos *loci* em Estudo Taxonômico de *Bacteroides fragilis*”

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências (Microbiologia).

No presente estudo, um grupo de cepas isoladas no período de 1980 a 2008 no Brasil (109 cepas) e na França (18 cepas) foi investigado quanto à presença do gene *bft* (que codifica a toxina de *Bacteroides fragilis* associada à enterovirulência) e subsequente classificação nos padrões genéticos I e III. Foi detectada somente uma (0,9%) cepa enterotoxigênica (padrão I) entre as cepas isoladas no Brasil e dentre as cepas isoladas na França, duas (11,1%) foram categorizadas como padrão I por albergarem o gene *bft*. Com base nas técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento, foi determinado que as três cepas padrão I encontradas apresentavam a isoforma *bft* -1. Apesar do baixo índice de cepas enterotoxigênicas no Brasil, a taxa de detecção de cepas não-toxigênicas do padrão III (sítio de inserção para a ilha de patogenicidade) foi considerada elevada (n=49/44,9%). Esses dados refletem a necessidade de estudos futuros para monitorar eventuais mudanças no padrão de enterovirulência desse micro-organismo em nosso país. Diversos estudos nos últimos anos têm revelado uma considerável diversidade genética na espécie *B. fragilis*, sendo que alguns trabalhos sugerem a existência de duas divisões, proposta esta fundamentada na presença e/ou ausência dos genes *cfiA* (metalo-β-lactamase/ divisão I) e *cepA* (cefalosporinase/ divisão II). A técnica de análise de sequências em múltiplos *loci* tem como base a comparação de sequências de fragmentos genômicos amplificados por PCR e pode ser utilizada para identificação molecular e diferenciação entre espécies bacterianas. Sendo assim, esta segunda etapa do estudo teve como um dos objetivos realizar uma análise comparativa de sequências dos genes: *rpoB* (codificador da subunidade β da RNA polimerase, *rrs* (rDNA 16S), *est* (esterase), *gdh* (glutamato desidrogenase, NAD-dependente), *pgm* (fosfoglucomutase) para fins de caracterização genética. Inicialmente, as cepas utilizadas foram divididas em dois grupos de acordo com a presença e/ou ausência dos genes *cfiA* e *cepA* através de PCR. Foi verificado que 16 cepas das 127 analisadas albergavam o gene *cfiA* e 60 carregavam o gene *cepA*. Para análises subsequentes, o total de 17 cepas (sete *cfiA* positivas e dez *cfiA* negativas) foi selecionado para reações de amplificação e sequenciamento primeiramente dos genes *rrs* e *rpoB*. Com a análise das sequências obtidas e, tendo por base a similaridade e agrupamento das sequências dos genes *rrs* e *rpoB*, foi observada uma divergência intra-espécie, com a separação dos dois subgrupos. Foram realizados os mesmos procedimentos para os genes de metabolismo celular *est*, *gdh* e *pgm*. No entanto, somente foi constatada a existência dessas duas divisões quando analisadas as sequências do gene *est*, o qual emerge como uma nova ferramenta de análise filogenética dentro dessa espécie. Uma cepa representante de cada uma das duas divisões foi ensaiada em modelo animal e foi detectada a produção de biofilme nas 17 cepas selecionadas no MLSA para fins de comparação quanto ao potencial de virulência. Foram realizados ensaios para avaliação da produção de biofilme, mas nenhuma alteração significativa foi observada. Por outro lado, a cepa pertencente ao subgrupo I (*cfiA*-negativa) apresentou maior potencial na formação de abscessos intraperitoneais do que a cepa pertencente à subdivisão II (*cfiA*-positiva). Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar se existe realmente diferença na expressão de fatores de virulência entre micro-organismos dessas subdivisões.

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*, enterovirulência, marcadores genéticos, MLSA, virulência

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

ABSTRACT

Karla Rodrigues Miranda

“Enterovirulence Patterns and Multilocus Sequence Analysis in *Bacteroides fragilis*”

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Abstract da Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências (Microbiologia).

The presence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) and nontoxigenic *B. fragilis* (NTBF) among 109 strains isolated between 1980 and 2008 in Brazil were investigated by PCR. One strain, representing 0.9% of the total of analyzed strains, harbored the *bft* gene which was identified as *bft*-1 isoform based on PCR-RFLP and sequencing. In strains isolated in France, two ETBF strains (11.1%) were found to harbour the *bft*-1 isoform. Forty-nine Brazillian strains (44.9%) exhibited the NTBF pattern III which possesses the flanking region required for pathogenicity island acquisition in which the *bft* gene is codified. These data reinforce the potential of *B. fragilis* as an emerging enteropathogen in our country, despite the low taxa of isolation of ETBF strains in Brazil. In the last few years, many studies revealed a remarkable genetic variability in *B. fragilis* species, leading the proposal of the existence of two genuspecies according to the presence or absence of the *cfiA* (metalo- β -lactamase/carbapenase) and *cepA* (cefalosporinase) genes. Sixteen strains from the total of 127 harboured the *cfiA* gene and sixty presented the *cepA* gene. Taken these data as starting point, the aim of the second stage of this study was to evaluate the use of glutamate dehydrogenase, phosphoglucomutase and esterase metabolic enzymes, RNA polymerase β subunit (*rpoB*) and 16S rRNA gene sequences to identify the presence of these two subgroups in a set of seventeen *B. fragilis* strains (seven *cfiA* positive and ten *cfiA* negative). Analysis of the *est* gene sequences generated a classification similar to 16SRNA- and *rpoB*- genes based on phylogenetic trees. On the other hand, the *pgm* and *gdh* genes did not revealead the existence of these subgroups within this specie. *est* gene maybe could be presented as an alternative tool for differentiation of very closely related species or subspecies. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) provided highly reproducible and reliable data for *B. fragilis* taxonomy. Concerning eventual alterations in the virulence within these subgroups, biofilm production assay and animal model were investigated. One strain from each subgroup was evaluated. No significant alteration in the bacterial adherence to an inert surface was detected. On the other hand, the representative strain from subdivision I (*cfiA*-negative) was found to present a higher ability to induce intraperitoneal abscess rather than strains from subdivision II (*cfiA*-positive). Nevertheless, further studies concerning the virulence of these two subdivisions within *B. fragilis* are needed.

Keywords: *Bacteroides fragilis*, enterovirulence, genetic markers, MLSA, virulence

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
INTRODUÇÃO	1
1. Bactérias anaeróbias.....	1
2. <i>Bacteroides</i> spp.	2
3. <i>Bacteroides fragilis</i>	4
4. <i>Bacteroides fragilis</i> toxin (BFT)	8
5. Resistência aos antimicrobianos.....	12
6. Beta-lactâmicos.	14
7. Diversidade genética da espécie <i>B. fragilis</i>	17
8. Análises de sequências em múltiplos <i>loci</i> (MLSA).....	20
OBJETIVOS	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Cepas bacterianas.....	27
2. Reativação e confirmação da identificação bioquímica	31
2.1. Reativação	31
2.2. Confirmação da identificação fenotípica através de testes bioquímicos convencionais.....	31
2.2.1. Semeadura em meio seletivo	31
2.2.2. Pesquisa da produção de indol.....	32
2.2.3. Pesquisa da produção de catalase	32
2.2.4. Fermentação de carboidratos.....	32
2.3. Confirmação da identificação fenotípica através de sistema miniaturizado	33
3. Obtenção de DNA cromossômico bacteriano para realização da PCR.....	33
4. PCR.....	34
5. <i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (PCR-RFLP)	36
5.1. Eletroforese	36
5.2. Purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	36
5.3. Análise bioinformática.....	37

5.3.1. Alinhamento das sequências.....	37
5.3.2. Árvores filogenéticas.....	37
6. Ensaio da produção de biofilme	38
7. Análise estatística	39
8. Modelo animal de indução de abscessos intra-abdominais e mortalidade	39
RESULTADOS.....	40
1. Confirmação da identificação da espécie <i>B. fragilis</i>	41
2. Detecção dos padrões de enterovirulência	42
3. Análises de sequências em múltiplos <i>loci</i> (MLSA).....	44
4. Ensaio da produção de biofilme	61
5. Indução de abscessos intra-abdominais em camundongos	62
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Estrutura esquematizada da holotoxina BFT	9
Figura 2: Estrutura esquematizada dos padrões moleculares de <i>Bacteroides fragilis</i>	10
Figura 3: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>nanH</i> das 17 cepas selecionadas para confirmação da identificação de <i>B. fragilis</i>	38
Figura 4: PCR-RFLP para determinação das isoformas presentes nas cepas ETBF após digestão do fragmento amplificado do gene <i>bft</i> com as enzimas <i>AccI</i> e <i>DraI</i>	39
Figura 5: Distribuição das cepas de <i>B. fragilis</i> isoladas no Brasil entre 1980 e 2008 e percentual encontrado nas cepas da França entre 2000 e 2004.....	40
Figura 6: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>cfiA</i> das 16 cepas selecionadas para confirmação da identificação de <i>B. fragilis</i>	41
Figura 7: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>rrs</i>	43
Figura 8: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>rpoB</i>	43
Figura 9: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>est</i>	44
Figura 10: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>pgm</i>	44
Figura 11: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene <i>gdh</i>	45
Figura 12: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene <i>rrs</i> (16S rDNA) demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> selecionadas.....	46
Figura 13: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene <i>rpoB</i> (16S rDNA) demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> selecionadas.....	47
Figura 14: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene <i>est</i> (16S rDNA) demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> selecionadas.....	48
Figura 15: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene <i>pgm</i> (16S rDNA) demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> selecionadas.....	49
Figura 16: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene <i>gdh</i> (16S rDNA) demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> selecionadas.....	50
Figura 17: Região conservada do gene <i>rrs</i> na qual é observada uma diferenciação das cepas <i>cfiA</i> -positivas e <i>cfiA</i> -negativas	58
Figura 18: Aderência de bactérias a placas de poliestireno em um ensaio de biofilme.....	61
Figura 19: Abscessos intraperitoneais em camundongos BALB/c machos	62

Quadro 1: Origem e identificação das 127 cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> selecionadas para este estudo.....	28
Quadro 2: Genes pesquisados, sequência de iniciadores, temperatura de dissociação, controles positivos e região 5' de hibridação dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e tamanhos de fragmentos esperados.....	35
Quadro 3: Características fenotípicas das cepas de <i>B. fragilis</i> através de testes fisiológicos convencionais.....	41
Quadro 4: Tabela de identificação de <i>B. fragilis</i> através do sistema API20A.....	41
Quadro 5: Origem e identificação das 17 cepas de <i>B. fragilis</i> selecionadas.....	46
Quadro 6: Dados das sequências do gene <i>rpoB</i> demonstrando uma diferenciação das cepas <i>cfiA</i> -positivas e <i>cfiA</i> -negativas conforme com a substituição de nucleotídeos.....	59
Quadro 7: Dados das sequências do gene <i>est</i> demonstrando uma diferenciação das cepas <i>cfiA</i> -positivas e <i>cfiA</i> -negativas conforme com a substituição de nucleotídeos.....	60
Tabela 1: Porcentagem de divergência entre as sequências do gene <i>rrs</i> das 17 cepas de <i>B. fragilis</i> selecionadas.....	55
Tabela 2: Porcentagem de divergência entre as sequências do gene <i>rpoB</i> das 17 cepas de <i>B. fragilis</i> selecionadas.....	56
Tabela 3: Porcentagem de divergência entre as sequências do gene <i>est</i> das 17 cepas de <i>B. fragilis</i> selecionadas.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

μg = micrograma
g = grama
h = horas
min = minutos
ng = nanograma
mg = miligrama
 μL = microlitro
mL = mililitro
M = molaridade
mM = milimolar
nM = nanomolar
 μM = micromolar
cm = centímetros
 $^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius
Da = Daltons
pb = pares de base
pH = potencial hidrogeniônico
U = unidade enzimática
x g = força gravitacional
AFLP = *Amplified Fragment Length Polymorphism*; análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados
AP-PCR = *Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction*; PCR com iniciadores arbitrários
ATCC = *American Type Culture Collection*
BBE = *Bacteroides Bile Esculina*
BFT = *Bacteroides fragilis* toxin ; toxina *B. fragilis*
BHI = *Brain - Heart infusion*; infusão cérebro e coração
BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*; ferramenta de busca e alinhamento local básico
CFU/mL = Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
CHIV = *Hospitalier Intercommunal – Villeneuve-Saint-Georges*
CPC = Complexo Polissacarídico Capsular
CTn = *conjugative transposon*; transposon conjugativo
CTnDOT = *conjugative transposon* da Família DOT
DNA = *deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucléico
DO = Densidade óptica
EDTA = *Ethylenediaminetetracetic acid*; ácido etilenodiaminatetracético
Eh = potencial de óxido-redução
ERIC-PCR = *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction*; PCR de sequências consenso repetitivas intergênicas de enterobactérias
est = gene que codifica a esterase
ETBF = *enterotoxigenic Bacteroides fragilis* ; *B. fragilis* enterotoxigênico
gdh = gene que codifica a glutamato desidrogenase
GDH = glutamato desidrogenase
IL = Interleucina
IS = *Insertion Sequence*; sequência de inserção
kb = kilobases
LPS = *Lipopolissacharide*; lipopolissacarídeo

MEC = componentes da matriz extracelular
ML = *Maximum Likelihood*; máxima verossimilhança
MLEE = *Multilocus Enzyme Electrophoresis*; análise de eletroforese de múltiplas enzimas
MLSA = *Multilocus Sequence Analysis*; análise de sequências de múltiplos *loci*
MLST = *Multilocus Sequence Typing*; análise de tipagem de múltiplos *loci*
MP = *Maximum Parsimony*; máxima parcimônia
MSCRAMMs = *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*
componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz
NJ = *Neighbor-Joining*
NTBF = *nontoxic B. fragilis*; *B. fragilis* não toxigênico
OMPs = proteínas de membrana externa
OTUs = *Operational Taxonomic Units*; unidades taxonômicas operacionais
PBPs = *Penicillin binding proteins*; Proteínas ligantes de penicilina
PBS = *Phosphate-buffered saline*; salina fosfato tamponada
PCR = *Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase
PFGE = *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; eletroforese em gel em campo pulsado
PGM = fosfoglucomutase
pgm = gene que codifica a fosfoglucomutase
PRAS = *Pre-Reduced Anaerobically Sterilized*; pré-reduzido anaerobicamente esterilizado
PSA = polissacarídeo A
PY = *Peptone – Yeast*; peptona – extrato de levedura
PYG = peptona – extrato de levedura - glicose
RAPD = *Random Amplified Polymorphic DNA*; DNA polimórfico amplificado
randomicamente
REA = *Restriction Enzyme Analysis*; análise através de enzimas de restrição
rep-PCR = *Repetitive Extragenic Palindromic- Polymerase Chain Reaction*; PCR de
sequências palindrômicas repetitivas extragênicas
RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism*; polimorfismo do comprimento dos
fragmentos de restrição
rpoB = gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase
rrn = operon rRNA
rRNA = *ribosomal Ribonucleic acid*; ácido ribonucléico ribossomal
rrs = gene que codifica a subunidade 16S do rRNA
SDS = *Sodium Dodecyl Sulphate*; sódio dodecil sulfato
TE = Tris – EDTA
 T_m = *melting point*; temperatura de dissociação
 $TNF\alpha$ = *Tumor Necrosis Factor alpha*; fator de necrose tumoral alfa

INTRODUÇÃO

1. Bactérias anaeróbias

As bactérias anaeróbias representam a maioria dos micro-organismos que compõem a microbiota anfibiótica do trato intestinal humano (HAO & LEE, 2004), estando também presentes na microbiota da cavidade oral e dos tratos genital feminino e respiratório (BROOK, 2004; SUMATI & SARITHA, 2009). De um total de aproximadamente 1800 gêneros e 15000-36000 espécies bacterianas presentes no intestino grosso, cerca de 90% correspondem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, acreditando-se que as espécies predominantes pertençam aos gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Bacteroides* (DIBASE *et al.*, 2008). No entanto, o rompimento do equilíbrio na relação entre a microbiota e o hospedeiro pode selecionar algumas espécies microbianas que passam da condição de comensais a patógenos, estabelecendo um modelo de infecção oportunista de origem endógena (JOUSIMIES-SOMER & SUMMANEN, 2002; WEXLER, 2007).

Infecções anaeróbias podem ocorrer em todos os sítios anatômicos, incluindo o sistema nervoso central, cavidade oral, abdome, pelve, pele e tecidos moles (SUMMANEN, 2002; WEXLER, 2007). Esses micro-organismos também colonizam recém-nascidos durante a passagem pelo canal vaginal no momento do parto e têm sido recuperados de diversos tipos de infecções neonatais (BROOK, 2002; BROOK, 2005). Devido à sua natureza fastidiosa, são micro-organismos de difícil isolamento a partir de espécimes clínicos, sendo frequentemente negligenciados. Além disso, a utilização de métodos inadequados de coleta, transporte e processamento de espécimes contribui para uma determinação pouco precisa dos percentuais de associação destas bactérias a processos infecciosos (BROOK, 2002; SUMMANEN, 2002).

As bactérias anaeróbias mais importantes clinicamente são espécies representantes de gêneros de bastonetes Gram-negativos (*Bacteroides*, *Bilophila*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*), de cocos Gram-positivos (*Peptostreptococcus*), de bacilos Gram-positivos formadores de esporos (*Clostridium*) ou não (*Actinomyces*, *Propionibacterium*) e de cocos Gram-negativos (*Veillonella*) (SUMMANEN, 2002).

Infecções mistas causadas por diferentes espécies de organismos anaeróbios facultativos e estritos são comumente observadas na clínica (SUMMANEN, 2002; BROOK, 2008a).

2. *Bacteroides* spp.

Originalmente descrito em 1898 por VEILLON & ZUBER, por muitos anos o gênero *Bacteroides* foi considerado como composto por bastonetes pleomórficos Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios, presentes na natureza sempre em associação com hospedeiros. Esses micro-organismos são predominantes na microbiota do cólon, chegando a superar as bactérias facultativas na proporção de 1000-10000:1 (HAO & LEE, 2004), sendo também encontrados como constituintes da microbiota do trato genital feminino (SUMATI & SARITHA, 2009). Por outro lado, são as bactérias anaeróbias mais isoladas de pacientes acometidos por infecções anaeróbias supurativas (WEXLER, 2007). Na década de 1970, análises fisiológicas de constituintes do gênero revelaram considerável heterogeneidade com relação as suas propriedades bioquímicas, indicando que essas bactérias não representavam um verdadeiro grupo filogenético.

Com o avanço das técnicas de análise filogenética, alguns pesquisadores tentaram redefinir esse grupo com a aplicação de abordagens como sorotipagem (LAMBE, 1974), fagotipagem (BOOTH *et al.*, 1979), análise dos perfis eletroforéticos de desidrogenases, composição de açúcares e ácidos graxos celulares (BRONDZ *et al.*, 1989; BRONDZ *et al.*, 1991; MAYBERRY, LAMBE & FERGUSON, 1982; HOLDEMAN, KELLY & MOORE, 1984), análise de lipídeos, hibridização rRNA-DNA (JOHNSON & HARICH, 1986), homologia de DNA (JOHNSON, 1978; VAN STEENBERGEN, VLAANDEREN & GRAAF, 1982), utilização de sondas de oligonucleotídeos para rRNA 16S (PASTER *et al.*, 1984) e comparações de sequências de rRNA 5S e 16S (JOHNSON, 1978; PASTER *et al.*, 1984; VAN DEN EYNDE *et al.*, 1989; VEILLON & ZUBER, 1898). Com base nessas informações, os membros do gênero *Bacteroides* foram então divididos em três gêneros: (1) *Bacteroides sensu stricto* constituído por espécies sacarolíticas não pigmentadas e resistentes à bile (SHAH & COLLINS, 1989); (2) *Prevotella*, constituído por micro-organismos moderadamente sacarolíticos sensíveis à bile (SHAH & COLLINS, 1990) e (3) *Porphyromonas*, constituído por espécies assacarolíticas pigmentadas sensíveis a bile ((HOLDEMAN, CATO & MOORE, 1977; SHAH & COLLINS, 1988).

Recentemente, em 2007, foi realizada uma nova reunião do subcomitê *ad-hoc* que discute questões taxonômicas de bastonetes Gram-negativos (OLSEN & SHAH, 2008). Nesse encontro, Finegold descreveu o gênero *Bacteroides* da seguinte maneira: bacilos pequenos ou cocobacilos Gram-negativos, imóveis, moderadamente pleomórficos; em sua maioria não hemolíticos; não utilizam compostos de nitrogênio orgânico; são estimulados pela presença de 20% de bile e usualmente são considerados como catalase negativos. Todas as espécies fermentam uma variedade de carboidratos com produção de gás e ácido. Os principais ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelo metabolismo são ácidos succínico e acético. As espécies atuais com nomes válidos publicados incluem *B. acidifaciens*, *B. barnesiae*, *B. caccae*, *B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. coprosuis*, *B. cellulosilyticus*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. finegoldii*, *B. fragilis*, *B. gallinarum*, *B. helcogenes*, *B. intestinalis*, *B. massiliensis*, *B. nordii*, *B. ovatus*, *B. plebeius*, *B. propionificaciens*, *B. pyogenes*, *B. salanitronis*, *B. salyersiae*, *B. stercoris*, *B. suis*, *B. tectus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus*. As demais espécies de *Bacteroides* as quais permanecem com posição indefinida são: *B. capillosus*, *B. cellulosolvans*, *B. coagulans*, *B. galacturonicus*, *B. pectinophilus*, *B. polypragmatis*, *B. ureolyticus* e *B. xylanolyticus* (OLSEN & SHAH, 2008).

Sakamoto e Benno (2006) reclassificaram algumas espécies 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*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides johnsonii* e *Parabacteroides merdae*. Estas espécies são classificadas como bactérias anaeróbias estritas, na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporulados e resistentes à bile. Esses micro-organismos 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 (WEXLER, 2007). 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 (WEXLER, 2007).

Embora a taxonomia e nomenclatura das bactérias anaeróbias estejam em constante modificação é fundamental acompanhar essas alterações para uma melhor descrição e

reconhecimento das associações parasita-hospedeiro (JOUSIMIES-SOMER & SUMMANEN, 2002).

3. *Bacteroides fragilis*

Dentro do gênero *Bacteroides*, a espécie *Bacteroides fragilis* é considerada a mais importante sob o ponto de vista clínico, pois apesar de representar menos de 1-2% da microbiota intestinal humana (HAO & LEE, 2004), é a bactéria anaeróbia mais frequentemente isolada de espécimes clínicos (ERIBE & OLSEN, 2000). As demais espécies do gênero representam cerca de 30% dessa população microbiana (SUND *et al.*, 2008), *B. thetaiotaomicron* representa 6% do total de bactérias e 12% do gênero *Bacteroides* (ZOCCO *et al.*, 2007). No entanto, *B. fragilis* é a espécie responsável por uma série de processos infecciosos como infecções intra-abdominais (BROOK, 2008a; HASPER, SCHEFOLD & BAUMGART, 2009), bacteriemias (WEXLER, 2007), infecções do trato respiratório (BROOK, 2004), infecções gastrointestinais (SEARS, 2009), do trato genital feminino (SUMATI & SARITHA, 2009), otite média crônica (BROOK, 2008b), abscessos hepáticos, cerebrais, pulmonares e cutâneos (HAO & LEE, 2004; WEXLER, 2007), além de infecções em tecidos moles (GOLDSTEIN & CITRON, 2009). A maioria destes processos infecciosos é de natureza polimicrobiana, nos quais *B. fragilis* é frequentemente encontrado em associação com bactérias anaeróbias estritas ou facultativas, podendo, no entanto, a espécie ser detectada como patógeno único (BROOK, 2008a; HAO & LEE, 2004).

Nos últimos anos, *B. fragilis* tem sido alvo de estudos em busca da compreensão do potencial de agressão da espécie, assim como a sua ampla adaptabilidade a diferentes ambientes. Alguns fatores de virulência de *B. fragilis* são apontados como responsáveis por sua disseminação, sobrevivência ou dano causado ao organismo hospedeiro (WEXLER, 2007; SUND *et al.*, 2008). Parâmetros ambientais são capazes de influenciar diretamente a expressão de fatores de virulência bacterianos como temperatura (BELL *et al.*, 2009), pH (DUNCAN *et al.*, 2009), osmolaridade, potencial de oxido-redução (Eh) (REOTT *et al.*, 2009) e disponibilidade de fontes de carbono e ferro (SIJBRANDI *et al.*, 2005). Fletcher e colaboradores (2009) relataram que a glicosilação de proteínas possui um papel central na fisiologia de *B. fragilis*, sendo necessária para o organismo competitivamente colonizar o intestino de mamíferos. Nesse estudo foi demonstrado que os sistemas de O-glicosilação são

conservados entre espécies intestinais de *Bacteroides* e aparentam contribuir para a predominância desse gênero no intestino humano (FLETCHER *et al.*, 2009).

Muitos estudos já demonstraram que as bactérias anaeróbias não são uniformemente sensíveis ao oxigênio e que existe uma ampla faixa de tolerância variando de espécies extremamente sensíveis àquelas que são capazes de permanecer viáveis quando expostas por longos períodos ao oxigênio. Considerando *B. fragilis* como anaeróbio obrigatório, por definição, ele é incapaz de se multiplicar na presença de O₂ atmosférico (tensão de 21%) (SUND *et al.*, 2008). No entanto, estudos realizados nos últimos anos têm revelado que a espécie é altamente resistente ao estresse oxidativo e pode sobreviver por períodos extensos em ambientes totalmente aerados. Sendo assim, *B. fragilis* tem sido considerado um dos anaeróbios mais aerotolerantes já descrito, sendo capaz de sobreviver por até 72 horas na presença de oxigênio atmosférico (REOTT, *et al.*, 2009).

Algumas abordagens revelaram que os polissacarídeos capsulares de *B. fragilis* são importantes determinantes imunológicos das respostas celular e humoral em hospedeiros animais e humanos, sendo caracterizados por possuírem uma estrutura bioquímica distinta da de outros antígenos capsulares bacterianos (KASPER *et al.*, 1979; SHAPIRO *et al.*, 1982; ONDERDONK *et al.*, 1989). Estes polissacarídeos compõem um complexo iônico de moléculas referido como complexo polissacarídico capsular (CPC) (ONDERDONK *et al.*, 1977; SHAPIRO *et al.*, 1986).

Inicialmente, foram descritos três polissacarídeos capsulares, denominados A, B e C (TZIANABOS *et al.*, 1992; COMSTOCK, PANTOSTI & KASPER, 2000; KALKA-MOLL *et al.*, 2001). Em 2001, Krinos e colaboradores demonstraram que a espécie é capaz de modular seus antígenos de superfície pela expressão de até oito polissacarídeos capsulares distintos (PSA-PSH) (KRINOS *et al.*, 2001). Essa modulação antigênica ocorre através de múltiplos sistemas de inversão de DNA (COYNE *et al.*, 2000; COYNE & COMSTOCK, 2008; COYNE *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2008). Essas inversões são mediadas pelo gene da invertase (*mpi*) envolvido na inversão de 13 regiões distintas de DNA, incluindo os promotores de sete regiões de biossíntese de polissacarídeos capsulares (LIU *et al.*, 2008; COYNE & COMSTOCK, 2008; PATRICK, *et al.*, 2009). No entanto, a principal característica desses polissacarídeos é a presença de grupos com cargas positivas e negativas

em cada unidade repetitiva. Estes domínios específicos carregados são denominados *zwitterions* e interagem com o sistema imune hospedeiro de forma a coordenar uma resposta celular que frequentemente leva à formação de abscessos (KALKA-MOLL *et al.*, 2001; RUIZ-PEREZ *et al.*, 2005). Recentemente foi descrito que o polissacarídeo A (PSA) encontrado na microbiota intestinal ajuda na proteção do hospedeiro contra doenças inflamatórias intestinais devido a ativação do sistema imune (MAZMANIAN, ROUND & KASPER, 2008).

A ligação desse micro-organismo às células mesoteliais via polissacarídeo induz a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral TNF- α e as interleucinas IL-12, IL-10 e IL-8, estimulando a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (GIBSON III *et al.*, 1998). Sabendo-se que existe uma considerável variação antigênica na expressão destes exopolímeros dentro de uma mesma cepa de *B. fragilis*, esse complexo pode ser considerado como um mecanismo de escape dos sistemas de defesa do hospedeiro (COMSTOCK & KASPER, 2006).

O CPC é considerado, até o momento, como fator de virulência mais importante para a espécie em função da sua capacidade de indução de abscessos (COYNE *et al.*, 2000; WEXLER, 2007; MAZMANIAN, 2008), assim como pela sua atuação como adesina (LIU, 2008) e evasina bacteriana (PATRICK *et al.*, 1996, WEXLER, 2007).

Além do CPC, também são importantes no processo de adesão, estruturas fimbriais e proteínas da membrana externa (PUMBWE, SKILBACK & WEXLER, 2006; WEXLER, TENORIO & PUMBWE, 2009). Alguns estudos sugerem que apesar de ser um componente bacteriano minoritário nas fezes, é possível que *B. fragilis* represente na verdade um constituinte majoritário da população microbiana associada à mucosa intestinal. Desta forma, suas propriedades adesivas poderiam contribuir para a sua maior incidência de isolamento em infecções extra-intestinais, particularmente naquelas precedidas por ruptura intestinal (PUMBWE, SKILBACK & WEXLER, 2006; WEXLER, 2007).

As proteínas de membrana externa (OMPs) de *B. fragilis* têm sido estudadas, especialmente as envolvidas na formação de cápsula, regulação gênica, modulação imune e colonização hospedeira (COMSTOCK & KASPER, 2006; CASSEL, SUTTERWALLA &

FLAVELL, 2008; COYNE *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; WEXLER, TENORIO & PUMBWE, 2009).

Diversos estudos demonstraram que as bactérias existem em sua maioria como biofilmes, compostos de células bacterianas envelopadas em uma matriz auto-produzida e aderente a uma superfície inerte ou viva (MURPHY & KIKHAM, 2002). O evento inicial na formação de biofilme envolve a adesão dos micro-organismos à superfícies. Os biofilmes permitem a sobrevivência de bactérias em ambientes hostis e sua resistência aos agentes antimicrobianos e ao sistema imune. *B. fragilis* é a principal bactéria anaeróbia isolada de infecções humanas gastrointestinais que produz biofilme (WEINACHT *et al.*, 2004).

A capacidade dos micro-organismos em aderir aos 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 foram descritas como possíveis adesinas (HOFSTAD, 1992; PATRICK, 1993). No entanto, poucos estudos direcionados para a análise da capacidade de aderência de cepas de *B. fragilis* aos componentes da matriz extracelular (MEC) foram realizados. Em 1994, Nagy, Manncke & Werner observaram que cepas pertencentes às espécies *B. fragilis* e *B. vulgatus* possuíam uma maior capacidade de aderência a fibronectina, proteínas fibrosas com funções adesivas da MEC, sugerindo a presença de moléculas que atuam como componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*; MSCRAMMs) (PATTI *et al.*, 1994). Recentemente, em um estudo conduzido por nosso grupo, Ferreira e colaboradores (2008) identificaram uma proteína de membrana externa idêntica a uma proteína anteriormente descrita como ligadora de plasminogênio, a Bfp60 (SIJBRANDI *et al.*, 2005). Neste estudo, os autores sugeriram que a interação de *B. fragilis* com o sistema fibrinolítico do hospedeiro após reconhecimento através da proteína Bfp60, possa provocar danos a MEC, aumentando o potencial de disseminação durante a infecção e em um segundo momento, possibilitando a formação de um ambiente propício à multiplicação bacteriana, como já proposto para outras espécies patogênicas (LÄHTEENMÄKI, EDELMAN & KORHONEN, 2005).

Além da atuação destas estruturas de superfície, a espécie é capaz de produzir enzimas extracelulares como hialuronidase, DNAses, lipases e proteases, que podem

potencializar a agressão ao hospedeiro em função da degradação de componentes celulares e teciduais com a finalidade de obtenção de nutrientes, evasão do sistema imune e disseminação (WEXLER, 2007). Proteases produzidas por *B. fragilis* estão envolvidas na inativação de enzimas que auxiliam nas etapas finais da digestão de alimentos e em mecanismos envolvidos na absorção seletiva de nutrientes. A hialuronidase e a condroitina sulfatase podem degradar a matriz extracelular do hospedeiro, permitindo a disseminação desse micro-organismo (WEXLER, 2007). A neuraminidase, produto do gene *nanH*, cliva polissacarídeos da mucina e aumenta o crescimento de populações microbianas pela geração de glicose disponível. Essa enzima pode catalisar a remoção de ácido siálico da superfície celular do hospedeiro e de proteínas imunoativas como imunoglobulinas e alguns componentes do sistema complemento contribuindo para a interrupção de funções vitais do hospedeiro (SHAUER, 2004)

B. fragilis é capaz de produzir duas toxinas: lipopolissacarídeo (LPS) (PUMBWE, SKILBECK & WEXLER 2006, PATRICK *et al.*, 2009) e fragilisina (*B. fragilis toxin*; BFT) (SEARS, 2009). O LPS de *B. fragilis*, apesar de ser pouco endotóxico quando comparado ao de outras bactérias Gram-negativas (DELAHOOKE, BARCLAY & POXTON, 1995), induz a formação de abscessos, a ativação policlonal de linfócitos B e a produção de citocinas por macrófagos (PANTOSTI *et al.*, 1991, WEXLER, 2007). Tanto a cápsula como o LPS podem funcionar como adesinas durante o estabelecimento do sítio de infecção (BEENA & SHIVANANDA, 1995). Em 1996, Patrick e colaboradores relataram a liberação de vesículas da membrana externa pela espécie. Estas vesículas aparentemente estariam envolvidas na amplificação do potencial patogênico da bactéria em decorrência de carregarem tanto enzimas como moléculas de LPS (PATRICK *et al.*, 1996; 2009).

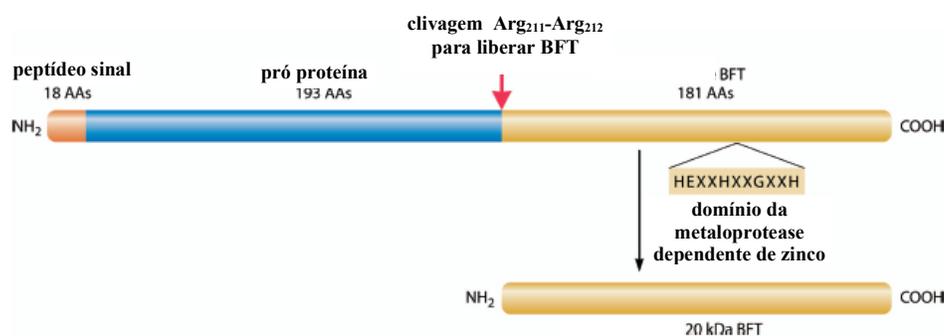
4. *Bacteroides fragilis* toxin (BFT)

A BFT, também denominada fragilisina, é uma metaloprotease capaz de induzir uma resposta secretória no trato intestinal de humanos e de outros animais, com subsequente estabelecimento de um quadro de diarreia (SEARS, 2009). Essa enterotoxina é codificada pelo gene *bft* e possui a capacidade de alterar a morfologia de células epiteliais do trato intestinal (FRANCO *et al.*, 1997). As cepas produtoras de BFT são denominadas *B. fragilis* enterotoxigênicas (*Enterotoxigenic B. fragilis*; ETBF) e foram associadas a casos de diarreia em humanos pela primeira vez em 1987 nos Estados Unidos, por Myers e Shoop (MYERS &

SHOPP, 1987). Após esse relato, inúmeros estudos subsequentes vieram a comprovar a associação de cepas ETBF à diarreia humana (SACK *et al.*, 1992; SACK *et al.*, 1994; PANTOSTI *et al.*, 1997), além de ser discutida uma provável atuação desta toxina em processos mais graves como, por exemplo, na determinação de doença inflamatória crônica (BASSET *et al.*, 2004) e câncer cólon-retal (TOPRAK *et al.*, 2006).

Sabe-se hoje que a BFT atua clivando proteínas constituintes das junções celulares (*tight junctions*), como a E-caderina, e que esta degradação proteolítica determina alterações na resistência epitelial, propiciando tanto a perda de fluidos como processos de inflamação e translocação bacteriana (SEARS, 2009). Alguns estudos demonstraram a existência de mais de um alelo do gene *bft*: *bft-1*, *bft-2*, *bft-3* ou *bft-Korea* (MONCRIEF *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1997; KLING *et al.*, 1997; CHUNG *et al.*, 1999) (**Figura 1**).

Figura 1: Estrutura esquematizada da holotoxina BFT.

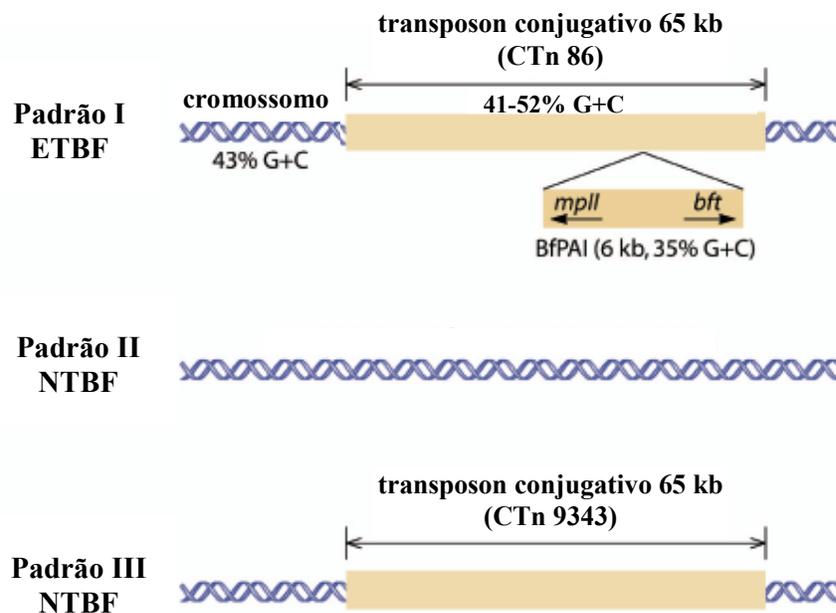


Cada isotipo de BFT (BFT-1, BFT-2 e BFT-3) consiste de três domínios de proteína: peptídeo sinal, pró proteína e toxina madura. A holotoxina é clivada por uma protease ainda não identificada de *B. fragilis* na região dos aminoácidos arginina (Arg)₂₁₁-alanina (Ala)₂₁₂ previamente à liberação da proteína BFT madura de aproximadamente 20-kDa das células bacterianas em direção ao cólon. AA: aminoácidos; H: histidina; G: glicina; BFT: toxina de *B. fragilis*. Adaptado de SEARS, 2009.

Moncrief e colaboradores, em 1999, relataram que o gene *bft* assim como outro gene para uma segunda metaloprotease (*mpII*), estão contidos em um pequeno elemento genético,

designado ilha de patogenicidade de *B. fragilis* (*B. fragilis* Pathogenicity Island; BfPAI), de 6.033 pb. Através de análise por reação da amplificação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) foi verificado que esse elemento está inserido em um sítio específico do cromossomo de *B. fragilis* (MONCRIEF *et al.*, 1998). As cepas de *B. fragilis* podem ser classificadas como: (1) ETBF, ou padrão I, contendo BfPAI e sua região flanqueadora dentro do transposon conjugativo CTn86 (~65kb); (2) *B. fragilis* não-toxigênico (*Non-toxigenic B. fragilis*; NTBF) padrão II, sendo a BfPAI assim como CTn flanqueadores ausentes e; (3) NTBF padrão III, que não possui a BfPAI mas contém transposons conjugativos CTn9343, a variante deste ou CTn86 (MONCRIEF *et al.*, 1995, FRANCO *et al.*, 1999, FRANCO, 2004, BUCKWOLD *et al.*, 2007) (Figura 2).

Figura 2: Estrutura esquematizada dos padrões moleculares de *Bacteroides fragilis*



Cepas de *B. fragilis* padrão I são cepas ETBF que possuem pelo menos um transposon conjugativo de 65 kb (CTn86), o qual contém a BfPAI de 6 kb. A BfPAI contém dois genes: um que codifica a BFT (*bft*), importante para patogênese das cepas ETBFs; e um que codifica a metaloprotease II (*mplI*), uma proteína que talvez tenha função na virulência. As cepas *B. fragilis* NTBF padrão II não possuem CTn86 e CTn9343. As cepas *B. fragilis* NTBF padrão III possuem pelo menos um transposon conjugativo (CTn9343). ETBF: cepas *B. fragilis* enterotoxigênicas; NTBF: cepas *B. fragilis* não toxigênicas; CTn = transposon conjugativo; BfPAI: ilha de patogenicidade de *B. fragilis*; BFT: toxina de *B. fragilis*. Adaptado de SEARS, 2009.

Em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, Antunes e colaboradores, em 2004, descreveram a detecção de um baixo percentual de cepas ETBF no Brasil. No entanto, os autores alertaram para a presença de um percentual considerável de cepas NTBF pertencentes ao padrão III, isoladas tanto de fezes de crianças diarréicas como de crianças saudáveis (ANTUNES *et al.*, 2004).

Em 2007, Avila-Campos e colaboradores analisaram 323 cepas clínicas isoladas nos Estados Unidos, através de multiplex-PCR, e detectaram um elevado índice de 13,6% de cepas ETBF (AVILA-CAMPOS *et al.*, 2007).

Além do trato gastrointestinal, cepas ETBF têm sido também detectadas em outros sítios (KATO *et al.*, 1995, CLAROS *et al.*, 2006, AVILA-CAMPOS *et al.*, 2007). Existem ainda na literatura relatos do isolamento de cepas ETBF de quadros de bacteriemia, sugerindo uma possível atuação para esta toxina nos estágios iniciais dos processos extra-intestinais (PANTOSTI *et al.*, 1994, 1997, KATO *et al.*, 1996, CLAROS *et al.*, 2006, AVILA-CAMPOS *et al.*, 2007). Um trabalho recentemente publicado por Claros e colaboradores (2006) avaliou a frequência de cepas de *B. fragilis*, isoladas nos Estados Unidos, pertencentes aos padrões I, II e III. Foram analisadas 63 cepas isoladas de hemocultura, sendo 18% categorizada como padrão I (ETBF), 43% como padrão II (NTBF) e 38% como padrão III (NTBF). Esses resultados foram comparados com os obtidos para 197 cepas de *B. fragilis* isoladas de diferentes processos infecciosos (infecções de pele e de tecidos moles). Neste segundo grupo de cepas, 10% foram categorizadas como pertencentes ao padrão I, 47% como padrão II e 43% como padrão III. Uma vez que cepas ETBF eram mais frequentes em quadros de bacteriemia do que em outros tipos de infecção, os autores voltaram a discutir a hipótese de que a enterotoxina produzida por *B. fragilis* possa conferir características de virulência que possam ir além de seus efeitos enterotoxigênicos.

Sabendo-se que os organismos ETBF são simbioses do cólon humano, o seu potencial para causar doença humana permanece ainda sob discussão. Em modelos murinos, cepas ETBF são capazes de induzir colite sintomática aguda, auto-limitada, que pode transitar para um carreamento de longo prazo no qual o hospedeiro murino não elimina a colite por ETBF (RHEE *et al.*, 2009). Para avaliar possíveis mecanismos de regulação e definição do resultado da interação ETBF-hospedeiro devem ser levados em consideração: diferenças na

virulência da cepa ETBF, diferenças no mecanismo de adesão (geneticamente determinadas), resposta inflamatória ou imune à ETBF e/ ou modulação da virulência da ETBF pela microbiota colônica hospedeira (SEARS, 2009).

5. Resistência aos antimicrobianos

O fenômeno da resistência aos antimicrobianos e a disseminação dos elementos genéticos associados a estes fenótipos consiste em um dos maiores problemas na clínica médica, limitando cada vez mais as opções terapêuticas (VEDANTAM, 2009).

A epidemiologia da resistência aos antimicrobianos em cepas de *Bacteroides* isoladas de espécimes clínicos e da microbiota intestinal tem merecido certo destaque, uma vez que esses micro-organismos podem ser responsáveis pela disseminação de determinantes de resistência (SALYERS, GUPTA & WANG, 2004; VEDANTAM, 2009). Adicionalmente, é importante salientar a importância da detecção de cepas resistentes em cepas da microbiota intestinal humana visto que essas podem emergir como possíveis patógenos endógenos (SOUZA *et al.*, 2000).

O gênero *Bacteroides* é um grupo heterogêneo quanto à susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, especialmente aos β -lactâmicos e à clindamicina (VEDANTAM, 2009). 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 de outras espécies a partir de processos infecciosos, com notável aumento na porcentagem de cepas pertencentes às espécies *B. uniformis* e *B. caccae* (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).

As espécies de *Bacteroides* são consideradas, por muitos pesquisadores, micro-organismos importantes no estudo dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos por apresentarem um grande espectro de mecanismos de resistência desenvolvidos contra os agentes antimicrobianos mais utilizados. Conjugado à problemática da resistência, esses micro-organismos 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.*, 2007).

A questão da resistência aos antimicrobianos também tem sido considerada por alguns autores no âmbito da virulência de *B. fragilis* (VEDANTAM, 2009). A princípio pode-se imaginar que cepas mais virulentas são as que possuem maior capacidade de causar dano na cavidade intra-abdominal (HASPER, SCHEFOLD & BAUMGART, 2009). No entanto, micro-organismos bem sucedidos não são necessariamente os mais agressivos, mas sim os que possuem a capacidade de suplantar as condições adversas do ambiente como a limitação de fontes de nutrientes, a atuação das defesas do hospedeiro ou a ação de antimicrobianos (WEXLER, 2007). O tratamento da maioria das infecções anaeróbias, quase sempre, torna-se complicado pelo crescimento razoavelmente lento das bactérias anaeróbias, pela natureza polimicrobiana das infecções e pela crescente resistência a antimicrobianos que esse grupo microbiano vem apresentando desde a década de 1970 (SOUZA *et al.*, 2000; VEDANTAM, 2009).

Em um trabalho realizado em nosso laboratório, Souza e colaboradores compararam o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *B. fragilis* isoladas no Brasil de espécimes clínicos no período de 1991 a 1998 e cepas isoladas de microbiota intestinal coletadas no mesmo período. Os autores demonstraram que aproximadamente 27% das cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos e 41% das cepas isoladas de cepas de microbiota intestinal eram resistentes a clindamicina. Todas as cepas isoladas de espécimes clínicos apresentaram resistência 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 duas cepas isoladas de espécimes clínicos (SOUZA *et al.*, 2000).

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 multirresistentes ao imipenem, a clindamicina e à combinação de amoxicilina e ácido clavulânico. Neste trabalho foi possível observar ainda a presença de duas cepas resistentes ao metronidazol, considerado um dos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por anaeróbios.

6. Beta-lactâmicos

Neste contexto, dentre as bactérias anaeróbias, o gênero *Bacteroides* é o que possui o maior espectro de mecanismos de resistência desenvolvidos contra vários antimicrobianos empregados no tratamento das infecções, em especial aos β -lactâmicos (VEDANTAM, 2009). Com isso, as espécies desse gênero têm se tornado importantes modelos no estudo da resistência bacteriana (WEXLER, 2007).

As espécies do gênero *Bacteroides* 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; VEDANTAM, 2009). Estes antimicrobianos inibem a síntese da parede celular bacteriana através de sua ligação às proteínas ligantes de penicilina (PBPs). As PBPs são enzimas responsáveis pelas etapas finais das ligações cruzadas da estrutura da parede celular (SCHEFFERS & PINHO, 2005). Dentre os principais tipos de estratégias de resistência aos β -lactâmicos entre as bactérias do gênero *Bacteroides* estão a produção de PBPs de baixa afinidade, decréscimo da permeabilidade da membrana externa e, principalmente, a produção de β -lactamases (VEDANTAM, 2009) 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 destroem 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 espectro limitado ou amplo, inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (PÉREZ-LLARENA & BOU, 2009). Essas enzimas pertencem à classe A de Ambler e codificadas pelo gene *cepA* presente no cromossomo ou, raramente, pelo gene *cfxA*, detectado no transposon mobilizável Tn4555 (FERREIRA *et al.*, 2007).

Em 2007, Ferreira e colaboradores analisaram a associação entre a presença do elemento de transposição 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 (FERREIRA *et al.*, 2007).

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 ou em plasmídios, pertence ao grupo funcional 3 e é inibida por EDTA (BOGAERTS *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado, no entanto, que um pequeno número de cepas de *B. fragilis* carrega o gene “silencioso” da metalo- β -lactamase o qual requer migração de uma sequência de inserção (IS) à montante do gene para que este seja expresso (SÓKI *et al.*, 2004).

O ensaio de PCR usando iniciadores específicos para a região à montante do gene *cfiA* representa a metodologia mais utilizada na tentativa de detectar e identificar esses elementos de inserção (WALSH *et al.*, 2000). Recentemente, Alavi, Poussier e Manceau (2007) utilizaram a metodologia de análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*; AFLP) por PCR para isolar sequências que flanqueiam os fragmentos de DNA, de forma semelhante a IS encontradas em *Xanthomonas axonopodis* (ALAVI, POUSSIER & MANCEAU, 2007).

Sóki e colaboradores (2004) realizaram uma triagem em cepas de *Bacteroides* resistentes a carbapenemas isoladas de fezes de indivíduos sadios e encontraram por PCR cepas de *B. fragilis* positivas para o gene *cfiA*. Entretanto, 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 expressa pelas cepas positivas por PCR para o referido gene. Esses resultados levam a hipótese da 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 no Brasil de quadros de bacteriemia, microbiota intestinal e trato genital feminino 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 trato genital feminino e 20% isoladas de bacteriemia. 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 (PAULA *et al.*, 2004).

Em outro trabalho realizado por nosso grupo, Boente identificou uma cepa de *B. fragilis* isolada no Brasil a partir de microbiota intestinal, resistente a imipenem na presença do gene *cfiA*. A metalo- β -lactamase codificada por esse gene se mostrou ativa conferindo um elevado nível de resistência, sugerindo o envolvimento de uma IS à montante do gene. Nesse mesmo estudo, os níveis de resistência a imipenem foram de 4,1% (BOENTE, 2008).

Os genes que codificam β -lactamases descritos em *Bacteroides* possuem diferentes graus de diversidade nas sequências, podendo estar relacionado com suas vias de transferência entre cepas (GARCIA *et al.*, 2008). O gene *cepA* e genes ortólogos de espécies desse gênero compartilham baixos níveis de identidade, sugerindo que sejam transferidos verticalmente (XU *et al.*, 2003).

Por outro lado, todos os genes *cfiA* possuem sequências de DNA intimamente relacionadas, mas sua distribuição limitada poderia indicar que seus mecanismos de transferência horizontal estariam restritos a um subgrupo dentro da espécie *B. fragilis* (GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI, 2000).

O terceiro gene de β -lactamase em *Bacteroides*, *cfxA*, é frequentemente associado ao transposon Tn4555, um transposon conjugativo não autônomo que está potencialmente envolvido na transferência horizontal desse gene, amplamente distribuído entre diferentes espécies de *Bacteroides*, *Prevotella* e *Cytophaga* (GIRAUD-MORIN, MADINIER & FOSSE, 2003; HANDAL, GIRAUD-MORIN & CAUGANT, 2005).

Garcia e colaboradores (2009) descreveram o *cfxA* como principal determinante de expressão de β -lactamase em *Bacteroides*, no qual a integração à montante da IS614B, um elemento de ativação comum ao gene *cfiA*, da sequência codificadora representaria um marcador molecular para altos níveis de atividade enzimática. Nesse mesmo estudo, foi

observada a presença do gene *cfxA* em cepas de *B. thetaiotaomicron* e *B. ovatus*, alocado em outro transposon conjugativo (Tn4351). Dessa forma, a detecção de elementos regulatórios e a associação a genes de β -lactamase podem ser correlacionados com a expressão gênica dessas enzimas em cepas de *Bacteroides* spp., sugerindo que esses elementos possam atuar como marcadores genéticos de expressão. Por outro lado, o fato do gene *cepA* estar presente no cromossomo torna a taxa de detecção desse gene muito comum entre as cepas de *Bacteroides* (GARCIA *et al.*, 2009).

7. Diversidade genética da espécie *B. fragilis*

Apesar da proposta de inúmeros fatores de virulência para *B. fragilis* é comum encontrarmos dados contraditórios na literatura deixando em aberto inúmeras questões quanto à associação destes fatores com a infecciosidade. A possível existência de distintos tipos genéticos na espécie, variáveis quanto ao potencial de agressão ao hospedeiro, em uma relação direta dos genes albergados tem sido objeto de algumas discussões e tem motivado estudos relativos à avaliação da diversidade genética.

Vários são os métodos de tipagem utilizados na caracterização de micro-organismos. Como métodos fenotípicos utilizados para a tipagem bacteriana podemos citar a biotipagem, a sorotipagem, a fagotipagem, a análise de perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a análise do perfil eletroforético de proteínas totais, dentre outros (CASH, 2009; RIPS, 2009; LANCELLOTTI *et al.*, 2008. TENOVER *et al.*, 2009; VUJANOVIC *et al.*, 2009). No entanto, nem sempre esses métodos fornecem dados fidedignos, por apresentarem algumas desvantagens como, por exemplo, o fato de uma determinada característica fenotípica nem sempre ser expressa, ou estar sujeita a variações ambientais, ou ainda a sensibilidade do método não ser suficiente para a distinção de diferentes cepas de uma mesma espécie (STULL, LIPUMA & EDLIND, 1988; EREMEEVA & DASCH, 2009; SANJUAN *et al.*, 2009).

As falhas frequentemente observadas nos métodos fenotípicos de tipagem bacteriana levaram ao desenvolvimento de métodos baseados no genoma microbiano e/ou em uma dada sequência de DNA, minimizando eventuais problemas com a sensibilidade e a reprodutibilidade dos resultados (CHO & PALSON, 2009; EREMEEVA & DASCH, 2009;

TENOVER *et al.*, 2007). Alguns desses métodos já foram aplicados para a caracterização de *B. fragilis*. Dentre estes, a ribotipagem, a análise através de enzimas de restrição (*Restriction Enzyme Analysis*; REA), a eletroforese em gel em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*; PFGE) e a PCR utilizando iniciadores arbitrários (*Arbitrarily Primed* – PCR; AP-PCR) ou sequências repetitivas (*Repetitive Extragenic Palindromic* – PCR; rep-PCR). Estes são métodos úteis nos estudos das relações epidemiológicas de espécies bacterianas (MORAES *et al.*, 1999; OLIVE & BEAN, 1999; ERIBE & OLSEN, 2000, VALLIM *et al.*, 2002) e alguns estudos foram centrados nesta linha apesar de estarem lidando com um micro-organismo anaeróbio, de grande limitação na sua transmissão entre hospedeiros na natureza.

Estudos utilizando AP-PCR e rep-PCR têm demonstrado uma ampla diversidade genética entre cepas de *B. fragilis*, impossibilitando a determinação de grupos específicos relacionados com a fonte de isolamento, a produção de enterotoxina ou a outros possíveis marcadores (MORAES *et al.*, 1999; ERIBE & OLSEN, 2000, VALLIM *et al.*, 2002)

Kleivdal e Hofstad, em 1995, não conseguiram demonstrar a existência de uma associação entre tipos genéticos e quadros de septicemia, em uma unidade de tratamento intensivo na Noruega, utilizando as técnicas de REA e ribotipagem (KLEIVDAL & HOFSTAD, 1995). Alguns relatos, ao estudarem cepas previamente categorizadas como ETBF e NTBF, isoladas de diferentes espécimes clínicos, utilizando a técnica de AP-PCR não conseguiram detectar uma correlação entre tipos genéticos e o fenótipo toxigênico (VALLIM *et al.*, 2002).

Podglajen e colaboradores avaliaram a diversidade genética de 500 cepas de *B. fragilis*, provenientes de 35 hospitais na França, utilizando as técnicas de AP-PCR, com dois iniciadores aleatórios descritos por Williams e colaboradores em 1990, e de ribotipagem. Os autores detectaram dois grupos geneticamente distintos relacionados com a presença ou a ausência dos genes de resistência que codificam uma metalo- β -lactamase/carbapenase, denominado *cfiA*, e uma cefalosporinase, denominado *cepA* (PODGLAJEN *et al.*, 1995). Johnson, após empregar técnicas de hibridização DNA-DNA, já havia observado na espécie a existência de dois grupos de homologia de DNA (grupo I e grupo II), os quais eram fenotipicamente indistinguíveis (JOHNSON, 1978). Por outro lado, em 1999, um estudo realizado por Moraes e colaboradores, apesar de ratificar a importância da técnica de AP-PCR

em estudos de avaliação da diversidade genotípica de *B. fragilis*, revelou a existência de dois genótipos predominantes, onde cepas de diferentes origens estavam distribuídas, porém, sem que uma correlação com a presença ou ausência dos genes *cfiA* e *cepA* tenha sido observada (MORAES *et al.*, 1999).

Sarma e colaboradores, em 2000, investigaram cepas isoladas nos Estados Unidos de pacientes humanos com infecção intestinal inflamatória e cepas de potros com diarreia, utilizando AP-PCR. Nesse estudo, mais uma vez foi verificada uma ampla diversidade genética, porém, os autores observaram uma relação clonal entre cepas isoladas de animais (um único tipo foi observado em 30% das cepas estudadas) (SARMA *et al.*, 2000).

Uma técnica baseada na expressão de genes de enzimas metabólicas, a *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), também tem sido utilizada como ferramenta para o estudo de taxonomia bacteriana e, apesar de se tratar de uma abordagem fenotípica, é considerada uma técnica de grande utilidade (TIBAYRENC, 2009).

Cepas apresentando os genes *cepA* e *cfiA* foram avaliadas através de MLEE por Gutacker, Valsangiacomo e Piffaretti e dois grupos foram novamente detectados, confirmando os resultados obtidos anteriormente por Podglajen e colaboradores (PODGLAJEN *et al.*, 1995). As cepas que carregavam o gene *cepA* (divisão I) apresentaram uma elevada taxa de recombinação nos genes que codificam enzimas metabólicas, revelando uma estrutura populacional não clonal. Por outro lado, as cepas que albergavam o gene *cfiA* (divisão II) demonstraram uma baixa taxa de recombinação, sugerindo uma evolução clonal. A distância genética detectada entre estes dois grupos encontrava-se no limiar para a distinção entre espécies, o que levou os autores a proposição de duas genomoespécies (GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI, 2000).

Em diversos estudos, a presença do gene *cfiA* nunca havia sido observada juntamente com o gene *cepA*, principalmente pelo fato de pertencerem a dois grupos geneticamente distintos. Em 2005, Ayala e colaboradores, descreveram duas cepas de *B. fragilis* que possuíam ambos os genes *cfiA* e *cepA*. Desde então, a subdivisão encontrada dentro da espécie *B. fragilis* tem sido correlacionada somente com a presença ou a ausência do gene

cfiA, sendo denominados grupo *cfiA*-negativo (divisão I) e grupo *cfiA*-positivo (divisão II) (AYALA *et al.*, 2005).

Terhes e colaboradores (2007) descreveram uma cepa que carregava tanto o gene *cfiA* como *bft*. Anteriormente, o gene *cfiA* somente foi encontrado em isolados NTBF padrões II e III, mas ainda pertencentes a divisão II (BUCKWOLD *et al.*, 2007). Após análises de PCR e padrão de tipagem por PCR de sequências consenso repetitivas intergênicas de enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – PCR; ERIC-PCR) foi verificado que a cepa que originalmente carregava apenas o gene *cfiA* adquiriu o gene *bft* posteriormente. Esse fato reforça a idéia de que a presença de novos CTn transmissíveis, possuindo genes de virulência e resistência, pode contribuir para o aumento do potencial de patogenicidade e adaptação desse micro-organismo (TERHES *et al.*, 2007).

8. Análises de sequências em múltiplos loci (MLSA)

Uma forma encontrada para se determinar relações evolutivas entre os organismos consistiu na substituição do modelo fenotípico (morfológico e fisiológico), por um modelo genotípico unidimensional. No modelo unidimensional das sequências, conceitos como similar ou parecido (que são subjetivos) podem ser substituídos. Os elementos de uma sequência podem ser avaliados de forma mais simples e direta, pois são restritos ao número de diferenças de nucleotídeos.

Através da comparação de sequências de RNA ribossômico (rRNA) foi provado ser possível determinar uma filogenia microbiana (WOESE, 1987). Com esta abordagem, foram revelados todos os táxons dos procariotos, assim como as relações entre estes e destes com os eucariotos. A filogenia universal, resultante destas análises, demonstrou que o grupo dos procariotos na verdade engloba dois grupos distintos de organismos. O novo grupo identificado são as chamadas arqueobactérias e esse dado é comprovado através das evidências fenotípicas (KEELING & DOOLITTLE, 1995).

As técnicas da biologia molecular possibilitaram uma caracterização taxonômica mais apurada dos micro-organismos. Como complemento da descrição das características

fenotípicas convencionais, a análise molecular pode permitir a caracterização mais objetiva e fundamentada dos micro-organismos.

A taxonomia molecular envolve o estudo dos ácidos nucleicos microbianos, principalmente DNA cromossômico e RNA ribossômico, para a obtenção de informações taxonômicas (STACKBRANDT *et al.*, 2002). As informações derivadas de ácidos nucleicos podem ser empregadas na classificação de linhagens microbianas em diversos níveis taxonômicos hierárquicos, desde o estabelecimento de relações intra-específicas entre linhagens até relações entre espécies, gêneros e níveis taxonômicos supra genéricos.

Uma das ferramentas mais recentes nos estudos de taxonomia molecular é a análise de sequências em múltiplos *loci* (*Multilocus Sequence Analysis*; MLSA), uma nova abordagem na investigação de relacionamentos filogenéticos dentro de uma mesma espécie (ZEIGLER, 2003; SANTOS & OCHMAN, 2004, NASER *et al.*, 2005). MLSA compara sequências primárias de DNA de macromoléculas conservadas de forma a avaliar a diversidade e o relacionamento entre diferentes cepas de táxons relacionados. Esse tipo de análise tem se tornado prática padrão em taxonomia polifásica, uma vez que é questionada se a utilização somente de árvores feitas a partir de um único gene poderia adequadamente refletir relações filogenéticas (transferência horizontal genética, diferenças em taxas de mutação, variabilidade genética). O *ad-hoc committee* para reavaliação das definições de espécies em Bacteriologia, em 2002, estabeleceu que um mínimo de cinco genes devem ser sequenciados para alcançar um nível de informação adequado de dados filogenéticos. Os critérios desses genes a serem escolhidos incluem: ampla distribuição, tamanho adequado, estar presente em uma única cópia dentro de um genoma e capacidade de predizer relações filogenéticas (STACKBRANDT *et al.*, 2002).

***rrn* (operon rRNA)**

rRNA's são moléculas antigas, funcionalmente constantes, universalmente distribuídas e relativamente bem conservadas mesmo entre organismos com grandes distâncias filogenéticas (WOESE, 1987). O gene *rrs* codifica o 16S rRNA. Existem três tipos de rRNA's codificados pelo operon *rrn*, que nos procariotos são, o 5S, o 16S e 23S com aproximadamente 120 (5S), 1500 (16S) e 2900 (23S) nucleotídeos. Os maiores (16S e 23S)

contêm diversas regiões conservadas com bom tamanho para um alinhamento eficiente e ainda assim apresentam variabilidade suficiente em outras regiões da molécula que podem funcionar como cronômetros filogenéticos. O rRNA 5S também já foi utilizado para análises filogenéticas, mas seu pequeno tamanho limita a informação possível de ser obtida desta molécula.

O rRNA 16S consiste de aproximadamente 1500 nucleotídeos que apresentam trechos de pareamento intramolecular, determinando uma estrutura secundária complexa com quatro domínios conservados. A estrutura da molécula de RNA determina sua interação com as proteínas ribossômicas e a própria conformação da subunidade ribossômica pequena.

As sequências das diferentes subunidades do rRNA têm sido utilizadas em estudos relacionados à evolução e identificação de gêneros e espécies bacterianas, uma vez que o rRNA é codificado por regiões muito conservadas. Essa característica permitiu a redefinição das relações genéticas e filogenéticas, previamente baseadas na análise do metabolismo celular (MENNA, BARCELLOS & HUNGRIA, 2009).

***rpoB* (gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase)**

A RNA polimerase catalisa a síntese de RNA a partir de uma fita molde de DNA. Em bactérias uma única RNA polimerase é responsável pela síntese de mRNA's, rRNA's e tRNA's. A enzima central é composta por quatro subunidades peptídicas: alfa (α), beta (β), beta' (β') e omega (ω). Assumindo a forma $\alpha 2\beta\beta'\omega$, a RNA polimerase pode se ligar ao DNA e catalisar a síntese de RNA não especificamente. A ligação desta a outra proteína, o fator sigma (σ), forma a holoenzima e confere especificidade. O fator σ é responsável pelo reconhecimento do promotor, estando presente no momento que a enzima começa a interagir com o DNA, se dissociando logo após. *Escherichia coli* sintetiza ao menos seis tipos de fatores sigma, cada um conferindo à RNA polimerase afinidade por promotores distintos. As subunidades α , β , e β' são produtos dos genes *rpoA*, *rpoB* e *rpoC*, respectivamente. O fator σ é produto do gene *rpoD*.

Sequências do gene *rpoB* têm sido usadas como alternativa para determinação da filogenia ou identificação de bactérias entéricas (MOLLET, DRANCOURT & RAOULT,

1997), *Mycobacterium* (KIM *et al.*, 2009), e espiroquetas (LA SCOLA *et al.*, 2006). O gene *rpoB* aparentemente possui uma só cópia nos genomas bacterianos e também aparenta possuir uma taxa de mutação mais elevada que o 16S rRNA (ADEKÁMBI, DRANCOURT & RAOULT, 2008).

***gdh* (gene que codifica a esterase)**

Glutamato desidrogenases (GDH) são enzimas de manutenção celular que catalisam a deaminação oxidativa reversível de glutamato para α -quetoglutarato e amônia. Essas enzimas são muito diversas e podem ser divididas em quatro classes distintas. GDH-1 e GDH-2 são pequenas enzimas hexaméricas com ampla distribuição taxonômica que utilizam NAD⁺ ou NADP⁺ como coenzima e atuam principalmente na assimilação de amônia. Uma classe de grandes GDHs (GDH-3, 115 kDa), previamente descritas somente em fungos e protistas, atuam no catabolismo do glutamato. Finalmente, enzimas específicas NAD⁺ de aproximadamente 180 kDa representam a quarta classe (GDH-4) e foram descobertas em eubactérias (BENACHENHOU-LAHFA, LABEDAN & FORTERRE, 1994; MIÑAMBRES *et al.*, 2000).

A combinação de reconstruções filogenéticas e análises de padrões de distribuição filogenética dos quatro genes indicam numerosas transferências de gene envolvendo procariotos, assim como eucariotos. A perda diferencial de genes, por outro lado, aparenta não exercer um papel importante na evolução de genes *gdh* em qualquer um dos três domínios (arquea, bactéria, eubactéria). Os índices de transferência lateral de genes que ocorre em procariotos em comparação com eucariotos podem ser similares (ANDERSSON & ROGER, 2003; BAPTESTE & BOYCHER, 2008).

B. fragilis possui duas enzimas com atividade de GDH, NAD(P)H-dependente (GDHA), e um NADH-específico (GDHB). A presença de duas enzimas com a mesma função é incomum e pode exercer um papel na habilidade desse micro-organismo em sobreviver a uma variedade de condições ambientais (ABRAHAMS, ILLES & ABRATT, 2001).

pgm

Fosfoglucomutase (PGM) é uma metalo enzima ubiqüitária expressa em todos os organismos (plantas, bactérias e animais). Essa proteína é uma enzima evolucionariamente conservada que catalisa a conversão de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato na presença de glicose-1,6-difosfato e Mg^{2+} (TANGUY *et al.*, 2006). PGM é essencial para glicólise e gluconeogenese e apresenta um mecanismo catalítico comum em diversas células. No mecanismo dessa enzima, um grupo fosforil é transferido da fosfoenzima ativa para glicose-1-fosfato, formando um intermediário defosfoenzima-glicose-1,6-difosfato, que então refosforila a enzima para formar glicose 6-fosfato. A PGM fosforilada tem sido encontrada em todos os domínios (arquea, bactéria, eubactéria) com estruturas altamente conservadas, apresentando uma função central em todas as células (TAKAHASHI, INUZUKA & INGI, 2004).

Estudos da evolução dessa enzima têm demonstrado que a história filogenética das seqüências de PGM é complexa e marcada por duplicações e translocações com o relato de dois casos de transferência horizontal de genes interreinos entre procariotos e eucariotos (WHITEHOUSE *et al.*, 1998).

est

Muitas enzimas lipolíticas, incluindo lipases, esterases ou carboxilesterases, além de vários tipos de fosfolipases, são encontradas em uma ampla variedade de organismos, tanto bactérias como humanos (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999). Lipases verdadeiras podem ser definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise e síntese de acilglicerois de cadeia acil relativamente longa (comprimento acima de 10 dez átomos de carbono), utilizando o trioleilglicerol como substrato padrão. Em contraste, as esterases catalisam a hidrólise de glicerolester com cadeia acil curta (menos de dez átomos de carbono) e longa, sendo triglicerol (tributirina) o substrato padrão (VERGER, 1997).

Em *Pasteurella multocida*, o gene *mesA* (“Multocida Esterase”) codifica uma proteína, MesA, a qual possui elevados níveis de similaridade com uma variedade de enzimas de eucariotos e procariotos (ADLER *et al.*, 1999), inclusive *B. fragilis*. Essa proteína confere

um fenótipo hemolítico às cepas desse micro-organismo em condições de crescimento anaeróbio (HUNT *et al.*, 2000).

Como mencionado anteriormente, inúmeros estudos nos últimos anos têm revelado uma considerável diversidade genética na espécie *B. fragilis*, os quais chegaram a propor a existência de duas genomopécies, proposta esta fundamentada na presença e/ou ausência dos genes *cfiA* e *cepA*, que codificam uma metalo- β -lactamase/carbapenase e uma cefalosporinase, respectivamente.

A possível existência destes dois subgrupos pode levar a uma revisão taxonômica. Com isso, no nosso entender, a tipagem de *B. fragilis* utilizando as sequências dos genes *rrs*, *rpoB*, *gdh*, *pgm* e *est* poderá fornecer dados que contribuam para esta discussão.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o perfil de enterovirulência e a utilidade da análise de sequências em múltiplos *loci* (MLSA) como ferramenta taxonômica e filogenética alternativa.

Para a realização dessa proposta, quatro objetivos específicos foram determinados:

- I. Avaliar a evolução de perfis de enterovirulência e distribuição dos padrões ETBF e NTBF em cepas de *B. fragilis*;
- II. Empregar a técnica de MLSA em um conjunto de 17 cepas através da análise dos genes *rrs* (rRNA16S), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *est* (esterase), *gdh* (glutamato desidrogenase) e *pgm* (fosfoglucomutase);
- III. Analisar a produção de biofilme nesse mesmo conjunto de 17 cepas;
- IV. Avaliar a indução da formação de abscessos por estas cepas em ensaios de modelo animal.

MATERIAL & MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

O total de 127 cepas de *B. fragilis*, utilizadas neste estudo, pertence à Coleção de Culturas do Laboratório de Biologia de Anaeróbios (IMPPG/UFRJ). Do total de cepas, 109 foram obtidas de diferentes origens: ambiente aquático poluído (14), indivíduos sadios da comunidade (53), pacientes (42) internados no Hospital Barra D'Or, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e no Hospital Municipal Cardoso Fontes, localizados na cidade do Rio de Janeiro (Brasil). As demais 18 cepas incluídas nesse estudo foram isoladas de material clínico de pacientes internados no *Centre Hospitalier Intercommunal* (CHI), Paris (França), gentilmente cedidas pelo Dr. Jean-Philippe Emond. Cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram também analisadas (ATCC 25285, ATCC 43859 e ATCC 23745). Todas as cepas utilizadas estão listadas no **Quadro 1**.

Quadro 1: Origem e identificação das 127 cepas de *Bacteroides fragilis* selecionadas para este estudo

Cepas	Período de isolamento	Origem	País de origem
1424	2002	Líquido ascítico	França
1425	2003	Secreção Purulenta	França
1426	2003	Infecção Pélvica	França
1427	2003	Bacteremia	França
1428	2003	Bacteremia	França
1429	2003	Bacteremia	França
1430	2003	Abscesso	França
1431	2003	Infecção urinária	França
1432	2003	Líquido Peritoneal	França
1433	2003	Líquido Ascítico	França
1434	2003	Líquido Peritoneal	França
1435	2003	Secreção Purulenta	França
1436	2004	Secreção Purulenta	França
1437	2004	Secreção Purulenta	França
1438	2004	Apendicite	França
1439	2004	Bacteremia	França
1440	2004	Secreção Purulenta	França
1441	2004	Líquido Peritoneal	França
058109	1980	Infecção Intrabdominal	Brasil
077225	1980	Infecção Intestinal	Brasil
1384-B	1997	Bacteremia	Brasil
1419	2001	Indeterminada	Brasil
1423	2004	Secreção Subcutânea	Brasil
1450	2005	Bacteremia	Brasil
1451	2005	Bacteremia	Brasil
1571	2006	Abscesso de parede	Brasil
25285	1976	Abscesso do apêndice	ATCC ^a
AA1	1997	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA10	1997	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA10c	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA41-3	1997	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA41-4	1997	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA42-2	1997	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA7	1997	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA7a	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
AA7b	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
AL5b	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
AL5d	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
FT-2	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
SPA-2	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil
1453	2005	Bacteriemia	Brasil
1455	2005	Bacteriemia	Brasil
23745	1968	Fluido pleural	ATCC
1032	1991	Bacteriemia	Brasil
1037	1991	Bacteriemia	Brasil
1081	1993	Bacteriemia	Brasil
1241	1994	Bacteriemia	Brasil

Quadro 1: Continuação

1384	1996	Bacteriemia	Brasil
HC2000.1	2000	Bacteriemia	Brasil
048203	1982	Infecção pele e tecidos moles	Brasil
048205	1982	Infecção pele e tecidos moles	Brasil
1108-3b	1994	Infecção pele e tecidos moles	Brasil
1118-1	1994	Infecção pele e tecidos moles	Brasil
MC1	1988	Infecção pele e tecidos moles	Brasil
MC3	1988	Infecção pele e tecidos moles	Brasil
283-2-1	1980	Infecção intestinal humana	Brasil
ES08.1	1997	Infecção intestinal humana	Brasil
ES08.3	1996	Infecção intestinal humana	Brasil
ES09.1	1997	Infecção intestinal humana	Brasil
FD19a	1994	Infecção intestinal humana	Brasil
1031	1991	Infecção intra-abdominal	Brasil
1033	1991	Infecção intra-abdominal	Brasil
1048 ^a	1993	Infecção intra-abdominal	Brasil
1058-4	1993	Infecção intra-abdominal	Brasil
1070-b	1993	Infecção intra-abdominal	Brasil
1103-4	1994	Infecção intra-abdominal	Brasil
1304-3a	1996	Infecção intra-abdominal	Brasil
43859	1987	Infecção intestinal humana	ATCC
1386-4	1997	Infecção intra-abdominal	Brasil
B3	1997	Infecção intra-abdominal	Brasil
MC03A	2000	Microbiota genital feminina	Brasil
RBG-A	2000	Microbiota genital feminina	Brasil
118310	1990	Microbiota intestinal humana	Brasil
BA12.11	1999	Microbiota intestinal humana	Brasil
BA12.2	1999	Microbiota intestinal humana	Brasil
BA4.2	1999	Microbiota intestinal humana	Brasil
EC01.2	1997	Microbiota intestinal humana	Brasil
EC02.1	1997	Microbiota intestinal humana	Brasil
EC03.2	1997	Microbiota intestinal humana	Brasil
EC04.1	1997	Microbiota intestinal humana	Brasil
EC05.3	1997	Microbiota intestinal humana	Brasil
EC06.3	1997	Microbiota intestinal humana	Brasil
F36-6	1980	Microbiota intestinal humana	Brasil
F43-6	1982	Microbiota intestinal humana	Brasil
FF10	1980	Microbiota intestinal humana	Brasil
FF14	1980	Microbiota intestinal humana	Brasil
FF15	1980	Microbiota intestinal humana	Brasil
FN12	1996	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF12.2	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF12.5	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF12.6	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF12.7	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF12.8	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF13.11	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF14.8	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF17.7	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF19.5	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF7.1	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MF7.3	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil

Quadro 1: Continuação

MF7.5	2000	Microbiota intestinal humana	Brasil
MIA23.4	2001	Microbiota intestinal humana	Brasil
MIA21.3	2001	Microbiota intestinal humana	Brasil
MIA24.1	2001	Microbiota intestinal humana	Brasil
MIA24.3	2001	Microbiota intestinal humana	Brasil
MIA24.4	2001	Microbiota intestinal humana	Brasil
016M	1984	Otite média crônica	Brasil
022H	1984	Otite média crônica	Brasil
023A	1984	Otite média crônica	Brasil
023C	1984	Otite média crônica	Brasil
030M	1984	Otite média crônica	Brasil
036M	1984	Otite média crônica	Brasil
1034	1991	Abscesso pélvico	Brasil
1077	1993	Indeterminada	Brasil
1270-3a1	1996	Indeterminada	Brasil
1393	1990	Indeterminada	Brasil
1457	2006	Indeterminada	Brasil
1567	2006	Indeterminada	Brasil
1570-2	2006	Indeterminada	Brasil
1384-B	1997	Indeterminada	Brasil

^aATCC: *American Type Culture Collection*

2. Reativação e confirmação da identificação bioquímica

2.1. Reativação

As cepas foram reativadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Difco) –PRAS (*Pre-Reduced Anaerobically Sterilized*) a partir de estoque em BHI-ágar inclinado e incubadas por 24 h 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 Co.) e hemina (5 µg/mL, Sigma Co.) (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003, BACIC & SMITH, 2008). Após o período de incubação, em ambiente de anaerobiose, as colônias foram repicadas para novo caldo BHI-PRAS, para avaliação morfológica pelo método de Gram, modificado por Kopeloff (LIBMAN *et al.*, 2006), e confirmação do tipo respiratório.

Como este estudo envolve a investigação aprofundada ao nível de análises de sequências de genes para verificação da presença de subgrupos dentro da espécie *B. fragilis*, inicialmente foi realizada a confirmação da identificação das cepas de *B. fragilis* incluídas nesse trabalho através de testes bioquímicos convencionais, sistemas miniaturizados e PCR espécie-específica.

2.2. Confirmação da identificação fenotípica através de testes bioquímicos convencionais

2.2.1. Semeadura em meio seletivo

As cepas bacterianas utilizadas nesse estudo foram também semeadas em meio seletivo e indicador *Bacteroides* Bile Esculina (BBE – Oxoid). Esses micro-organismos são intrinsecamente resistentes à bile e ao aminoglicosídeo gentamicina que constituem esse meio, sendo capazes de crescer e hidrolisar a esculina formando colônias pigmentadas. (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

2.2.2. Pesquisa da produção de indol

O meio de cultura indol-nitrato (BBL) foi empregado para a verificação da produção de indol. Em um tubo contendo o meio indol-nitrato foram adicionados 0,2 mL de uma cultura bacteriana em caldo BHI-PRAS de 24 h. Após o período de incubação de 24 h, o indol produzido foi extraído pela adição de 1 mL de xilol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) ao tubo, seguida de agitação. O tubo foi deixado em repouso por dois minutos e, em seguida, adicionado de 0,5 mL de reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído). O aparecimento de um anel de coloração rósea ou fúcsia dentro de 15 min indicou reação positiva, enquanto o aparecimento de um anel amarelo indicou reação negativa. Cepas de *B. thetaiotaomicron* e *E. coli* foram utilizadas como controles positivos e a cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 como controle negativo (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

2.2.3. Pesquisa da produção de catalase

Para a verificação de produção de catalase, as colônias foram incubadas a 37 °C durante 48 h em anaerobiose, em placa contendo meio BHI-ágar. Após incubação, as culturas foram expostas ao ar atmosférico durante 30 min para a indução da expressão da catalase, sendo então adicionado peróxido de hidrogênio (3%). A liberação de bolhas indicou a produção de catalase. Cepas de *Staphylococcus aureus* e de *B. fragilis* (ATCC 25285) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

2.2.4. Fermentação de carboidratos

As cepas foram submetidas a testes de fermentação de carboidratos para identificação de espécie. O meio básico para os testes bioquímicos utilizado consistiu no extrato de levedura e peptona (Peptone – Yeast extract; PY) (Biolife, Itália) (HOLDEMAN, CATO & MOORE, 1977). Foram utilizados os seguintes carboidratos no meio básico pré-reduzido: sacarose (Sigma Co.), L- arabinose (Sigma Co.) e trealose (Merck) (concentração final de 1,0%); e arabinose e trealose (concentração final de 0,5%). O pH da solução foi ajustado para 6,9. A partir de uma cultura em caldo BHI-PRAS de 24 h, 0,3 mL foram inoculados em tubos contendo 5 mL do meio básico com os diferentes açúcares, assim como

apenas o meio básico, sob fluxo de CO₂, e incubados a 37 °C. A leitura foi realizada após 48 h de incubação, utilizando-se potenciômetro com eletrodo combinado, sendo as cepas que apresentaram uma diminuição de pelo menos 0,4 em relação ao pH inicial do meio foram consideradas fermentadoras. As cepas ATCC 23745 e ATCC 43859 foram utilizadas como controles dos ensaios bioquímicos (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

2.3. Confirmação da identificação fenotípica através de sistema miniaturizado (API20A)

A identificação foi confirmada utilizando o sistema API 20 A (BioMérieux, S.A., Marcy l'Etoile, França) seguindo as recomendações do fabricante.

3. Obtenção de DNA cromossômico bacteriano para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR)

DNA cromossômico das cepas bacterianas foi extraído utilizando o método do isotiocianato de guanidina descrito por Pitcher, Saunders e Owen (1989) com algumas modificações. As cepas foram cultivadas em placas contendo ágar sangue suplementado com hemina (5 µg/mL, Sigma Co.) e menadione (10 µg/mL, Sigma Co.) e incubadas por 48 h a 37°C em ambiente de anaerobiose. Um raspado de aproximadamente 50 mg do crescimento bacteriano foi suspenso em 500 µL de isotiocianato de guanidina 5 M em um tubo de microcentrifuga. Os tubos foram agitados e, em seguida, incubados à temperatura ambiente por 5 a 10 min. Os tubos foram então resfriados em gelo por 10 min e após esse período, adicionados de 250 µL de acetato de amônia (7,5 M). Posteriormente, os tubos foram agitados gentilmente e incubados em gelo por mais 10 min. Foram adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) e os tubos agitados e centrifugados a 13000 x g por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga, no qual foram adicionados 430 µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos várias vezes até a formação de um precipitado fibroso branco. O material foi então centrifugado a 13000 x g por 5 min. Os precipitados foram lavados cinco vezes com 500 µL de etanol 70%. Após cada lavagem, os tubos foram centrifugados a 11000 x g durante 10 min. Por último, os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente, até que o etanol evaporasse e, após este período, 50 µL de TE (Tris-EDTA, pH 8.0) foram adicionados e os tubos colocados em banho-maria a 55 °C por

aproximadamente 1 h e o DNA dissolvido foi posteriormente estocado a -20 °C (PITCHER, SAUNDERS & OWEN, 1989).

4. PCR

Para a amplificação dos genes utilizados no presente estudo, a mistura de reação foi preparada em um volume total de 50 µL contendo 50 ng de DNA cromossômico, 10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada iniciador descrito a seguir e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies).

Todas as amplificações por PCR foram realizadas em termociclador (Gene Amp® PCR System 9700), seguindo o protocolo de 35 ciclos com a etapa de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridação 2-5 °C abaixo da temperatura de dissociação conforme estabelecido para cada iniciador por 1 min e extensão a 72 °C por 90 s, com uma única extensão final de 7 min.

Os iniciadores, tamanhos dos fragmentos obtidos, temperaturas de dissociação, controles positivos e posições de alinhamento da região 5'dos iniciadores que foram utilizados no trabalho estão listados no **Quadro 2**.

Quadro 2: Genes pesquisados, sequência de iniciadores, temperatura de dissociação, controles positivos e região 5' de hibridação dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e tamanhos de fragmentos esperados.

Gene ou região ^a	Sequência de iniciadores	T _m ^b	Controle positivo	Região 5'	Fragmento	Referências
<i>nanH</i>	BfnA: 5' - TTC GCT TTT CTG TTT TCT GTG T - 3' BfnB: 5' - CAG CAA CCA CCC AAA CAT TAT T - 3'	60°C 62°C	ATCC25285	260-279 1080-1102	842 pb	OBATA-YASUOKA <i>et al.</i> , 2002
<i>bft</i>	BF-5: 5' - GAT GCT CCA GTT ACA GCT TCC ATT G - 3' BF-6: 5' - CGC CCA GTA TAT GAC CTA GTT CGT G - 3'	62,4°C 62,8°C	ATCC43859	91-116 1066-1091	976 pb	SCOTTO D' ABUSCO <i>et al.</i> , 2000
Região à montante da BfPAI	P1T3: 5' - TTC AAC CTG ATC GAT CCG GAA GAT CCG - 3' P1T7: 5' - GGT AGA CTA CCT GAG TAA GGA GTC - 3'	65,2°C 61,4°C	ATCC23745	25489-25514 27089-27116	1600 kb	FRANCO <i>et al.</i> , 1999
<i>cepA</i>	cepA1: 5' - TTT CTG CTA TGT CCTGCC C - 3' cepA2: 5' - ATC TTT CAC GAA GAC GGC - 3'	54,8°C 52,5°C	ATCC25285	472-491 1234 -1251	780 pb	GUTACKER <i>et al.</i> , 2000
<i>cfiA</i>	cfiA1: 5' - CCA TGC TTT TCC CTG TCG CAG - 3' cfiA2: 5' - GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC - 3'	58,4°C 56°C	AA10	557 a 582 1266 a 1285	747 pb	PODGLAJEN <i>et al.</i> , 1992
<i>rrs</i>	16SF: 5' - AAC GCG AAG AAC CTT AC - 3' 16SR: 5' - CCG TGT GTA CAA GAC CC - 3'	49,8°C 50,6°C	ATCC25285	828-845 1211-1228	400 pb	NC006347 ^c ; desenhados no presente estudo
<i>rpoB</i>	rpobF: 5' - CTG AGA AGC GTA AAA AAG AG - 3' rpobR: 5' - GTA GAT ATA AAG CAC AGC CTC - 3'	56°C 60°C	ATCC25285	125-144 964-984	859 pb	NC003228 ^d ; desenhados no presente estudo
<i>est</i>	estF: 5' - GTA GTG ACC CCT GAT GTT GC - 3' estR: 5' - CAT GAT CTA TCT TGC GGC CC - 3'	62°C 62°C	ATCC25285	121-140 692-721	601 pb	NC003228; desenhados no presente estudo
<i>pgm</i>	pgmF: 5' - CGA GTT TGG TAC GGG CGG AC - 3' pgmR: 5' - CCG TCC TTA ATC ATC TGC TC - 3'	66°C 60°C	ATCC25285	150-169 796-815	682 pb	NC003228; desenhados no presente estudo
<i>gdh</i>	gdhF: 5' - GCA TTC CAG ACA GAG TAT AC - 3' gdhR: 5' - GGA GAT CAG GCA TAC TTT AC - 3'	58°C 58°C	ATCC25285	152-170 683-702	551 pb	NC003228; desenhados no presente estudo

^agenes *nanH* (neuraminidase), *bft* (fragilisina), *cepA* (cefalosporinase A), *cfiA* (metalo-β-lactamase/carbapenase), *rrs* (rDNA 16S), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase), *est* (esterase), *pgm* (fosfoglucomutase), *gdh* (glutamato desidrogenase), região à montante da ilha de patogenicidade de *B. fragilis* (BfPAI)

^bT_m = *melting point* (temperatura de dissociação)

^cNC006347: número de acesso da sequência do genoma de *B. fragilis* YCH46 (ATCC25285) utilizado para desenho dos iniciadores

^dNC003228: número de acesso da sequência do genoma de *B. fragilis* NCTC9343 (ATCC25285) utilizado para desenho dos iniciadores

5. Análise de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição seguida de PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; PCR-RFLP)

PCR-RFLP foi realizada conforme descrito por Scotto D' Abusco e colaboradores (2000). Os produtos de amplificação do gene *bft* foram purificados com o uso do *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) e então clivados com as enzimas de restrição *AccI* e *DraI* de acordo com instruções do fabricante. Essas enzimas apresentam diferentes sítios de reconhecimento para as isoformas *bft-1*, *bft-2* ou *bft-3*, gerando fragmentos de tamanhos diferentes. A digestão de *bft-1* com *DraI* gera dois fragmentos (640 e 336 pb), enquanto a digestão de *bft-2* ou *bft-3* resulta em três fragmentos (561, 336 e 79 pb); a restrição de *bft-1* com *AccI* gera três fragmentos (701, 213 e 62 pb), e a digestão de *bft-2* ou *bft-3* dois fragmentos (914 e 62 pb).

5.1. Eletroforese

Após amplificação, 10µL de cada produto de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% (p/v), através de eletroforese horizontal em tampão TBE (89 mM de Tris – Sigma, 89 mM de ácido bórico - Vetec, 2 mM de EDTA - Sigma, pH 8,25). Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de 0,5µg/ mL de brometo de etídio (Sigma). O padrão para a determinação do tamanho de fragmentos de DNA e para uma quantificação estimativa, *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), foi incluído em cada gel, e sua imagem capturada através do sistema de captura de imagem Minibis Pró (BioAmerica Inc., USA).

5.2. Purificação e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Os *amplicons* foram purificados utilizando-se o *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, 100 µL de *amplicon* foram adicionados a um tubo de microcentrifuga contendo 300 µL de tampão de captura. Após agitação com auxílio de *vortex*, a mistura foi transferida para uma minicoluna e incubada a temperatura ambiente por 1 min. Posteriormente, a cepa foi centrifugada a 13000 x g por 30 s. O material

não retido pela coluna foi descartado e, então, foram adicionados à minicoluna 500 µL de tampão de lavagem. Após nova centrifugação a 13000 x g por 30 s, a minicoluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga e aplicados 50 µL de tampão de eluição. A cepa foi incubada a temperatura ambiente por 1 min e, posteriormente foi centrifugada a 13000 x g por 1 min para obtenção do DNA purificado que foi armazenado a -20 °C.

Após purificação, as amostras de DNA e uma alíquota dos iniciadores foram enviadas para o Centro de Estudo do Genoma Humano, no Instituto de Biociências, na Universidade de São Paulo para sequenciamento. As reações de sequenciamento 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 sequências foram analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando *Base Caller Cimarron 3.12*.

5.3. Análise bioinformática

5.3.1. Alinhamento das sequências

Os alinhamentos múltiplos das sequências foram realizados com o auxílio do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1997), que utiliza a técnica do alinhamento progressivo. Esta técnica produz um alinhamento global tendo como guia uma árvore filogenética calculada pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987). Esta árvore é criada por comparações par a par pela técnica da programação dinâmica, que garante como resultado o melhor alinhamento possível. Posteriormente, os alinhamentos foram verificados e editados com o Bioedit 7.0.4.1 (HALL, 1999).

5.3.2. Árvores filogenéticas

Os métodos adotados para inferir as árvores filogenéticas foram *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987; STUDIER & KEPPLER, 1988), *Maximum Parsimony* (BHATTACHARYA, 1996; BRUEN & BRYANT, 2008) e *Maximum Likelihood* (FELSENSTEIN, 1981). Para se avaliar a estabilidade das árvores geradas foi usada a análise de *bootstrap* (EFRON, HALLORAN & HOLMES, 1996) com 1000 repetições para os

métodos *Neighbor-Joining* e *Maximum Parsimony* e com 100 repetições para o método de *Maximum Likelihood*.

No presente estudo, foram incluídas as sequências *outgroup* depositadas no GenBank: *B. xyloisolvans* XB1 (AM230650), *B. stercoris* ATCC431 (NR_027196), *B. thetaiotaomicron* VPI5482 (NC_004663), *B. vulgatus* ATCC8482 (NC_009614) e *P. gingivalis* ATCC33277 (NC_010729). Sequências *outgroup* consistem de um grupo de organismos que atuam como grupo de referência para determinação da relação evolucionária entre três ou mais grupos monofiléticos de organismos em estudo. Grupos monofiléticos referem-se a um conjunto de espécies que compartilham um ancestral comum. Essas sequências *outgroup* são hipotetizadas para serem relacionadas umas às outras, porém distantes das demais sequências em estudo (MOUNT, 2004).

Inicialmente foi incluída a cepa de *B. fragilis* MBK2 (FM207090), como mais uma confirmação da identidade devido à problemática na identificação desses micro-organismos.

As matrizes de distância foram computadas com o auxílio do programa MEGA 4.2 (KUMAR, TAMURA & NEI, 2004a), analisando-se somente as posições do alinhamento onde foi possível comparar todas as sequências (sem lacunas). As distâncias evolutivas não foram corrigidas, utilizando-se a distância *p*, que é a proporção de sítios onde duas sequências que estão sendo comparadas diferem (KUMAR, TAMURA & NEI, 2004b).

6. Ensaio da produção de biofilme

O ensaio da produção de biofilme foi realizado conforme descrito por Weinacht e colaboradores (2004), com modificações. Todas as 17 cepas selecionadas para o MLSA foram cultivadas por 18 h e diluídas 1:100 em caldo BHI-PRAS. Alíquotas de 100 µL foram adicionadas em quadruplicata em poços de microplacas de poliestireno. As placas foram incubadas anaerobicamente durante 24 h a 37 °C. Após esse período, os poços das placas foram lavados três vezes com PBS 1x (*Phosphate-buffered saline*) e 100 µL de cristal violeta 0,01% foram adicionados. Após 20 min, o corante foi removido e os poços lavados quatro vezes com PBS 1x. As bactérias aderidas e coradas foram então suspensas em 33% de ácido acético e a densidade óptica (DO₅₇₀) determinada. Cada placa incluiu como controle negativo

quatro poços contendo BHI-PRAS e tratados igualmente aos poços contendo bactéria. A DO₅₇₀ foi normalizada em relação ao controle negativo. A absorbância equivale ao número de bactérias aderidas. Foram realizados dois experimentos independentes.

7. Análise estatística

Todos os testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados utilizando-se o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 11.0 (SPSS Inc[®]. Chicago, IL, EUA). O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

8. Modelo animal de indução de abscessos intra-abdominais e mortalidade

O modelo utilizado foi proposto por Sund e colaboradores (2008). Uma cepa representante de cada uma das duas divisões de *B. fragilis* foi selecionada. As cepas 1424 (*cfiA* positiva/ divisão II) e 1433 (*cfiA* negativa/ divisão I) foram cultivadas em caldo BHI-PRAS até a metade da fase exponencial (18 h) e diluídas em caldo PYG-PRAS (peptona, extrato de levedura e glicose) (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002) até 3×10^8 UFC/mL (escala 1 de McFarland). O inóculo continha uma mistura de 1:1 do micro-organismo e de uma solução adjuvante de conteúdo cecal estéril de camundongo. Quinhentos microlitros foram inoculados na cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c machos, entre 6 e 8 semanas de vida, com o auxílio de uma seringa de insulina (1 mL) e agulha de 27,5G 1/2" (0,38 x 13 mm). Os camundongos foram observados durante sete dias pós-infecção para o caso de haver morte, e após esse período foram sacrificados em câmara de CO₂ e necropsiados para a investigação da presença de abscessos. Todos os abscessos encontrados foram retirados de cada camundongo, macerados em 0,9 mL de tampão Blanks-PRAS e 10 µL foram plaqueados em ágar sangue. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h em ambiente de anaerobiose e a contagem das colônias (UFC/mL) foi feita com o auxílio do equipamento *Quebec[®] Colony Counter – American Optical Corporation*. Os macerados também foram inoculados em placas de ágar sangue e estas incubadas em ambiente de aerobiose para verificar que os abscessos não seriam decorrentes de contaminação. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Todos os procedimentos com os animais respeitaram a Declaração Universal dos Direitos do Animal (ONU, 1978), da qual o Brasil é signatário, os Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e a Lei nº 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas sobre a prática didático-científica da vivisseção de animais.

RESULTADOS

1. Confirmação da identificação da espécie *B. fragilis*

Nesse trabalho, todas as cepas foram identificadas como *B. fragilis* através dos testes bioquímicos convencionais (**Quadro 3**) e pelo sistema miniaturizado API20A (**Quadro 4**).

Quadro 3: Características fenotípicas das cepas de *B. fragilis* através de testes fisiológicos convencionais

Características Fenotípicas ^a						
Crescimento em 20% bile	SAC	IND	CAT	ESC	ARA	TRE
+	+	-	+	+	-	-

^a SAC: sacarose; IND: indol; CAT: catalase ESC: esculina; ARA: arabinose; TRE: trealose;
Adaptado de JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002

Quadro 4: Tabela de identificação de *B. fragilis* através do sistema API 20A

Características Fenotípicas ^{a,b}										
IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL
-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT	GRAM
+	-	+ ^c	+	-	+	-	-	-	+	-

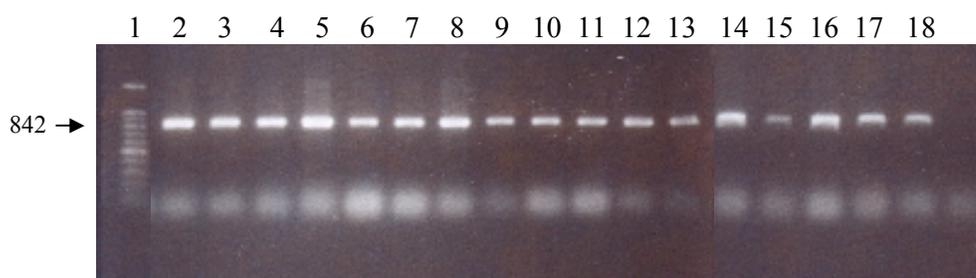
^a Perfil numérico: 46544240

^b IND: indol; URE: ureia; GLU: glicose; MAN: manitol; LAC: lactose; SAC: sacarose; MAL: maltose; SAL: salicina; XYL: xilose; ARA: arabinose; GEL: gelatina; ESC: esculina; GLY: glicerol; CEL: celobiose; MNE: manose; MLZ: melezitose; RAF: rafinose; SOR: sorbitol; RHA: raminose; TRE: trealose; CAT: catalase.

^c+: maioria das cepas apresenta resultado positivo.

Outra metodologia empregada para confirmação da identificação inicial das cepas de *B. fragilis* foi a PCR específica para o gene da neuraminidase (*nanH*), marcador da espécie *B. fragilis* (OBATA-YASUOKA *et al.*, 2002). Todas as 127 cepas apresentaram o fragmento de 842 pb correspondente ao gene da neuraminidase. Na **Figura 3**, pode ser observado o perfil eletroforético obtido após PCR para o gene *nanH* das cepas selecionadas.

Figura 3: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *nanH* das 17 cepas selecionadas para confirmação da identificação de *B. fragilis*



1) Padrão de Tamanho Molecular de 100pb; 2) 1033; 3) 1386-4; 4) 1424; 5) BA12.2; 6) BA12.11; 7) HC2000.1; 8) RBG-A; 9) AA7b; 10) 1425; 11) 1431; 12) 1433; 13) 1435; 14) 1437; 15) 1441; 16) 1450; 17) 1457; 18) ATCC25285.

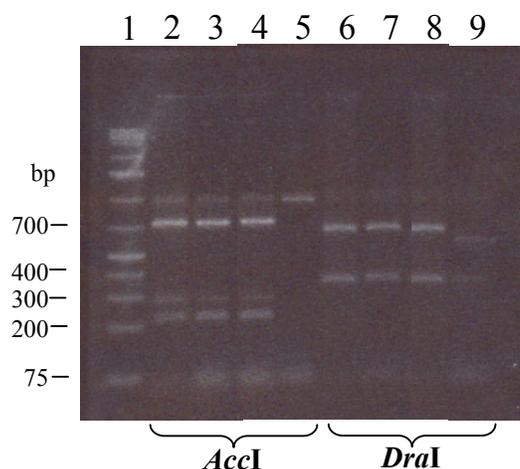
2. Detecção dos padrões de enterovirulência

Dentre as 109 cepas isoladas no Brasil, somente uma (0,9%) (PC49) apresentou o fragmento de 976 pb, sendo categorizada como ETBF ou padrão I. Das 18 cepas isoladas na França, duas cepas (1428 e 1432) foram categorizadas como ETBF/ padrão I (11,1%).

RFLP-PCR demonstrou que as cepas PC49 (microbiota intestinal), 1428 (bacteriemia) e 1432 (líquido peritoneal) apresentaram a isoforma *bft-1*, enquanto a cepa controle da isoforma *bft-2* ATCC 43859 apresentou o perfil de bandas esperado (**Figura 4**). A cepa controle das isoformas *bft-1* (ATCC 43858) e *bft-3* (Korea 419) não foram incluídas devido ao fato de não pertencerem à coleção do nosso laboratório. Esses resultados foram

confirmados por sequenciamento, com 99,99% de similaridade com a respectiva sequência da cepa ETBF ATCC43858 depositada no GenBank.

Figura 4: PCR-RFLP para determinação das isoformas presentes nas cepas ETBF após digestão do fragmento amplificado do gene *bft* com as enzimas *AccI* e *DraI*.

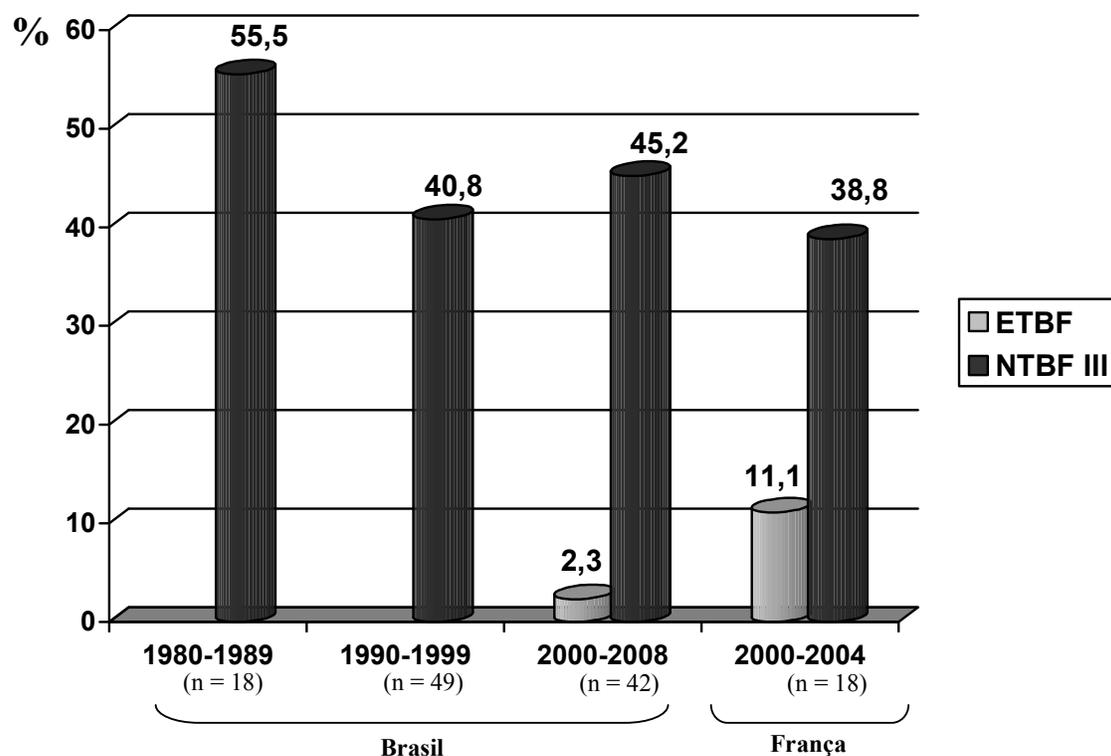


1) Padrão de Tamanho Molecular de 1kb; **2,6)** 1428 (*bft*-1); **3,7)** 1432 (*bft*-1); **4,8)** PC049 (*bft*-1); **5,9)** ATCC43859 (*bft*-2).

Um fragmento de 1,6 kb típico para NTBF padrão III foi amplificado em 49 cepas (44,9%) isoladas no Brasil e em sete cepas (38,8%) obtidas da França.

A distribuição dos perfis genéticos em diferentes períodos de tempo de coleta dos espécimes pode ser observada na **Figura 5**. Não foi detectada nenhuma mudança significativa na distribuição dos perfis de enterovirulência nas cepas analisadas, apesar do índice de isolamento do perfil NTBFIII permanecer elevado ao longo dos anos.

Figura 5: Distribuição das cepas de *B. fragilis* isoladas no Brasil entre 1980 e 2008 e percentual encontrado nas cepas da França entre 2000 e 2004

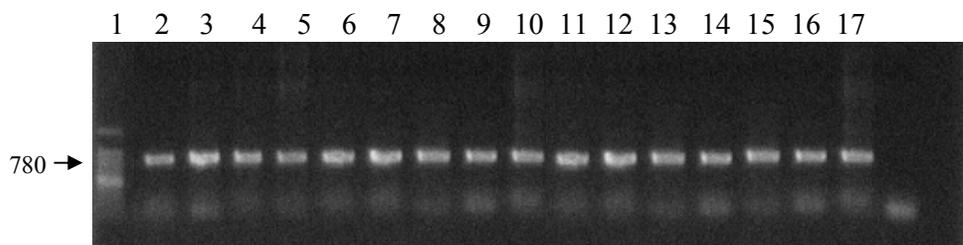


ETBF: *B. fragilis* enterotoxigênicas (padrão I); NTBF III: *B. fragilis* não toxigênicas padrão III.

3. Análises de sequências em múltiplos loci (MLSA)

Do total de 127 cepas estudadas, foi detectado que 16 apresentaram o fragmento de 780 pb e, portanto, albergavam o gene *cfiA* (Figura 6). Com relação ao gene *cepA*, 60 cepas (47,2%) carregavam o referido gene. Não foi observada nenhuma cepa albergando ambos os genes *cfiA* e *cepA*.

Figura 6: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *cfiA* nas 16 cepas encontradas nesse estudo.



1) Padrão de Tamanho Molecular de 100pb; 2)1033; 3) 1386-4; 4) 1424; 5) BA12.2; 6) BA12.11; 7) HC2000.1; 8) RBG-A; 9) AA10; 10) SPA-2; 11)BA4.2; 12) BAS5.3.1; 13) MIA23.4; 14) MF19.5; 15) MC03A; 16) 1571; 17)PC052.

Primeiramente, um conjunto incluindo todas as 16 cepas *cfiA* positivas e um grupo de 16 cepas *cfiA* negativas, porém, *cepA* positivas foi estudado. A equivalência numérica entre os dois grupos foi realizada para obtenção de uma base comparativa homogênea. No entanto, os resultados de muitas sequências não foram considerados satisfatórios, devido a problemas na PCR, concentração de DNA abaixo da requerida para reações de sequenciamento e presença de mais de uma sequência nos gráficos do eletroesferograma. Com isso, estas sequências foram retiradas das análises. No intuito de construir uma análise comparativa para os cinco genes do MLSA, apenas as cepas que apresentavam sequências com gráfico do eletroesferograma apresentando picos elevados bem definidos e sulcos aprofundados com leitura do nucleotídeo correspondente correta e identidade com a sequência correspondente no GenBank foram selecionadas.

A partir desse resultado, 17 cepas (sete *cfiA* positivas e dez *cfiA* negativas) foram selecionadas para avaliação da técnica de análise de sequências em múltiplos *loci* (MLSA) (**Quadro 5**).

Quadro 5: Origem e identificação das 17 cepas de *Bacteroides fragilis* selecionadas

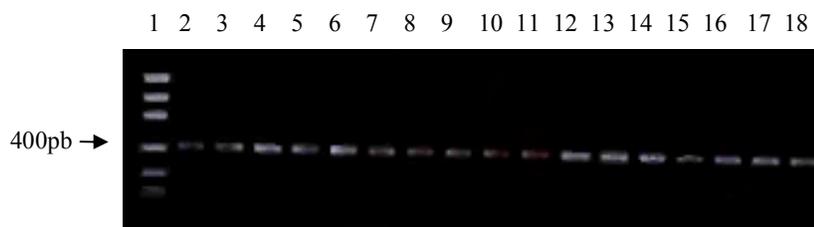
Cepas	Período de isolamento	Origem	País de origem	Padrão	<i>cfiA</i>	<i>cepA</i>
1386-4	1997	Infecção intra-abdominal	Brasil	II	+	-
BA12.2	1999	Microbiota intestinal humana	Brasil	III	+	-
BA12.11	1999	Microbiota intestinal humana	Brasil	III	+	-
AA7b ^a	1996	Ambiente aquático poluído	Brasil	II	-	-
1424	2002	Infecção intra-abdominal	França	II	+	-
HC2000.1	2000	Bacteriemia	Brasil	II	+	-
RBG-A	2000	Microbiota genital feminina	Brasil	II	+	-
1033	1991	Infecção intra-abdominal	Brasil	III	+	-
1433	2003	Infecção intra-abdominal	França	III	-	+
1431	2003	Infecção trato geniturinário	França	III	-	+
1425	2003	Infecção intra-abdominal	França	II	-	+
1441	2004	Infecção peritoneal	França	III	-	+
1437	2004	Ferida cirúrgica	França	II	-	+
1450	2005	Bacteriemia	Brasil	II	-	+
1435	2003	Abscesso anal	França	II	-	+
1457	2006	Indeterminada ^b	Brasil	III	-	+
ATCC25285	1976	Abscesso de apêndice	-	II	-	+

^acepa negativa para os genes *cepA* e *cfiA* isolada de ambiente incluída somente como dado adicional nas análises futuras

^bcepa obtida de material clínico, com origem de isolamento desconhecida

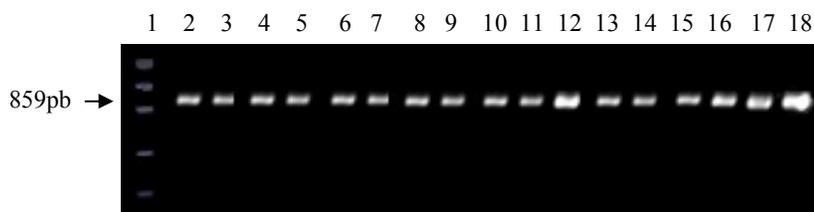
Na MLSA foram utilizados cinco genes: *rrs* (**Figura 7**), *rpoB* (**Figura 8**), *est* (**Figura 9**), *pgm* (**Figura 10**) e *gdh* (**Figura 11**).

Figura 7: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *rrs*.



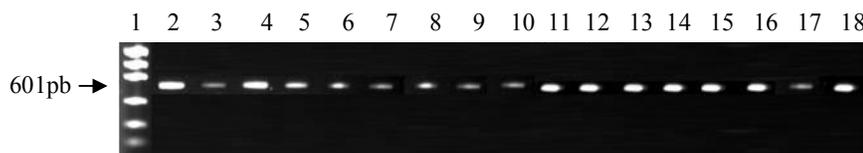
Banda de 400 pb correspondente ao fragmento do gene *rrs* das 17 cepas selecionadas. **1)** Padrão de Massa Molecular *DNA Low Mass*; **2)** 1033; **3)** 1386-4; **4)** 1424; **5)** BA12.2; **6)** BA12.11; **7)** HC2000.1; **8)** RBG-A; **9)** AA7b; **10)** 1425; **11)** 1431; **12)** 1433; **13)** 1435; **14)** 1437; **15)** 1441; **16)** 1450; **17)** 1457; **18)** ATCC25285

Figura 8: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *rpoB*.



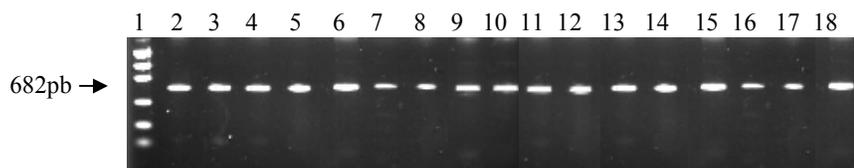
Banda de 859 pb correspondente ao fragmento do gene *rpoB* das 17 cepas selecionadas. **1)** Padrão de Massa Molecular *DNA Low Mass*; **2)** 1033; **3)** 1386-4; **4)** 1424; **5)** BA12.2; **6)** BA12.11; **7)** HC2000.1; **8)** RBG-A; **9)** AA7b; **10)** 1425; **11)** 1431; **12)** 1433; **13)** 1435; **14)** 1437; **15)** 1441; **16)** 1450; **17)** 1457; **18)** ATCC25285

Figura 9: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *est*.



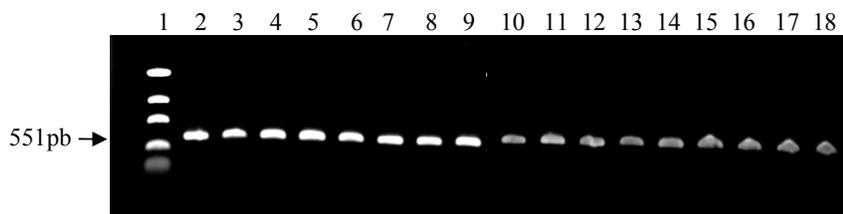
Banda de 601 pb correspondente ao fragmento do gene *est* das 17 cepas selecionadas. **1)** Padrão de Massa Molecular *DNA Low Mass*; **2)** 1033; **3)** 1386-4; **4)** 1424; **5)** BA12.2; **6)** BA12.11; **7)** HC2000.1; **8)** RBG-A; **9)** AA7b; **10)** 1425; **11)** 1431; **12)** 1433; **13)** 1435; **14)** 1437; **15)** 1441; **16)** 1450; **17)** 1457; **18)** ATCC25285

Figura 10: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *pgm*.



Banda de 682 pb correspondente ao fragmento do gene *pgm* das 17 cepas selecionadas. **1)** Padrão de Massa Molecular *DNA Low Mass*; **2)** 1033; **3)** 1386-4; **4)** 1424; **5)** BA12.2; **6)** BA12.11; **7)** HC2000.1; **8)** RBG-A; **9)** AA7b; **10)** 1425; **11)** 1431; **12)** 1433; **13)** 1435; **14)** 1437; **15)** 1441; **16)** 1450; **17)** 1457; **18)** ATCC25285

Figura 11: Gel de agarose (1,5%) demonstrando os fragmentos resultantes da amplificação por PCR do gene *gdh*.

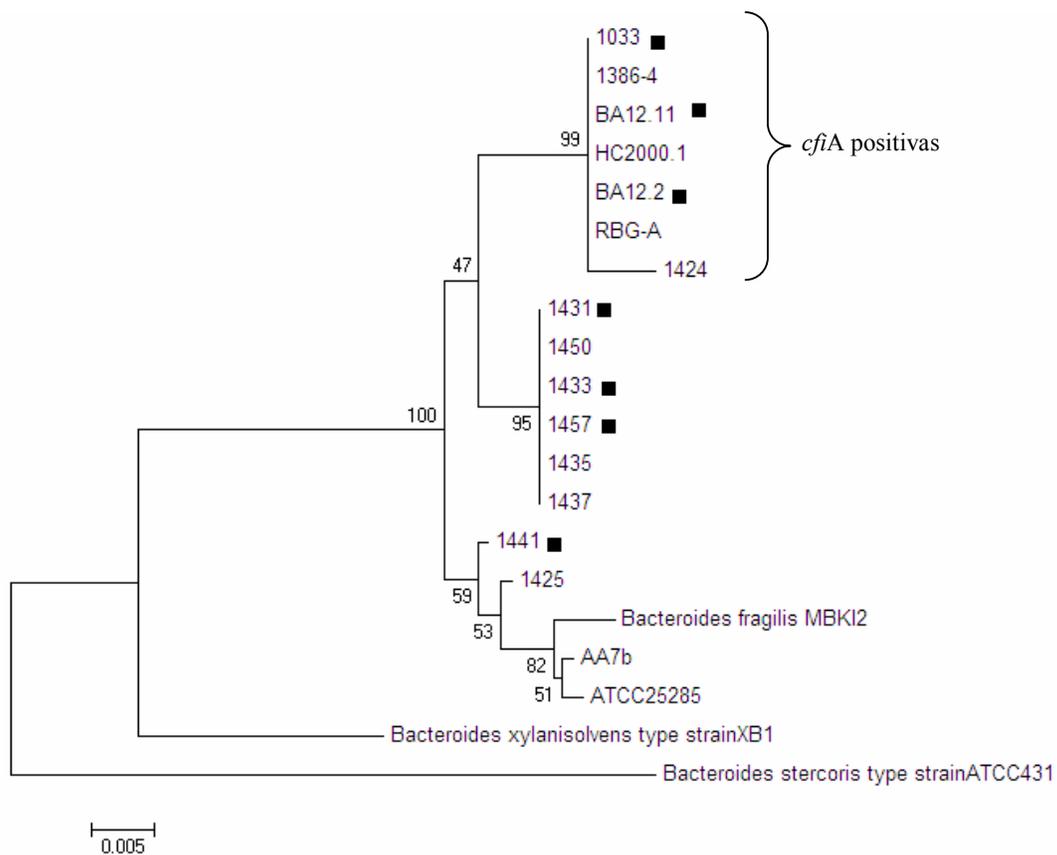


Banda de 551 pb correspondente ao fragmento do gene *gdh* das 17 cepas selecionadas. **1)** Padrão de Massa Molecular *DNA Low Mass*; **2)** 1033; **3)** 1386-4; **4)** 1424; **5)** BA12.2; **6)** BA12.11; **7)** HC2000.1; **8)** RBG-A; **9)** AA7b; **10)** 1425; **11)** 1431; **12)** 1433; **13)** 1435; **14)** 1437; **15)** 1441; **16)** 1450; **17)** 1457; **18)** ATCC25285

Os fragmentos purificados dos cinco genes de cada uma das 17 cepas foram sequenciados. Após sequenciamento, a análise visual e edição das sequências e posterior alinhamento foram realizados. Seguido ao alinhamento, as árvores filogenéticas foram inferidas.

A árvore obtida pela análise das sequências do gene *rrs* demonstrou que as 17 cepas foram divididas em três *clusters*, um contendo somente cepas *cfiA* positivas e os demais, *cfiA* negativas (**Figura 12**).

Figura 12: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene *rrs* (16S rDNA) demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *B. fragilis* selecionadas.



Cepas com o padrão de enterovirulência NTBF III estão indicadas pelo símbolo ■.

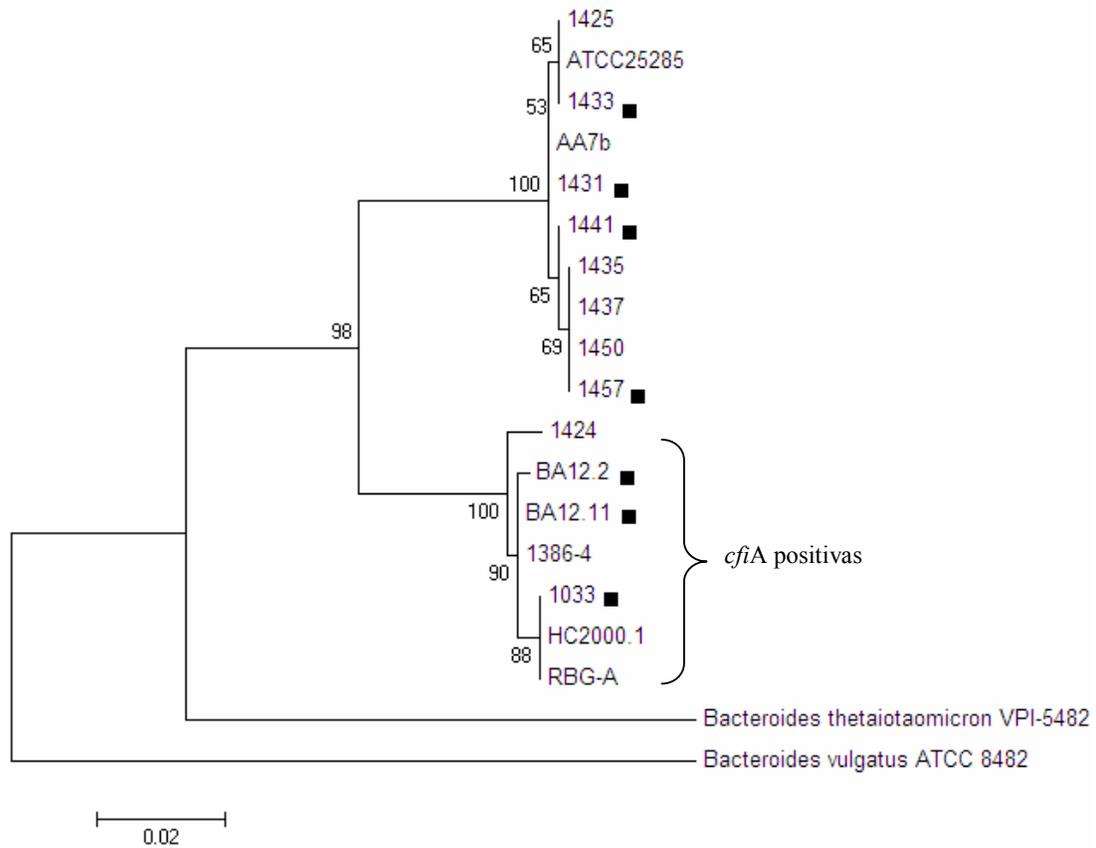
Cepas *outgroup*: *B. xylanisolvens* XB1 e *B. stercoris* ATCC431.

Cepa *ingroup*: *B. fragilis* MBK12

Método: *Neighbor-Joining*, 1000 *bootstraps*

Com relação às sequências dos genes *rpoB* (Figura 13) e *est* (Figura 14), foi verificado que as cepas também foram divididas em dois *clusters* bem distintos, um contendo cepas *cfiA* positivas e o outro *cfiA* negativas.

Figura 13: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene *rpoB* demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *B. fragilis* selecionadas.

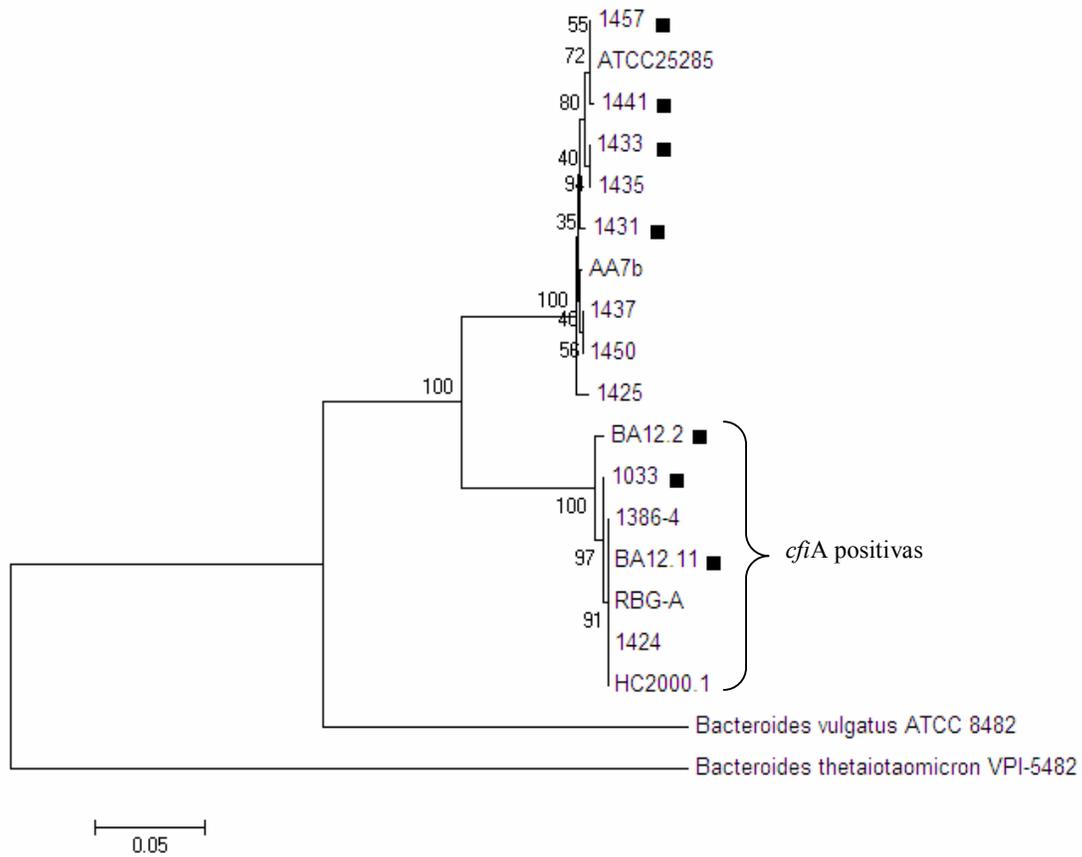


Cepas com o padrão de enterovirulência NTBF III estão indicadas pelo símbolo ■.

Cepas *outgroup*: *B. thetaiotaomicron* VPI5482 e *B. vulgatus* ATCC8482.

Método: *Neighbor-Joining*, 1000 *bootstraps*

Figura 14: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene *est* demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *B. fragilis* selecionadas.



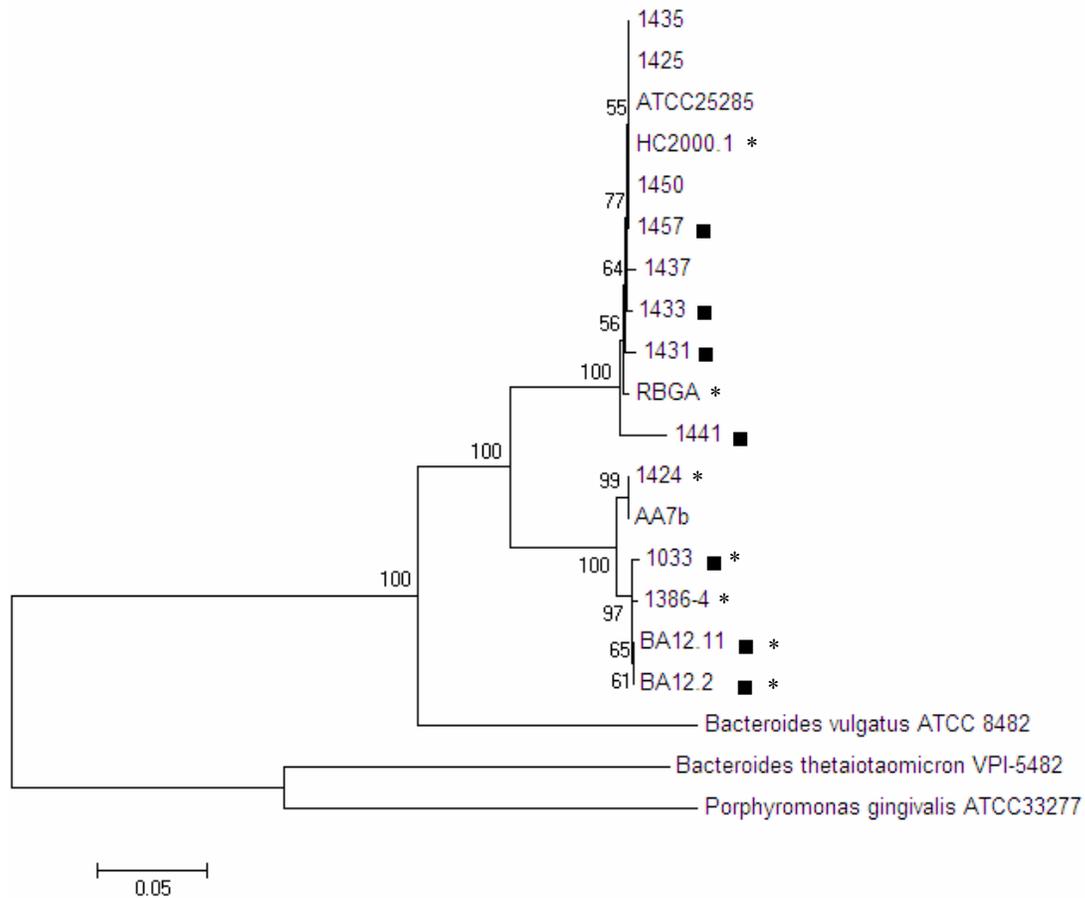
Cepas com o padrão de enterovirulência NTBF III estão indicadas pelo símbolo ■.

Cepas outgroup: *B. thetaiotaomicron* VPI5482 e *B. vulgatus* ATCC8482.

Método: *Neighbor-Joining*, 1000 *bootstraps*

A árvore obtida através das sequências do gene *pgm* também demonstrou a divisão em dois *clusters*, um contendo em sua maioria cepas *cfiA* positivas e o outro *cfiA* negativas, mas com a presença de ambos nos dois grupos (**Figura 15**).

Figura 15: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene *pgm* demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *B fragilis* selecionadas.



Cepas com o padrão de enterovirulência NTBF III estão indicadas pelo símbolo ■.

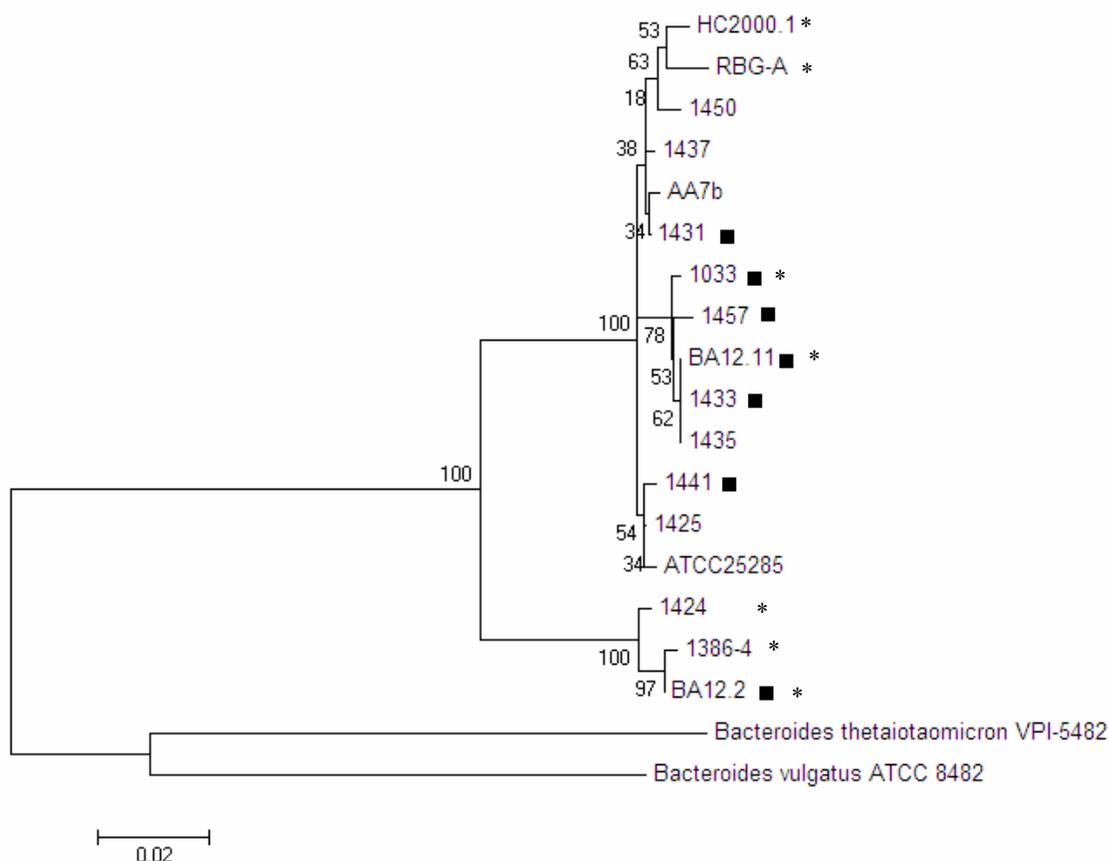
Cepas *cfiA*-positivas estão indicadas pelo símbolo *.

Cepas outgroup: *B. thetaiotaomicron* VPI5482, *B. vulgatus* ATCC8482 e *P. gingivalis* ATCC33277.

Método: *Neighbor-Joining*, 1000 *bootstraps*

Por outro lado, a árvore obtida através das sequências do gene *gdh* demonstrou que as cepas permaneceram distribuídas nos *clusters*, apresentando uma relação genética indistinguível (**Figura 16**).

Figura 16: Árvore filogenética obtida através das sequências do gene *gdh* demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *B. fragilis* selecionadas.



Cepas com o padrão de enterovirulência NTBF III estão indicadas pelo símbolo ■.

Cepas *cfiA*-positivas estão indicadas pelo símbolo *

Cepas outgroup: *B. thetaiotaomicron* VPI5482 e *B. vulgatus* ATCC8482.

Método: *Neighbor-Joining*, 1000 *bootstraps*

Esses resultados obtidos pelo método de construção das árvores filogenéticas *Neighbor-Joining* (1000 *bootstraps*) foram apoiados pelos métodos *Maximum Parsimony* (1000 *bootstraps*) e *Maximum Likelihood* (100 *bootstraps*).

Para avaliar a distribuição do gene *bft* entre as cepas, inicialmente foram incluídas as três cepas ETBF e todas as cepas *cfiA* positivas, mas os sequenciamentos resultantes não foram satisfatórios, conforme citado anteriormente, sendo conseqüentemente retiradas das análises. A distribuição do padrão NTBF III nas cepas selecionadas está representada nas **Figuras 12, 13, 14, 15 e 16**.

Além das árvores filogenéticas obtidas após alinhamento das sequências, também foram determinadas as matrizes de distância dos genes estudados.

Com relação à matriz do gene *rrs*, foi verificada uma similaridade variando entre 99,5 e 100% (divergência média de 0,5%) entre as cepas *cfiA* positivas. A porcentagem de similaridade entre as cepas *cfiA* negativas encontrada variou entre 98,4 e 100% (divergência média de 1,6%). A porcentagem de divergência entre os subgrupos I (*cfiA* negativas) e II (*cfiA* positivas) variou entre 1,3 e 3,4%. (**Tabela 1**).

Na matriz do gene *rpoB*, foi verificada uma similaridade variando entre 94,1 e 100% (divergência média de 5,9%) entre as cepas *cfiA* positivas. A porcentagem de similaridade entre as cepas *cfiA* negativas encontrada variou entre 99,3 e 100% (divergência média de 0,7%). A porcentagem de divergência entre os subgrupos I (*cfiA* negativas) e II (*cfiA* positivas) variou entre 5,6 e 6,6%. (**Tabela 2**).

Para o gene *est*, foi verificada uma similaridade variando entre 99,8 e 100% (divergência média de 0,2%) entre as cepas *cfiA* positivas. A porcentagem de similaridade entre as cepas *cfiA* negativas encontrada variou entre 99,0 e 100% (divergência média de 1,0%). A porcentagem de divergência entre os subgrupos I (*cfiA* negativas) e II (*cfiA* positivas) variou entre 11,8 e 12,8% (**Tabela 3**).

Tabela 1: Porcentagem de divergência entre as sequências do gene *rrs* das 17 cepas de *B. fragilis* selecionadas

Cepa ^a	Divergência (%) das sequências do gene <i>rrs</i> ^b																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 1033		-	0,5	-	-	-	-	1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3	1,3	2,9
2 1386-4			0,5	-	-	-	-	1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3	1,3	2,9
3 1424				0,5	0,5	0,5	0,5	2,4	2,4	1,8	1,8	1,8	1,8	2,1	1,8	1,8	3,4
4 BA12.2					-	-	-	1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3	1,3	2,9
5 BA12.11						-	-	1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3	1,3	2,9
6 HC2000.1							-	1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3	1,3	2,9
7 RBG-A								1,8	1,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,6	1,3	1,3	2,9
8 AA7b									-	1,0	1,0	1,0	1,0	0,3	1,0	1,0	1,0
9 1425										1,0	1,0	1,0	1,0	0,3	1,0	1,0	1,0
10 1431											-	-	-	0,8	-	-	1,6
11 1433												-	-	0,8	-	-	1,6
12 1435													-	0,8	-	-	1,6
13 1437														0,8	-	-	1,6
14 1441															0,8	0,8	1,3
15 1450																-	1,6
16 1457																	1,6
17 ATCC25285																	

^aCepas 1 a 7 : *cfiA* positivas (subgrupo II) ; cepas 8 a 17 : *cfiA* negativas (subgrupo I)

^bAs porcentagens de divergência entre os subgrupos I e II estão sinalizadas em negrito

Tabela 2: Porcentagem de divergência entre as sequências do gene *rpoB* das 17 cepas de *B. fragilis* selecionadas

Cepa ^a	Divergência (%) das sequências do gene <i>rpoB</i> ^b																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 1033		0,5	1,4	0,5	0,7	-	-	6,1	5,7	6,2	5,7	6,6	6,6	6,4	6,6	6,6	5,9
2 1386-4			1,0	0,2	0,3	0,5	5,9	5,9	5,9	6,0	5,9	6,4	6,4	6,2	6,4	6,4	5,9
3 1424				1,0	0,7	1,4	1,4	5,7	5,7	5,9	5,7	6,2	6,2	6,0	6,2	6,2	5,7
4 BA12.2					0,3	0,5	0,5	5,9	5,9	6,1	5,9	6,4	6,4	6,2	6,4	6,4	5,9
5 BA12.11						0,7	0,7	5,6	5,5	5,7	5,5	6,1	6,1	5,9	6,1	6,1	5,5
6 HC2000.1							-	6,1	5,7	6,2	5,7	6,5	6,5	6,4	6,5	6,5	5,9
7 RBG-A								6,1	5,7	6,2	5,7	6,6	6,6	6,4	6,6	6,6	5,9
8 AA7b									0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
9 1425										0,3	-	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,2
10 1431											0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
11 1433												0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,2
12 1435													-	0,5	-	-	0,7
13 1437														0,5	-	-	0,7
14 1441															0,5	0,5	0,7
15 1450																-	0,7
16 1457																	0,7
17 ATCC25285																	

^aCepas 1 a 7 : *cfiA* positivas (subgrupo II) ; cepas 8 a 17 : *cfiA* negativas (subgrupo I)

^bAs porcentagens de divergência entre os subgrupos I e II estão sinalizadas em negrito

Tabela 3: Porcentagem de divergência entre as sequências do gene *est* das 17 cepas de *B. fragilis* selecionadas

Cepa ^a	Divergência (%) das sequências do gene <i>est</i> ^b																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 1033		0,2	0,2	0,8	0,3	0,2	0,2	11,8	12,6	12,0	12,2	12,2	12,4	12,4	12,4	12,2	12,2
2 1386-4			-	1,0	-	-	-	12,0	12,8	12,2	12,4	12,4	12,6	12,6	12,6	12,4	12,4
3 1424				1,0	-	-	-	12,0	12,6	12,2	12,4	12,4	12,6	12,6	12,6	12,4	12,4
4 BA12.2					1,0	1,0	1,0	11,8	12,8	12,0	12,2	12,2	12,4	12,4	12,4	12,2	12,2
5 BA12.11						-	-	12,0	12,8	12,2	12,4	12,4	12,6	12,6	12,6	12,4	12,4
6 HC2000.1							-	12,0	12,8	12,2	12,4	12,4	12,6	12,6	12,6	12,4	12,4
7 RBG-A								12,0	12,8	12,2	12,4	12,4	12,6	12,6	12,6	12,4	12,4
8 AA7b									0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	1,0	0,6	0,8	0,8
9 1425										0,6	1,2	1,4	-	1,4	-	1,2	1,2
10 1431											0,6	0,8	0,4	0,8	0,4	0,6	0,6
11 1433												-	1,0	0,6	1,0	0,4	0,4
12 1435													1,1	0,6	1,1	0,4	0,4
13 1437														1,2	-	1,0	1,0
14 1441															1,2	0,2	0,2
15 1450																1,0	1,0
16 1457																	-
17 ATCC25285																	

^aCepas 1 a 7 : *cfiA* positivas (subgrupo II) ; cepas 8 a 17 : *cfiA* negativas (subgrupo I)

^bAs percentagens de divergência entre os subgrupos I e II estão sinalizadas em negrito

Quadro 6: Dados das sequências do gene *rpoB* demonstrando uma diferenciação das cepas *cfiA*-positivas e *cfiA*-negativas conforme com a substituição de nucleotídeos

Posição do nucleotídeo	Nucleotídeo presente e alteração de aminoácido ^a	
	<i>cfiA</i> positivas	<i>cfiA</i> negativas
77	T (L)	C (S)
89	C (S)	T (F)
179	C (S)	A (Y)
194	T (I)	C (T)
206	C (S)	T (L)
287	C (P)	T (L)
308	G (R)	A (Q)
326	C (S)	T (L)
347	T (L)	C (S)
356	C (T)	T (I)
359	C (S)	T (L)
365	T (M)	C (T)
374	T (M)	C (T)
383	C (S)	T (L)
398	G (N)	A (S)
401	A (Y)	G (C)
429	T (L)	C (S)
440	T (M)	C (T)

^aA: alanina, C: citosina, F: fenilalanina, I: isoleucina, L: leucina, M: metionina, N: asparagina, P: prolina, Q: glutamina, R: arginina, S: serina, T: treonina, Y: tirosina

Quadro 7: Dados das sequências do gene *est* demonstrando uma diferenciação das cepas *cfiA*-positivas e *cfiA*-negativas conforme com a substituição de nucleotídeos

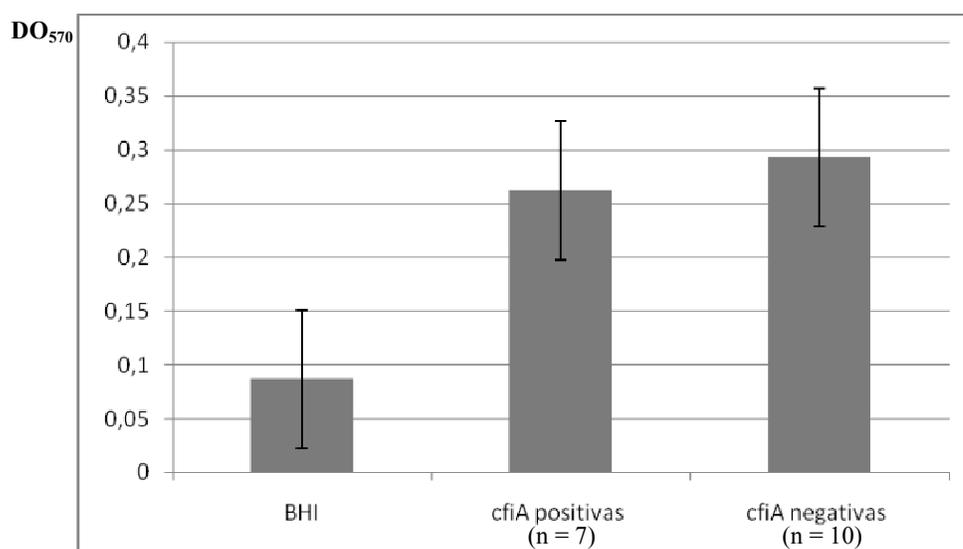
Posição do nucleotídeo	Nucleotídeo presente e alteração de aminoácido ^a	
	<i>cfiA</i> positivas	<i>cfiA</i> negativas
8	C (A)	T (V)
50	A (Y)	G (C)
59	C (S)	A (*)
88	A (M)	G (V)
184	T (Y)	C (H)
193	G (E)	T (*)
211	C (R)	T (*)
214	C (P)	T (S)
217	T (*)	G (E)
223	G (A)	A (T)
232	C (H)	T (Y)
244	T (Y)	C (H)
250	G (G)	A (R)
262	T (Y)	A (N)
269	C (H)	T (Y)
274	C (P)	T (S)
277	C (S)	T (P)
280	T (C)	C (R)
289	T (W)	C (R)
334	C (P)	T (S)
340	T (S)	C (P)
343	G (A)	C (Q)
346	G (E)	A (K)
349	T (Y)	C (H)
364	A (T)	G (A)
377	A (N)	C (T)
382	T (F)	C (L)
385	C (Q)	A (K)
394-396	AGG (R)	GAA (E)
398	G (C)	A (Y)
514, 516	A,C (N)	C,T (D)

^aA: alanina, C: citosina, D: aspartato, E: glutamato, F: fenilalanina, G: glicina, H: histidina, K: lisina, L: leucina, M: metionina, N: asparagina, P: prolina, Q: glutamina, R: arginina, S: serina, T: treonina, V: valina, W: triptofano, Y: tirosina, *: códon de terminação

4. Ensaio da produção de biofilme

Na tentativa de detectar alguma diferença na virulência desses dois subgrupos, foi realizado um ensaio de aderência bacteriana em microplacas de poliestireno. No entanto, não foi observada alteração significativa na produção de biofilme entre as cepas pertencentes aos dois subgrupos de *B. fragilis* conforme demonstrado na **Figura 18**.

Figura 18: Aderência de bactérias a placas de poliestireno em um ensaio de biofilme.

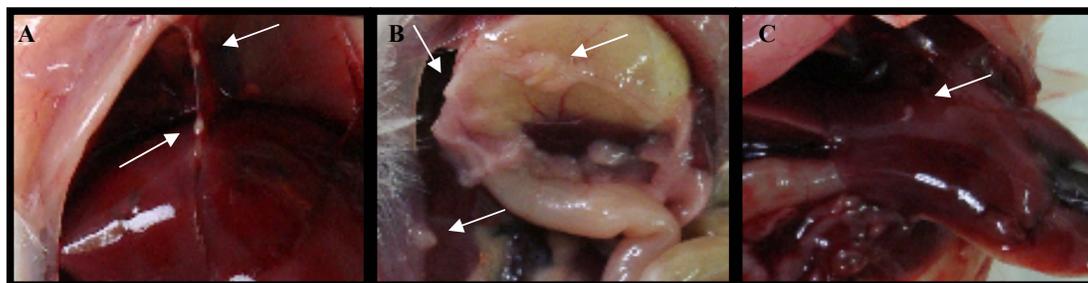


Produção de biofilme (DO₅₇₀) determinada em ensaio de biofilme em microplaca a 37°C/ 24 h. As médias das absorbâncias obtidas das cepas de cada subgrupo e do controle BHI-PRAS estão representadas. Os dados são de dois experimentos independentes. Análises estatísticas foram realizadas utilizando todas as comparações múltiplas de pareamento (*Tukey Test*). O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

5. Indução de abscessos intra-abdominais em camundongos

Após não ser verificada nenhuma alteração na produção de biofilme em ambos os subgrupos, partiu-se então para um ensaio no qual pudéssemos observar diferença no principal critério de determinação do potencial de virulência para a espécie, a capacidade de indução de abscessos, o qual pode ser avaliado em um modelo animal. Foram selecionadas as cepas 1424 (*cfiA*-positiva) e 1433 (*cfiA*-negativa), ambas isoladas de pacientes com infecção intra-abdominal. Através do inóculo de uma mistura do micro-organismo e conteúdo cecal estéril de camundongo na cavidade abdominal de camundongos saudáveis para indução de abscessos intra-abdominais foi observado que a cepa 1433 apresentou mais focos de abscesso do que a cepa 1424. Apenas um animal não apresentou abscesso. Na cepa 1433, foram encontrados dois abscessos no fígado em um camundongo (**Figura 19A**) e dois abscessos no estômago e outro na membrana peritoneal no outro animal (**Figura 19B**). Já a cepa 1424 apresentou foco de abscesso apenas no fígado de um camundongo (**Figura 19C**). Foram observadas poucas, porém, características colônias de *B. fragilis* nas placas de agar sangue suplementado no macerado dos abscessos da cepa 1433. Foram encontradas 12 colônias em cada placa e, após coloração de Gram, foi confirmada a presença de bacilos Gram-negativos. Não foi observado crescimento na placa inoculada com o macerado da cepa 1424. Para ambas as cepas, não houve crescimento em aerobiose.

Figura 19: Abscessos intraperitoneais em camundongos BALB/c machos.



Os camundongos inoculados com 10^8 UFC/mL de *B. fragilis* e necropsiados sete dias depois. As setas indicam a localização dos abscessos. A) abscessos hepáticos causados pela cepa 1433 (*cfiA*-negativa); B) abscessos na membrana peritoneal e estômago causados pela cepa 1433 (*cfiA*-negativa); C) abscesso hepático causado pela cepa 1424 (*cfiA*-positiva).

DISCUSSÃO

A identificação presuntiva ao nível de espécies de *Bacteroides* spp. requer uma bateria de testes bioquímicos e perfis de ácidos graxos de baixo peso molecular. Entretanto, nem sempre os métodos fenotípicos utilizados na rotina laboratorial conseguem distinguir claramente espécies muito relacionadas. Com isso, a identificação definitiva exige, em alguns casos, o emprego de métodos moleculares como o sequenciamento do rDNA 16S. A frequente reclassificação de membros do gênero *Bacteroides* spp. leva à necessidade da atualização dos testes empregados e da interpretação dos mesmos. Levando-se em consideração a natureza fastidiosa e a complexa identificação desses micro-organismos, a confirmação da identificação das cepas analisadas no presente trabalho foi realizada. Essa etapa inicial foi desenvolvida na tentativa de eliminar a hipótese de eventuais resultados atípicos decorrentes de contaminação ou identificação prévia equivocada ou desatualizada.

B. fragilis é um importante componente da microbiota do trato gastrointestinal e frequentemente relatado como patógeno oportunista, causando infecções severas, incluindo abscessos intra-abdominais, cerebrais, pulmonares, pélvicos e sepse com elevado índice de morbidade e mortalidade (WEXLER, 2007).

A espécie *B. fragilis* pode ser dividida em dois subgrupos geneticamente caracterizados pelo carreamento de genes de diferentes cefalosporinases. A divisão I, ou subgrupo I, é caracterizada pela presença do gene *cepA* (que codifica uma serina- β -lactamase de classe A) e a ausência do gene *cfiA* (que codifica uma metalo- β -lactamase de classe B), que confere resistência a imipenem. A divisão II, ou subgrupo II, é definida pela presença do gene *cfiA* e ausência do gene *cepA*. Ambos os subgrupos têm sido descritos como divergentes através de perfis de ribotipagem, com o subgrupo I (divisão I) apresentando diversos ribotipos e o subgrupo II (divisão II) apresentando um único padrão distinto (PODGLAJEN *et al.*, 1995; GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI, 2000). O subgrupo II também carrega três sequências de inserção (IS) não albergadas pelo subgrupo I: IS4351, IS942 e IS1186 (HOLTON, 2008). Essa subdivisão em duas genomoespécies tem sido confirmada através do emprego de uma variedade de técnicas moleculares, incluindo MLEE. Esses dados indicam que o subgrupo I possui uma elevada taxa de recombinação e uma estrutura não clonal enquanto a subdivisão II apresenta uma estrutura clonal com baixo índice de

recombinação (GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI, 2000; HOLTON, 2008).

Em inúmeros estudos, a presença do gene *cfiA* nunca havia sido observada juntamente com o gene *cepA*, uma vez que as cepas *cfiA* positivas e *cfiA* negativas pertencem a grupos filogeneticamente distintos. No entanto, desde a detecção de ambos os genes *cfiA* e *cepA* em duas cepas de *B. fragilis*, essa subdivisão encontrada dentro da espécie tem sido correlacionada somente de acordo com a presença ou ausência do gene *cfiA*, sendo denominados grupo *cfiA*-negativo (divisão I ou subgrupo I) e grupo *cfiA*-positivo (divisão II ou subgrupo II) (AYALA *et al.*, 2005).

Dentre os fatores de virulência de *B. fragilis* é amplamente estudada a BFT, que hidrolisa o domínio extracelular de E-caderina, e interrompe a adesão intercelular, aumentando, assim, a permeabilidade do epitélio. Isto causa uma redistribuição intracelular de actina com modificações morfológicas nas células e liberação de beta-catenina, que transloca ao núcleo, resultando em um aumento da proliferação celular (HOLTON, 2008).

Até o momento foi descrito que todas as cepas enterotoxigênicas (ETBF) pertencem à divisão I. A técnica de MLEE e a análise de *clusters* indicam que as cepas ETBF não são clonais, consistente com os elevados índices de recombinação descritos na divisão I (GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI, 2000). Este fato indica uma faixa altamente restrita de hospedeiros para os transposons que carregam a ilha de patogenicidade contendo o gene *bft* (BfPAI) (HOLTON, 2008).

Apesar da forte associação de cepas ETBF a processos diarréicos, estas são isoladas em frequências consideradas elevadas de pacientes com infecções extra-intestinais e bacteriemias. No entanto, diversos estudos clínicos demonstram que 5-20% da população mundial aparenta carrear essas cepas assintomaticamente (SEARS, 2009). Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado a associação da toxina BFT com quadro de doença inflamatória e com câncer cólon-retal (BASSET *et al.*, 2004, TOPRAK *et al.*, 2006).

A detecção de apenas uma cepa, então categorizada como ETBF, dentre as 109 cepas de *B. fragilis* isoladas no Brasil demonstrou que os índices de isolamento desse perfil

permanecem baixos (1,5-3,0%) em nosso país (BRESSANE *et al.* 2001, ANTUNES *et al.* 2002, KRZYZANOWSKY & AVILA-CAMPOS 2003; NAKANO *et al.*, 2007).

Em diversas outras regiões do mundo como Japão (14,9%), Vietnã (7,3%), Turquia (25%), Bangladesh (20,3%) e Estados Unidos (19,7%), os índices de isolamento de cepas ETBF são muito elevados (KATO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2005; DURMAZ, DALGALAR & DURMAZ, 2005; PATHELA *et al.*, 2005; COHEN *et al.*, 2006).

Na Itália, Pantosti e colaboradores (1997) encontraram taxas de 10 e 17% em cepas isoladas de crianças e adultos, respectivamente (PANTOSTI *et al.*, 1997). Em um outro estudo realizado com cepas isoladas de 227 crianças do mesmo país, foi relatado o índice de 33,3% de cepas ETBF (SEARS, 2009).

Na Suécia, Zhang e colaboradores descreveram que 26,8% das cepas isoladas de 728 pacientes são ETBF (ZHANG *et al.*, 1999).

Com base nesses dados, pode-se constatar que os níveis da presença dessas cepas enterotoxigênicas na Europa são elevados. Foi detectada a presença de duas cepas do total de 18 investigadas nesse estudo isoladas na França. Apesar de pertencerem a um mesmo centro hospitalar, não representando assim o país, é proposto que cepas ETBF continuem circulando em altos índices (11,1%, 2/18), como previamente documentado por Luczak e colaboradores (2001). No trabalho desses autores em 2001, foi encontrada uma cepa ETBF do total de 10, representando 10% de ETBF. O presente relato é o segundo envolvendo cepas isoladas na França e essa facilidade na detecção desse padrão de enterovirulência atenta para a necessidade de maiores estudos investigativos na detecção e caracterização de isoformas do referido gene nesse país.

Cepas ETBF podem produzir três isoformas da enterotoxina codificadas pelos genes *bft-1*, *bft-2* e *bft-3*. Embora essas isoformas apresentem as mesmas atividades biológicas, possuem potenciais diferentes. As isoformas *bft-1* e *bft-2* são resistentes a tripsina e estáveis a variações de pH, sendo assim resistentes a degradação no intestino de humanos e animais. Em *bft-2* e *bft-3* foi relatada uma discreta atividade biológica específica ainda não completamente

elucidada. A isoforma *bft-3* somente foi descrita em países do sudoeste asiático como Coreia, Japão e Vietnã, sugerindo uma evolução regional das cepas ETBF (SEARS, 2009)

No presente estudo, foram avaliadas quais isoformas estavam presentes nas três cepas ETBF. Após sequenciamento do fragmento obtido pela amplificação do gene *bft* das três cepas ETBF detectadas, foi observada uma porcentagem de similaridade de 99,99% com sequências da isoforma *bft-1* da cepa ATCC43858. Esse resultado está de acordo com vários estudos semelhantes, nos quais a isoforma *bft-1* é predominantemente encontrada em diversas partes do mundo (MONCRIEF *et al.* 1995; ULGER *et al.* 2006; AVILA-CAMPOS *et al.* 2007).

Dados filogenéticos indicam que as cepas de *B. fragilis* possuem alta diversidade genética e os estudos funcionais das sequências dos genomas de duas cepas não-toxigênicas (NTBF) demonstraram mecanismos regulatórios de inversão de DNA, sugerindo que esses micro-organismos sejam altamente adaptáveis, com variabilidade rápida e dinâmica nos padrões de expressão de moléculas de superfície (CARDENO-TARRAGA *et al.*, 2005; COYNE *et al.*, 2003; KUWAHARA *et al.*, 2004).

Estudos genéticos utilizando cepas de *Bacteroides* isoladas de microbiota humana têm mostrado que este gênero possui elementos móveis e conjugativos, como plasmídios e transposons, responsáveis pela transferência de genes. O gene *cfiA* tem sido encontrado apenas nas cepas NTBF padrão II e III, mas ainda na divisão II (BUCKWOLD *et al.*, 2007). Se os genes responsáveis pela transferência desses transposons conjugativos são funcionais, é possível que o gene *bft* possa ser transferido de uma cepa enterotoxigênica para uma não toxigênica. A presença de novos transposons conjugativos transmissíveis, genes de virulência e resistência pode contribuir para o aumento do potencial de patogenicidade e aptidão dessa cepa. Além disso, esses fatores podem promover o desenvolvimento de uma infecção mais severa, que pode se tornar não susceptível à maioria das possibilidades terapêuticas (TERHES *et al.*, 2007).

Com base no elevado percentual de NTBF III (44,9% no Brasil e 38,8% na França) e assumindo a possibilidade de transferência horizontal de genes, estudos adicionais são

necessários para monitorar possíveis mudanças na enterovirulência desse micro-organismo, apesar da baixa incidência de cepas ETBF no Brasil.

Os frequentes relatos demonstrando essa subdivisão em *B. fragilis* levaram à proposta que essas duas genomopécies possam representar duas diferentes espécies de *Bacteroides* spp. Nos últimos anos a taxonomia de *Bacteroides* spp. sofreu significativas mudanças (OLSEN & SHAH, 2008; SAKAMOTO & BENNO, 2006). A taxonomia de micro-organismos é um processo complexo que leva em consideração a análise de características fenotípicas, químicas e moleculares (taxonomia polifásica).

A porcentagem de hibridização DNA-DNA é considerada padrão ouro para delimitação de espécies levando em consideração que membros de uma mesma espécie compartilham 50-70% de reassociação de DNA e 5-7% de diferenças em estabilidade térmica entre duplex homólogo e heterólogo (WAYNE *et al.*, 1987; JOHNSON, 1978; URSING; LIOR & OWEN, 1994; STACKEBRANDT *et al.*, 2002). Dentro de muitas espécies bem definidas, esses valores de reassociação de DNA são acima de 70% (ROSSÉLLO-MORA & AMANN, 2001; ROSSÉLLO-MORA, 2003; 2005).

Metodologias moleculares, mais comumente o sequenciamento do rDNA 16S, permitem a alocação direta de organismos em uma classificação filogenética, ao nível de família e gênero. A análise de sequências de rDNA 16S é a ferramenta mais utilizada em taxonomia e filogenia microbiana, estabelecendo relações evolutivas entre os micro-organismos, e apresentando vantagens, como ser universalmente distribuída e apresentar regiões conservadas alternadas com regiões variáveis, o que teoricamente permitiria uma boa resolução filogenética (WOESE, 2000). No entanto, alguns estudos indicam que o rDNA 16S possui limitações como ferramenta taxonômica em alguns grupos bacterianos já que a maioria dos genomas bacterianos sequenciados possui múltiplas cópias com sequências variadas deste gene (STACKEBRANDT *et al.*, 2002). Além disso, é frequentemente descrito que a variação existente nas sequências de rDNA 16S não é suficiente para discriminar espécies muito próximas. Por ser um gene muito conservado, o 16S rRNA é útil para estabelecer relações entre organismos distantes filogeneticamente, porém, a sua acurácia é reduzida gradativamente conforme o espectro filogenético analisado diminui, se tornando muito difícil diferenciar espécies muito relacionadas e virtualmente impossível diferenciar estirpes.

Adicionalmente, a resolução filogenética intra-específica em alguns casos não é suficiente (SCHLEGEL *et al.*, 2003). Desde 2000, a análise de sequências de rDNA 16S tem se destacado nas sistemáticas microbianas, revolucionando a compreensão da evolução de procariotos e de sua diversidade (MORSE, O'HANLON & COLLINS, 2002; WOESE, 2000), representando um excelente instrumento para reconstrução de relações filogenéticas. No entanto, com as evidências de que segmentos do gene rRNA 16S podem ser transferidos lateralmente, existe a necessidade de uma criteriosa interpretação dos resultados obtidos (WANG & ZHANG, 2000). Organismos com menos de 97% de similaridade não geram valores de reassociação de DNA acima de 60% nos experimentos de hibridização DNA-DNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). Sendo assim, esse método não apresentaria uma base aceitável para a diferenciação dessa subdivisão em *B. fragilis*.

O gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase tem emergido como um gene candidato para análises filogenéticas e identificação de bactérias, especialmente em estudos de isolados intimamente relacionados (ADÉKAMBI, DRANCOURT & RAOULT, 2008). Associado ao gene rDNA 16S, o gene *rpoB* tem auxiliado no delineamento de novas espécies bacterianas e o refinamento das análises da comunidade bacteriana, assim como o monitoramento de mutações conferindo resistência à rifampicina. O sequenciamento de *rpoB* possibilita estimar eficientemente o conteúdo G+C%, valor de hibridização DNA-DNA e média de identidade de nucleotídeos (porcentagem da sequência total genômica compartilhada entre duas cepas) quando relações taxonômicas tem sido estabelecidas (ADÉKAMBI, DRANCOURT & RAOULT, 2008).

Os sistematas têm encorajado a proposta de novas espécies com base em outras metodologias genômicas ou técnicas para suplementar ou suplantam a reassociação de DNA. Essas novas abordagens devem seguir os seguintes critérios: ser quantitativo e os resultados receptivos para análises estatísticas; ser validado com coleções de cepas para as quais dados extensos de similaridade DNA-DNA e, de preferência, estabilidade termal estejam disponíveis. Além disso, uma coleção de cepas representativas das linhagens filogenéticas de espécies devem ser incluídas nesse estudo (STACKEBANDT *et al.*, 2002). O comitê *ad hoc* para reavaliação da definição de espécies em Bacteriologia considera algumas técnicas promissoras nessa área como o sequenciamento de genes de manutenção celular. O consenso atual é que um nível informativo de dados filogenéticos deva ser obtido a partir de um

mínimo de cinco genes. Esses genes devem estar presentes em diversos *loci* cromossômicos e amplamente distribuídos entre os taxóns. Os níveis de informação obtidos dependem da diversidade genética presente em um táxon. Portanto, o número absoluto de genes a serem analisados deve ser avaliado com base na eficiência de agrupamento dos *clusters* obtidos por uma variedade de análises filogenéticas. É esperado que o nível de divergência entre cepas de uma espécie possa diferir de táxon a táxon. Essa análise de sequências em múltiplos *loci* (MLSA) é uma extensão da abordagem de análise da tipagem de múltiplos *loci* (*Multilocus Sequence Typing*; MLST), que tem sido amplamente utilizada para indexar e organizar a variabilidade genética intra-espécie (STACKEBANDT *et al.*, 2002; NASER *et al.*, 2005; URWIN & MAIDEN, 2003). A MLST trouxe uma nova dimensão na elucidação de relacionamento genômico nos níveis inter e intra-específico pela análise de sequências desses genes metabólicos. Essa técnica tem sido empregada principalmente em epidemiologia, mas oferece a oportunidade de incorporar os discernimentos disponíveis a partir de abordagens filogenética e genética de população em sistemática bacteriana e provêm aos microbiologistas ferramentas de busca para marcadores filogenéticos independentes de genes rDNA (ENRIGHT & SPRATT, 1999; COOPER & FEIL, 2004; TURNER & FEIL, 2007).

MLST e MLSA têm sido apontadas como poderosos e pragmáticos métodos moleculares para tipagem de um grande número de cepas microbianas para estudos de genética de população, delimitação de espécies e determinação de cepas para espécies bacterianas definidas (BISHOP *et al.*, 2009; MARGOS *et al.*, 2009). Estudos de taxonomia têm apontado que os resultados de MLEE apenas refletem indiretamente a estrutura populacional genética, tornando difícil a comparação entre resultados obtidos em diferentes laboratórios. Por outro lado, a utilização de sequências de nucleotídeos com variação pode diretamente identificar tipos alélicos, disponibilizando dados que possam ser comparados em diversas partes do mundo, como o emprego do MLST. No entanto, ainda não existe nada descrito até o momento para o gênero *Bacteroides* spp.

Com base nesses princípios de análise de genes de manutenção celular, a técnica de MLSA tem emergido como uma nova abordagem para fins taxonômicos (NASER *et al.*, 2005). Para avaliar a presença dessa divisão em nossas cepas, foi realizado uma MLSA de cinco *loci*: *rrs* (rRNA16S), *rpoB* e três das 15 enzimas metabólicas anteriormente utilizadas

para MLEE por GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI em 2000: *est* (esterase), *gdh* (glutamato desidrogenase) e *pgm* (fosfoglucomutase).

Inicialmente, foi estudado um conjunto incluindo todas as 16 cepas *cfiA* positivas e um grupo de 16 cepas *cfiA* negativas. A equivalência numérica entre os dois grupos foi realizada para obtenção de uma base comparativa homogênea. No entanto, os resultados de muitas sequências não foram considerados satisfatórios. Com isso, estas sequências foram retiradas das análises. No intuito de construir uma análise comparativa para os cinco genes analisados pós MLSA, apenas as cepas que apresentavam sequências com gráfico do eletroesferograma apresentando picos elevados bem definidos e sulcos aprofundados com leitura de nucleotídeo correspondente correta e identidade com a sequência correspondente no GenBank foram selecionadas. Porém, as sequências das cepas ETBF obtidas que apresentaram resultado adequado agruparam-se dentro da divisão contendo as cepas *cfiA* negativas (divisão I). As cepas NTBF III apresentaram-se dispersas em ambos os subgrupos detectados. O elevado percentual (47,2%) de cepas albergando o gene *cepA* era esperado, devido ao fato desse gene estar presente no cromossomo (GARCIA *et al.*, 2009).

As metodologias de distância têm como objetivo construir uma árvore filogenética tomando como base uma matriz de distância. Esta matriz demonstra as distâncias evolutivas entre cada uma das sequências alinhadas. Os pares de sequências que apresentarem as menores distâncias entre eles são denominados “vizinhos” (*neighbor*). Em uma árvore, tais sequências compartilham um mesmo nó interno e são ligadas ao mesmo por um ramo. O objetivo destes métodos é identificar uma árvore que posicione os “vizinhos” corretamente e que também determine o tamanho dos ramos de modo que reproduzam os dados originais da melhor forma possível. Esse método de distância é denominado *Neighbor – Joining* (NJ) (SAITOU & NEI, 1987) e é especialmente útil quando as taxas de evolução das linhagens consideradas variam. Existem alguns algoritmos que utilizam métodos de distância para construir árvores filogenéticas (WIENS & SERVEDIO, 1998; MOUNT, 2004).

O princípio da parcimônia máxima ou mínima evolução está relacionado à identificação da árvore filogenética que apresente o menor número de mudanças evolutivas para explicar as diferenças entre as unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Units*, OTUs) estudadas (MOUNT, 2001). Esse método cladístico resulta em uma

árvore chamada de árvore de parcimônia máxima. Pode acontecer de ser obtida mais de uma árvore contendo o mesmo número mínimo de mudanças encontradas entre as OTUs. Assim, podemos obter duas árvores distintas a partir dos mesmos dados de entrada (SWOFFORD *et al.*, 1996).

Em parcimônia máxima (*Maximum Parsimony*; MP), para ser construída a topologia da árvore mais parcimoniosa, não são observadas todas as sequências de nucleotídeos, apenas aquelas que apresentam sítios informativos (MOUNT, 2001). Para calcularmos uma árvore de parcimônia máxima devem ser identificados, primeiramente, todos os sítios informativos presentes nas sequências de DNA das OTUs. Em seguida, para cada árvore filogenética possível, deve ser calculado o número mínimo de substituições em cada sítio informativo. Finalmente, é somado o número de mudanças de todos os sítios informativos para cada árvore e escolhida a árvore associada com o menor número de substituições.

O princípio da máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*; ML) consiste em avaliar a probabilidade de que um determinado modelo de mudanças evolutivas possa explicar a origem dos dados observados. Estimativas de ML foram utilizadas pela primeira vez por Cavalli-Sforza & Edwards em 1967, embora não utilizando dados de sequência de macromoléculas (realizado por FELSENSTEIN em 1981). O objetivo do método é inferir o histórico ou o conjunto de histórias evolutivas que sejam os mais consistentes em relação aos dados estudados. Para a aplicação do ML, é necessário que um modelo concreto de mudanças evolutivas que leve à conversão de uma sequência em outra seja especificado. Nesta metodologia, os modelos de mudanças evolutivas são avaliados quanto à sua probabilidade de explicar um conjunto de dados de forma que reflita a história evolutiva mais próxima da realidade, ou seja, a história mais verossímil (*likelihood*). Nessa avaliação, os modelos recebem valores de verossimilhança e aquele que apresentar o melhor valor é o que será utilizado para se inferir a árvore filogenética.

É de fundamental importância reconhecer que as árvores filogenéticas obtidas pelos métodos descritos acima são hipóteses. Deve-se, portanto testar a estabilidade e a confiança dos dados. Existem alguns métodos que permitem saber se os dados são bem estruturados ou se contém um bom sinal filogenético. Como já mencionado, um dos métodos mais utilizados é o do *bootstrap*. Os índices de *bootstrap* (EFRON, HALLORAN & HOLMES, 1996;

FELSENSTEIN, 1985) são verificados através da análise de reamostragem de caracteres da matriz de dados, gerando novas matrizes. Se, na reamostragem de caracteres, determinados ramos permanecem sempre juntos nas novas topologias simuladas, aquele nó que os une receberá um valor de 100% na árvore original.

É importante ressaltar que não existe uma única metodologia que se aplique a todos os estudos filogenéticos realizados com dados moleculares. Embora existam inúmeros algoritmos, procedimentos e *softwares* desenvolvidos para este tipo de análise, sua confiabilidade e praticidade são em todos os casos dependentes do tamanho e da estrutura dos dados analisados. As vantagens e desvantagens destes métodos estão sujeitas a debates científicos, devido ao risco de gerar resultados incorretos é maior na filogenia molecular computacional do que em muitos outros campos da ciência. Por vezes, o fator limitante neste tipo de análise não é o poder computacional, mas sim o conhecimento do pesquisador (FELSENSTEIN, 1981; MOUNT, 2004).

Na sistemática, estudos envolvendo variação intra-espécies incluem investigações dos perfis fisiológicos e a utilização de pelos menos três métodos de construção das árvores filogenéticas como: distância (NJ), parcimônia (MP) e verossimilhança (ML) (WIENS, 1995; SWOFORD *et al.*, 1996). No presente trabalho, foram empregadas essas três metodologias e as árvores resultantes apresentaram topologias similares. Com isso, todas as árvores representadas de NJ apresentaram resultados confirmados pelos demais métodos de agrupamento MP e ML.

Em 2007, Ko e colaboradores analisaram as sequências dos genes rRNA 16S e *rpoB* de um grupo de 19 cepas de referência de diferentes espécies depositadas no GenBank, sendo que dentre as cinco sequências de *B. fragilis* apenas uma albergava o gene *cfiA*. Os autores relataram a existência dessa divergência (variando entre 8,2 e 11,1%) intra-espécie referente à presença dos subgrupos I e II. Os níveis de divergência inter-espécies das sequências de *rpoB* (7,6-20,8%) foram superiores aos encontrados nas sequências de rDNA 16S (3,1-8,9%), apontando o *rpoB* como um gene alternativo na distinção de *Bacteroides* spp (KO *et al.*, 2007). Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, as sequências dos genes *rpoB*, *gyrB* (girase B), *pdiA* (isomerase proteína dissulfeto) e *ompA* (proteína de membrana externa A) foram determinadas. Foi investigada uma coleção de 63 cepas de *B. fragilis* isoladas na

Coreia e no Japão, incluindo quatro cepas de referência. Desse total, somente três albergavam o gene *cfiA*. Os índices de divergência entre as duas divisões variaram de 7,5 e 17,4% entre as sequências dos genes *rpoB* (8,2-10%), *gyrB* (14,6-17,4%), *pdiA* (10,1-12,2%) e *ompA* (7,5-8,4%). Todas as sequências dos quatro genes demonstraram uma clara separação dos grupos *cfiA* negativos e *cfiA* positivos, sendo relatada uma elevada frequência de recombinação intra-espécie na divisão I. Nesse mesmo estudo, foi investigada a distribuição do gene *bft*, sendo que os isolados que albergavam esse gene apresentaram-se esparsamente distribuídos na divisão I (KO *et al.*, 2009).

Os resultados do presente trabalho indicam que as análises dos genes *rpoB* e *rrs* continuam apresentando a existência desses dois subgrupos em *B. fragilis*, conforme relatado em estudos recentes (KO *et al.* 2007; KO *et al.*, 2009). A divergência entre as sequências das cepas dos dois subgrupos variou de 1,3 a 3,4% para o gene *rrs* de 5,7 a 6,6% para o gene *rpoB*.

Nenhum dos demais três genes de manutenção celular foram descritos em análises filogenéticas. Os índices de divergência do gene *est* encontrados variaram de 11,8 a 12,6 entre os subgrupos, enquanto os genes *pgm* e *gdh* apresentaram taxas de 13,3 e 7,0%, respectivamente. Contudo, apenas as matrizes de divergência dos genes *rrs*, *rpoB* e *est* foram consideradas nesse estudo, uma vez que apenas as sequências desses genes foram capazes de separar eficientemente os grupos de cepas *cfiA* positivas e *cfiA* negativas.

Com base nesses resultados, o gene *est* apresenta uma maior taxa de evolução do que os genes *rrs* e *rpoB*. A árvore filogenética resultante da análise desse gene possui topologia bem definida e distinta entre os subgrupos com 100% de índice *bootstrap* (em 100% dos agrupamentos as cepas foram arranjadas conforme apresentado na árvore). Esse gene metabólico, nunca anteriormente empregado em estudos filogenéticos, pode emergir como uma nova ferramenta na distinção de grupos filogeneticamente relacionados, principalmente na divergência intra-espécies.

A diferenciação desses dois subgrupos pode também ser observada através da presença de substituição de nucleotídeos. Nas sequências de todos os *loci*, foram buscadas regiões conservadas que pudessem indicar a substituição de nucleotídeo e consequente

alteração na codificação de aminoácidos. Nas sequências de rDNA 16S foi verificada uma única região de 15 nucleotídeos conservada entre as cepas de um mesmo subgrupo. No gene *rpoB*, 18 regiões de substituição de nucleotídeo conservadas também características de cada subgrupo foram encontradas. Com relação ao gene *est*, 32 regiões foram detectadas, sendo que em uma delas, uma sequência de três nucleotídeos foi modificada (AGG→GAA; arginina→glutamato). Esses dados não podem ser considerados assinaturas genômicas uma vez que o conceito destas está condicionado à invariabilidade de composição de nucleotídeos intragenômicos relativos, tipicamente representada pelos arranjos de frequências de nucleotídeos, normalizados pelo conteúdo G+C (SANDBERG *et al.*, 2003).

Com base nesses dados, técnicas de detecção de polimorfismo, como RFLP, podem ser desenvolvidas para identificação desses subgrupos devido à baixa variabilidade dentro de cada grupo.

Apesar da homologia de DNA desses subgrupos (64-72%) determinadas por hibridização DNA-DNA (JOHNSON, 1978) serem limítrofes para delimitação de espécies (PALYS, NAKAMURA & COHAN, 1997), os valores descritos de similaridade de sequências de rDNA 16S (98,4-98,9%) estão dentro dos limites (97%) de definição de uma única espécie (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). Apesar da ausência de qualquer diferença metabólica entre cepas de *B. fragilis* nas subdivisões I e II, a notável divergência entre essas duas divisões, assim como o nível de homogeneidade dentro de cada divisão, fortemente reforça a ideia da existência de dois grupos geneticamente distintos.

A abordagem utilizada nesse estudo, baseada na análise de regiões codificadoras de proteínas para acessar a diversidade e relacionamentos de espécies bacterianas é similar em conceito aos dados genotípicos obtidos pelo MLST que tem sido desenvolvido na determinação da diversidade gênica entre espécies bacterianas. No entanto, apesar do MLST ser utilizado principalmente no monitoramento da epidemiologia e estrutura de populações dentro de espécies patogênicas, ainda não foi descrito para *B. fragilis*. Levando em consideração o potencial patogênico desse micro-organismo, os conjuntos de iniciadores desenhados no presente estudo podem servir como um ponto inicial no desenvolvimento de esquemas de MLST em uma variedade de espécies bacterianas, incluindo as que não têm sido

previamente bem caracterizadas em nível molecular e permitirá uma análise comparativa futura de processos evolucionários e moleculares ao longo de diversos táxons.

Bacteroides spp. é o gênero predominante encontrado nas superfícies epiteliais retais e colônicas *in vivo* e provavelmente são os principais micro-organismos degradadores de polissacarídeo devido a sua capacidade de crescer em uma variedade de polissacarídeos e sintetizar uma série de despolimerases e glicosidades associadas a superfície celular (MACFARLANE, WOODMANSEY & MACFARLANE, 2005). Estudos *in vitro* com *B. fragilis* sugerem que através da regulação do metabolismo, o acúmulo de açúcares durante despolimerização de cadeias oligossacarídicas de mucina podem ter importantes consequências no que diz respeito à fisiologia e ecologia de outras espécies que estejam presentes no ambiente de degradação de muco (MACFARLANE, WOODMANSEY & MACFARLANE, 2005). A variação de fase de polissacarídeos de superfície desse micro-organismo é uma característica conservada da espécie (COYNE *et al.*, 2003). Em um estudo realizado por Weinacht e colaboradores (2004), foi verificado que as bactérias que expressam moléculas de superfície capazes de autoagregar são mais aptas a aderir à mucosa intestinal, provendo uma população capaz de se manter no ambiente de forma contínua. É possível que as substâncias auto-agregativas contribuam para a manutenção de comunidades bacterianas ou biofilmes dentro de um ecossistema intestinal (WEINACHT *et al.*, 2004).

Com isso, no presente estudo, foi verificada em que a existência dessa subdivisão poderia influenciar na expressão desse fator de virulência de *B. fragilis*. Inicialmente, foi realizado um ensaio de aderência desse micro-organismo a uma superfície inerte. Nesse ensaio da produção de biofilme, não foi verificada nenhuma alteração no padrão de adesão entre as cepas de ambos os subgrupos, indicando que a subdivisão não interfere na quantidade de biofilme produzido.

Uma outra importante característica de *B. fragilis* consiste no fato desse micro-organismo constituir a espécie bacteriana anaeróbia mais frequentemente isolada de infecções humanas, principalmente em caso de sepse intra-abdominal. A formação de abscessos intra-abdominais é um exemplo da resposta imunológica do hospedeiro, que age como uma barreira de contenção dos organismos infectantes dentro da cavidade peritoneal. Embora a resposta tecidual seja inicialmente benéfica ao hospedeiro, abscessos não tratados causam significativa

morbidade e podem ser fatais. O complexo polissacarídeo capsular (CPC) é um determinante de virulência primário que induz a formação desses abscessos (ONDERDONK, 2004). No presente estudo, foi empregado o modelo de indução de abscessos em camundongos proposto por Sund e colaboradores (2008) para avaliação da expressão desse virulência por cepas representantes de cada subgrupo na cavidade peritoneal.

Foi observada uma maior indução na formação de abscessos pela cepa pertencente à subdivisão I (*cfiA* negativa; *cepA* positiva), com a detecção de abscessos no fígado, estômago e membrana da cavidade peritoneal. Apesar da inviabilidade de realizar a contagem UFC/mL, devido ao número de colônias ser inferior a 30, as colônias resultantes eram características de *B. fragilis*. Por outro lado, a cepa pertencente à subdivisão II (*cfiA* positiva; *cepA* negativa) induziu a formação de apenas um abscesso em somente um camundongo, e nenhuma colônia foi observada após cultivo.

Esses resultados sugerem que a presença dessa divisão na espécie de *B. fragilis* talvez possa interferir na formação de abscessos por esse micro-organismo. No entanto, investigações mais aprofundadas acerca desse fator de virulência e todos os outros expressos por esse micro-organismo ainda se tornam necessárias.

CONCLUSÕES

- 1) No presente estudo foi possível observar um elevado índice de cepas de *B. fragilis* não-toxigênicas padrão III e esses níveis foram mantidos ao longo dos anos. Foi detectado neste estudo um baixo índice (0,9%) de cepas toxigênicas no Brasil. Este resultado confirma dados anteriores, mas é de fundamental importância o contínuo monitoramento da evolução desses perfis de enterovirulência e distribuição dos padrões ETBF e NTBF III. A elevada taxa de detecção de 11,1% de ETBF em uma amostragem de um único centro hospitalar da França, alerta para o alto índice de ETBF circulante nesse país. Esse fato demonstra a necessidade de maiores investigações direcionadas para a detecção desse perfil enterovirulento. O presente estudo é o segundo relato da frequente presença de cepas ETBF, apesar de ambos trabalhos empregarem um pequeno número de cepas. Semelhante ao Brasil, a taxa de isolamento de cepas NTBF III na França também é elevada (38,8%).
- 2) O emprego da técnica de MLSA em um conjunto de 17 cepas através da análise dos genes *rrs* (rRNA16S), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *est* (esterase), *gdh* (glutamato desidrogenase) e *pgm* (fosfoglucomutase) demonstrou que os genes *rrs*, *rpoB* e *est* são excelentes ferramentas na distinção dos subgrupos I (*cfiA* negativas) e II (*cfiA* positivas). A análise do gene *est* emerge como uma nova ferramenta de análise filogenética capaz de distinguir cepas de uma mesma espécie com maior eficiência que as sequências do gene *rrs* e *rpoB*.
- 3) A produção de biofilme por cepas de ambos os grupos é indistinguível, indicando que a capacidade de *B. fragilis* aderir a superfícies inertes não é afetada pela presença dessa subdivisão.
- 4) Os ensaios em modelo animal demonstraram diferenças na indução de formação de abscessos entre as cepas representantes de cada subgrupo. A cepa da subdivisão I (*cfiA* negativa; *cepA* positiva) apresentou um maior potencial de indução da formação de abscessos do que a cepa pertencente a subdivisão II (*cfiA* positiva; *cepA* positiva). Esses dados sugerem diferenças no potencial de virulência de *B. fragilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, G.L.; ILES, K.D. & ABRATT, A.R. **The *Bacteroides fragilis* NAD-specific glutamate dehydrogenase enzyme is cell surface-associated and regulated by peptides at the protein level.** *Anaerobe.* 7: 135-142, 2001
- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. & RAOULT, D. **The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists.** *Trends Microbiol.* 17:37-45, 2008
- ALAVI, S.M.; POUSSIER, S. & MANCEAU, C. **Characterization of ISXax1, a novel insertion sequence restricted to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (variants fuscans and non-fuscans) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5):1678-1682, 2007
- 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.* 40: 4349-4352, 2002
- ANDERSSON, J.O. & ROGER, A.J. **Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes.** *BMC Evol. Biol.* 3:14, 2003
- ANTUNES, E.N.F.; FERREIRA, E.O.; FALCÃO, L.S.; PAULA, G.R.; AVELAR, K.E.S.; BARROSO, D.E.; LEITE, J.P.G.; FERREIRA MCS & DOMINGUES RMCP. **Non-toxicogenic pattern II and III *Bacteroides fragilis* strains: coexistence in the same host.** *Res. Microbiol.* 155:522-524, 2004
- ANTUNES, E.N.F.; FERREIRA, E.O.; VALLIM, D.C.; PAULA, G.R.; SELDIN, L.; SABRÁ, A., FERREIRA, M.C.S. & DOMINGUES, R.M.C.P. **Pattern III non-toxicogenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) strains in Brazil.** *Anaerobe* 8:17-22, 2002
- AVILA-CAMPOS, M.J.; LIU, C.; SONG, Y.; ROWLINSON, M.-C. & FINEGOLD, S.M. **Determination of *bft* gene subtypes in *Bacteroides fragilis* clinical isolates.** *J. Clin. Microbiol.* 45:1336-1338, 2007
- AYALA, J. QUESADA, A., VADILLO, S. CRIADO, J & PRIZ, S. **Penicillin-binding proteins of *Bacteroides fragilis* and their role in the resistance to imipenem of clinical isolates.** *J. Med. Microbiol.* 54:1055-1064, 2005
- BACIC, M.K. & SMITH, C.J. **Laboratory maintenance and cultivation of *bacteroides* species.** *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 13:Unit 13C.1, 2008
- BAPTESTE, E. & BOUCHER, Y. **Lateral gene transfer challenges rincipis of microbial systematics.** *Cell.* 16: 200-207, 2008
- BASSET, C. HOLTON, J. BAZEOS, D. VAIRA, D. & BLOOM, S. **Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease: Dig. Dis. Sci.** 49:1425-1432, 2004
- BEACHEY, E.H. **Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface.** *J. Infect. Dis.* 143, 325-345, 1981.
- BEENA, V.K. & SHIVANANDA, P.G. **In vitro adhesiveness of *Bacteroides fragilis* group in relation to encapsulation.** *Indian J Med Res.* 105:258-261, 1997

- BELL, A.; LAYTON, A.C.; MCKAY, L.; WILLIAMS, D.; GENTRY, R. & SAYLER, G.S. **Factors influencing the persistence of fecal *Bacteroides* in stream water.** J. Environ. Qual. 38:1224-1232, 2009
- BENACHENHOU-LAHFA, N.; LABEDAN, B. & FORTERRE, P. **PCR-mediated cloning and sequencing of the gene encoding glutamate dehydrogenase from the archaeon *Sulfolobus shibatae*: identification of putative amino-acid signatures for extremophilic adaptation.** Gene 140:17-24, 1994
- BHATTACHARYA, D. **Analysis of the distribution of bootstrap tree lengths using the maximum parsimony method.** Mol. Phylogenet. Evol. 6:339-350, 1996
- BISHOP, C.J.; AANENSEN, D.M.; JORDAN, G.E.; KILIAN, M.; HANAGE, W.P. & SPRATT, B.G. **Assigning strains to bacterial species via the internet.** BMC Biol. 26:7-3, 2009
- BOENTE, R.F. **Perfil de susceptibilidade e detecção de determinantes de resistência nos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*.** Dissertação de mestrado em Ciências (Microbiologia). Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008
- BOGAERTS, P.; ENGELHARDT, A.; BERHIN, C.; BYLUND, L.; HO, P.; YUSOF, A. & GLUPCZYNSKI, Y. **Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the *cfiA* metallo-beta-lactamase gene in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*.** Clin. Microbiol. Infect. 14:973-977, 2008
- BOOTH, S.J.; VAN TASSELL, R.L.; JOHNSON, J.L. & WILKINS, T.D. **Bacteriophages of *Bacteroides*.** Rev of Infect. Dis. 1: 325-336, 1979
- BRESSANE, M.A.; DURIGON, L.E. & AVILA-CAMPOS, M.J. **Prevalence of the *Bacteroides fragilis* group and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in immunodeficient children.** Pathogenesis 7:277-281, 2001
- BRONDZ, I.; CARLSSON, M.; SJÖSTRÖM & SUNDQVIST, G. **Significance of cellular fatty acids and sugars in defining the genus *Porphyromonas*.** Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 314-318, 1989
- BRONDZ, I.; OLSEN, I.; HAAPASALO, M. & WINKELHOFF, A.J.V. **Multivariate analyses of fatty acid data from whole-cell methanolysates of *Prevotella*, *Bacteroides*, and *Porphyromonas* spp.** J. Gen. Microbiol. 137: 1445-1452, 1991
- BROOK, I. In: **Pediatric anaerobic infection: diagnosis and management**, 3rd ed., BROOK, I. (ed.), Marcel-Dekker, New York, USA, pp 611, 2002
- BROOK, I. **Anaerobic pulmonary infections in children.** Pediatr. Emerg. Care. 20 (9): 636-640, 2004
- BROOK, I. **Infected neonatal cephalohematomas caused by anaerobic bacteria.** J. Perinat. Med. 33(3):255-258, 2005
- BROOK, I. **Microbiology and management of joint and bone infections due to anaerobic bacteria.** J. Orthop. Sci.13(2):160-169, 2008a
- BROOK, I. **The role os anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy.** Anaerobe,14(6):297-300, 2008b
- BRUEN, T.C. & BRYANT, D. **Parsimony via consensus.** Syst. Biol. 57 (2): 251-256, 2008

- BUCKWOLD, S.L.; SHOEMAKER, N.B.; SEARS, C.L. & FRANCO, A. **Identification and characterization of conjugative transposons CTn86 and CTn9343 in *Bacteroides fragilis* strains.** Appl. Environ. Microbiol. 73:53-63, 2007
- CASH, P. **Proteomics in the study of the molecular taxonomy and epidemiology of bacterial pathogens.** Electrophoresis. Suppl 1:S133-141, 2009
- CASSEL, S.L.; SUTTERWALA, F.S. & FLAVELL, R.A. **The tiny conductor: immune regulation via commensal organisms.** Cell Host Microbe 3: 340-341, 2008
- CARDENO-TARRAGA, A.M.; PATRICK, S.; CROSSMAN, L.C; BLAKELY, G.; ABRATT, V.; LENNARD, N.; POXTON, I.; DUERDEN, B.; HARRIS, B.; QUAIL, M.A.; BARRON, A.; CLARK, L.; CORTON, C.; DOGGETT, J.; HOLDEN, M.T.; LARKE, N.; LINE, A.; LORD, A.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; WOODWARD, J.; BARRELL & PARKHILL, J. **Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression.** Science 307:1463–1465, 2005
- CHO, B.K. & PALSSON, B.Ø. **Probing the basis for genotype-phenotype relationships.** Nat. Methods. 6:565-566, 2009
- CHUNG, G.T.; FRANCO, A.A.; WU, S.; RHIE, G.E.; CHENG, R.; OH, H.B. & SEARS, C.L. **Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*.** Infect Immun. 67:4945-4949, 1999
- CLAROS, M.C.; CLAROS, Z.C.; HECHT, D.W.; CITRON, D.M.; GOLDSTEIN, E.J.; SILVA, J; TANG-FELDMAN, Y. & RODLOFF, A.C. **Characterization of the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island in human blood culture isolates.** Anaerobe 12:17-22, 2006
- COHEN, S.H.; SHETAB, R.; TANG-FELDMAN, Y.J.; SARMA, J.; SILVA, J. & PRINDIVILLE, T.P. **Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in hospital-acquired diarrhea.** Diagn. Infect. Dis. 55:251-254, 2006
- COMSTOCK, L.E. & KASPER, D.L. **Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses.** Cell 126: 847-850, 2006
- COMSTOCK, L.E., PANTOSTI, A. & KASPER, D.L. **Genetic diversity of the capsular polysaccharide C biosynthesis region of *Bacteroides fragilis*.** Infect. Immun. 68: 6182-6188, 2000.
- COOPER, J.E. & FEIL, E.J. 2004. **Multilocus sequence typing – what is resolved?** Trends Microbiol. 8: 373-377
- COYNE, M.J. & COMSTOCK, L.E. **Niche-specific features of the intestinal bacteroidales.** J. Bacteriol. 190:736-742, 2008
- COYNE, M.J.; CHATZIDAKI-LIVANIS, M.; PAOLETTI, L.C.; COMSTOCK, L.E. **Role of glycan synthesis in colonization of the mammalian gut by the bacterial symbiont *Bacteroides fragilis*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:13099-13104, 2008
- COYNE, M.J.; KALKA-MOLL, W.; TZIANABOS, A.O.; KASPER, D.L. & COMSTOCK, L.E. ***Bacteroides fragilis* NCTC9343 produces at least three distinct capsular polysaccharides: cloning, characterization, and reassignment of polysaccharide B and C biosynthesis loci.** Infect. Immun. 68: 6176-6181, 2000

- COYNE, M.J.; WEINACHT, K.G.; KRINOS, C.M. & COMSTOCK, L.E. **Mpi recombinase globally modulates the surface architecture of a human commensal bacterium.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10446–10451, 2003
- DELAHOOKE, D.M.; BARCLAY, G.R. & POXTON, I.R. **A re-appraisal of the biological activity of bacteroides LPS.** J Med Microbiol. 42:102-112, 1995
- DIBASE, J.K.; ZHANG, H.; CROWELL, M.D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G.A. & RITTMANN, B.E. **Gut microbiot and its possible relationship with obesity.** Mayo Clin. Proc. 83:460-469, 2008
- DUNCAN, S.H.; LOUIS, P.; THOMSON, J.M. & FLINT, H.J. **The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota.** Environ. Microbiol. 11:2112-2122, 2009
- DURMAZ, B.; DALGALAR, M. & DURMAZ, R. **Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with diarrhea: a controlled study.** Anaerobe 11:318-321, 2005
- EFRON, B.; HALLORAN, E. & HOLMES, S. **Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees.** Proc Natl Acad. Sci. USA 93:13429-13434, 1996
- ENRIGHT, M.C. & SPRATT, B.G. 1999. **Multilocus sequence typing.** Trends Microbiol. 7: 482-487
- EREMEEVA, M.E. & DASCH, G.A. **Closing the gaps between genotype and phenotype in *Rickettsia rickettsii*.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 1166:12-26, 2009
- ERIBE, E.R. & OLSEN, I. **Strain differentiation in *Bacteroides fragilis* by RAPD and Dendron Computer-Assisted Gel Analysis.** APMIS. 108: 676-684, 2000
- FELSENSTEIN, J. **Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.** J. Mol. Evol. 17:368-376, 1981
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** Evolution 39:783–791, 1985
- FERREIRA, L.Q.; AVELAR, K.E.; VIEIRA, J.M.; DE PAULA, G.R.; COLOMBO, A.P.; DOMINGUES, R.M. & FERREIRA, M.C. **Association between the *cfxA* gene and transposon Tn4555 in *Bacteroides distasonis* strains and other *Bacteroides* species.** Curr. Microbiol. 54:348-353, 2007
- FERREIRA, E.O.; CARVALHO, J.B.; PEIXOTO, R.J.M.; LOBO, L.A.; ZINGALLI, R.B.; SMITH, J.C.; ROCHA, E.R. & DOMINGUES, R.M.C.P. **The interaction of *Bacteroides fragilis* with the components of the human fibrinolytic system.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. 56: 48-55, 2009
- FERREIRA, M.C.S., DOMINGUES, R.M.C.P & UZEDA, M. In: **Manual de Bacteriologia de Anaeróbios.** Rio de Janeiro, Brasil, 2003
- FLETCHER, C.M.; COYNE, M.J.; VILLA, O.F.; CHATZIDAKI-LIVANIS, M. & COMSTOCK, L.E. **A general O-glycosylation system important to the physiology of a major human intestinal symbiont.** Cell 137:321-331, 2009
- FRANCO, A.A. **The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island is contained in a putative novel conjugative transposon.** J. Bacteriol. 186: 6077-6092, 2004

- FRANCO, A.A.; CHENG, R.K.; CHUNG, G.T.; WU, S.; OH, H.B. & SEARS, C.L. **Molecular evolution of the pathogenicity island of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains.** J. Bacteriol. 181: 6623-6633, 1999
- FRANCO, A.A.; Mundy LM, Trucksis M, Wu S, Kaper JB, Sears CL. **Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene.** Infect. Immun. 65: 1007-1013, 1997
- GARCÍA, N.; GUTIÉRREZ, G.; LORENZO, M.; GARCIA, J.E.; PIRIZ, S. & QUESADA, A. **Genetic determinants for *cfxA* expression in *Bacteroides* strains isolated from human infections.** J. Antimicrob. Chemother. 62: 942-947, 2008
- GARCÍA, N.; GUTIÉRREZ, G.; LORENZO, M.; VADILLO, S.; PÍRIZ, S. & QUESADA, A. **Gene context and DNA rearrangements in the carbapenemase locus of division II strains of *Bacteroides fragilis*.** Antimicrob. Agents Chemother. 53:2677-2688, 2009
- GIBSON III, F.C.; ONDERDONK, A.B.; KASPER, D.L. & TZIANABOS, A.O. **Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*.** Infect. Immun. 160: 5000-5006, 1998
- GIRAUD-MORIN, C.; MADINIER, I. & FOSSE, T. **Sequence analysis of *cfxA2*-like β -lactamases in *Prevotella* species.** J. Antimicrob. Chemother. 51: 1293-1296, 2003
- GOLDSTEIN, E.J. & CITRON, D.M. **Activity of a novel carbapenem, doripenem, against anaerobic pathogens.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 63:447-54, 2009
- GUTACKER, M.; VALSANGIACOMO, C. & PIFFARETTI, C.J. **Identification of two genetic groups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis: distribution of antibiotic resistance (*cfiA*, *cepA*) and enterotoxin (*bft*) encoding genes.** Microbiol. 146: 1241-1254, 2000
- HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98, 1999
- HANDAL T.; GIRAUD-MORIN, C. & CAUGANT, D.A. **Chromosome- and plasmid-encoded β -lactamases in *Capnocytophaga* spp.** Antimicrob. Agents Chemother. 49:3940-3943, 2005
- HAO, W.-L. & LEE, Y-K. **Microflora of the gastrointestinal tract.** Methods Mol. Biol. 268: 491-502, 2004
- HASPER, D.; SCHEFOLD, J.C. & BAUMGART, D.C. 2009. **Management of severe abdominal infections.** Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 4:57-65, 2009
- HECHT, D. W. **Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments.** Clin. Infect. Dis. 39:92-97, 2004
- HEDBERG, M & NORD, C.E. **Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe.** Clin. Microbiol. Infect. 9:475-488, 2003
- HOFSTAD, T. **Virulence factors in anaerobic bacteria.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 1044-1048, 1992
- HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P. & MOORE, W.E.C. **VPI Anaerobic Laboratory Manual.** 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, V. A., 1977

- HOLDEMAN, L.V.; KELLY, R.W. & MOORE, W.E.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984
- HOLTON, J. **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis***. *Curr. Infect. Dis. Reports* 10:99–104, 2008
- HUNT, M.L.; COX, A.J.; RU, C.G. RAJAKUMAR, K. & ADLER, B. **Characterisation of a *Pasteurella multocida* esterase gene which confers a hemolytic phenotype in *Escherichia coli* under anaerobic conditions**. *FEMS Microbiol. Lett.* 192:249-256, 2000
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W. & REETZ, M.T. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases**. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-51, 1999
- JOHNSON, J.L. **Taxonomy of the *Bacteroides*. I. Deoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species**. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28:245-256, 1978
- JOHNSON, J.L. & HARICH, G. **Ribosomal ribonucleic acid homology among species**. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:71-79, 1986
- JOUSIMIES-SOMER, H. & SUMMANEN, P. **Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic Gram-negative bacteria (excluding spirochetes)**. *Clin. Infect. Dis.* 35:S17-21, 2002
- JOUSIMIES-SOMER, H. R., SUMMANEN, P., CITRON, D. M., BARON, E. J., WEXLER, H. M. & FINEGOLD, S. M. In: Wadsworth – KTL. **Anaerobic Bacteriology Manual**. Ed. Star Publishing company. 6thed. Belmont, California. 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: 2339-2344, 2001
- KASPER, D.L.; ONDERDONK, A.B.; CRABB, J. & BARTLETT, J.G. **Protective efficacy of immunization with capsular antigen against experimental infection with *Bacteroides fragilis***. *J. Infect. Dis.* 140:724-731, 1979
- KATO, N.; KARUNIAWATI, A.; JOTWANI, R.; KATO, H.; WATANABE, K. & UENO, K. **Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from extraintestinal sites by cell culture assay**. *Clin. Infect. Dis.* 20:S141, 1995
- KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K. & UENO, K. **Association of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteriemia**. *Clin. Infect. Dis.* 23: S83-86, 1996
- KATO, N.; LIU, C.; KATO, H.; WATANABE, K.; NAKAMURA, H.; IWAI, N.; SUZUKI, K. & UENO, K. **Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children with diarrhea in Japan**. *J. Clin. Microbiol.* 37:801-803, 1999
- KEELING, P.J. & DOOLITTLE, W.F. **Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5761-5764, 1995
- KIM, Y.M.; KIM, M.; KIM, S.K.; PARK, K.; JIN, S.H.; LEE, U.S.; KIM, Y.; CHAE, G.T. & LEE, S.B. **Mycobacterial infections in coal workers' pneumoconiosis patients in South Korea**. *Scand. J. Infect. Dis.* 29:1-77, 2009

- KLEIVDAL, H & HOFSTAD, T. **Chromosomal restriction endonuclease analysis and ribotyping of *Bacteroides fragilis***. APMIS 103:180-184, 1995
- KLING, J.J.; WRIGHT, R.L.; MONCRIEF, J.S. & WILKINS, T.D. **Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis***. FEMS Microbiol. Lett. 146:279-284, 1997
- KO, K.S.; KUWAHARA, T.; HAEHWA, L.; YOON, Y.J.; KIM, B.J.; LEE, K.H.; OHNISHI, Y. & KOOK, Y.H. **RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequence analysis for the identification of *Bacteroides* spp.** Clin. Microbiol. Infect. 13:48-54, 2007
- KO, K.S.; KUWAHARA, T.; LEE, K. & KOOK, Y.H. **Population structure and distribution of virulence-related genes of *Bacteroides fragilis* isolates from Korea and Japan**. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64:340-343, 2009
- 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 1927 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, A.O.; KASPER, D.L.; COMSTOCK, L.E. **Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions**. Nature 414:555-558, 2001
- KRZYZANOWSKY, F. & AVILA-CAMPOS, M.J. **Detection of non-enterotoxigenic and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples from children in São Paulo, Brazil**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 45:225-227, 2003
- KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. **MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment**. Brief Bioinform. 5:150-163, 2004a
- KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:11030-11035, 2004b
- KUWAHARA, T.; YAMASHITA, A.; HIRAKAWA, H.; NAKAYAMA, H.; TOH, H.; OKADA, N.; KUHARA, S.; HATTORI, M.; HAYASHI, T. & OHNISHI, Y. **Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14919-14924, 2004
- LA SCOLA, B.; BUI, L.T.; BARANTON, G.; KHAMIS, A. & RAOULT, D. **Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species**. FEMS Microbiol. Lett. 263:142-147, 2006
- LAMBE, D.W. **Determination of *Bacteroides melaninogenicus* serogroups by fluorescent antibody staining**. Appl. Microbiol. 28:561-567, 1974
- LANCELLOTTI, M.; PACE, F.; STEHLING, E.G.; VILLARES, M.C.; BROCCHI, M. & SILVEIRA, W.D. **Ribotyping, biotyping and capsular typing of *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients in Campinas, southeast Brazil**. Braz. J. Infect. Dis. 12:430-437, 2008
- LÄHTEENMÄKI, K.; EDELMAN, S. & KORHONEN, T.K. **Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion**. Trends Microbiol. 13:79-85, 2005

- LIBMAN, M.D.; KRAMER, M.; PLATT, R.; MONTREAL PREMATURETY STUDY GROUP. **Comparison of Gram and Kopeloff stains in the diagnosis of bacterial vaginosis in pregnancy.** *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 54:197-201, 2006
- LIU, C.H.; LEE, S.M.; VANLARE, J.M.; KASPER, D.L. & MAZMANIAN, S.K. **Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization.** *Procl. Nat. Acad. Sci. USA* 105:3951-3956, 2008
- LUCZAK, M.; OBUCH-WOSZCZATYŃSKI, P.; PITUCH, H.; LESZCZYŃSKI, P.; MARTIROSIAN, G.; PATRICK, S.; POXTON, I.; WINTERMANS, R.G.; DUBREUIL, L. & MEISEL-MIKOŁAJCZYK, F. **Search for enterotoxin gene in *Bacteroides fragilis* strains isolated from clinical specimens in Poland, Great Britain, The Netherlands and France.** *Med. Sci. Monit.* 7:222-225, 2001
- MACFARLANE, S.; WOODMANSEY, E.J. & MACFARLANE, G.T. **Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system.** *Appl. Environm. Microbiol.* 71:7483-7492, 2005
- MARGOS, G.; VOLLMER, S.A.; CORNET, M.; GARNIER, M.; FINGERLE, V.; WILSKE, B.; BORMANE, A.; VITORINO, L.; COLLARES-PEREIRA, M.; DRANCOURT, M.; KURTENBACH, K. **A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes.** *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5410-5416, 2009
- MAYBERRY, W.R.; LAMBE, D.W. & FERGUSON, K.P. **Identification of *Bacteroides* species by cellular fatty acid profiles.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:21-27, 1982
- MAZMANIAN, S.K. **Capsular polysaccharides of symbiotic bacteria modulate immune responses during experimental colitis.** *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 46: Suppl 1:E11-12, 2008
- MAZMANIAN, S.K.; ROUND, J.L. & KASPER, D.L. **A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease.** *Nature* 453:620-625, 2008
- MIÑAMBRES, B.; OLIVERA, E.R.; JENSEN, R.A. & LUENGO, J.M. **A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*.** *J. Biol. Chem.* 15:275:39529-39542, 2000
- MENNA, P.; BARCELLOS, F.G. & HUNGRIA, M. **Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of 16S rRNA genes, ITS regions and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009
- MOLLET, C.; DRANCOURT, M. & RAOULT, D. ***rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification.** *Mol. Microbiol.* 26:1005-1011, 1997
- 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
- MONCRIEF, J.S.; OBISO, R.; BARROSO, L.A.; KLING, J.J.; WRIGHT, R.L.; VAN TASSELL, R.L.; LYERLY, D.M. & WILKINS, T.D. **The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease.** *Infect. Immun.* 63:175-181, 1995
- MORAES, S.R.; GONÇALVES, R.B.; MOUTON, C.; SELDIN, L.; FERREIRA, M.C. & DOMINGUES, R.M. ***Bacteroides fragilis* isolates compared by AP-PCR.** *Res. Microbiol.* 150: 257-63, 1999

- MORSE, R.; O'HANLON, K. & COLLINS, M.D. **Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase of gram-positive and gram-negative bacteria.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1477-1484, 2002
- MOUNT, D.W. Phylogenetic Prediction, Chapter 7, In: **Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis**, 2nd edition, David W. Mount. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2004.
- MURPHY, T.F. & KIRKHAM, C. **Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili.** *BMC Microbiol.* 2:7, 2002
- MYERS, L.L. & SHOOP, P. **Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea.** *J. Clin. Microbiol.* 25: 2330-2333, 1987
- NAGY, E.; MANNCKE, B. & WERNER, H. **Fibronectin and vitronectin binding of *Bacteroides fragilis* and eight other species of the genus.** *Zentralbl. Bakteriologie.* 281, 235-239, 1994
- NAKANO, V. GOMES T.A. VIEIRA M.A. FERREIRA R.C. & AVILA-CAMPOS, M.J. **bft gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea.** *Anaerobe* 13:1-5, 2007
- NASER, S.M.; THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; GEVERS, D. DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M. & SWINGS, J. **Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes.** *Microbiology* 151: 2141–2150, 2005
- NGUYEN, M.H.; YU, V.L.; MORRIS, A.J.; MCDERMOTT, L.; WAGENER, M.W.; HARREL, L. & SNYDMAN, D.R. **Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam.** *J. Clin. Microbiol.* 43:755-760, 2005
- OBATA-YASUOKA, M.; BA-THEIN, W. & HAMADA, H & HAYASHI, H. **A multiplex polymerase chain reaction-based diagnostic method for bacterial vaginosis.** *Obstet. Gynecol.* 100:759-764, 2002
- OLIVE, M.D. & BEAN, P. **Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.** *J. Clin. Microbiol.* 37:1661-1669, 1999
- OLSEN I. & SHAH N.H. **International Committee on Systematics of Prokaryotes – Subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1051-1055, 2008
- ONDERDONK A.B. **Animal models simulating anaerobic infections.** *Anaerobe* 11:189-195, 2004
- ONDERDONK, A.B.; CISNEROS, R.L.; CRABB, J.H.; FINBERG, R.W. & KASPER, D.L. **Intraperitoneal host cellular responses and in vivo killing of *Bacteroides fragilis* in a bacterial containment chamber.** *Infect. Immun.* 57: 3030-3037, 1989
- 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 encapsulated and unencapsulated strains.** *J. Infect. Dis.* 136:82-89, 1977
- PALYS, T.; NAKAMURA, L.K. & COHAN, F.M. **Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1145-1156, 1997
- PANTOSTI, A.; TZIANABOS, A.O.; ONDERDONK, A.B. & KASPER, D.L. **Immunochemical characterization of two surface polysaccharides of *Bacteroides fragilis*.** *Infect. Immun.* 59: 2057-2082, 1991

- PANTOSTI, A.; MENOZZI, M.G.; FRATE, A.; SANFILIPPO, L.; D'AMBROSIO, F. & MALPELI, M. **Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and its toxin in stool samples from adults and children in Italy.** Clin Infect Dis 24:12-16, 1997
- PANTOSTI, A.; PIERSIMONI, C. & PERISSI, A. **Detection of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the feces of a child with diarrhea.** J. Clin. Microbiol. 19:809-810, 1994
- PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; OLSEN, I. & FRASER, G.J. **Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria.** J. Bacteriol. 176:725-732, 1984
- PATHELA, P. HASAN, K.Z. ROY, E. ALAM, K. HUQ, F. SIDDIQUE, A.K. & SACK, R.B. **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-associated diarrhea in children 0-2 years of age in rural Bangladesh.** J. Infect. Dis. 191:1245-1252, 2005
- PATRICK, S. **The virulence of *Bacteroides fragilis*.** Rev. Med. Microbiol. 4:40-49, 1993
- PATRICK, S.; PATRICK, S.; MCKENNA, J.P.; O'HAGAN, S. & DERMOTT, E. **A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles.** Microbial Pathogenesis. 20:191-202, 1996
- PATRICK, S.; HOUSTON, S.; THACKER, Z. & BLAKELY, G.W. **Mutational analysis of genes implicated in LPS and capsular polysaccharide biosynthesis in the opportunistic pathogen *Bacteroides fragilis*.** Microbiology 155:1039-49, 2009
- PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MACGAVIN, M.J. & HÖÖK, M. **MSCRAMM – mediated adherence of microorganism to host tissues.** Annu. Rev. Microbiol. 48:585-617, 1994
- 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.** Int. J. Antimicrob. Agents. 24:53-58, 2004
- PÉREZ-LLARENA, F.J. & BOU, G. **Beta-lactamase inhibitors: the story so far.** Curr. Med. Chem., 2009
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A. & OWEN, R.J. **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** Lett. Appl. Microbiol. 8:151-156, 1989
- PODGLAJEN, I.; BREUIL, J.; CASIN, I. & COLLATZ, E. **Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of PCR-generated fragment patterns and insertion sequence content.** J. Bacteriol. 177:5270-5275, 1995
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A. & WEXLER, H.M. **The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach-or all three?** Anaerobe 12:211-220, 2006
- REOTT, M.A.; PARKER, A.C.; ROCHA, E.R. & SMITH, C. **Thioredoxins in redox maintenance and survival during oxidative stress of *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol. 191:3384-3391, 2009
- RHEE, K.-J.; WU, S.; WU, X.; HUSO, D.L.; KARIM, B.; FRANCO, A.A.; RABIZADEH, S.; GOLUB, J.E.; MATHEWS, L.E.; SHIN, J.; SARTOR, R.B.; GOLENBOCK, D.; HAMAD, A.R.; GAN, C.M.; HOUSSEAU, F. & SEARS, C.L. **Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice.** Infect. Immun. 77:1708-1718, 2009

- RIPP, S. **Bacteriophage-based pathogen detection.** Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2009
- ROSSELLÓ-MORA, R. **Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept?** Syst. Appl. Microbiol. 26:323-326, 2003
- ROSSELLÓ-MORA, R. **Updating prokaryotic taxonomy.** J. Bacteriol. 187:6255-6257, 2005
- ROSSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. **The species concept for prokaryotes.** FEMS Microbiol. Rev. 25:39-67, 2001
- RUIZ-PEREZ, B.; CHUNG, D.R.; SHARPE, A.H.; YAGITA, H.; KALKA-MOLL, W.M.; SAYEGH, M.H.; KASPER, D.L.; TZIANABOS, A.O. **Modulation of surgical fibrosis by microbial zwitterionic polysaccharides.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:16753-16758, 2005
- SACK, R.B.; ALBERT, M.J.; ALAM, K.; NEOGI, P.K. & AKBAR, M.S. **Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study.** J. Clin. Microbiol. 32:960-963, 1994
- SACK, R.B.; MYERS, L.L.; ALMEIDO-HILL, J.; SHOOP, D.S.; BRADBURY, W.C.; REID, R. & SANTOSHAM, M. **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologic studies of its role as a human diarrheal pathogen.** J. Diarrheal Dis. Res. 10:4-9, 1992
- SAITOU, N. & NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Mol. Biol. Evol. 4:406-425, 1987
- 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., GUPTA A., WANG Y. **Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes.** Trends Microbiol. 12:412-416, 2004
- SANDBERG, R.; BRÄNDEN, C.I.; ERNBERG, I. & CÖSTER, J. **Quantifying the species-specificity in genomic signatures, synonymous codon choice, amino acid usage and G+C content.** Gene 311:35-42, 2003
- SANJUÁN, E.; FOUZ, B. OLIVER, J.D. & AMARO, C. **Evaluation of genotypic and phenotypic methods to distinguish clinical from environmental *Vibrio vulnificus* strains.** Appl. Environ. Microbiol. 75:1604-1613, 2009
- SANTOS, S.R. & OCHMAN, H. **Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins.** Environ. Microbiol. 6:754-759, 2004
- SARMA, P.N.; TANG, Y.J.; PRINDIVILLE, T.P.; OSBORNE, P.D.; JANG, S.; SILVA, J.J. & COHEN, S.H. **Genotyping of *Bacteroides fragilis* isolates from stool specimens by arbitrarily-primed-PCR.** Diag. Microbiol. Infect. Dis. 37:225-229, 2000
- SCHAUER, R. **Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man.** Zoology (Jena) 107:49-64, 2004
- SCHLEGEL, L.; GRIMONT, F.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D. & BOUVET, A. **Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of**

Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:631–645, 2003

SCHEFFERS, D.J. & PINHO, M.G. **Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69:585-607, 2005

SCOTTO D'ABUSCO, A.; GROSSO, M.D.; CENSINI, S.; COVACCI, A. & PANTOSTI, A. **The alleles of the bft gene are distributed differently among Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from human sources and can be present in double copies.** J. Clin. Microbiol. 38:607-610, 2000

SEARS, C.L. **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiontes.** Clin. Microbiol. Rev. 22:349-69, 2009

SHAH, H.N. & COLLINS, M.D. **Proposal for reclassification of *Bacteroides assaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*.** Int. J. Syst. Bacteriol. 38:128-131, 1988

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

SHAH, H.N. & COLLINS, M.D. ***Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*.** Int. J. Syst. Bacteriol. 40:205-208, 1990

SHAPIRO, M.E.; KASPER, D.L.; ZALEZNIK, D.F.; SPRIGGS, S.; ONDERDONK, A.B. & FINBERG, R.W. **Cellular control of abscess formation: role of T cells in the regulation of abscesses formed in response to *Bacteroides fragilis*.** J. Immunol. 137:341-346, 1986

SHAPIRO, M.E.; ONDERDONK, A.B.; KASPER, D.L. & FINBERG, R.W. **Cellular immunity to *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide.** J. Exp. Med. 154:1188-1197, 1982

SIJBRANDI, R.; DEN BLAAUWEN, T.; TAME, J.R.; OUDEGA, B., LUIRINK, J.; OTTO, B.R. **Characterization of an iron-regulated alpha-enolase of *Bacteroides fragilis*.** Microbes 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. 43:2417-2422, 1999

SNYDMAN, D.R.; JACOBUS, N.V. & MCDERMOTT, L.A. **National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 and 2004.** Antimicrob. Agents Chemother. 51:1649-1655, 2007

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

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: 475-481, 2000

- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B.M. **Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.** Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849, 1994
- STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C. & WHITMAN, W.B. **Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1043-1047, 2002
- STUDIER, J.A. & KEPPLER, K.J. **A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei.** Mol. Biol. Evol. 5:729-731, 1988
- STULL TL, LIPUMA JJ, EDLIND TD. **A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA.** J. Infect. Dis. 157:280-286, 1988
- SUMATI A.H. & SARITHA N.K. **Bacterial vaginosis with special reference to anaerobes.** Indian J Pathol Microbiol. 52:56-58, 2009
- SUND, C.J.; ROCHA, E.R.; TZIANABOS, A.O.; WELLS, W.G.; GEE, J.M.; REOTT, M.A.; O'ROURKE, D.P. & SMITH, C.J. **The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of *OxyR* and its effect on survival and virulence.** Mol. Microbiol. 67:129-142, 2008
- SWOFFORD, D. **PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0.** Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill, 1990.
- TAKAHASHI, K.; INUZUKA, M. & INGI, T. **Cellular signaling mediated by calphoglin-induced activation of IPP and PGM.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 325:203-214, 2004
- TANGUY, A.; BOUTET, I.; BOUDRY, P.; DEGREMONT, L.; LAROCHE, J. & MORAGA, D. **Molecular identification and expression of the phosphoglucomutase (PGM) gene from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.** Gene 382:20-27, 2006
- TENOVER, F.C.; GAY, E.A.; FRYE, S.; EELLS, S.J.; HEALY, M. & MCGOWAN, J.E. **Comparison of typing results for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by the DiversiLab System and Pulsed-Field Gel Electrophoresis.** J. Clin. Microbiol. 2009
- TENOVER, F.C.; VAUGHN, R.R.; MCDUGAL, L.K.; FOSHEIM, G.E. & MCGOWAN, J.E. **Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** J. Clin. Microbiol. 45(7):2215-2219, 2007
- TERHES, G., BRAZIER, J. SOKI, J., URBAN, E. & NAGY, E. **Coincidence of *bft* and *cfiA* genes in a multi-resistant clinical isolate of *Bacteroides fragilis*.** J. Med. Microbiol. 56:1416-1418, 2007
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Res. 25:4876-4882, 1997
- TIBAYRENC, M. **Multilocus enzyme electrophoresis for parasites and other pathogens.** Methods Mol Biol. 551:13-25, 2009

TOPRAK, N.U.; YAGCI, A.; GULLUOGLU, B.M.; AKIN, M.L.; DEMIRKALEM, P.; CELENK, T. & SOYLETIR, G. **A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer.** Clin. Microbiol. Infect. 12:782-786, 2006

TURNER, K.M. & FEIL, E.J. **The secret life of the multilocus sequence type.** Int. J. Antimicrob. Agents. 29:129-135, 2007

TZIANABOS, A.O.; PANTOSTI, A.; BAUMANN, H.; BRISSON, J.R.; JENNINGS, H.J. & KASPER, D.L. **The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* comprises two ionically linked polysaccharides.** J. Biol. Chem. 267: 18230-18235, 1992

ULGER, T.N.; RAJENDRAM, D.; YAGCI, A.; GHARBIA, S.; SHAH, H.N.; GULLUOGLU, B.M.; AKIN, L.M.; DEMIRKALEM, P.; CELENK, T. & SOYLETIR, G. **The distribution of the *bft* alleles among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from stool specimens and extraintestinal sites.** Anaerobe 12:71-74, 2006

URSING, J.B.; LIOR, H. & OWEN, R.J. **Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteraceae*?** Int. J. Syst. Bacteriol. 44:842-845, 1994

URWIN, R. & MAIDEN, M.C. **Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology.** Trends Microbiol. 11:479-487, 2003

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

VAN DEN EYNDE, H.V.; DE BAERE, R.; SHAH, H.N.; GHARBIA, S.E.; FOX, G.E.; MICHALIK, J.; VAN DE PEER, Y. & DE WATCHER, R. **5S ribosomal ribonucleic acid sequence in *Bacteroides* and *Fusobacterium*: evolutionary relationships within these genera and among eubacteria in general.** Int. J. Syst. Bacteriol. 39:78-84, 1989

VAN STEENBERGEN, T.J.M.; VLAANDEREN, C.A. & GRAAF, J. **Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacteroides melaninogenicus* and related species.** J. Appl. Bacteriol. 53:269-276, 1982

VEDANTAM, G. **Antimicrobial resistance in *Bacteroides* spp.: occurrence and dissemination.** Future Microbiol. 4:413-423, 2009

VEILLON, M.H. & ZUBER, H. **Recherches sur quelques microbes strictment anaerobes et leur role en pathologie.** Arch. Exp. Med. Path. Anat. 10:517-545, 1898

VERGER, R. **Interfacial activation of lipases: facts and artifacts.** Trends Biotechnol. 15:32-38, 1997

VUJANOVIC, V.; VIDOVIC, S.; FERNANDEZ, M.R.; DAIDA, P. & KORBER, D. **Whole-cell protein and ITS rDNA profiles as diagnostic tools to discriminate *Fusarium avenaceum* intraspecific variability and associated virulence.** Can. J. Microbiol. 55:117-125, 2009

WALSH, C. **Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance.** Nature 406:775-781, 2000

WANG, Y. & ZHANG, Z. **Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes.** Microbiology 146:2845-2854, 2000

- WANG, Y.; WANG, G.R.; SHELBY, A.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **A newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnGERM1, contains genes also found in gram-positive bacteria.** Appl. Environ. Microbiol. 69:4595-4603, 2003
- WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P. & TRUPER, H.G. **Report of the *Ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics.** Int. J. Syst. Bacteriol. 37:463-464, 1987
- WEINACHT, K.G.; ROCHE, H.; KRINOS, C.M.; COYNE, M.J.; PARKHILL, J. & COMSTOCK, L.E. **Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affecting the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*.** Mol. Microbiol. 53:1319-1330, 2004
- WEXLER, H.M. ***Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty.** Clin. Microbiol. Rev. 20:593-621, 2007.
- WEXLER, H.M.; TENORIO, E. & PUMBWE, L. **Characteristics of *Bacteroides fragilis* lacking the major outer membrane protein, *OmpA*.** Microbiology, 2009
- WIENS, J.J. & SERVEDIO, M.R. **Phylogenetic analysis and intra-specific variation: performance of parsimony, likelihood, and distance methods.** Syst. Biol. 47:228-253, 1998
- WHITEHOUSE, D.B.; TOMKINS, J.; LOVEGROVE, J.U.; HOPKINSON, D.A. & MCMILLAN, W.O. **A phylogenetic approach to the identification of phosphoglucomutase genes.** Mol. Biol. Evol. 15:456-462, 1998
- WOESE CR. **Bacterial evolution.** Microbiol Rev 51: 221-271, 1987
- WOESE, C.R. **Interpreting the universal phylogenetic tree.** PNAS USA 97: 8392-8396, 2000
- XU, J.M.; BJURSELL, K.; HIMROD, J.; DENG, S.; CARMICHAEL, L.K.; CHIANG, H.C.; HOOPER, L.V. & GORDON, J.I. **A genomic view of the human *bacteroides thetaiotaomicron* symbioses.** Science 299:2074-2076, 2003
- ZEIGLER, D.R. **Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1893-1900, 2003
- ZHANG, G.; SVENUNGSSON, B.; KARNELL & WEINTRAUB, A. **Prevalence of enteroxigenic *Bacteroides fragilis* in adult patients with diarrhea and healthy controls.** Clin. Infect. Dis. 29:590-594, 1999
- ZOCCO, M.A.; AINORA, M.E.; GASBARRINI, G. & GASBARRINI, A. ***Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction.** Dig. Liver Dis. 39:707-712, 2007

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](#)