

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**“Aspectos da epidemiologia da colonização por
Bacteroides spp. e *Parabacteroides distasonis* em
pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo
de um hospital universitário do Rio de Janeiro”**

LAÍS DOS SANTOS FALCÃO

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Laís dos Santos Falcão

**“Aspectos da epidemiologia da colonização por
Bacteroides spp. e *Parabacteroides distasonis* em
pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo
de um hospital universitário do Rio de Janeiro”**



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
ABRIL DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Falcão, Laís dos Santos

“Aspectos da epidemiologia da colonização por *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis* em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de Janeiro” Laís dos Santos Falcão - Rio de Janeiro, 2010

xvi, 74

Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientador: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Referências bibliográficas: f 66

1. *Bacteroides* spp. 2. *Parabacteroides* 3. Epidemiologia 4. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos 5. Determinantes genéticos de resistência

I. Domingues, Regina Maria Cavalcanti Pilotto. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. “Aspectos da epidemiologia da colonização por *Bacteroides fragilis* grupo e *Parabacteroides* spp. em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de Janeiro”

Laís dos Santos Falcão

“Aspectos da epidemiologia da colonização por *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis* em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de Janeiro”

Rio de Janeiro, 30 abril de 2010

Aprovada por:

(Prof^a. Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, PhD, UFRJ)

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

(Prof^a. Vânia Lúcia Carreira Merquior, PhD, UERJ)

(Prof. Raphael Hirata Junior, PhD, UERJ)

(Prof. Beatriz Meurer Moreira, 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

Agradeço aos que me ensinaram....

Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida, por guiar-me, dar coragem, mostrar-me a microbiologia, permitindo que chegasse aqui, tendo a certeza de estar no caminho certo....

Aos meus pais, Eva e Falcão, a meus irmãos, Letícia e Leandro, e meu sobrinho, Matheus, por sempre acreditarem em mim, dando força e coragem nos momentos turbulentos, e os de alegria.

Ao meu marido Eduardo, pelo amor, carinho, incentivo, pelo apoio incondicional, nos momentos de alegria e de tristeza...

À Prof^a. Regina, que há 10 anos me mostrou o mundo fascinante das bactérias anaeróbias, obrigada por fazer parte do meu “crescimento” e à Prof^a. Candida, que sem dúvida também fez parte desse processo, muito obrigada.

À Prof^a. Prof Beatriz Meurer, coordenadora do projeto clonal, permitindo que este fosse o objeto do estudo desta tese de doutorado, além da revisão;

À Juliana Mattos que colaborou na análise epidemiológica, muito obrigada pela atenção.

A todos da família anaeróbios, os que passaram, os que continuam nesta caminhada, e aos mais novos membros: Joaquim, sempre disposto a ensinar, Renato, Lili, Lele e Karla que mesmo envolvidos com seus trabalhos sempre encontram tempo para dar idéias. A Renata, Heidi, Ilana, Livia e Rafael atuais doutorandos do laboratório; A Daniele, Mariana e Thais, que estão trilhando o caminho acadêmico; A Natasha, Felipe, Deborah, Rosane, Letícia e Semiramis, a todos pela amizade, carinho e momentos de distração.

Aos alunos que passaram pelo laboratório, e que sem dúvida colaboraram muito com este trabalho: Priscila Zonzini e Bruno Dias.

Aos professores e funcionários do IMPPG, por terem direta, ou indiretamente me apresentado o mundo microbiano,

A Helena, Antônio, Orlando, Dilma, Shirley, Safira, Valéria enfim a todos pela disposição em ajudar.

A todos que conheci nestes 10 anos, desde a graduação ao doutorado, que fazem parte da minha história....

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 Científico e Tecnológico (CNPq), a Capes, a Faperj, e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/Pronex) pelo suporte financeiro.

“Dai-me, Senhor, o dom de ensinar,
Dai-me esta graça que vem do amor.
Mas, antes do ensinar, Senhor,
Dai-me o dom de aprender.
Aprender a ensinar
Aprender o amor de ensinar.
Que o meu ensinar seja simples,
humano e alegre, como o amor.
De aprender sempre.”

Autor: Antonio Pedro Schlindwein

RESUMO

Laís dos Santos Falcão

“Aspectos da epidemiologia da colonização por *Bacteroides* spp e *Parabacteroides distasonis* em pacientes admitidos no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário do Rio de Janeiro”

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).

O gênero *Bacteroides* é predominante nas populações de microbiota anfiótica do cólon de humanos adultos. Embora seja um componente minoritário deste ambiente, *Bacteroides fragilis* é a espécie anaeróbia mais comumente associada a infecções, tais como infecções intra-abdominais e da corrente sanguínea. Duas espécies majoritárias deste ambiente, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Parabacteroides distasonis*, emergiram como patógenos potenciais e como reservatórios de genes de resistência. O objetivo deste estudo foi o de caracterizar aspectos fenotípicos e genotípicos da identificação, da resistência e dos padrões de enterovirulência deste grupo de espécies anaeróbias isoladas de pacientes admitidos em uma coorte recentemente acompanhada no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro. Espécimes retais foram coletados semanalmente da admissão até a alta ou óbito, de maio de 2007 a abril de 2008. No total, 537 “swabs” foram coletados de 193 pacientes, sendo isoladas 135 amostras anaeróbias de 70 pacientes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de colonizados e o de não colonizados em relação ao sexo, à idade e ao tempo de internação no CTI. Em relação ao desfecho, observou-se uma associação negativa, entre ter anaeróbio isolado e óbito, ou seja, os pacientes que tiveram isolamento de anaeróbio evoluíram a óbito com menor frequência. As espécies mais frequentemente isoladas foram *B. thetaiotaomicron* (27%), *P. distasonis* (21%), *B. fragilis* (19%), *B. vulgatus* (15%) e outras espécies de *Bacteroides* (18%). Todas as amostras apresentaram sensibilidade ao imipenem, 3 mostraram sensibilidade reduzida (CIM 4 mg/L) ao metronidazol e 3 susceptibilidade intermediária à amoxicilina/clavulanato (MIC 8 mg/L). Alta prevalência de resistência foi observada para a tetraciclina (78%), a clindamicina (55%), a cefoxitina (25%), o moxifloxacina (23%) e o cefotaxime (21%). Multirresistência (co-resistência a pelo menos três antimicrobianos diferentes) foi observada em 36% das amostras, ocorrendo uma variação de 75% entre *B. thetaiotaomicron* e de apenas 2% entre *B. fragilis* e *B. vulgatus*. As prevalências dos genes de resistência foram de: *tetQ*, 89%; *cepA*, 31%; *cfiA*, 18%; *ermF* 15%; e *nim* 2%. Em relação aos padrões genéticos de enterovirulência, três amostras de *B. fragilis* albergavam o gene *bft*, sendo caracterizadas como *B. fragilis* enterotoxigênicas (ETBF), outras três amostras apresentaram a região lateral a ilha de patogenicidade de *B. fragilis* (BfPAI), sendo caracterizadas como *B. fragilis* não toxigênicas (NTBF) padrão III. O presente estudo revelou altas taxas de resistência para vários agentes antimicrobianos entre amostras isoladas da microbiota comensal. Determinantes de resistência foram altamente prevalentes destacando o papel destes microrganismos comensais como reservatórios de genes de resistência a múltiplas drogas, ressaltando que processos de transferência de genes podem ocorrer no ambiente gastrointestinal. Desta forma, estudos que caracterizem aspectos fenotípicos e genotípicos deste grupo mostram-se importantes.

Palavras-chave: *Bacteroides* spp., *Parabacteroides distasonis*, Epidemiologia, Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, Determinantes genéticos de resistência

Rio de Janeiro
Abril de 2010

ABSTRACT

Laís dos Santos Falcão

“ Epidemiology aspects of colonization by *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides distasonis* in patients admitted to intensive care units at a university hospital in Rio de Janeiro ”

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 genus *Bacteroides* is one of the major microbial groups that form the intestinal microbiota in adults. Although it is a minor component in this niche, *Bacteroides fragilis* is the principal anaerobic species associated with clinical infections, such as intra-abdominal and bloodstream infections. Two of the major species in this niche, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Parabacteroides distasonis*, have been considered as potential pathogens and reservoirs for antibiotic resistance genes. The aim of the present study was to assess phenotypic and genotypic aspects of identification, resistance rates, and enterovirulence pattern of different anaerobic species in a cohort of patients admitted to an intensive care unit of a university hospital in Rio de Janeiro city. Rectal swab specimens were collected weekly from admission to discharge, from May 2007 to April 2008. In total, 537 specimens were collected from 193 patients, and 135 anaerobic isolates were obtained from 70 patients. There was not statistical significant difference between colonized and non colonized patients related to sex, age, and duration of CTI permanence. In relation to the outcome, a negative association was observed in the patients who had isolation of anaerobe and death, that is, patients with anaerobes had evolved to death lesser frequently. Most frequent bacterial species were *B. thetaiotaomicron* (27%), *P. distasonis* (21%), *B. fragilis* (19%), *B. vulgatus* (15%) and other *Bacteroides* species (18%). All isolates were susceptible to imipenem, 3 showed decreased susceptibility to metronidazole (MIC 4 mg/L), and 3 showed intermediate susceptibility to amoxicillin/clavulanate (MIC 8 mg/L). High resistance prevalences were observed for tetracycline (78%), clindamycin (55%), cefoxitin (25%), moxifloxacin (23%), and cefotaxime (21%). Multidrug-resistance (co-resistance to at least three different antimicrobials) was observed in 36% of the isolates, but varied within different species: 75% among *B. thetaiotaomicron*, and 2% among *B. fragilis* and *B. vulgatus*. The prevalence of resistance genes was: *tetQ*, 89%; *cepA*, 31%; *cfiA*, 18%; *ermF* 15%; and *nim* 2%. In relation to the genetic patterns of enterovirulence, three *B. fragilis* samples presented the gene *bft*, being characterized as enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF), other three samples of *B. fragilis* lacked the pathogenicity island, but the flanking region was present, being characterized as non-toxigenic *B. fragilis* (NTBF) pattern III. The present study revealed high rates of resistance to several antimicrobial agents among isolates of the commensal microbiota. Important resistant determinants were highly prevalent, showing the role of these microorganisms as reservoirs of resistance genes, reinforcing that transference processes can occur in the gastrointestinal environment. Summing up, studies that show the characterization of phenotypic and genotypic aspects of this group are thought to be important.

Keywords: *Bacteroides* spp., *Parabacteroides distasonis*, Epidemiology, antimicrobial susceptibility pattern, resistance genetic determinants

Rio de Janeiro
Abril de 2010

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
(1) Microbiota anfibiótica: comensais e patógenos	1
(2) Bactérias anaeróbias	4
(2.1) Taxonomia	4
(2.2) Fatores de virulência.....	6
(3) Resistência a antimicrobianos	11
(3.1) Resistência a β -lactâmicos	12
(3.2) Resistência a Tetraciclina.....	14
(3.3) Resistência a Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas.....	15
(3.4) Resistência a Nitroimidazóis	17
(3.5) Resistência a Quinolonas	19
(4) Epidemiologia	20
(5) Justificativa do estudo.....	21
OBJETIVOS.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
(1) Desenho do estudo	24
(2) Ambiente do estudo	24
(3) Aspectos éticos	24
(4) Coleta de espécimes clínicos.....	25
(5) Procedimentos microbiológicos.....	25
(6) Isolamento e identificação	25
(7) Manutenção das cepas.....	26
(8) Pesquisa da produção de indol	27
(9) Pesquisa da produção de catalase	27
(10) Fermentação de carboidratos e hidrólise da esculina	27
(11) Confirmação da identificação fenotípica	28
(12) Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	29
(12.1) Método de diluição em ágar.....	29
(12.1.1) Antimicrobianos.....	29
(12.1.2) Inóculo	29
(12.1.3) Meio de cultura e preparo das placas.....	29
(12.1.4) Inoculação.....	29
(12.1.5) Incubação.....	30
(12.1.6) Leitura e interpretação de resultados	30
(12.2) Método do teste Epsilométrico (teste-E)	31
(12.2.1) Antimicrobianos.....	31

(12.2.2) Inóculo	31
(12.2.3) Inoculação.....	31
(12.2.4) Leitura e interpretação de resultados	31
(13) Detecção de determinantes de resistência	32
(13.1) Extração de DNA cromossômico.....	32
(14) Amplificação de determinantes de resistência por PCR	33
(15) Amplificação de determinantes de enterovirulência por PCR.....	34
(16) Sequenciamento do gene bft	34
(17) Análise dados.....	35
RESULTADOS	36
(1) Isolamento e identificação	36
(2) Análise descritiva: pacientes x bactérias anaeróbias.....	39
(3) Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	44
(4) Ensaio da PCR.....	46
(5) Perfil de susceptibilidade X determinantes de resistência	47
(6) Perfil de enterovirulência	47
DISCUSSÃO	55
(1) Análise descritiva: pacientes x bactérias anaeróbias.....	55
(2) Susceptibilidade a antimicrobianos	57
(3) Determinantes de resistência	60
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS.....	75

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Estrutura esquemática da holotoxina “ <i>Bacteroides fragilis</i> toxin” (BFT).	9
Figura 2: Ação da “ <i>Bacteroides fragilis</i> toxin” (BFT).	9
Figura 3: Padrões moleculares de <i>B. fragilis</i>	10
Figura 4: Chave de identificação de espécies de <i>Bacteroides</i> resistentes à bile.....	26
Figura 5: Fluxograma representando os pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008, incluídos no estudo para identificação de bactérias anaeróbias.....	37
Gráfico 1: Tempo de internação no HUCFF antes da admissão no CTI conforme isolamento de anaeróbios em 197 pacientes	40
Quadro 1: Frequência de isolamento de <i>Bacteroides</i> spp. e <i>Parabacteroides distasonis</i> em fezes e espécimes clínicos	4
Quadro 2: Genes de resistência pesquisados, sequência de iniciadores, controles positivos utilizados nas reações de PCR e tamanho de fragmentos esperados	33
Tabela 1: Espécies isoladas de pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008.....	38
Tabela 2: Distribuição dos motivos de internação dos 197 pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008	41
Tabela 3: Características observadas em pacientes com isolamento de bactérias anaeróbias num total de 197 pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre 05/2007 e 04/2008.....	42

Tabela 4: Características observadas em pacientes com isolamento de <i>Bacteroides fragilis</i> ou <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> num total de 186 indivíduos submetidos à pesquisa de anaeróbios.....	43
Tabela 5: Susceptibilidade a antimicrobianos de 89 amostras de <i>Bacteroides spp.</i> e <i>Parabacteroides distasonis</i> isoladas de pacientes internados na CTI do HUCFF.....	48
Tabela 6: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008	49
Tabela 7: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de <i>Parabacteroides distasonis</i> isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008	50
Tabela 8: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência e de enterovirulência de amostras de <i>Bacteroides fragilis</i> isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008	51
Tabela 9: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de <i>Bacteroides vulgatus</i> isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008	52
Tabela 10: Demonstração do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de <i>Bacteroides fragilis</i> isoladas de pacientes (PC 27 e PC 52) internados no CTI do HUCFF a partir dos quais várias amostras foram obtidas	53
Tabela 11: Distribuição dos determinantes de resistência nas 89 amostras de <i>Bacteroides spp.</i> e <i>Parabacteroides distasonis</i> isoladas de pacientes internados na CTI do HUCFF	54

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

°C = graus Celsius

Da = Daltons

pb = pares de base

pH = potencial hidrogeniônico

x g = força gravitacional

A/CL = Amoxicilina/ácido clavulânico

AS = Ágar Sangue

ATCC = *American Type Culture Collection*

BBE = *Bacteroides Bile Esculina*

BfPAI = *B. fragilis* pathogenity island; ilha de patogenicidade de *B. fragilis*

BFT = *Bacteroides fragilis* toxin ; toxina *B. fragilis*

BHI = *Brain - Heart infusion*; infusão cérebro e coração

CFT = Cefotaxime

CFX = Cefoxitina

CIM = concentração inibitória mínima

CLI = Clindamicina

CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CPC = Complexo Polissacarídico Capsular

CTI = centro de tratamento intensivo

CTn = *conjugative transposon*; transposon conjugativo

CTnDOT = *conjugative transposon* da Família DOT

DNA = *deoxiribonucleic acid*; ácido desoxirribonucléico

DO = Densidade óptica

EDTA = *Ethylenediaminetetracetic acid*; ácido etilenodiaminatetracético

ETBF = *enterotoxigenic Bacteroides fragilis* ; *B. fragilis* enterotoxigênico

HUCFF = Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
I = intermediário
IC 95 = intervalo de confiança com 95 % de probabilidade
ID = indeterminado
IL = Interleucina
IMP = Imipenem;
IS = *Insertion Sequence*; sequência de inserção
kb = kilobases
LPS = *Lipopolissacharide*; lipopolissacarídeo
MEC = componentes da matriz extracelular
MET = Metronidazol
MR = multirresistentes
MXF = Moxifloxacina
– = ausência do gene.
NTBF = *nontoxic B. fragilis*; *B. fragilis* não toxigênico
+ = presença do gene;
PBPs = *Penicillin binding proteins*; Proteínas ligantes de penicilina
PBS = *Phosphate-buffered saline*; salina fosfato tamponada
PCR = *Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase
PRAS = *Pre-Reduced Anaerobically Sterilized*; pré-reduzido anaerobicamente esterilizado
PY = *Peptone – Yeast*; peptona – extrato de levedura
PYG = peptona – extrato de levedura - glicose
R = resistência
RC = razão de chance
RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
rRNA = *ribosomal Ribonucleic acid*; ácido ribonucléico ribossomal
S = susceptíveis
TA = temperatura ambiente
Tampão TBE = Tris – ácido bórico –EDTA
Tampão TE = Tris-EDTA
Teste – E = Teste-Epsilométrico
TET = Tetraciclina

INTRODUÇÃO

(1) Microbiota anfibiônica: comensais e patógenos

O corpo humano é habitado por um número imenso de bactérias, arqueas, vírus e organismos eucariotos unicelulares. A coleção de microrganismos que co-existem em harmonia com seus hospedeiros é referida como microbiota, microflora ou flora normal (SALYERS, 1984; SEARS, 2005). A composição e a função das bactérias que são parte desta comunidade têm sido estudadas extensivamente. Estima-se que a microbiota humana seja composta de 10^{14} células bacterianas, um número 10 vezes maior do que o número de células humanas presentes no corpo humano. A microbiota coloniza virtualmente cada superfície corporal que é exposta a fatores ambientais externos, como a pele, o trato genito-urinário, gastrointestinal e respiratório (CHILLER, SELKIN & MURAKAWA, 2001; LEY, PETERSON & GORDON, 2006; HULL & CHOW, 2007; VERSTRAELEN, 2008; NEISH, 2009).

Durante os primeiros dias de vida, se inicia a colonização da superfície do hospedeiro por várias bactérias e, gradualmente, parte delas passa a compor a microbiota indígena. Ao longo da vida somos continuamente expostos aos microrganismos através do contato com outros indivíduos, com animais e com o ambiente (SALYERS, 1984; LEY, PETERSON & GORDON, 2006).

Existem muitas evidências da possível co-evolução do hospedeiro e sua microbiota indígena. Foi demonstrado que a transferência de comunidades microbianas entre diferentes hospedeiros resultava na adaptação da nova microbiota, tornando-se esta semelhante à microbiota nativa do hospedeiro que recebeu o “transplante” microbiano (RAWLS *et al.* 2006). Além disso, o hospedeiro desenvolveu mecanismos intrigantes, como a expressão exacerbada de IgA, restringindo a penetração e permitindo um controle local da microbiota residente sem a indução de uma resposta inflamatória intensa do sistema imune (MACPHERSON & UHR, 2004).

Esta adaptação não é uma surpresa quando se considera que diferentes grupos bacterianos e espécies têm sido envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento

intestinal e em funções do hospedeiro. Através de estudos com animais “germ-free” detectou-se um número anormal de tipos celulares e produtos, déficit nas estruturas linfóides sistêmicas e locais, como baço e linfonodos mal formados, assim como um número reduzido de folículos linfóides maduros e irregularidades no perfil de citocinas (MACPHERSON & UHR, 2004).

Assim, tem sido proposto que bactérias comensais produzem moléculas imunomodulatórias diretamente envolvidas no desenvolvimento adequado do sistema imunológico de mamíferos (MAZMANIAN, *et al.*, 2005; MAZMANIAN & KASPER, 2006). Além da colaboração no desenvolvimento do sistema imune, a microbiota apresenta outras atividades benéficas, como a produção de ácidos graxos voláteis (resultado dos processos fermentativos), que são reabsorvidos pelo hospedeiro, sendo utilizados como fonte de energia, assim também carboidratos simples, aminoácidos e vitaminas podem servir como fonte de energia ao hospedeiro (HOOPER, MIDVEDT & GORDON, 2002; WEXLER, 2007).

Nas últimas décadas, muitos pesquisadores têm estudado as bactérias presentes no ambiente intestinal, focando principalmente nos patógenos gastrointestinais e na maneira como eles causam doenças (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Apesar disso, recentemente houve um aumento significativo nos estudos que analisam o efeito de microrganismos comensais sobre o intestino de mamíferos (DIBAISE *et al.* 2008).

De longe, o trato gastrointestinal é o órgão mais densamente colonizado. Estima-se que apenas o cólon contenha cerca de 70% de todos os microrganismos presentes no corpo humano. A microbiota intestinal é composta principalmente por bactérias anaeróbias, que sobrepõem os facultativos e aeróbios em uma ordem de 2 a 3 vezes de magnitude (SALYERS, 1984). Embora exista mais de 50 filos descritos, a microbiota intestinal é dominada por dois destes, os Bacteroidetes e os Firmicutes, acreditando-se que as espécies predominantes pertençam aos gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Bacteroides* (ECKBURG *et al.*, 2005; LEY, PETERSON & GORDON, 2006).

Uma análise recente sugere que a microbiota intestinal humana é composta por mais de 35.000 espécies bacterianas. Esta microbiota representa um complexo e importante sistema ecológico em que alterações podem ocasionar implicações clínicas

graves (DIBAISE *et al.* 2008). 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 (PATRICK, LUTTON & CROCKARD, 1995; JOUSIMIES-SOMER & SUMMANEN, 2002; WEXLER, 2007).

Infecções anaeróbias podem ocorrer em todos os sítios anatômicos, incluindo o sistema nervoso central, a cavidade oral, o abdome, a pelve, a pele e os tecidos moles (BROOK, 2002; WEXLER, 2007). Esses microrganismos 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). Devido à sua natureza fastidiosa, são microrganismos 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).

De uma forma geral as infecções causadas por estes patógenos são de natureza polimicrobiana, sendo frequente o isolamento associado de bactérias facultativas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* e *Enterococcus spp.* (WILLIS, 1991; BROOK, 2005). Nos casos em que ocorre a ruptura da parede intestinal, membros da flora normal atingem sítios corporais estéreis como a cavidade peritoneal. No primeiro estágio da infecção (aproximadamente 20 horas), os aeróbios, tais como *E. coli*, são os membros que predominam na infecção, estabelecendo a destruição inicial do tecido, e reduzindo o potencial de oxi-redução do tecido. Uma vez que o oxigênio for removido, bactérias anaeróbias como *B. fragilis* predominam (PUMBWE, SKILBECK & WEXLER, 2006).

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

negativos (*Veillonella*) e de cocos Gram-positivos (*Peptostreptococcus*) (SUMMANEN, 2002).

As espécies do gênero *Bacteroides* estão entre as mais frequentemente isoladas de diferentes processos infecciosos, tais como infecções intra-abdominais e bacteremias. (BROOK, 2003; BROOK, 2009). As espécies *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides thetaiotaomicron* merecem destaque por serem as mais comumente encontradas como agentes de infecções (Quadro 1). Essas infecções geralmente surgem a partir da contaminação de sítios corporais normalmente não colonizados com material fecal (PATRICK, 2002).

Quadro 1: Frequência de isolamento de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis* entre os anaeróbios em fezes e espécimes clínicos (extraído e modificada de PATRICK, 2002)

Espécies	Isolamento (%)	
	Fezes	Espécimes clínicos
<i>B. fragilis</i>	4-13	63-81
<i>B. thetaiotaomicron</i>	15-29	13-17
<i>P. distasonis</i>	9	3-6
<i>B. ovatus</i>	4	0-7
<i>B. vulgatus</i>	43-45	2-3

(2) Bactérias anaeróbias

(2.1) Taxonomia

Apesar de se creditar a Louis Pasteur o primeiro cultivo de uma bactéria anaeróbia estrita, foi através dos estudos de Veillon e Zuber (1897, 1898) que ficou comprovado o envolvimento de bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas, não formadoras de esporos, em infecções como abscessos cerebrais, pulmonares, peritonites e otites. Os microrganismos mais comumente observados em peritonites e apendicites foram nomeados como *Bacillus* (atualmente *Bacteroides*) *fragilis* (PATRICK, 2002).

O gênero *Bacteroides* foi inicialmente considerado um grupo que albergava qualquer bastonete Gram-negativo anaeróbio não formador de esporos, que não fosse

pertencente aos gêneros *Fusobacterium* ou *Leptotrichia* (PATRICK, 2002), passando por várias revisões nos 20 últimos anos.

A aplicação de técnicas de biologia molecular, tais como estudos de homologia DNA-DNA e sequenciamento do gene *rrs* (RNA 16S), contribuiu na estruturação taxonômica de diversos gêneros (JONHSON, 1978; SHAH, 2009). Através destas técnicas, espécies anaeróbias clinicamente relevantes foram alocadas em novos gêneros: *Porphyromonas* (contendo espécies sensíveis à bile, pigmentadas e assacarolíticas), *Prevotella* (contendo espécies sensíveis à bile, pigmentadas e não pigmentadas e moderadamente sacarolíticas) e *Bacteroides* (espécies resistentes à bile, não pigmentadas e sacarolíticas) (SHAH & COLLINS, 1988; 1990; SHAH, 2009).

Shah e Collins, em 1989, propuseram a formação do “grupo *Bacteroides fragilis*”, contendo 10 espécies principais: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* e *Bacteroides vulgatus* (SHAH & COLLINS, 1989; 1990).

Em 2005, as espécies *Bacteroides goldsteinii*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides plebeius* e *Bacteroides coprocola*, isoladas de fezes humanas, e *Bacteroides massiliensis*, isolada de hemocultura de um infante, foram adicionadas ao gênero *Bacteroides*.

Sakamoto e Benno, em 2006, propuseram a criação de um novo gênero: *Parabacteroides*, com base em estudos comparativos de sequenciamento do gene *rrs* (rRNA 16S), reclassificando as espécies *B. goldsteinii*, *B. distasonis* e *B. merdae* (SAKAMOTO & BENNO, 2006). Uma quarta espécie, *Parabacteroides jonhsonii*, foi subsequentemente adicionado ao novo gênero em 2007 (SAKAMOTO, 2007).

Uma característica marcante deste novo gênero *Parabacteroides* é a predominância das menaquinonas 9 e 10, diferentemente do observado nas espécies do gênero *Bacteroides* que apresentam principalmente as menaquinonas 10 e 11 (SAKAMOTO & BENNO, 2006). Já em 1981, Collins e Jones destacavam o potencial taxonômico das quinonas respiratórias ou isoprenóides. As quinonas isoprenóides são constituintes da membrana citoplasmática bacteriana, apresentando como principais

funções o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa. A variação na sua constituição tem sido uma valiosa ferramenta na sistemática microbiana (COLLINS & JONES, 1981).

No início de 2010, após as várias revisões, o gênero *Bacteroides* continha as 8 espécies remanescentes do antigo grupo *B. fragilis*, as 5 descritas em 2005, além de *Bacteroides clarus*, *Bacteroides coprophilus*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides faecis*, *Bacteroides finegoldii*, *Bacteroides fluxus*, *Bacteroides intestinalis* e *Bacteroides oleiciplenus*, isoladas de seres humanos, e *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides barnesiae*, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides gallinarum*, *Bacteroides helcogenes*, *Bacteroides pyogenes* e *Bacteroides salanitronis*, *Bacteroides suis* e *Bacteroides tectus*, isoladas de animais (OLSEN & SHAH, 2008; SHAH, 2009).

As atualizações taxonômicas são importantes na área clínica, uma vez que a identificação correta de um microrganismo anaeróbio pode colaborar na escolha correta da terapia empírica, além de destacar o potencial de agressão do patógeno isolado (WEXLER, 2007).

(2.2) Fatores de virulência

Alguns fatores de virulência têm sido descritos na tentativa de determinar o comportamento patogênico desses microrganismos. Entretanto, estes estudos têm se restringido principalmente à espécie *B. fragilis* devido à sua maior prevalência e importância clínica (KALKA-MOLL *et al.*, 2001). Apresentaremos alguns fatores que colaboram com a aderência e agressão ao tecido hospedeiro, assim como mecanismos de evasão que favorecem a permanência do microrganismo no sítio infeccioso.

Um dos fatores mais bem estudados na espécie *B. fragilis* é a expressão de um complexo polissacarídico capsular (CPC - composto por 8 polissacarídeos distintos) que possui a clássica função anti-fagocitária, além da capacidade de induzir a formação de abscessos intra-abdominais e promover a aderência a células do hospedeiro (PRUZZO, GUSMAN & RICHETTI, 1989; KRINOS *et al.*, 2001). A presença de grupos com cargas positivas e negativas em cada unidade sacarídica caracteriza os polissacarídeos capsulares de *B. fragilis*. Estes domínios específicos carregados (“zwitterions”) são

essenciais para a atividade biológica destas moléculas, em especial no que diz respeito à indução de abscessos (KALKA – MOLL *et al.*, 2001).

A capacidade dos microrganismos de aderir a tecidos do hospedeiro é considerada um fator determinante para o estabelecimento de processos de colonização e infecção (BEACHEY, 1981). Uma das primeiras descrições de adesinas para este grupo, foi realizada por Rogemond e Guinet, descrevendo a presença de adesinas do tipo lectina, que permite aos organismos do gênero *Bacteroides* interagirem com células epiteliais e outras bactérias (ROGEMOND & GUINET, 1986). Em 1994, Nagy, Manncke & Werner observaram que cepas pertencentes às espécies *B. fragilis* e *B. vulgatus* possuíam uma maior capacidade de aderência à fibronectina quando comparado as outras espécies do gênero.

A matriz extracelular e a membrana basal estão entre as principais barreiras do hospedeiro a diversos patógenos. É neste contexto que a produção de proteases se mostra importante fator de virulência, causando danos aos tecidos e células do hospedeiro, assim como conferindo uma alternativa de escape ao rigor do sistema imune em função da degradação de imunoglobulinas. Esta degradação protéica também contribui para a nutrição e disseminação bacterianas (GIBSON & MACFARLANE, 1988; MACFARLANE & GIBSON, 1991).

Microrganismos anaeróbios estritos requerem condições reduzidas e ausência de O₂ para realizar seu crescimento. Entretanto, algumas cepas de *Bacteroides* e *Parabacteroides* podem sobreviver por longos períodos expostos ao oxigênio. A aerotolerância tem sido relacionada à produção de catalase e superóxido desmutase. Todas as cepas de *B. fragilis* e *P. distasonis* produzem catalase. Somente algumas cepas de *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* e *B. eggerthii* produzem a enzima, e *B. vulgatus* e *B. uniformis* não as produzem (PATRICK, 2002).

Baughn e Malamy, em 2004, descreveram que *B. fragilis* pode crescer na presença de concentrações pequenas (nanomoles) de oxigênio. Até este momento, sabia-se que os microrganismos anaeróbios poderiam sobreviver na presença de oxigênio por produzirem enzimas que inativem os radicais tóxicos de oxigênio, mas seria pouco provável que poderiam crescer. Esta capacidade de crescimento na presença de

concentrações pequenas de O₂, no entanto, foi comprovada, podendo ser considerada um fator decisivo no momento inicial da infecção, explicando a prevalência da espécie *B. fragilis* em diferentes processos infecciosos (BAUGHN & MALAMY, 2004).

Além de sua inquestionável importância em infecções extra-intestinais, em 1984, *B. fragilis* foi associado pela primeira vez a um surto de diarreia aguda em ovelhas recém-nascidas em três fazendas em uma mesma região dos Estados Unidos, o que acrescentou à espécie um possível papel como patógeno entérico (MYERS *et al.*, 1984). Algumas cepas desta espécie apresentavam uma atividade enterotoxigênica, pela produção de uma proteína, denominada *Bacteroides fragilis* “toxin” (BFT) (Figura 1).

Esta proteína foi definida como uma metaloproteases da classe das metzincinas, de aproximadamente 20 kDa, formada por um único peptídeo que tem atividade antigênica (VAN TASSEL, LYERLY & WILKINS, 1992). Três isoformas da BFT já foram identificadas. BFT-1 e BFT-2 possuem 92% de similaridade na sequência de aminoácidos. A terceira isoforma, BFT-3, foi identificada em cepas isoladas de sítios extra-intestinais de pacientes na Coreia, sendo mais relacionada à BFT-2. (CHUNG *et al.*, 1999).

Estudos paralelos demonstraram que, através da degradação proteolítica, a BFT pode atuar de forma a romper a barreira epitelial, levando a lesões teciduais e secreção de fluidos, uma vez que esta barreira desempenha um importante papel no transporte de íons e água, além de regular a comunicação entre as células (OBISO JR., AZGHANI & WILKINS, 1997). Atualmente, sabe-se que a BFT atua na degradação da E-caderina, contribuindo para alterações na permeabilidade, inflamação e até no possível desencadeamento de câncer de cólon (WU *et al.*, 2003; SEARS, *et al.*, 2008) (Figura 2).

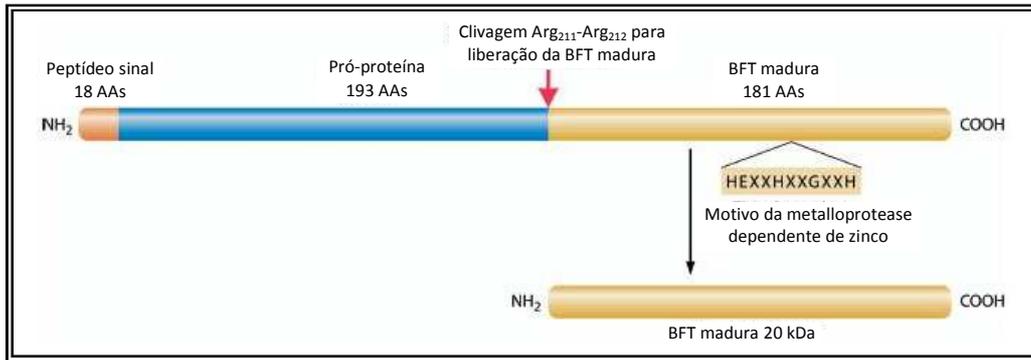


Figura 1. Estrutura esquemática da holotoxina “*Bacteroides fragilis toxin*” (BFT). Cada um dos isotipos (BFT-1, BFT-2 e BFT-3) consiste de três domínios: o peptídeo sinal, a pró-proteína e a toxina madura. A holotoxina é clivada liberando a toxina madura. (Figura extraída e modificada de SEARS, 2009).

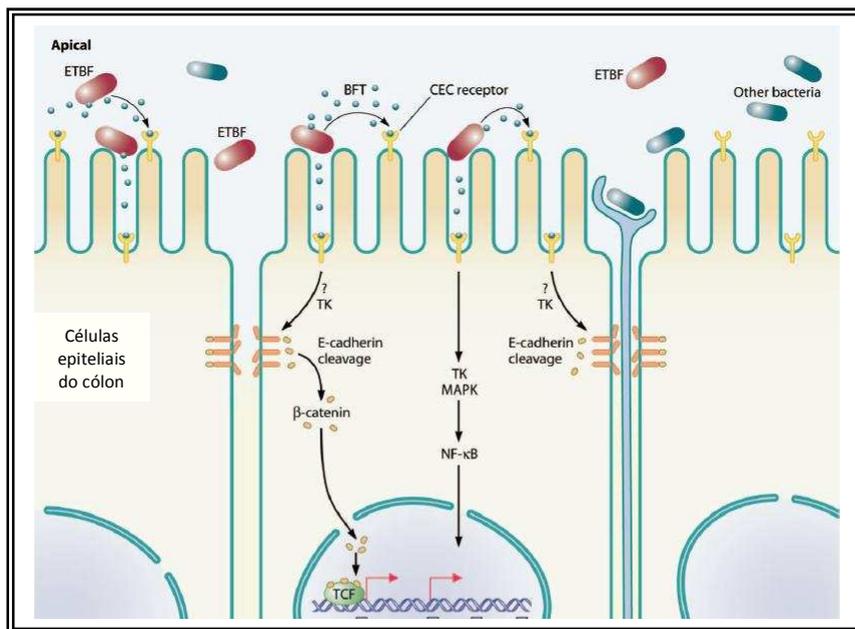


Figura 2. Ação da “*Bacteroides fragilis toxin*” (BFT). Cepas enterotoxigênicas de *Bacteroides fragilis* (ETBF) colonizam o cólon, após a etapa inicial a BFT é liberada ligando-se a um receptor específico das células epiteliais do cólon (CEC), causando uma complexa transdução de sinais, envolvendo a β-catenina, a tirosina quinase (TK), as proteínas ativadoras mitogênicas quinases (MAPK) e o fator NF-κβ. A transdução de sinais resulta na clivagem da E-caderina, e na expressão de uma série de quimiocinas, de citocinas e de outros fatores que podem estar envolvidos em processos inflamatórios da mucosa em resposta à colonização por cepas ETBF (Figura extraída e modificada de SEARS, 2009).

A partir do conceito de que genes de virulência de bactérias patogênicas estão localizados em elementos genéticos “específicos”, conhecidos como ilhas de patogenicidade, Moncrief e colaboradores (1998), reportaram que também o gene *bft*, que codifica a BFT estava contido em um pequeno elemento genético, chamado ilha de patogenicidade do *B. fragilis* (BfPAI).

Posteriormente, Franco e colaboradores (1999), estudando uma coleção de cepas ETBF e *B. fragilis* não-enterotoxigênico (“nontoxigenic *Bacteroides fragilis*”: NTBF), verificaram que essa ilha, contendo o gene *bft* e o gene para uma metaloprotease (*mpII*) estavam presentes exclusivamente em cepas ETBF (FRANCO *et al.*, 1999). Posteriormente verificou-se que a BfPAI está inserida em um transposon conjugativo (CTn), denominado CTn86. Dentre 191 cepas NTBF analisadas por estes autores, 52% não possuíam nem a BfPAI nem uma região lateral à BfPAI. Estas cepas foram designadas NTBF de padrão II. As cepas NTBF restantes não apresentavam a BfPAI, mas continham a região lateral, que é um CTn, o CTn9343, sendo designadas NTBF de padrão III (Figura 3) (BUCKWOLD *et al.*, 2007).

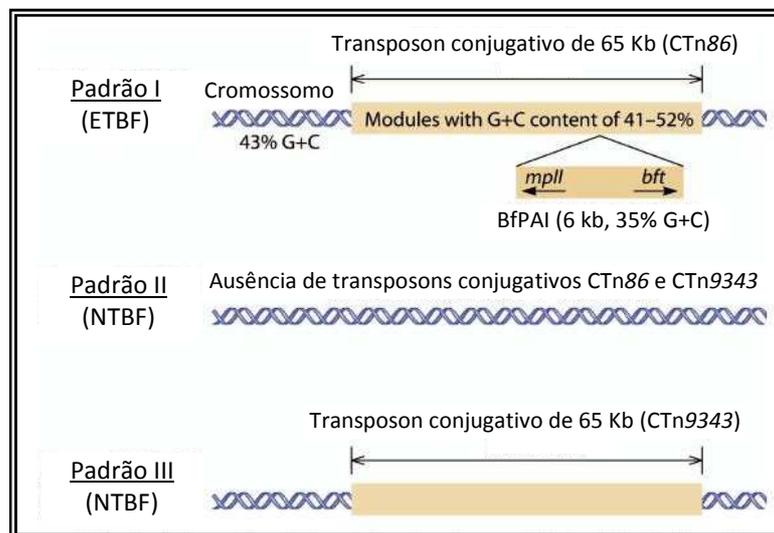


Figura 3. Padrões moleculares de *B. fragilis*. o padrão I corresponde a cepas de *B. fragilis* enterotoxigênicas (ETBF) que possuem o transposon conjugativo (CTn) CTn86, no qual está contido a ilha de patogenicidade de 6kb BfPAI. A BfPAI contém dois genes, um que codifica a BFT (*bft*), e um segundo que codifica uma metaloprotease (*mpII*). O padrão II corresponde a cepas de *B. fragilis* que não apresentam os CTns (CTn86 e CTn9343). O padrão III corresponde a cepas não toxigênicas que apresentam o CTn9343 (Figura extraída e modificada de SEARS, 2009).

Cepas ETBF vêm sendo encontradas em diferentes partes do mundo como EUA, Itália, Polônia, Hungria, Japão, Nicarágua e Brasil (MYERS *et al.*, 1987; PANTOSTI, PIERSIMONI & PERISSI, 1994; KATO *et al.*, 1996; CÁCERES *et al.*, 2000; BRESSANE, DURIGON & AVILA-CAMPOS, 2001), com uma taxa de isolamento de 1 a 19% (SACK *et al.*, 1994). Recentemente, em nosso país, foi detectada uma taxa de isolamento de 1,5% de cepas ETBF (ANTUNES *et al.*, 2002), revelando uma restrita circulação do gene *bft* nas cepas isoladas no Brasil. No entanto, um percentual considerável de cepas NTBF, pertencentes ao padrão III pode ser detectado (~ 60%), o que poderia sugerir uma possível mudança no fenótipo de enterovirulência da espécie em nosso país dentro de algum tempo.

(3) Resistência a antimicrobianos

Desde a introdução da penicilina nos anos 40, numerosos agentes antibacterianos foram desenvolvidos e utilizados clinicamente, sendo capazes de controlar inúmeras infecções. Entretanto, o otimismo inicial de que todas as doenças infecciosas poderiam ser tratadas com sucesso foi desmantelado com as primeiras descrições de falha terapêutica devido à emergência de microrganismos resistentes (HARBOTTLE *et al.*, 2006).

Especula-se que os mecanismos de resistência surgiram a partir dos próprios microrganismos produtores de antibióticos, como um mecanismo de auto-proteção. Song e colaboradores (2005), a partir da análise metagenômica de sedimentos de regiões abissais do mar próximo a Papua Nova Guiné, detectaram a presença de uma β -lactamase do tipo TEM, estimando que possuía 10.000 anos. Um fator que contribuiu para a rápida disseminação da resistência antimicrobiana entre gêneros taxonomicamente distantes foi a aquisição de elementos genéticos móveis (HARBOTTLE *et al.*, 2006).

Vários agentes antimicrobianos podem ser utilizados na terapia de infecções causadas por bactérias anaeróbias, tais como β -lactâmicos, lincosamidas, nitroimidazóis e quinolonas de terceira geração. Em geral, a escolha inicial é empírica, baseando-se em resultados de estudos de monitoramento. Os níveis de resistência no gênero *Bacteroides*

começaram a aumentar a partir da década de 60. Vários estudos demonstraram esta mudança, principalmente nos últimos 10 anos. Os determinantes de resistência podem estar presentes no cromossomo, tão bem quanto em plasmídeos e transposons, sendo disseminados por conjugação dentro deste gênero (VEDANTAM, 2009).

(3.1) Resistência a β -lactâmicos

Dentro da categoria de drogas β -lactâmicas temos as penicilinas, as cefalosporinas, as carbapenemas e os monobactâmicos. As penicilinas podem ser separadas em amplo espectro, como a amoxicilina e a ampicilina, e em baixo espectro como a benzilpenicilina e a oxacilina. As carbapenemas como o imipenem e o ertapenem, são drogas semi-sintéticas com amplo espectro de ação. Geralmente, esta classe de drogas permanece estável e mantém sua atividade frente à ação de muitas β -lactamases. As cefalosporinas têm sido sucessivamente modificadas gerando produtos de primeira (cefazolina), segunda (cefotaxima), terceira (cefotaxime) e quarta geração (cefepime). Para completar, temos os monobactâmicos, como o aztreonam (VEDANTAM, 2009).

Estes antimicrobianos inibem a síntese da parede celular bacteriana através da ligação às proteínas ligantes de penicilina (PBPs). As PBPs são enzimas responsáveis pelas etapas finais das ligações cruzadas da estrutura da parede celular. A inibição de uma ou mais destas enzimas essenciais resulta em acúmulo das unidades precursoras da parede celular, o que por sua vez induz a ativação do sistema autolítico da célula resultando em citólise (ALTERTHUM, 2008).

As espécies do “grupo *B. fragilis*” têm sido reconhecidas como as bactérias anaeróbias mais resistentes aos agentes antimicrobianos, principalmente aos β -lactâmicos, desde a década de 1960, quando houve a descrição da primeira cepa de *Bacteroides* spp. resistente à penicilina (SOUZA *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2002). Dentre os principais tipos de estratégias de resistência aos β -lactâmicos entre as bactérias do gênero *Bacteroides* estão a presença de PBPs de baixa afinidade, decréscimo da permeabilidade da membrana externa e, principalmente, a produção de β -lactamases

(NORD & HEDBERG, 1990; RASMUSSEN, BUSH & TALLY, 1997), sendo esta última usada pela maioria das cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos.

Bactérias produtoras de β -lactamases secretam a enzima no espaço periplasmático onde são capazes de destruir os antibióticos β -lactâmicos, antes que estes alcancem as PBPs (WALSH, 2000). A maioria dessas enzimas são cefalosporinas constitutivas com atividade contra penicilinas e cefalosporinas de baixo e amplo espectro, inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactan (PARKER & SMITH, 1993) pertencentes à classe A de Ambler e codificadas pelo gene *cepA* presente no cromossomo (em cerca de 90% das amostras de *B. fragilis*) ou, raramente, pelo gene *cfxA* (YAMAOKA *et al.*, 1990), detectado no transposon mobilizável Tn4555 (TRIBBLE, PARKER & SMITH, 1999).

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

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

Entretanto, a produção de uma metalo- β -lactamase dependente de zinco por cepas de *B. fragilis* tem comprometido o uso clínico de cefalosporinas e de carbapenemas. Esta enzima codificada pelo gene *cfiA* presente no cromossomo bacteriano (THOMPSON & MALAMY, 1990) ou em plasmídeos (BANDO *et al.*, 1991) pertence ao grupo funcional 3 e é inibida por EDTA (THOMPSON & MALAMY, 1990). A expressão desta metalo- β -lactamase tem sido relatada em cepas de *B. fragilis* isoladas de espécimes clínicos nos EUA (CUCHURAL, MALAMY & TALLY, 1986), França (PODGLAJEN *et al.*, 1992) e Reino Unido (RASMUSSEN, GLUZMAN & TALLY, 1991). Tem sido demonstrado, no entanto, que algumas cepas que albergam o gene *cfiA*, não o expressam, sendo considerado “silencioso”. Sua ativação requer a migração de uma

sequência de inserção (IS) à montante do gene para que este seja expresso (PODGLAJEN, BREUIL & COLLATZ, 1994).

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

(3.2) Resistência a Tetraciclina

A tetraciclina, considerada inicialmente como uma droga promissora para tratamento de infecções anaeróbias, se mostrou ineficaz já no início da década de 1970, quando foram detectadas cepas de *Bacteroides* resistentes. Atualmente, a maioria das cepas analisadas apresentam fenótipo de resistência à tetraciclina (SALYERS & SHOEMAKER, 1996; PAULA *et al.*, 2004). A entrada desta droga na célula ocorre em duas fases: difusão passiva através de poros hidrofílicos na membrana externa e transporte ativo através da membrana citoplasmática. Uma vez no interior da célula, o antimicrobiano se liga à subunidade 30S do ribossomo bacteriano e impede a ligação de aminoacil-tRNA ao seu sítio de ligação nesta estrutura (ROBERTS, 1996).

As bactérias têm utilizado três diferentes estratégias para tornarem-se resistentes: limitando o acesso da droga aos ribossomos, alterando estruturalmente os ribossomos para prevenir o reconhecimento da droga ao seu sítio alvo, e através da inativação da droga por meio da ação de enzimas (SPEER, SHOEMAKER & SALYERS, 1992).

Estudos genéticos utilizando cepas de *Bacteroides* isoladas de microbiota humana têm mostrado que este gênero possui elementos conjugativos responsáveis pela transferência de genes (SALYERS & SHOEMAKER, 1992; SALYERS *et al.*, 1995) como os CTns da família CTnDOT, que carregam o gene de resistência a tetraciclina *tetQ*. A excisão

do gene *tetQ* é estimulada pela presença de tetraciclina (STEVENS, SALYERS & SHOEMAKER, 1990; CHENG *et al.*, 2001).

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

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

Recentemente, uma nova classe de antimicrobianos foi aprovada para uso nos EUA e na Europa, a tigeciclina, uma glicilciclina, que apresenta uma excelente atividade contra bactérias anaeróbias gram-positivas e gram-negativas (GOLDSTEIN *et al.*, 2006). Estes compostos assemelham-se às tetraciclinas (derivados da minociclina), mas com uma afinidade maior por ribossomos, apresentando atividade mesmo em amostras resistentes à tetraciclina (VEDANTAM, 2009). Entretanto, em 2007, foi publicado um estudo multicêntrico dos EUA em que se detectou 5% de resistência a tigeciclina em 2.722 amostras de *B. fragilis* coletadas de centros médicos de diferentes regiões geográficas (SNYDMAN *et al.*, 2007).

(3.3) Resistência a Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas

Os componentes do grupo denominado MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas) compartilham sítios superpostos de ligação no centro

peptidiltransferase na subunidade 50S do ribossomo. Estes compostos se ligam aos domínios II e V do rRNA 23S, bloqueando a formação de ligações peptídicas. A clindamicina e a eritromicina, drogas usadas no tratamento de infecções por anaeróbios, são representantes do grupo, sendo a primeira uma lincosamida e a segunda, um macrolídeo. Os determinantes de resistência aos macrolídeos localizam-se geralmente em elementos conjugativos auto-transmissíveis, conferindo resistência cruzada aos outros componentes do grupo (MOAZED & NOLLER, 1987; SALYERS, 2002).

A primeira cepa de *B. fragilis* resistente à clindamicina foi descrita em 1976 (FANG *et al.*, 2002). Os percentuais de cepas resistentes à clindamicina e à eritromicina em diversos países têm variado drasticamente, sendo influenciado possivelmente pelo nível de consumo destes fármacos. Estudos têm constatado a elevação considerável destas taxas de resistência, o que torna essencial a aplicação de políticas rigorosas de vigilância dos perfis de susceptibilidade para este antimicrobiano (DUBREUIL *et al.*, 1992; WATANABE, UENO & KATO, 1992).

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

O gene *ermF*, associado primeiramente a *Bacteroides* e gêneros relacionados, tem sido o principal determinante de resistência associado a este fenótipo. O mesmo pode ser carregado em transposons conjugativos (CTns), como por exemplo CTnDOT, que além do gene *ermF* carrega o gene de resistência à tetraciclina, *tetQ*. Este transposon está amplamente disseminado no gênero *Bacteroides* e pode estar diretamente relacionado a eventos de transferência horizontal de genes (WANG *et al.*, 2003). Outros genes têm sido relatados, tais como *ermG* e *ermB*, os quais foram inicialmente observados em bactérias Gram-positivas, evidenciando-se assim uma extensiva transferência de genes,

principalmente via conjugação, entre os *Bacteroides* e outros microrganismos (SHOEMAKER *et al.*, 2001).

Estudos realizados em nosso laboratório em 2000 demonstraram que 41% das cepas isoladas de microbiota intestinal de indivíduos saudáveis apresentavam resistência à clindamicina (SOUZA *et al.*, 2000). Paula e colaboradores (2004), através da técnica da reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR), detectaram o gene *ermF* em 11% das cepas analisadas resistentes à clindamicina. Essas cepas carregavam também o gene *tetQ* e provavelmente pertencem à família Tc^rErm^r. No entanto, em 16 cepas resistentes à clindamicina não foi detectado o gene *ermF*. É possível que outros genes como *ermG* e *ermB*, também detectados no gênero *Bacteroides*, estivessem envolvidos nesse fenótipo (SHOEMAKER *et al.*, 2001).

(3.4) Resistência a Nitroimidazóis

Os 5-nitroimidazóis (5-Ni) (metronidazol, tinidazol e ornidazol) foram introduzidos na clínica médica no início da década de 1960, mas apenas em 1978 foi descrita a primeira cepa de *B. fragilis*, de origem clínica, resistente ao metronidazol, após uma prolongada terapia com este antimicrobiano (INGHAM *et al.*, 1978). Mesmo após 50 anos de uso, os 5-Ni ainda são o principal grupo de antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções anaeróbias, pois apresentam uma excelente atividade, principalmente devido aos baixos percentuais (< 5%) de cepas resistentes detectados até o momento (DUBREUIL *et al.*, 1992; WATANABE, UENO & KATO, 1992; SNYDAMANN *et al.*, 2007). Os 5-Ni são pró-drogas inativas que entram na célula por difusão simples. A posterior ativação dos 5-Ni requer redução intracelular do grupo nitro resultando na produção de intermediários de vida curta: radicais nitro-aniônico (R-NO₂), nitroso (R-NO) e o hidroxilamino (R-NHOH). Acredita-se que o R-NO₂ seja a molécula mais ativa, capaz de oxidar macromoléculas, particularmente o DNA, culminando com a quebra das fitas simples e duplas, sua subsequente degradação e morte celular (CHURCH & LAISHLEY, 1995; REYSSET, 1996). Os 5-Ni são estáveis somente sob condições anaeróbias, sendo prontamente inativados na presença de oxigênio (EDWARDS, 1993).

Em um estudo molecular foi demonstrado que o fenótipo de sensibilidade reduzida ao metronidazol estava associado à presença de genes denominados *nim* (REYSSET, HAGGOUUD & SEBALD, 1993; REYSSET, 1996). Foram identificados quatro genes relacionados a esse fenótipo em espécies de *Bacteroides*, três deles localizados em plasmídeos mobilizáveis (*nimA*, *nimC* e *nimD*) e o quarto (*nimB*) mapeado no cromossomo (HAGGOUUD *et al.*, 1994; TRINH *et al.*, 1995). Em 1997, Carlier e colaboradores, analisando propriedades fenotípicas de cepas resistentes e sensíveis ao metronidazol, sugeriram que os genes *nim* (A, B, C e D) codificam uma redutase que converte 4- ou 5- nitroimidazóis a 4- ou 5- aminoimidazóis, impedindo a formação de radicais nitrosos tóxicos, os quais são essenciais para a atividade antimicrobiana.

Em 2000, Stubbs e colaboradores caracterizaram um novo gene *nim* através das técnicas de PCR e “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP). Este novo gene *nim*, o qual exibiu 75% de similaridade com a sequência do gene *nimB*, e passou a ser designado *nimE*. Recentemente, foi detectado o gene *nimE* no gênero *Veillonella*, apresentando 99,8% de similaridade com o gene descrito em *B. fragilis*. Tal estudo sugere que o gene esteja localizado em um plasmídeo presente em poucas cópias na célula (MARCHANDIN *et al.*, 2004). Mais recentemente, um novo gene designado como *nimF*, apresentando 78% de similaridade com o gene *nimD*, foi descrito em uma cepa do grupo *B. fragilis* (LÖFMARK *et al.*, 2005). Gal e Brazier (2006), detectaram um novo padrão de fragmento no RFLP, encontrando um novo gene *nim*, *nimG*, que compartilha 83% de similaridade com o gene *nimB* previamente descrito. Em 2009 foi demonstrada a existência do oitavo gene *nim*, *nimH*, presente em cepas de *B. fragilis* (entrada genbank FJ969397.1). No presente ano foi descrito o nono gene *nim*, *nimI*, detectado em cepas de *Prevotella baroniae*. A identificação em espécie foi realizada através do sequenciamento da região rRNA 16S (gene *rrs*) e a confirmação do novo gene *nim*, por realizada por sequenciamento (ALAUZET *et al.*, 2010).

A resistência ao metronidazol tem sido relatada na Europa (DUBLANCHET *et al.*, 1986), África (LUBBE, STANLEY & CHALKLEY, 1999) e mais recentemente nos EUA (SCHAPIRO *et al.*, 2004). Em estudo realizado em nosso laboratório, foram detectadas 10 cepas de *Bacteroides* apresentando fenótipo de sensibilidade reduzida a 5-Ni para as

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

Em *Bacteroides* spp., elementos IS (sequência de inserção) têm sido envolvidos na modulação da expressão desses genes de resistência. Sóki e colaboradores (2006) analisaram cepas pertencentes ao gênero *Bacteroides* quanto à presença dos genes *nimA-E*, sua localização em plasmídeos ou cromossomo e demonstração do elemento IS ativador. Neste estudo, não foi possível correlacionar um elemento IS específico para cada gene. Porém, um novo elemento IS (*ISBf6*) provou estar associado exclusivamente com o gene *nimE* testado. Neste estudo foi possível observar ainda a presença dos genes *nimA*, *nimC* e *nimD*, inicialmente associado a plasmídeos, albergados no cromossomo.

(3.5) Resistência a Quinolonas

Este grupo envolve drogas sintéticas, bactericidas, que inibem a replicação bacteriana através da inibição da enzima DNA girase, e apresentam também ação sobre a topoisomerase IV. Historicamente estas drogas eram consideradas ineficazes contra bactérias anaeróbias. Entretanto, as quinolonas de última geração tiveram seu espectro ampliado apresentando ação tanto contra aeróbios, como para anaeróbios. Mostram-se uma excelente escolha para infecções mistas, como no caso de infecções intra-abdominais (OH & EDLUND, 2003). Gatifloxacin, moxifloxacin e trovafloxacin são exemplos de quinolonas com atividade contra anaeróbios. Nos últimos anos tem sido descrita a presença de cepas do gênero *Bacteroides* resistente a quinolonas.

Como observado em outros grupos bacterianos, a resistência a quinolonas pode ser conferida por três mecanismos distintos. O primeiro envolve mutação na DNA girase e na topoisomerase IV reduzindo a ligação das quinolonas ao sítio alvo (GOLAN *et al.*, 2003). O segundo envolve a super-expressão de bombas de efluxo, resultando em um decréscimo da concentração intracelular do antimicrobiano, reduzindo sua eficácia (WEXLER, 2007). O terceiro, descrito nos últimos 5 anos, é mediado por um plasmídeo

transferível que codifica uma proteína denominada Qnr que confere uma proteção física à DNA girase, prevenindo assim o acesso da droga ao seu alvo.

(4) Epidemiologia

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

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

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

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

As espécies do gênero *Bacteroides* têm sido consideradas, por muitos autores, instrumentos importantes no estudo dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos por apresentarem um grande espectro de mecanismos de resistência desenvolvidos contra os agentes mais utilizados. Conjugado à problemática da resistência, esses microrganismos dispõem de uma gama considerável de elementos genéticos móveis responsáveis pela disseminação de genes (WANG *et al.*, 2003; SALYERS, GUPTA & WANG, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006).

(5) Justificativa do estudo

A emergência de resistência a antimicrobianos entre bactérias anaeróbias, principalmente entre as espécies do gênero *Bacteroides* e *Parabacteroides* responsáveis por infecções, tem se apresentado como um dos maiores problemas na seleção da terapêutica. Neste contexto, a verificação da presença de determinantes de resistência contribui na detecção precoce de amostras com potencial de resistência, destacando que

os testes para determinação da susceptibilidade de anaeróbios são dispendiosos e trabalhosos. Desta maneira, estudos que realizem o monitoramento do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, e a detecção de determinantes de resistência colaboram na compreensão de possíveis causas da falha terapêutica, assim como podem identificar o surgimento de amostras resistentes a múltiplas drogas.

Por outro lado, permanecem escassos no Brasil, estudos que determinem os padrões de enterovirulência das amostras de *B. fragilis*, destacando o potencial patogênico destas amostras devido a produção de uma enterotoxina. Assim investigações que monitorem a presença destes padrões mostram-se importantes.

Desta forma, o presente estudo foi desenhado para caracterizar aspectos fenotípicos e genotípicos da identificação, da resistência e padrões de enterovirulência de amostras de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis* isoladas de colonização de pacientes admitidos em uma coorte recentemente acompanhada no centro de tratamento intensivo (CTI) de um hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

O objetivo deste estudo foi o de caracterizar uma coleção de amostras de bactérias anaeróbias obtida a partir de uma coorte de pacientes admitidos no CTI do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- (a) Comparar características demográficas e clínicas presentes em pacientes com isolamento de anaeróbios com aqueles presentes em pacientes sem isolamento deste microrganismo;
- (b) Identificar em espécies as bactérias anaeróbias provenientes de uma coorte de pacientes admitidos em um CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008;
- (c) Determinar o perfil de susceptibilidade de cepas de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp. aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina, cefoxitina, clindamicina e metronidazol, através de teste de diluição em ágar;
- (d) Determinar o perfil de susceptibilidade a imipenem, amoxicilina-clavulanato, cefotaxime e moxifloxacina das cepas de *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp. através do teste Epsilométrico;
- (e) Detectar os principais determinantes genéticos associados aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos supracitados nas cepas em estudo através da técnica da PCR;
- (f) Determinar os padrões de enterovirulência das cepas de *B. fragilis* isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

(1) Desenho do estudo

No período de maio de 2007 a abril de 2008, foi estabelecida uma coorte de pacientes admitidos no CTI do HUCFF para estudo da epidemiologia da colonização por *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides distasonis*. Todos os pacientes admitidos por um período maior ou igual a 72 h foram incluídos no estudo e acompanhados desde a admissão até a alta. Os pacientes que permaneceram internados por um período menor a 72 h foram excluídos do estudo.

A pesquisa de colonização por microrganismos anaeróbios, principalmente bactérias anaeróbias Gram-negativas, foi realizada em espécimes obtidos de secreção retal coletados semanalmente.

(2) Ambiente do estudo

Este estudo foi realizado no HUCFF. Trata-se de um hospital federal, público, terciário e de ensino, com 449 leitos ativados, contando com cerca de 1.200 internações mensais, 50 das quais no CTI geral. O CTI geral é composto por três unidades: a unidade cirúrgica, onde são internados pacientes em pós-operatório imediato (8 leitos), a unidade clínica, onde são admitidos pacientes cujo motivo de internação seja complicação clínica (6 leitos), e a unidade de convênios, destinada à internação de pacientes atendidos no HUCFF através de convênios particulares (4 leitos).

(3) Aspectos éticos

O presente estudo é observacional. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF sob número 120/06. Houve coleta apenas de amostras clínicas de colonização, obtidas de espécime retal que contêm normalmente uma variedade de microrganismos, inclusive anaeróbios, objeto do presente estudo.

(4) Coleta de espécimes clínicos

Os pacientes incluídos foram acompanhados da admissão no CTI até a alta do setor. Foram realizadas coletas de espécime do reto com auxílio de “swab” previamente umedecido com soro fisiológico (NaCl 0,9%) no primeiro e terceiro dias de internação e depois semanalmente, até a alta ou óbito do paciente.

(5) Procedimentos microbiológicos

Os “swabs” retais recebidos foram inoculados em meio seletivo e estimulante (meio PYG-Bile semi-sólido), que preserva os microrganismos anaeróbios viáveis por vários dias até o momento do processamento. Os “swabs” inoculados em meio seletivo foram ainda incubados por 24h a 37°C para a estimulação do crescimento de microrganismos anaeróbios.

(6) Isolamento e identificação

As culturas incubadas em tubos contendo PYG-Bile semi-sólido foram plaqueadas em meio *Ágar-Bacteroides-Bile-Esculina* (BBE) (LIVINGSTON, KOMINOS & YEE, 1978). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose por 48h a 37°C, em atmosfera contendo uma mistura gasosa de 80% de N₂, 10% de H₂ e 10% de CO₂ (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). Em cada placa, até 5 colônias sugestivas de anaeróbios foram coletadas e inoculadas em caldo “Brain-Heart-Infusion – Pre-Reduced Anaerobically Sterilized” BHI-PRAS (Difco) e mantidas a 37°C por 24h. Posteriormente, foi realizado um teste para determinação do metabolismo respiratório o qual consiste em semear estas culturas em placas de *Ágar Sangue* (AS) (Oxoid) suplementado com vitamina K (menadione) (10 µg/mL, Sigma) e hemina (5 µg/mL, Sigma) (ASS) em triplicata, sendo uma incubada em atmosfera de anaerobiose, outra em microaerofilia e a terceira em aerobiose. As cepas de bactérias anaeróbias obrigatórias foram submetidas à identificação. Inicialmente, as amostras foram identificadas de acordo com testes bacteriológicos baseados na resistência à bile, hidrólise da esculina, coloração pelo

método de Gram, teste de indol, produção de catalase e fermentação de açúcares (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). A identificação foi complementada com o auxílio do sistema API 20A (Biomérieux, S.A., Marcy l’Etoile, França) seguindo as recomendações do fabricante e utilizando-se a chave de identificação descrita na figura 4, para determinação das espécies encontradas.

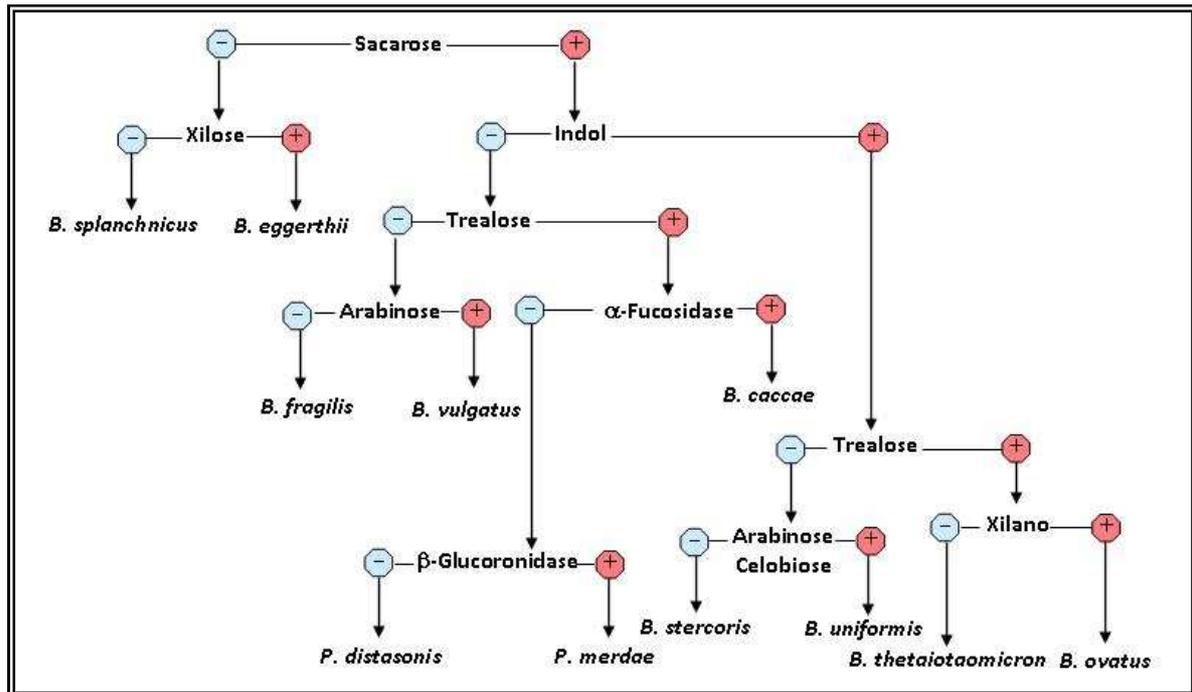


Figura 4. Chave de identificação de espécies de *Bacteroides* resistentes à bile (Figura extraída e modificada de JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002)

(7) Manutenção das cepas

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

(8) 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, foram adicionados 0,3 mL de uma cultura de 24h de crescimento em caldo BHI-PRAS a 37°C. Após o período de incubação de no mínimo 24 h ou até a turvação do tubo, foi realizada a leitura do teste. Os tubos foram agitados para homogeneização do conteúdo sendo transferidos 2 mL para um novo tubo, onde foi adicionado 1 mL de xilol (Vetec), seguido de agitação. O tubo foi deixado em repouso por 2 min e em seguida foi adicionado 0,5 mL de reativo de Ehrlich. O aparecimento de um anel de coloração rósea ou fúcsia dentro de 15 min indicou reação positiva. Cepas de *B. thetaiotaomicron* e *E. coli* foram utilizadas como controle positivo e a cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 como controle negativo (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

(9) Pesquisa da produção de catalase

Para a verificação da produção de catalase, as colônias foram incubadas a 37°C por 48 h em anaerobiose, em placa contendo meio BHI-Ágar. Após a incubação, as culturas foram expostas ao ar atmosférico durante 30 min para a indução enzimática, sendo adicionado H₂O₂ a 3%. A liberação de bolhas indicou a produção de catalase. A cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 foi incluída como controle positivo para este teste (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

(10) Fermentação de carboidratos e hidrólise da esculina

As colônias selecionadas foram submetidas a testes de fermentação de carboidratos para a identificação da espécie. O meio básico para os testes bioquímicos foi o extrato de levedura e peptona – PY (HOLDEMAN, CATO & MOORE, 1977). Foram utilizados os seguintes carboidratos: sacarose (Sigma), L-arabinose (Sigma), trealose (Merck), xilano (Sigma) e esculina (Sigma) nas concentrações finais no meio básico pré-reduzido de 1,0% para o primeiro açúcar e de 0,5% para os demais. O pH da solução foi ajustado para 6,9. A partir de uma cultura em caldo BHI-PRAS de 24 h a 37°C, 0,3 mL

foram inoculados em cada tubo contendo 5 mL do meio básico com os diferentes açúcares. Um tubo contendo apenas o meio básico, sob fluxo de CO₂, foi utilizado como controle negativo. Após a inoculação, os tubos foram incubados por 48 h a 37°C. A leitura do teste foi realizada utilizando-se potenciômetro com eletrodo combinado, sendo as cepas que apresentaram uma variação de pelo menos 0,4 abaixo do pH inicial do meio, consideradas fermentadoras. No caso da confirmação da hidrólise da esculina após a inoculação de 0,3 mL no meio base esculina e incubação por 48 h a 37°C, foram adicionadas algumas gotas de citrato férrico amoniacal. Uma reação positiva é indicada pelo desenvolvimento de uma cor escura. A cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 foi incluída como controle dos testes, sendo positiva para a fermentação da sacarose e hidrólise da esculina e negativa para a fermentação da trealose e arabinose (FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003).

(11) Confirmação da identificação fenotípica

A confirmação da identificação foi feita através do sistema API 20A (Biomérieux, S.A., Marcy l'Etoile, França) seguindo as recomendações do fabricante. As cepas foram reativadas em caldo BHI-PRAS a partir de estoque em BHI-Ágar inclinado, sendo incubadas por 24 h a 37°C (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). Posteriormente, foram semeadas em placas de AS, e após 24 h de incubação a 37°C em jarra de anaerobiose (BBL®), o inóculo foi preparado a partir do raspado dessas culturas. Esse inóculo foi diluído no meio em suspensão, até obter opacidade final similar ao padrão 3 da escala de McFarland. Com a utilização de uma pipeta Pasteur estéril, a suspensão foi inoculada na galeria. Após 48 h de incubação a 37°C em sistema de anaerobiose, foi realizada a leitura e interpretação dos resultados. A identificação foi obtida através da consulta ao sistema "online" API 20A da Biomérieux. A cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 foi incluída como controle para a identificação.

(12) Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

(12.1) Método de diluição em ágar

(12.1.1) Antimicrobianos

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos comercializados pela Sigma: tetraciclina, cefoxitina, clindamicina e metronidazol para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de todas as cepas estudadas. O preparo das soluções estoques dos antimicrobianos bem como as concentrações atingidas pelos mesmos a partir da diluição do estoque (5120 µg/mL), seguiram as normas do CLSI (2007).

(12.1.2) Inóculo

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

(12.1.3) Meio de cultura e preparo das placas

Foi utilizado o meio de cultura Brucella-ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada diluição do meio corresponde a uma placa, cada uma com de 18 mL de Brucella-ágar, 1 mL de sangue e 1 mL da diluição do antimicrobiano correspondente. A concentração final do antimicrobiano no meio atinge a faixa de 256 µg/mL a 0,125 µg/mL. Além das placas com os antimicrobianos, foram preparadas 4 placas sem antimicrobianos como controles de crescimento bacteriano, atestando a qualidade e pureza do teste, antes e após da inoculação.

(12.1.4) Inoculação

As cepas em análise foram inoculadas com o auxílio do replicador de Steers, incluindo duas cepas padrão, *B. fragilis* ATCC 25285 e *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, da seguinte forma:

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

(12.1.5) Incubação

As placas inoculadas foram incubadas a 37°C em jarra (BBL®) em ambiente de anaerobiose, obtido através do sistema anaerocult A (Merck) (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). Duas das placas controle, utilizadas antes e após a inoculação das placas contendo antibiótico, foram incubadas em ambiente de anaerobiose para confirmação da viabilidade, e duas outras em aerobiose, para avaliar a pureza das cepas testadas.

(12.1.6) Leitura e interpretação de resultados

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

(12.2) Método do teste Epsilométrico (teste-E)

(12.2.1) Antimicrobianos

Foram utilizados fitas de Teste-E (ABBIODISK, Solna, Suécia) com imipenem, amoxicilina-clavulanato, cefotaxime e moxifloxacina para a determinação da CIM de cepas selecionadas, segundo recomendações do fabricante. As concentrações finais atingiram a faixa de 256 µg/mL a 0,016 µg/mL.

(12.2.2) Inóculo

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

(12.2.3) Inoculação

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

(12.2.4) Leitura e interpretação de resultados

O valor da CIM foi determinado pelo ponto de inibição da elipse que intercepta a lateral da fita. Dessa forma, quando o crescimento ocorre ao longo da fita, nenhuma elipse é vista e o valor da CIM é relatado como maior (>) que o maior valor na escala. Quando a elipse de inibição está abaixo da fita, o valor é relatado como menor (<) que o menor valor na escala. O teste E gera valores da CIM a partir de uma escala contínua e

pode fornecer resultados entre as diluições convencionais utilizadas pelo CLSI. Quando o valor da CIM estava entre as diluições correspondentes aos limites de sensibilidade recomendados pelo CLSI, o resultado considerado foi aquele da maior concentração mais próxima. Para garantir a confiabilidade dos testes, a cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 foi utilizada para comparação.

(13) Detecção de determinantes de resistência

A presença dos seguintes determinantes de resistência foram investigados em todas as cepas, por meio da técnica de PCR: *tetQ* (proteína que confere proteção ao ribossomo, sítio alvo da tetraciclina), *cepA* (cefalosporinase constitutiva), *cfiA* (carbapenemase), *ermF* (metilase) e *nim* (redutase). Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

(13.1) Extração de DNA cromossômico

O crescimento bacteriano foi obtido a partir de cultura incubada por 24 h em caldo BHI-PRAS ou de colônias obtidas de placas de ágar sangue suplementado (JOUSIMIES-SOMER *et al.*, 2002; FERREIRA, DOMINGUES & UZEDA, 2003). O DNA foi extraído como descrito por Pitcher, Saunders & Owen, em 1989. Brevemente, as células bacterianas foram ressuspensas em 100 µL de tampão TE (10mM de Tris-HCl - Sigma; 1mM/1 EDTA - Sigma, pH 8,0) e foram lisadas em uma solução contendo 500 µL de isotiocianato de guanidina (GibcoBRL – Life Technologies) a 5 M. As suspensões celulares foram agitadas manualmente, e posteriormente incubadas à temperatura ambiente (TA) por 5 a 10 min. Os lisados foram então resfriados no gelo, adicionando-se 250 µL de acetato de amônio (Vetec) a 7,5 M, agitando-se manualmente os tubos e em seguida, incubando-se por 10 min (gelo). Uma solução de 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v - Vetec) foi adicionada e a mistura gentilmente agitada. Em seguida, foi realizada centrifugação por 10 min a 13000 xg. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 430 µL de isopropanol (Vetec) gelado. Os tubos foram, então, invertidos para misturar as soluções. O precipitado fibroso de DNA foi depositado no fundo do tubo por centrifugação a 7000 xg por 1 min. O sedimento de

DNA foi então lavado 5 vezes com etanol (Vetec) 70%. Os tubos permaneceram abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Finalmente, os sedimentos foram diluídos em 50 µL de tampão TE pH 8,0.

(14) Amplificação de determinantes de resistência por PCR

Para a amplificação dos genes *tetQ*, *cepA*, *cfiA*, *ermF* e *nim*, a mistura de reação foi preparada em um volume total de 25 µL contendo DNA, 10mM 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). Os iniciadores, controles positivos e controles negativos que foram utilizados no trabalho estão no quadro 2.

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

Quadro 2: Genes de resistência pesquisados, sequência de iniciadores, controles positivos utilizados nas reações de PCR e tamanho de fragmentos esperados

Gene de resistência	Sequência de iniciadores	Referência	Controle positivo*	Tamanho do fragmento
<i>tetQ</i>	tetQ1: 5`- GGC TTC TAC GAC ATC TAT TA-3`; tetQ2: 5`- CAT CAA CAT TTA TCT CTC TG-3`	SHOEMAKER <i>et al.</i> , 2001	4720-3	658pb
<i>ermF</i>	F1: 5`- CGG GTC AGC ACT TTA CTA TTG- 3`; F2: 5`- GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG- 3`	CHUNG <i>et al.</i> , 1999	4720-3	798 pb
<i>nim</i>	nim3: 5`- ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG-3`; nim5: 5`- GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC – 3`	TRINH & REYSSET, 1996	BF-8	458 pb
<i>cepA</i>	cepA1: 5`- TTT CTG CTA TGT CCTGCC C- 3`; cepA2: 5`- ATC TTT CAC GAA GAC GGC – 3`	GUTACKER <i>et al.</i> , 2000	ATCC-25285	780 pb
<i>cfiA</i>	cfiA1: 5`- CCA TGC TTT TCC CTG TCG CAG-3`; cfiA2: 5`- GGG CTA TGG CTT TGA AGT GC- 3`	PODGLAJEN <i>et al.</i> , 1992	AA10	747 pb

*Amostras da coleção de cultura do laboratório de Biologia de Anaeróbios – IMPPG/UFRJ

(15) Amplificação de determinantes de enterovirulência por PCR

A técnica de PCR foi empregada para determinação de cepas ETBF através da detecção do gene *bft*, e posteriormente foi realizada a categorização das cepas NTBF nos seus principais padrões, quanto à presença da região lateral à ilha de patogenicidade (BfPAI).

A metodologia utilizada para a amplificação do gene *bft* foi aquela descrita por Scotto d'Abusco e colaboradores em 2000, utilizando as sequências iniciadoras BF5 5'-GAT GCT CCA GTT ACA GCT TCC ATT G – 3' e BF6 5'CGC CCA GTA TAT GAC CTA GTT CGT G – 3'. O fragmento esperado para o DNA amplificado de amostras com qualquer uma das três isoformas (BFT-1, BFT-2 e BFT-3) do gene *bft* é de 976 pb. A mistura de reação para amplificação foi a mesma descrita no item 10 desta seção. A cepa ETBF 1432, mantida na coleção de cultura do laboratório de Biologia de Anaeróbios – IMPPG/UFRJ, foi incluída como controle positivo e, a cepa de *B. fragilis* ATCC 25285 como controle negativo.

Para a amplificação da presença da região lateral a BfPAI, que apresenta CTns (CTn9343, CTn 86 ou variantes) foram utilizadas as sequências iniciadoras P1T3 5'- TTC AAC CTG ATC GAT CCG GAA GAT CCG – 3' e P1T7 5'- GCT GGT AGA CTA CCT GAG TAA GGA GTC -3', que geram um fragmento de 1,6 Kb caracterizando as cepas NTBF padrão III. A cepa NTBF 1439 mantida na coleção de cultura do laboratório de Biologia de Anaeróbios – IMPPG/UFRJ, foi incluída como controle positivo e, a cepa de *B. fragilis* 1428 como controle negativo (SCOTTO D'ABUSCO *et al.*, 2000).

(16) Sequenciamento do gene *bft*

O fragmento obtido após a amplificação do gene *bft* foi purificado utilizando-se o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. A amostra foi colocada em um tubo estéril de microcentrífuga com a coluna para purificação, foi adicionado 500 µL de tampão do tampão de captura. O tubo foi centrifugado a 13000 xg por 30 seg, e o conteúdo que passou pela coluna foi descartado. Adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem, seguida de uma nova centrifugação a 13000 xg por 30 seg. O tubo de coleta foi descartado e a

coluna transferida para um novo tubo estéril de microcentrífuga. Foram adicionados 50 µL de tampão de eluição, a minicoluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 min. Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 13000 xg por 1 min, o microtubo contendo o DNA purificado foi estocado a – 20 °C.

Após purificação, as amostras de DNA e uma alíquota dos iniciadores foram enviados para o Centro de Pesquisa do Genoma Humano, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, usando o kit para sequenciamento MegaBACE™1000 and DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase). A sequência obtida foi editada no programa “BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.1” e analisada pelo “BLAST software” (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), sendo comparada com as sequências depositadas no banco de dados “GenBank”.

(17) Análise dados

Todos os dados foram registrados em formulários padronizados e digitados em banco de dados criado no programa Microsoft Access (versão Office XP Professional). Os dados foram analisados no programa Stata 11.0 (STATA Corp. College Station, Texas, EUA). Para análise descritiva dos dados foram calculadas médias, medianas, intervalos interquartis (25-75%), proporções e taxas. As variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste do qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher*. Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste *T Student* ou *Mann-Whitney*. Como estatística de teste foram calculados intervalos de confiança de 95% e os valores de *p*. O valor de *p* foi considerado significativo quando menor que 0,05.

RESULTADOS

(1) Isolamento e identificação

No presente estudo, 197 pacientes admitidos no CTI do HUCFF, durante maio de 2007 e abril de 2008, foram pesquisados quanto a presença de bactérias anaeróbias. Destes pacientes através do método de isolamento escolhida, foi possível recuperar 135 amostras de bactérias anaeróbias, pela coleta de espécimes retais, em 70 deles (35,5%), conforme visto na figura 5.

Na figura 5 vemos também que dentre os 127 pacientes onde não foi possível o isolamento de microrganismos anaeróbios, em 63 (49,6%) não foi observado crescimento após inoculação do espécime retal em meio seletivo para anaeróbios. Em 34 (26,8%) houve crescimento no meio seletivo, sendo as colônias sugestivas de anaeróbios selecionadas para as etapas de identificação, com verificação do metabolismo respiratório anaeróbio, e obtenção de cultura pura. Algumas destas colônias apresentaram crescimento nas placas incubadas em aerobiose, confirmando tratar-se de microrganismos facultativos, sendo conseqüentemente excluídas do estudo. Outras colônias inoculadas em caldo BHI-PRAS aparentemente não apresentaram crescimento após o período de incubação. Mesmo havendo indício de não crescimento, pois o meio permaneceu límpido as amostras foram semeadas em AS, sendo confirmado a ausência de microrganismos. Em 30 (23,6%) houve a formação de “swarming” nas placas, o que impediu a confirmação da presença de microrganismos anaeróbios.

As 135 amostras de anaeróbios supracitados foram identificadas como sendo pertencentes aos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, uma vez que apresentaram crescimento em BBE, metabolismo respiratório anaeróbio e aspecto morfotintorial de bastonetes Gram-negativos. Para confirmação das espécies foram realizados testes fenotípicos e miniaturizados (API 20A).

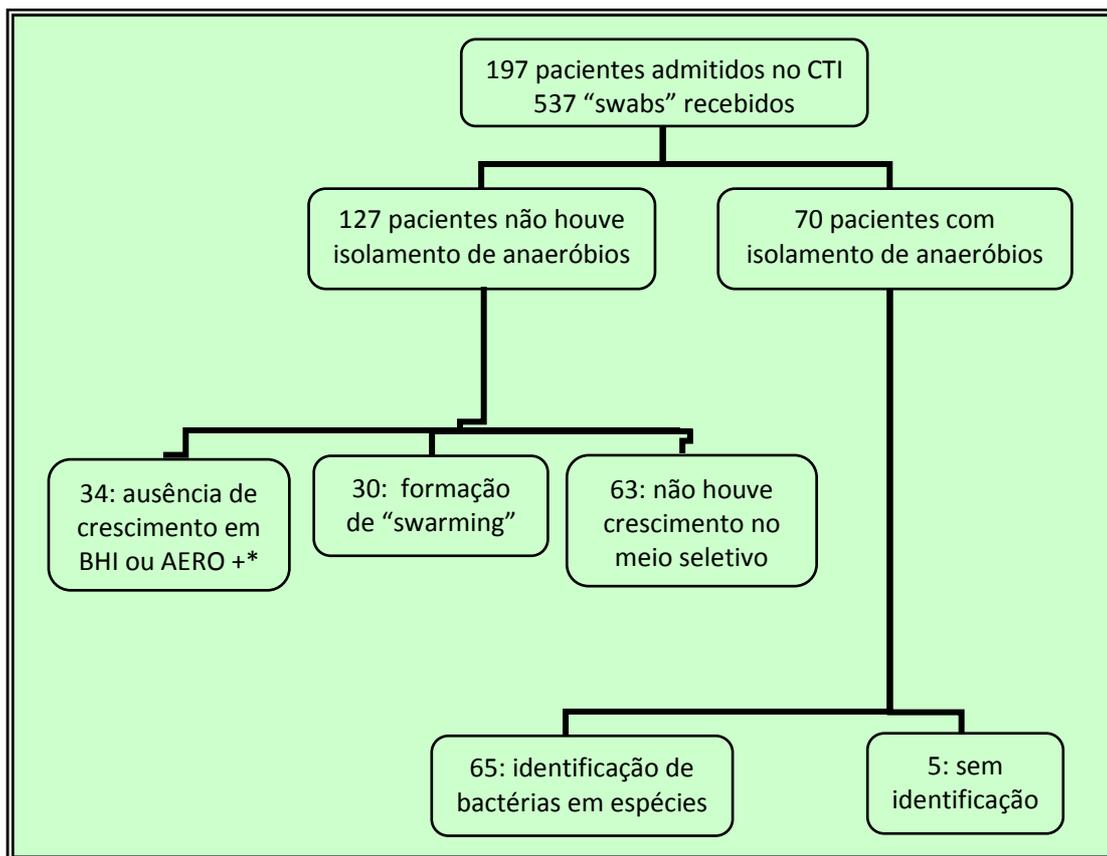


Figura 5. Fluxograma representando os pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008, incluídos no estudo para identificação de bactérias anaeróbias. *AERO +: confirmação da presença de microrganismo com metabolismo respiratório facultativo.

Conforme verificado na tabela 1, dentre as 135 amostras isoladas as espécies mais frequentes foram *B. thetaiotaomicron*, *P. distasonis*, *B. fragilis* e *B. vulgatus*. Dentre as espécies minoritárias foram obtidas *B. uniformis*, *B. caccae*, *B. ovatus*, *B. stercoris* e *B. eggerthii*. Como as espécies *B. ovatus* e *B. thetaiotaomicron* são semelhantes fenotipicamente, algumas amostras não foram discriminadas através da metodologia utilizada, sendo estas referidas neste trabalho como *B. ovatus/thetaiotaomicron*. Doze amostras perderam a viabilidade ao longo do trabalho, não sendo possível chegar a sua identificação. Com isto, no final do estudo foram obtidas 123 amostras de 65 pacientes. Em 12 pacientes (18,5%) foram encontradas duas espécies de anaeróbios, e em 6 pacientes (9,2%) foram encontradas três espécies. Nestes 18 pacientes, em que foram encontradas múltiplas espécies anaeróbias, a espécie mais frequentemente isolada foi *B. thetaiotaomicron* (10 pacientes), seguida de *B. vulgatus* (9 pacientes), *P. distasonis* (6

pacientes) e *B. fragilis* (5 pacientes). Como representado na tabela 1, alguns pacientes apresentaram a mesma espécie isolada em diferentes coletas.

Tabela 1. Espécies isoladas de pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008

Espécie	N. de pacientes/ No. amostras isoladas						
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	Total
<i>B. thetaiotaomicron</i>	19/19	3/6	2/6	0/0	0/0	0/0	24/31
<i>P. distasonis</i>	12/12	5/10	1/3	0/0	0/0	0/0	18/25
<i>B. fragilis</i>	11/11	3/6	0/0	1/4	1/5	1/6	17/32
<i>B. vulgatus</i>	10/10	2/4	1/3	0/0	0/0	0/0	13/17
<i>B. uniformis</i>	5/5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	5/5
<i>B. caccae</i>	2/2	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	3/4
<i>B. ovatus</i>	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3
<i>B. ovatus/thetaiotaomicron</i>	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3
<i>B. stercoris</i>	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/2
<i>B. eggerthii</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Sem identificação	10/10	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	11/12

* Número da coleta efetuada em um mesmo paciente

(2) Análise descritiva: pacientes x bactérias anaeróbias

Setenta pacientes (35,5%) apresentaram isolamento de algum microrganismo anaeróbio e 127 (64,5%) não apresentaram. A faixa etária dos pacientes do estudo variou entre 9,3 a 93,6 anos. Um total de 114 (57,9%) pacientes era do sexo feminino. A mediana dos dois grupos, pacientes que apresentaram anaeróbio frente aos que não houve isolamento foi semelhante, assim como a porcentagem de mulheres em cada um dos grupos.

Quando analisado o tempo de internação no HUCFF antes da admissão no CTI, foi observado que alguns pacientes foram diretamente admitidos no CTI, enquanto outros permaneceram internados por até 199 dias (gráfico 1). Pode ser observado ainda que os pacientes que apresentaram bactérias anaeróbias permaneceram internados por um tempo menor, cerca de 2 dias, contra 6 dias do grupo de pacientes sem isolamento de anaeróbios.

Conforme visto na tabela 2, os motivos de internação no CTI foram separados em cirurgia eletiva, de urgência, clínico e em alguns casos não foi determinado, sendo designado como indeterminado. Dentre os 70 pacientes com isolamento de anaeróbios foi verificada uma distribuição semelhante quanto ao motivo de internação. O tempo de internação no CTI desde a admissão até o desfecho (alta ou óbito) variou de 1 a 96 dias. Dois grupos, pacientes com isolamento de anaeróbio e pacientes sem isolamento, apresentaram uma distribuição semelhante em relação ao tempo de internação, sendo de 9,5 dias para o primeiro grupo e de 8 dias para o segundo.

Sessenta e um pacientes (31,0%) tiveram como desfecho o óbito, e 136 (69,0%) tiveram alta. Um número maior de pacientes em que não houve isolamento de anaeróbio veio a óbito, quando comparado com o grupo em que houve isolamento. Na tabela 3 é possível observar as características demográficas e clínicas da população do estudo.

Como descrito anteriormente, as espécies predominantes neste estudo foram *B. fragilis* e *B. thetaiotaomicron*. Desta forma, foi realizada uma análise comparativa das características dos pacientes com isolamento dessas espécies (Tabela 4). A mesma tendência é encontrada entre os pacientes que apresentaram isolamento das espécies predominantes e aqueles em que não houve isolamento de anaeróbios, perfil este semelhante ao descrito na tabela 3.

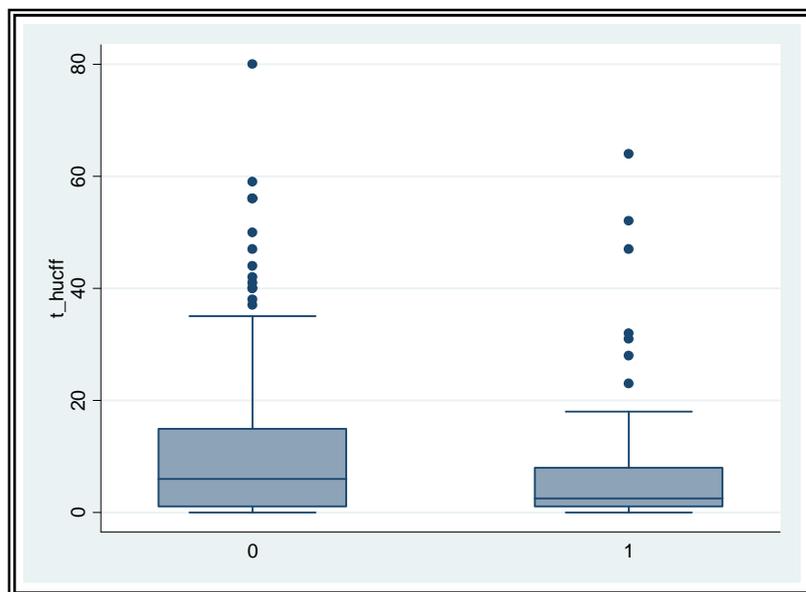


Gráfico 1. Tempo de internação em dias no HUCFF (t_hucff) antes da admissão no CTI conforme isolamento de anaeróbios em 197 pacientes. Pacientes com isolamento de bactérias anaeróbias (1) e sem bactérias anaeróbias (0). Para fins de melhor visualização do gráfico, 2 pacientes que apresentaram tempos de internação extremos (105 e 199 dias), e que não apresentaram isolamento de anaeróbios, foram retirados. O aspecto do gráfico com a inclusão destes dois pacientes ficou semelhante, a este apresentado.

Tabela 2. Distribuição dos motivos de internação dos 197 pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008

Motivo da internação	Número e (%) de pacientes	
	Total	Com isolamento de anaeróbios
Cirurgia eletiva	62 (31,5)	23 (37,0)
Cirurgia de urgência	46 (23,4)	23 (50,0)
Clínico	85 (43,1)	24 (28,2)
Indeterminado	4 (2,0)	0
Total	197	70

Tabela 3. Características observadas em pacientes com isolamento de bactérias anaeróbias num total de 197 pacientes admitidos no CTI do HUCFF entre maio de 2007 e abril de 2008

Variável	Parâmetro*		RC (IC95%)	p
	Pacientes com isolamento de anaeróbios	Pacientes sem isolamento de anaeróbios		
Pacientes	70 (35,5)	127 (64,5)	-	-
Idade em anos	58,7 (52,8-70,6)	59,2 (48,3-69,9)	-	-
Sexo feminino	35 (50,0)	79 (62,2)	0,6 (0,3-1,1)	0,096
Tempo de internação no HUCFF antes do CTI em dias	2,5 (1,0-8,0)	6,0 (1,0-17,0)	-	0,013
Motivo de internação: clínico	24 (34,3)	61 (49,6)	0,5 (0,2-1,0)	0,039
Motivo de internação: cirurgia urgência	23 (32,9)	23 (18,7)	2,1 (1,0 – 4,4)	0,026
Tempo de internação no CTI em dias	9,5 (5,0-30,0)	8 (3,0-21,0)	-	0,085
Óbito	14 (20,0)	47 (37,0)	0,4 (0,2-0,9)	0,013

*Mediana (intervalo interquartilico) ou número (%). RC: razão de chances; IC 95: intervalo de confiança com 95 % de probabilidade

Tabela 4. Características observadas em pacientes com isolamento de *Bacteroides fragilis* ou *Bacteroides thetaiotaomicron* num total de 186 indivíduos submetidos à pesquisa de anaeróbios

Variável	<i>B. fragilis</i> (N 17)			<i>B. thetaiotaomicron</i> (N 24)		
	Parâmetro*	RC (IC 95%)	<i>p</i>	Parâmetro*	RC (IC 95%)	<i>p</i>
Pacientes	17 (9,1)	-	-	24 (12,9)	-	-
Idade em anos	55,6 (52,9 – 70,6)	-	0,80	61,1 (54,1 – 67,1)	-	0,50
Sexo feminino	8 (47,0)	0,6 (0,2 – 1,8)	0,30	10 (41,7)	0,4 (0,2 – 1,2)	0,07
Tempo de internação no HUCFF antes do CTI em dias	2,0 (1,0 – 3,0)	-	0,06	4,5 (2 – 8,5)	-	0,29
Motivo de internação: clínico	4 (23,5)	0,3 (0,1 – 1,2)	0,06	11 (45,8)	1,0 (0,4 – 2,7)	0,93
Motivo de internação: cirurgia urgência	8 (47,0)	3,5 (1,1 – 11,2)	0,01	8 (33,3)	1,8 (0,6 – 5,2)	0,17
Tempo de internação no CTI em dias	9,0 (4,0 – 25,0)	-	0,47	10,0 (3,5 – 34,0)	-	0,39
Óbito	4 (6,7)	0,6 (0,1 – 2,1)	0,41	5 (8,5)	0,5 (0,1 – 1,5)	0,21

*Mediana (intervalo interquartilico) ou número (%) dos pacientes em que houve isolamento de microrganismo indicado com aqueles sem isolamento de microrganismo anaeróbio. RC: razão de chances; IC 95: intervalo de confiança com 95 % de probabilidade

(3) Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Todas as 123 amostras incluídas no estudo foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 8 antimicrobianos pelo método de diluição em ágar (cefexitina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina) e pelo teste-E (amoxicilina/clavulanato, imipenem, cefotaxime e moxifloxacina). Na análise destes resultados, foram calculadas proporções que utilizaram diferentes coleções de amostras. Estas diferentes coleções são descritas a seguir.

(i) Para o cálculo da taxa global de resistência a antimicrobianos, apenas uma amostra por cada um dos 65 pacientes do estudo foi selecionada, ressaltando que no caso de isolamento de mais de uma espécie do mesmo paciente, todas foram selecionadas. No caso dos pacientes a partir dos quais várias amostras haviam sido obtidas, a amostra com resistência ao maior número de antimicrobianos foi selecionada. Este procedimento foi realizado para evitar que amostras com o mesmo perfil isoladas de um mesmo paciente alterassem o cálculo final da frequência de resistência.

(ii) Para comparação entre as taxas de resistência obtidas entre as diferentes espécies identificadas no estudo, foi selecionada uma amostra de cada paciente em cada grupo. Desta forma, 24 amostras de *B. thetaiotaomicron*, 18 amostras de *P. distasonis*, 17 amostras de *B. fragilis* e 13 amostras de *B. vulgatus* foram selecionadas como grupos majoritários, completando com 17 amostras de espécies minoritárias.

(iii) Os perfis de resistência foram descritos para a totalidade das amostras (tabela 5), sendo apresentado posteriormente em separado para cada um dos grupos majoritários (tabela 6, 7, 8 e 9).

Como observado na tabela 5, a maior taxa de resistência foi detectada para a tetraciclina (77,5%), e em seguida a clindamicina (55,1%), a cefexitina (24,7%) com valores próximos aos obtidos para o cefotaxime (21,3%), e do moxifloxacina (22,5%).

Conforme mostrado na tabela 6, a espécie *B. thetaiotaomicron* apresentou as maiores taxas de resistência, obtendo-se para a clindamicina uma taxa de 87,5%, para a cefoxitina de 58,3% e para o cefotaxime de 45,8%.

A tabela 7 mostra que a espécie *P. distasonis* também apresentou altas taxas de resistência, como obtido para a espécie *B. thetaiotaomicron*, sendo detectada para a clindamicina uma taxa de 77,8% de resistência e para o moxifloxacina de 44,4%.

Na tabela 8, observa-se que a espécie *B. fragilis* apresentou baixos níveis de resistência, detectando-se uma taxa de apenas 17,6% de resistência para a clindamicina, sendo todas as amostras consideradas susceptíveis a cefoxitina e ao cefotaxime.

A tabela 9 mostra que a espécie *B. vulgatus*, similarmente ao que aconteceu com a espécie *B. fragilis*, apresentou pequenas taxas de resistência, sendo detectada apenas uma taxa de 15,4% de resistência para a clindamicina, cefoxitina e cefotaxime.

As amostras da espécie *B. fragilis* foram o grupo que apresentou o maior número de isolamentos sucessivos no mesmo paciente em diferentes coletas. A tabela 10 ilustra o perfil de amostras isoladas de dois pacientes (PC 27 e PC 52) em diferentes coletas. As amostras do paciente PC 27 apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, já as amostras do paciente PC 52 apresentaram resistência a dois antimicrobianos, sendo considerado as com nível intermediário, em todas as amostras coletadas, demonstrando assim o perfil semelhante das amostras dos pacientes.

Adicionalmente, amostras multirresistentes (MR), que apresentam resistência concomitante a pelo menos três antimicrobianos diferentes, foram detectadas no presente estudo. A espécie com maior frequência de amostras MR foi *B. thetaiotaomicron* com 18 amostras (75%) de 24, e quando considerado a MR a partir da resistência a pelo menos dois antimicrobianos, o número de amostras MR subiria para 23 amostras (95,9%).

A segunda espécie com maior número de amostras MR foi *P. distasonis* com 6 amostras (33,3%) de 18 considerando três antimicrobianos. Novamente caso fosse considerada resistência a dois antimicrobianos, a MR subiria para 16 (88,9%).

A terceira espécie foi *B. vulgatus* com 2 amostras (15,4%) de 13. A espécie *B. fragilis* foi uma das espécies que apresentaram menor frequência de amostras MR, apenas 2 amostras (11,7%) MR de um total de 17 isoladas.

(4) Ensaio da PCR

Todas as 123 amostras incluídas no estudo foram avaliadas quanto à presença de determinantes de resistência. Na análise destes resultados, foram calculadas as mesmas proporções que foram utilizadas para determinação do perfil de susceptibilidade. No caso dos pacientes a partir dos quais várias amostras haviam sido obtidas, aquela amostra com detecção de um maior número de genes de resistência foi selecionada. Este procedimento foi realizado, mais uma vez, para evitar que amostras com o mesmo perfil isoladas de um mesmo paciente alterassem o cálculo final da frequência da presença dos genes.

Conforme mostrado na tabela 11, concernente às taxas de detecção dos determinantes de resistência, foi verificado que dentre as 89 amostras selecionadas, 28 (31,5%) albergavam o gene *cepA*, sendo 15 destas amostras (53%) pertencentes à espécie *B. fragilis*, seguida de 5 amostras (18%) da espécie *P. distasonis* e de 3 amostras (11%) da espécie *B. thetaiotaomicron*. As 5 amostras restantes estavam distribuídas nas espécies minoritárias, não sendo detectado nas espécies, *B. caccae*, *B. stercoris* e *B. eggerthii*. Duas das 28 amostras que albergavam o gene *cepA*, albergavam simultaneamente o gene *cfiA*. Ao todo 16 amostras (18%) possuíam o gene *cfiA*, sendo 4 amostras (25%) pertencentes a espécie *B. thetaiotaomicron*, seguida de 3 (19%) da espécie *P. distasonis* e de 2 (12%) da espécie *B. fragilis*. As 5 amostras restantes estavam distribuídas nas espécies minoritárias, não sendo detectado nas espécies, *B. caccae* e *B. uniformis*.

O gene *tetQ* foi detectado em 79 amostras (89%), estando presente em todas as espécies no presente estudo. As espécies *P. distasonis* e *B. vulgatus* apresentaram a maior frequência de detecção deste gene, associado à resistência a tetraciclina, uma vez que dentre as espécies mencionadas apenas uma de 18 e de 13 amostra,

respectivamente, não apresentou o gene referido. Dentre as amostras que albergavam o gene *tetQ*, 13 amostras apresentaram também o gene *ermF*. Quando analisadas em relação à presença do gene *nim*, foi verificado que apenas duas amostras (2%) albergavam este gene, ambas pertencentes a espécie *B. thetaiotaomicron*.

(5) Perfil de susceptibilidade X determinantes de resistência

Conforme observado nas tabelas 6, 7, 8 e 9, que mostram a distribuição dos genes de resistência em espécies majoritárias deste estudo, 22 amostras apresentaram resistência a cefoxitina. Destas amostras apenas quatro albergavam o gene *cepA*, e três amostras o gene *cfiA*. Uma situação semelhante foi observada para o cefotaxime, em que 19 amostras apresentaram resistência, mas apenas 5 destas albergavam o gene *cepA* e 3 o gene *cfiA*. Dentre as amostras que albergavam o gene *cepA* e *cfiA* todas mostraram-se uniformemente susceptíveis à associação amoxicilina/clavulanato, não sendo observado uma correlação entre a presença do gene e a resistência.

Já em relação a tetraciclina pode ser constatado uma correlação entre resistência e a presença do gene *tetQ*, uma vez que de 69 amostras resistentes, apenas 6 não albergavam o gene pesquisado.

Das 49 amostras resistentes à clindamicina, apenas 8 foram positivas para o gene *ermF*, enquanto 5 amostras que albergavam o gene mostraram-se susceptíveis a clindamicina.

As amostras albergando o gene *nim*, mostraram-se uniformemente susceptíveis ao metronidazol. No entanto, as três amostras que apresentaram sensibilidade reduzida ao metronidazol (CIM 4 mg/L), não albergavam o gene *nim*.

(6) Perfil de enterovirulência

Na tabela 8, na qual é possível observar a distribuição do perfil de enterovirulência, verifica-se que 3 amostras (17,6%) da espécie *B. fragilis* albergavam o gene *bft*, sendo denominadas ETBF. O prontuário dos 3 pacientes foi analisado quanto à possibilidade da presença de fezes diarréicas. Dentre os três pacientes, apenas um (PC

25 bf) apresentou diarreia; os outros dois (PC 14.1 bf e PC 20.2 bf) apresentaram constipação no período pesquisado. Após o sequenciamento do fragmento do gene *bft* detectado por PCR, as sequências nucleotídicas obtidas mostraram similaridade de 99,9% com a sequência *bft-1*, sendo consideradas pertencentes da isoforma BFT-1. As 14 amostras restantes da espécie *B. fragilis* foram submetidas a ensaios de PCR para confirmação do padrão não toxigênico das amostras. Destas, em 3 amostras (17,6%) foi detectada a região lateral à ilha de patogenicidade (BfPAI), sendo permitido categorizá-las como NTBF padrão III. As demais (11 amostras) foram definidas como pertencentes ao padrão NTBF II.

Tabela 5. Susceptibilidade a antimicrobianos de 89 amostras de *Bacteroides spp.* e *Parabacteroides distasonis* isoladas de pacientes internados na CTI do HUCFF

Agentes antimicrobianos	Ponto de corte* (mg/L)	CIM (mg/L)					
		Varição	50%	90%	R	I	S
Amoxicilina/ clavulanato	16,0	0,125 – 8,0	0,5	2,0	0	3 (3,4)	86 (96,6)
Cefoxitina	64,0	2,0 – 256	16,0	64,0	22 (24,7)	22 (24,7)	45 (50,6)
Cefotaxime	64,0	0,125 – >256	8,0	> 256	19 (21,3)	12 (13,5)	58 (65,2)
Clindamicina	8,0	0,125 – >256	8,0	> 256	49 (55,1)	10 (11,2)	30 (33,7)
Imipenem	16,0	0,125 – 1,0	0,25	0,5	0	0	89 (100)
Metronidazol	32,0	0,125 – 8,0	1,0	2,0	0	0	89 (100) ^a
Moxifloxacin	8,0	0,125 - >32	2,0	> 32	20 (22,5)	5 (5,6)	64 (71,9)
Tetraciclina	16,0	0,125 – 64	32,0	64,0	69 (77,5)	2 (2,2)	18 (20,3)

*Limite para determinação de resistência (>), segundo o CLSI, 2007. ^aTrês amostras apresentaram sensibilidade reduzida (CIM 4,0 mg/L). R: resistência; I: intermediário; S: susceptível.

Tabela 6: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de *Bacteroides thetaiotaomicron* isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008

Amostras	CLI	TET	CFX	MET	A/CL	IMP	CFT	MXF	cepA	cfiA	tetQ	ermF	nim
PC 83 bt	R	R	I	S	S	S	R	I	-	-	+	-	-
PC 12.2 bt	R	R	R	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-
PC 41 bt	R	R	R	S	S	S	I	S	-	-	+	-	-
PC 67 bt	R	R	I	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-
PC 37 bt	R	R	R	S	S	S	I	S	-	+	+	-	-
PC 17.2 bt	R	R	I	S	S	S	I	S	-	-	+	-	+
PC 26 bt	R	R	R	S	S	S	I	R	-	-	-	-	-
PC 36 bt	I	R	R	S	S	S	R	I	-	+	+	-	-
PC 45 bt	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 68.1 bt	R	S	I	S	S	S	S	R	-	-	+	-	-
PC 88.1 bt	R	R	R	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-
PC 48 bt	R	R	R	S	S	S	R	S	+	-	+	-	-
PC 31 bt	R	R	R	S	I ^a	S	R	R	-	-	+	-	-
PC 63.3 bt	R	S	R	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-
PC 53 bt	R	R	I	S	S	S	R	S	+	-	+	-	-
PC 55 bt	R	R	R	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 75 bt	R	R	S	S	S	S	I	S	-	-	-	-	-
PC 35.1 bt	I	S	R	S	S	S	R	S	-	+	+	-	-
PC 56 bt	R	R	S	S	S	S	S	S	-	-	+	+	+
PC 42 bt	R	R	R	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-
PC 87 bt	R	R	S	S	S	S	S	R	-	-	+	+	-
PC 15.1 bt	R	R	I	S	S	S	R	R	-	+	+	-	-
PC 47 bt	R	R	R	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-
PC 46 bt	R	R	R	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
Total*	21(87,5)	20(83,3)	14(58,3)	0	0^a	0	11(45,8)	5(20,8)	3(12,5)	4(16,7)	21(87,5)	2(8,3)	2(8,3)

*N e (%): resistência aos antimicrobianos analisados e da detecção dos genes de resistência. ^aSusceptibilidade intermediária. R- resistência; I – intermediário; S – susceptíveis; CLI – Clindamicina; TET – Tetraciclina; CFX – Cefoxitina; MET – Metronidazol; A/CL – Amoxicilina/ácido clavulânico; IMP – Imipenem; CFT – Cefotaxime; MXF – Moxifloxacina; P + presença do gene; N – ausência do gene.

Tabela 7: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de *Parabacteroides distasonis* isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008

Amostras	CLI	TET	CFX	MET	A/CL	IMP	CFT	MXF	cepA	cfiA	tetQ	ermF	nim
PC 71 pd	I	R	S	S	S	S	I	R	+	-	-	-	-
PC 4 pd	R	R	I	S	S	S	S	S	+	-	+	+	-
PC 59 pd	R	R	R	S	S	S	R	S	+	-	+	-	-
PC 72 pd	R	R	S	S	S	S	S	R	-	-	+	-	-
PC 13.1 pd	R	R	S	S	S	S	S	R	-	+	+	+	-
PC 54.1 pd	R	S	S	S	S	S	S	R	+	-	+	-	-
PC 84 pd	S	R	S	S	S	S	S	R	-	-	+	-	-
PC 18.1 pd	R	S	S	S	S	S	S	R	-	+	+	-	-
PC 73 pd	R	R	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 65 pd	R	R	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 64.2 pd	R	R	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 70 pd	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 74.2 pd	R	R	R	S	S	S	R	S	+	-	+	-	-
PC 76 pd	R	R	I	S	S	S	R	R	-	-	+	-	-
PC 16.1 pd	R	R	S	S	S	S	S	S	-	+	+	+	-
PC 49 pd	R	R	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 81.1 pd	I	S	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 11 pd	R	R	I	S	S	S	S	R	-	-	+	+	-
Total*	15(83,4)	14(77,8)	2(11,1)	0	0	0	3(16,7)	8(44,4)	5(27,7)	3(16,7)	17(94,4)	4(22,2)	0

*N e (%): resistência aos antimicrobianos analisados e da detecção dos genes de resistência. ^aSusceptibilidade intermediária. R- resistência; I – intermediário; S – susceptíveis; CLI – Clindamicina; TET – Tetraciclina; CFX – Cefoxitina; MET – Metronidazol; A/CL – Amoxicilina/ácido clavulânico; IMP – Imipenem; CFT – Cefotaxime; MXF – Moxifloxacina; P + presença do gene; N – ausência do gene.

Tabela 8: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência e de enterovirulência de amostras de *Bacteroides fragilis* isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008

Amostras	CLI	TET	CFX	MET	A/CL	IMP	CFT	MXF	cepA	cfiA	tetQ	ermF	nim	bft	NTBF III*
PC 78 bf	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 5 bf	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-
PC 77 bf	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-	+
PC 2.1 bf	S	R	S	S	S	S	I	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 25 bf	S	R	S	S	S	S	S	I	+	+	+	+	-	+	-
PC 79 bf	S	S	S	S ^a	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-	+
PC 88.2 bf	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 19.1 bf	I	R	S	S	S	S	S	R	+	-	+	-	-	-	-
PC 10 bf	R	R	S	S	S	S	S	R	+	-	+	-	-	-	+
PC 69.2 bf	I	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 38 bf	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 39 bf	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 23.1 bf	R	R	S	S	S	S	I	R	-	+	+	-	-	-	-
PC 3.2 bf	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 14.1 bf	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	+	-
PC 80 bf	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 20.2 bf	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	+	-
Total*	3(17,6)	13(76,5)	0	0^a	0	0	0	3(17,6)	15(88,3)	2(11,8)	15(88,3)	1(5,9)	0	3(17,6)	3(17,6)

*N e (%): resistência aos antimicrobianos analisados e da detecção dos genes de resistência. ^aSensibilidade reduzida (CIM 4 mg/L). R- resistência; I – intermediário; S – susceptíveis; CLI – Clindamicina; TET – Tetraciclina; CFX – Cefoxitina; MET – Metronidazol; A/CL – Amoxicilina/ácido clavulânico; IMP – Imipenem; CFT – Cefotaxime; MXF – Moxifloxacina; + presença do gene; - ausência do gene. Caracterização das amostras não toxigênicas padrão III através da detecção região lateral a ilha de patogenicidade do *B. fragilis* (BfPAI).

Tabela 9: Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de *Bacteroides vulgatus* isoladas de pacientes internados no CTI do HUCFF no período de maio de 2007 a abril de 2008

Amostras	CLI	TET	CFX	MET	A/CL	IMP	CFT	MXF	cepA	cfiA	tetQ	ermF	nim
PC 1.2 bv	S	R	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 12.1 bv	S	R	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-
PC 29 bv	S	R	S	S ^a	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 66.1 bv	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	+	+	-
PC 60 bv	R	R	R	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-
PC 62 bv	R	R	S	S	S	S	S	R	-	-	+	-	-
PC 21.2 bv	S	R	S	S	S	S	S	R	-	+	+	+	-
PC 63.2 bv	S	R	I	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-
PC 57 bv	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-
PC 9 bv	S	R	S	S	S	S	S	R	-	-	+	+	-
PC 81.2 bv	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
PC 40 bv	I	S	R	S	S	S	R	S	-	-	+	-	-
PC 20.3 bv	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-
Total*	2(15,4)	11(84,6)	2(15,4)	0^a	0	0	2(15,4)	3(23,1)	1(7,7)	2(15,4)	12(92,3)	3(23,1)	0

*N e (%): resistência aos antimicrobianos analisados e da detecção dos genes de resistência. ^a Sensibilidade reduzida (CIM 4 mg/L). R- resistência; I – intermediário; S – susceptíveis; CLI – Clindamicina; TET – Tetraciclina; CFX – Cefoxitina; MET – Metronidazol; A/CL – Amoxicilina/ácido clavulânico; IMP – Imipenem; CFT – Cefotaxime; MXF – Moxifloxacina; + presença do gene; – ausência do gene.

Tabela 10: Demonstração do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença de genes de resistência de amostras de *Bacteroides fragilis* isoladas de pacientes (PC 27 e PC 52) internados no CTI do HUCFF a partir dos quais várias amostras foram obtidas

Pacientes	Amostras	Data de isolamento	CLI	TET	CFX	MET	A/CL	IMP	CFT	MXF	cepA	cfiA	tetQ	ermF	nim	bft	NTBF III
PC 27	PC 3.1 bf	21/5/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-	-
PC 27	PC 3.2 bf	21/5/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 27	PC 3.3 bf	21/5/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-	-
PC 27	PC 6.1 bf	23/5/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 27	PC 6.2 bf	23/5/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 27	PC 8.1 bf	13/6/2007	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	-	-	-	-
PC 52	PC 23.1 bf	29/6/2007	R	R	S	S	S	S	I	R	-	+	+	-	-	-	-
PC 52	PC 23.2 bf	29/6/2007	S	R	I	S	S	S	S	I	-	+	+	-	-	-	-
PC 52	PC 28.1 bf	2/7/2007	S	R	S	S	S	S	S	R	-	+	+	-	-	-	-
PC 52	PC 28.2 bf	2/7/2007	S	R	S	S	S	S	S	R	-	+	+	-	-	-	-
PC 52	PC 32 bf	4/7/2007	R	R	S	S	S	S	S	R	+	+	+	-	-	-	-

R- resistência; I – intermediário; S – susceptíveis; CLI – Clindamicina; TET – Tetraciclina; CFX – Cefoxitina; MET – Metronidazol; A/CL – Amoxicilina/ácido clavulânico; IMP – Imipenem; CFT – Cefotaxime; MXF – Moxifloxacina; + presença do gene; - ausência do gene.

Tabela 11. Distribuição dos determinantes de resistência nas 89 amostras de *Bacteroides spp.* e *Parabacteroides distasonis* isoladas de pacientes internados na CTI do HUCFF

Espécies (N.)	Número e (%) de amostras portadoras do gene indicado				
	<i>cepA</i>	<i>cfiA</i>	<i>tetQ</i>	<i>ermF</i>	<i>nim</i>
<i>B. fragilis</i> (17)	15 (88,2)	2 (11,8)	14 (82,4)	1 (5,9)	0
<i>B. thetaiotaomicron</i> (24)	3 (12,5)	4 (16,7)	21 (87,5)	2 (8,3)	2 (8,3)
<i>P. distasonis</i> (18)	5 (27,8)	3 (16,7)	17 (94,4)	4 (22,2)	0
<i>B. vulgatus</i> (13)	1 (7,7)	2 (15,4)	12 (92,3)	3 (23,0)	0
Outros* (17)	4 (23,5)	5 (29,4)	15 (88,2)	3 (17,6)	0
Total (89)	28 (31,4)	16 (18,0)	79 (88,8)	13 (14,6)	2 (2,2)

*Outros são representados pelas espécies minoritárias: *B. uniformis*, *B. ovatus*, *B. ovatus/thetaiotaomicron*, *B. caccae*, *B. stercoris* e *B. eggerthii*.

(1) Análise descritiva: pacientes x bactérias anaeróbias

Sabe-se que a administração de agentes antimicrobianos ocasiona distúrbios no equilíbrio ecológico entre o hospedeiro e seus microrganismos. A extensão do distúrbio depende do espectro de ação, da dose, da via de administração, das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antimicrobiano, e da inativação “in vivo” do agente. A absorção incompleta de drogas administradas via oral pode influenciar na composição da microbiota intestinal. Os distúrbios clínicos mais frequentes são infecções fúngicas e diarreias, cessando geralmente com o final do tratamento. Uma microbiota bem balanceada previne o estabelecimento de bactérias resistentes, reduzindo o risco do espalhamento de cepas resistentes entre pacientes e a disseminação de determinantes de resistência (SULLIVAN, EDLUND & NORD, 2001).

No presente estudo, foram acompanhados os pacientes admitidos no CTI do HUCFF durante o período compreendido entre maio de 2007 e abril de 2008. Setenta pacientes apresentaram isolamento de microrganismos anaeróbios, tendo como principais espécies identificadas *B. thetaiotaomicron*, *P. distasonis*, *B. vulgatus* e *B. fragilis*. Essas espécies são consideradas comensais majoritárias do trato intestinal. Entretanto, a sua prevalência neste ambiente não explicaria por si só o seu maior isolamento. Aliando o conhecimento de que essas mesmas espécies vêm gradativamente apresentando um aumento nas taxas de resistência, pode-se explicar a maior prevalência delas no ambiente hospitalar. Por outro lado, uma das prováveis razões para o não isolamento de microrganismos anaeróbios em 64% dos pacientes, pode ser devido ao uso constante de antimicrobianos nesta população ocasionando desequilíbrio na microbiota intestinal. Alguns estudos demonstraram que o uso de penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, entre outras classes de antimicrobianos, geram distúrbios na microbiota gastrointestinal (SULLIVAN, EDLUND & NORD, 2001).

Através da análise de algumas variáveis estudadas, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que apresentaram microrganismos anaeróbios identificados (n=70) e aqueles sem isolamento (n=127), em relação ao sexo, à idade e ao tempo de internação no CTI. Quanto ao período de permanência no HUCFF anterior à admissão no CTI, observou-se que os pacientes que tiveram microrganismo anaeróbio isolado apresentaram mediana de tempo de internação menor (2,5 dias) do que os que não apresentaram anaeróbio. Pacientes que permaneceram por um tempo menor no HUCFF, geralmente fazem menos uso de antimicrobianos, o que pode explicar a maior incidência de isolamento entre este grupo, uma vez que a microbiota intestinal estaria ainda equilibrada.

Os motivos de internação foram separados em 4 grupos: clínico, cirurgia eletiva, cirurgia de urgência e indeterminado. Entre os pacientes que apresentaram microrganismo anaeróbio, a presença de uma condição clínica como motivo de internação foi menos frequente do que entre aqueles sem isolamento. Esta associação negativa pode ter sido devida ao uso frequente de antimicrobianos. Por sua vez os pacientes com cirurgia de urgência apresentaram uma associação positiva, pois permaneceram menos tempo no hospital antes da admissão no CTI, e portanto, tiveram menos chance de exposição a antimicrobianos, que poderiam comprometer a microbiota anaeróbia.

Com relação ao desfecho, duas possibilidades poderiam ser observadas: o paciente obteve alta ou veio a óbito. Os pacientes que apresentaram anaeróbio isolado tiveram associação negativa com óbito, ou seja, evoluíram a óbito com menor frequência comparado com os pacientes sem isolamento de anaeróbio. Desta forma, o isolamento de anaeróbio foi associado a uma menor gravidade do paciente. Foi realizada uma análise comparativa entre *B. fragilis* e *B. thetaiotaomicron*, sendo observada a mesma tendência detectada nos pacientes que apresentaram anaeróbios. No caso de *B. fragilis* merece destaque a maior expressão da associação positiva entre pacientes com esta espécie e como motivo de internação a cirurgia de urgência, mesmo com o menor número de casos, manteve-se estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

(2) Susceptibilidade a antimicrobianos

No Brasil, ainda é reduzido o número de grupos que investigam os níveis de susceptibilidade de bactérias anaeróbias aos antimicrobianos através do monitoramento frequente seja das cepas oriundas de espécimes clínicos, seja de microbiota. As bactérias dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* têm sido constantemente relacionadas a infecções em humanos de origem endógena.

As taxas de incidência das infecções causadas por anaeróbios apresentam variação de 4% a 50%, porém, o isolamento deste grupo de microrganismos não é incluído na rotina de muitos laboratórios e hospitais. Uma vez que testes de susceptibilidade não são frequentemente realizados, exceto para amostras isoladas de sítios estéreis (sangue, LCR, etc), é importante realizar estudos de vigilância para definir o perfil de susceptibilidade predominante em uma dada região ou em determinado hospital (KOETH *et al.*, 2004). A determinação de um agente antimicrobiano com eficácia conhecida quando há a necessidade de tratamento empírico de uma infecção com grande probabilidade da presença de anaeróbios torna-se importante (FELEKE & FORLENZA, 1991).

A resistência entre anaeróbios tem aumentado desde o início dos anos 70 (LEE *et al.*, 1996; BAQUERO & REIG, 1992). As espécies do gênero *Bacteroides* spp., principalmente *B. fragilis*, permanecem como as espécies anaeróbias mais frequentemente isoladas. Entretanto, grupos de microrganismos anaeróbios previamente considerados como sensíveis à maioria dos antimicrobianos têm emergido como patógenos devido ao aumento dos níveis de resistência, ocasionando preocupação quanto à terapia empírica apropriada. Embora a tendência do perfil de resistência deste grupo venha sendo monitorada e publicada em pesquisas locais e nacionais, os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias anaeróbias isoladas em hospitais permanece pouco estudados (HECHT, 2004). Assim, a realização de estudos regulares de vigilância assume caráter de grande relevância.

Frequentemente, os antimicrobianos prescritos na terapia empírica de infecções com a participação de anaeróbios incluem β -lactâmicos (com ou sem inibidores de β -lactamases), carbapenemas, clindamicina e metronidazol. Recentemente, as fluoroquinolonas passaram a ser também empregadas em combinação com a clindamicina e o metronidazol (HARDMAN & LIMBIRD, 1996; WEXLER, 2007). Os agentes β -lactâmicos são frequentemente eficazes contra anaeróbios estritos e facultativos. Entretanto, a maioria das bactérias anaeróbias estritas é produtora de β -lactamases, especialmente *Bacteroides*, *Prevotella* e algumas espécies de *Fusobacterium* (NORD, 1986), sendo, portanto importante a inclusão de um inibidor de β -lactamase como ácido clavulânico (APPELBAUM, SPANGLER & JACOBS, 1990). Uma alternativa terapêutica seria o uso de carbapenemas, uma classe de β -lactâmicos que inclui o imipenem, meropenem e que se mostra eficaz contra bactérias anaeróbias estritas e facultativas e que geralmente não é inativada por β -lactamases (KOETH *et al.*, 2004).

No presente estudo, os antimicrobianos amoxicilina-clavulanato e imipenem apresentaram excelente atividade para as 123 amostras analisadas. Resultados semelhantes têm sido observados em diversos estudos, embora alguns autores já tenham detectado cepas resistentes a estes antimicrobianos (LIU *et al.* 2008). Estudos no Brasil demonstraram que a resistência a imipenem e amoxicilina-clavulanato permanece rara no grupo *B. fragilis* (PAULA *et al.*, 2004; BOENTE *et al.*, 2010).

As taxas de resistência às cefalosporinas têm variado entre 3,5 a 41% entre diferentes áreas geográficas, mesmo assim, estas drogas têm ainda se mostrado ativas contra anaeróbios, sendo comumente prescritas como agentes de primeira linha para tratamento (VEDANTAM, 2009). No presente estudo, o cefotaxime mostrou-se levemente mais eficaz, quando comparado à cefoxitina. A espécie *B. thetaiotaomicron* apresentou as maiores taxas de resistência, seguida de *P. distasonis* e *B. vulgatus*. Estudos anteriores destacavam a espécie *P. distasonis* como a que apresentava as maiores taxas de resistência (SNYDMAN *et al.*, 2007; WEXLER, 2007). As amostras de *B. fragilis* apresentaram susceptibilidade plena a ambas drogas, demonstrando mais uma vez que esta espécie mantém-se sensível aos antimicrobianos.

A clindamicina é frequentemente utilizada para o tratamento das infecções causadas por anaeróbios, entretanto, seu uso tem sido restringido pelo aumento progressivo de microrganismos resistentes. Em um estudo no Canadá, analisou-se amostras isoladas de diferentes processos infecciosos durante 7 anos, e o percentual total de resistência apresentou média de 11,8%. No entanto, quando se observa as taxas por espécie, *B. thetaiotaomicron* e *P. distasonis* apresentaram em alguns anos quase 25% de resistência (LABBÉ *et al.*, 1999). No Brasil a taxa de resistência variou entre 18,2 e 37% (SOUZA *et al.*, 2000; AVELAR *et al.*, 2003; PAULA *et al.*, 2004; BOENTE *et al.*, 2010). No presente estudo a taxa global de resistência foi de 55%, aumento observado nos últimos anos. Entretanto, a distribuição dos percentuais de resistência não foi semelhante entre as espécies, e mais uma vez *B. thetaiotaomicron* e *P. distasonis* apresentaram índices mais elevados do que, *B. fragilis* e *B. vulgatus*.

Os nitroimidazóis, dentre eles o metronidazol, permanecem como as drogas mais eficazes contra bactérias anaeróbias, particularmente, no tratamento de doenças infecciosas envolvendo espécies do grupo *Bacteroides* (DINIZ *et al.*, 2003). O metronidazol é prescrito em diferentes concentrações de acordo com a etiologia da infecção, mas em todos os esquemas terapêuticos, a droga atinge a concentração sérica de pelo menos 4 µg/mL (KATZUNG, 1998). Dados epidemiológicos sugerem que essa variação terapêutica no uso do metronidazol pode ser um dos principais fatores que contribuem para as diferentes frequências de sensibilidade reduzida observadas em microrganismos isolados em diferentes áreas geográficas. Tem sido proposto que o aumento do número de amostras com sensibilidade reduzida relatado em países desenvolvidos pode também estar relacionado ao uso de metronidazol no tratamento de doenças por protozoários (JENKS, LABIGNE & FERRERO, 1999). No Brasil, já foram descritas cepas apresentando sensibilidade reduzida ao metronidazol (CIM = 4 a 16 mg/L) (PAULA *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2006). No presente estudo, foi possível detectar três amostras de diferentes espécies apresentando sensibilidade reduzida (CIM = 4 mg/L).

Desde a introdução do ciprofloxacino, tem crescido o interesse da utilização de quinolonas para tratar infecções causadas por microrganismos anaeróbios. As metoxifluoroquinolonas, gatifloxacina e moxifloxacina, apresentam um amplo espectro de ação contra bactérias anaeróbias e parecem promissoras no tratamento de infecções polimicrobianas. Entretanto, mesmo com o uso recente, os anaeróbios vêm apresentando crescentes taxas de resistência a esta classe de drogas (STEIN, ELLIE & GOLDSTEIN, 2005). Em um estudo da Espanha, observou-se a progressão no aumento das taxas de resistência, iniciando com 6% em 1997, atingindo 16% em 2002 (BETRIU *et al.*, 2005), e nos EUA, já foi relatada uma resistência de 38% (SNYDMAN *et al.*, 2007). No Brasil, há relatos de resistência a quinolonas relacionados ao gênero *Clostridium* (BALASSIANO *et al.*, 2009). No presente trabalho detectou-se uma taxa de 20% de resistência, destacando que é possível que no futuro este grupo de antimicrobianos não seja mais uma opção terapêutica.

(3) Determinantes de resistência

Para a microbiota anfibiótica atuar como reservatório de genes de resistência, os componentes desta população devem ser capazes de adquirir genes de resistência tanto a partir de microrganismos transitórios quanto de microrganismos que colonizam os mesmos nichos e transmiti-los a outros microrganismos. Uma variedade de bactérias do solo, dos alimentos, da microbiota da cavidade oral, do trato respiratório superior e patógenos intestinais, transitam através do cólon, onde a transferência de genes para as espécies de *Bacteroides* ou anaeróbios Gram-negativos pode ocorrer (SALYERS & SHOEMAKER, 1996).

O processo de conjugação parece ser o método preferencial de transferência de genes dentro deste grupo. Genes de resistência estão presentes em Tns, plasmídeos e elementos móveis. Muitos destes elementos são pequenos de tamanho carregando somente o necessário para iniciar o processo de transferência. Todos os CTNs presentes em *Bacteroides* albergam genes de resistência a tetraciclina, servindo como marcador

da presença destes elementos. Embora a tetraciclina não apresente importância terapêutica atualmente, pois cerca de 70% das amostras mostram-se resistentes a este antimicrobiano, por albergarem os CTns, a presença de concentrações subinibitórias do antimicrobiano pode estimular os processo de transferência destes elementos móveis (SHOEMAKER *et al.*, 2001; HECHT, 2004). No presente estudo, 77,5% das amostras apresentaram resistência a tetraciclina, e 88,8% das amostras albergavam o gene *tetQ*, evidenciando mais uma vez sua ampla distribuição, e destacando a possível presença de elementos móveis nas amostras deste estudo que podem colaborar na disseminação de determinantes de resistência a antimicrobianos, entre espécies do gênero *Bacteroides*, tão como entre comensais (HECHT, 2004).

O determinante *ermF* é geralmente responsável pela resistência a antimicrobianos do grupo MLS em *B. fragilis*, tendo como principal representante a clindamicina (RASMUSSEN, ODELSON & MACRINA, 1994). No presente trabalho, 14,6% das amostras apresentaram este gene, percentual elevado quando comparado a estudos anteriores no Brasil (PAULA *et al.*, 2004). Em 2006, Pumbwe e colaboradores, isolaram uma cepa de *B. fragilis* que apresentava um sistema de resistência a múltiplas drogas, através da expressão de bombas de efluxo. Estes dados sugerem a existência de outros mecanismos de resistência a clindamicina não relacionados a presença do gene *erm* visto que a circulação deste determinante parece ser restrita no Brasil (PUMBWE *et al.*, 2006).

Duas amostras sensíveis ao metronidazol albergavam o gene *nim*; no entanto, as amostras que apresentaram o fenótipo de sensibilidade reduzida (CIM = 4 mg/L) não os continham. Esse resultado sugere a existência de mecanismos alternativos envolvidos no perfil de sensibilidade reduzida destas amostras. Mecanismos como redução da captação de metronidazol, atividade reduzida da nitroreductase ou ainda atividade reduzida da piruvato ferredoxina oxireductase têm sido sugeridos (GAL & BRAZIER, 2004). Estudos anteriores detectaram a presença de sub-populações *nim*-positivas com fenótipo inicialmente sensível ao metronidazol. Porém, após exposição prolongada a

este antimicrobiano foram divididas em uma população de fenótipo instável, revertido ao fenótipo inicial durante o crescimento na ausência de metronidazol, e em uma população com fenótipo de resistência que permaneceu mesmo durante o crescimento na ausência do antimicrobiano. Desta forma, é possível que mutações que levem à expressão do gene *nim*, inicialmente “silencioso”, possam ocorrer em processos clínicos. Conseqüentemente, níveis clinicamente relevantes de resistência ao metronidazol seriam alcançados, culminando na falha terapêutica (GAL & BRAZIER, 2004; LÖFMARK *et al.*, 2005).

A maioria das cepas do gênero *Bacteroides* spp. é naturalmente resistente a muitas penicilinas. Cepas apresentando resistência a esses antimicrobianos produzem β -lactamases cromossômicas da classe A codificadas pelo gene *cepA*. Essas enzimas exibem predominantemente atividade de cefalosporinase, e frequentemente são inibidas por inibidores de β -lactamases (EDWARDS & GREENWOOD, 1992; AVELAR *et al.*, 2003). No presente estudo, 31% das amostras albergavam este determinante de resistência, no entanto, a distribuição do gene foi desigual, visto que 88,2% das amostras de *B. fragilis* apresentavam o determinante.

No presente estudo foi detectada uma baixa incidência (18%), do gene *cfiA*. Este gene é considerado exclusivo da espécie *B. fragilis* (GUTACKER, VALSANGIACOMO & PIFFARETTI, 2000), entretanto, excetuando-se as amostras das espécies *B. caccae* e *B. uniformis* em todas as demais detectou-se o referido gene. Apesar da detecção do gene *cfiA*, todas as amostras apresentaram sensibilidade ao imipenem e a amoxicilina/clavulanato, a exceção de uma amostra (CIM = 8 mg/L para amoxicilina/clavulanato). No evento da resistência aos carbapenemas, o gene *cfiA* pode estar “silencioso” ou ser expresso em vários níveis, e ainda requerer a inserção de um elemento IS que permite a expressão deste gene dependendo das variações na estrutura do promotor formado (EDWARDS *et al.*, 1999). É possível que as cepas analisadas apresentem fenótipo sensível ao imipenem devido à ausência de um promotor fornecido pela IS.

As características dos genes de resistência a antimicrobianos avaliados neste estudo, os quais estão frequentemente associados a elementos genéticos móveis, permitem o seu envolvimento em mecanismos de transferência horizontal entre amostras do gênero *Bacteroides* spp. ou até mesmo para outros gêneros. O controle do uso de antimicrobianos que possam selecionar amostras resistentes, que por sua vez albergam tais elementos, é de extrema importância, uma vez que pode ocorrer a indução da transferência para amostras susceptíveis. Os resultados deste estudo reafirmam a importância da vigilância dos padrões de resistência a antimicrobianos, bem como a investigação dos genes relacionados a esses mecanismos de resistência.

(4) Determinantes de enterovirulência

A taxa de isolamento de amostras enterotoxigênicas (ETBF) tem variado de 1 a 19% (SACK *et al.*, 1994). Este grupo de amostras tem sido detectado mundialmente, como EUA, Itália, Japão, Nicarágua e Brasil (MYERS *et al.*, 1987; PANTOSTI, PIERSIMONI & PERISSI, 1994; KATO *et al.*, 1996; CÁCERES *et al.*, 2000; BRESSANE, DURIGON & AVILA-CAMPOS, 2001). Em 1995, San Joaquin e colaboradores estudaram 991 crianças com diarreia (CD) e 581 controles assintomáticos (CA). Cepas ETBF foram isoladas em 4,4% das CD e 3,1% dos CA, dados que sugeriram que parte das cepas de *B. fragilis* indígenas são inerentemente pertencentes ao padrão I, sem que, no entanto, estas estejam necessariamente relacionadas a quadros diarreicos.

Antunes e colaboradores em 2002, detectaram uma amostra ETBF (1,5%) de 66 *B. fragilis* isolados de crianças com diarreia, revelando uma restrita circulação do gene *bft* nas cepas isoladas no Brasil. Em 2004, Antunes e colaboradores, pesquisaram novamente cepas ETBF em 334 crianças com diarreia provenientes de três hospitais da cidade do Rio de Janeiro entre maio de 2000 e agosto de 2001. Trinta e uma cepas de *B. fragilis* foram isoladas, não sendo detectada amostras ETBF. Entretanto, neste segundo trabalho detectou-se um percentual considerável de cepas NTBF, pertencentes ao padrão III (~ 60%), o que sugeriu uma possível mudança no fenótipo de enterovirulência

da espécie em nosso país. (ANTUNES *et al.*, 2002; ANTUNES *et al.*, 2004). No presente estudo, detectou-se 17,6% de amostras ETBF, talvez reflexo desta alteração no fenótipo de enterovirulência.

Estudos têm demonstrado que microrganismos anaeróbios podem ser reservatórios de resistência a múltiplas drogas, e que os processos de transferência podem ocorrer na microbiota gastrointestinal. Desta forma, estudos que caracterizem aspectos fenotípicos e genotípicos deste grupo mostram-se importantes. Mais estudos são necessários para elucidar a relação entre microrganismos anaeróbios que colonizam pacientes internados submetidos à antibioticoterapia. No presente estudo o isolamento de anaeróbios foi mais comum entre os pacientes internados no hospital por um período menor anterior a admissão no CTI, comparado com os pacientes com períodos maiores de internação, assim como se mostrou estatisticamente significativo nos pacientes que não evoluíram para óbito. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar esta possível relação benéfica para o hospedeiro que permaneceu colonizado por anaeróbios.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

1. No presente estudo, bactérias anaeróbias foram isoladas de 70 pacientes (35,5%) de 197 investigados.

2. Entre os pacientes com isolamento de anaeróbios, foram observados menor tempo de internação hospitalar anteriormente à internação no CTI e menor frequência de evolução para óbito, comparado aos pacientes sem isolamento destes microrganismos.

3. Dentre as amostras de bactérias anaeróbias isoladas, os gêneros *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp. foram os mais prevalentes, tendo como principais espécies: *B. thetaiotaomicron*, *P. distasonis*, *B. fragilis* e *B. vulgatus*.

4. A determinação da susceptibilidade a 8 antimicrobianos permitiu observar resistência a pelo menos 5 antimicrobianos testados (clindamicina, tetraciclina, cefoxitina, cefotaxime e moxifloxacina) e confirmar a elevada sensibilidade ao metronidazol, imipenem e amoxicilina/clavulanato.

5. A presença do gene *cfiA*, considerado exclusivo da espécie *B. fragilis*, foi encontrado em outros *Bacteroides* spp.

6. Cepas enterotoxigênicas foram detectadas numa taxa elevada (17,6%) para os padrões nacionais. Da mesma forma, detectou-se cepas NTBF padrão III.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAUZET, C.; MORY, F.; TEYSSIER, C.; HALLAGE, H.; CARLIER, J.P.; GROLLIER, G. & LOZNIIEWSKI, A. **Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new nim gene in *Prevotella baroniae*.** Antimicrob. Agents. Chemother., 54: 60-64, 2010.
- 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., 4349-4352, 2002.
- ALTERTHUM, F. **Mecanismos de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência.** In: Microbiologia, cap 9: pp 79-85. Editado por TRABULSI, R.L., ALTERTHUM, F., São Paulo, Atheneu, Brasil, 2008.
- 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.
- APPEULBAUM, P.C.; SPANGLER, S.K. & JACOBS, M.R. **β - Lactamases production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcilin, ticarcilin-clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers.** Antimicrob. Agents. Chemother., 34, 1546-1450, 1990.
- AVELAR, K.E.S.; OTSUKI, K.; VINCENTE, A.C.P.; VIEIRA, J.M.B.D.; PAULA, G.R.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C. **Presence of the *cfxA* gene in *Bacteroides distasonis*.** Research. Microbiol., 154, 369-374, 2003.
- BALASSIANO I.T.; MIRANDA K.R.; BOENTE R.F.; PAUER H.; OLIVEIRA I.C.; SANTOS-FILHO J.; AMORIM E.L.; CANINÉ G.A.; SOUZA C.F.; GOMES M.Z.; FERREIRA E.O.; BRAZIER J.S & DOMINGUES R.M.C.P. **Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Anaerobe., 15: 61-64, 2009.
- BANDOH, K.; MUTO, Y.; WATANABE, K.; KATOH, N. & UENO, K. **Biochemical properties and purification of metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*.** Antimicrob. Agents. Chemother., 35, 371-372, 1991.
- BAQUERO, F. & REIG, M. **Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 1016-1020, 1992.
- BAUGHN, A.D. & MALAMY, M.H. **The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen.** Nature., 29: 441-444, 2004.
- BEACHEY, E.H. **Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface.** J. Infect. Dis., 143, 325-345, 1981.
- BETRIU, C.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; GÓMEZ, M.; CULEBRAS, E. & PICAZO, J.J. **Changing patterns of fluoroquinolone resistance among *Bacteroides fragilis* group organisms over a 6-year period (1997-2002).** Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 53: 221-223, 2005.
- BOENTE, R.F.; FERREIRA, L.Q.; FALCÃO, L.S.; MIRANDA, K.R.; GUIMARÃES, P.L.; SANTOS-FILHO, J.; VIEIRA, J.M.; BARROSO, D.E.; EMOND, J.P.; FERREIRA, E.O.; PAULA, G.R. & DOMINGUES, R.M.C.P. **Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains.** Anaerobe., 16: 190-194, 2010.
- BRESSANE, M.A.; DURIGON, L.E. & AVILA-CAMPOS, M.J. **Prevalence of the *Bacteroides fragilis* group and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in immunodeficient children.** Anaerobe., 7: 277-281, 2001.
- BROOK, I. **Anaerobic infections in children.** Microbes. Infect., 4:1271-1280, 2002.

- BROOK, I. **Microbiology and management of intra-abdominal infections in children.** *Pediatr. Int.*, 45: 123-129, 2003.
- BROOK, I. **Microbiology of intracranial abscesses and their associated sinusitis.** *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, 131: 1017-1019, 2005.
- BROOK, I. **The role of anaerobic bacteria in bacteremia.** *Anaerobe.*, 16 [Epub ahead of print], 2009.
- BUCKWOLD, S.L.; SHOEMAKER, N.B.; SEARS, S.L. & FRANCO, A.A. **Identification and characterization of conjugative transposons CTn86 and CTn9343 in *Bacteroides fragilis* strains.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 53-63, 2007.
- CÁCERES, M.; ZHANG, G.; WEINTRAUB, A. & NORD, C.E. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in children with diarrhoea in Nicaragua.** *Anaerobe.*, 6: 143-148, 2000.
- CARLIER, J.P.; SELLIER, M.; RAGER, M.N. & REYSSET, G. **Metabolism of a 5-nitroimidazole susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 41, 1495-1499, 1997.
- CHENG, Q.; SUTANTO, Y.; SHOEMAKER, N.B.; GARDNER, J.F. & SALYERS, A.A. **Identification of genes required for the excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposon.** *Mol. Microbiol.*, 41, 625-632, 2001.
- CHILLER, K.; SELKIN, B.A. & MURAKAWA, G.J. **Skin microflora and bacterial infections of the skin.** *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 6: 170-174, 2001.
- CHUNG, W.O.; YOUNG, K.; LENG, Z. & ROBERTS, M.C. **Mobile elements carrying *ermF* and *tetQ* genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 44, 329-335, 1999.
- CHURCH, D.L. & LAISHLEY, E.J. **Reduction of metronidazole by hydrogenase from clostridia.** *Anaerobe.*, 1: 81-92, 1995.
- CLANCY, J.; PETITPAS, J.; DIB-HAJJ, F.; YUAN, W.; CRONAN, M.; KAMATH, A.V.; BERGERON, J. & RETSEMA, J.A. **Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*.** *Mol. Microbiol.*, 22: 867-879, 1996.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard - Seventh edition. M11 A7, 2007.**
- COLLINS, M.D. & JONES, D. **Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications.** *Microbiol. Rev.*, 45: 316-354, 1981.
- CUCHURAL, G.J.; JR, MALAMY, M.H. & TALLY, F.P. **β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 30, 634-638, 1986.
- DIBAISE, J.K.; ZHANG, H.; CROWELL, M.D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G.A. & RITTMANN, B.E. **Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity.** *Mayo. Clin. Proc.*, 83: 460-469, 2008.
- DINIZ, C.G.; ARANTES, R.M.; CARA, D.C.; LIMA, F.L.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R. & FARIAS, L.M. **Enhanced pathogenicity of susceptible strains of *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole.** *Microb. Infect.*, 5, 19-26, 2003.
- DUBLANCHET, A.; CAILLON, J.; EMOND, J.P.; CHARDON, N.H. & DURGEON, H.B. **Isolation of *Bacteroides fragilis* strains with reduced sensitivity to 5-nitroimidazoles.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11, 1094-1099, 1986.
- DUBREUIL, L.; BREUIL, J.; DUBLANCHET, A. & SEDALLIAN, A. **Survey of the susceptibility patterns of *Bacteroides fragilis* group strains in France from 1977 to 1992.** *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* 11, 1094-1099, 1992.

- ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E. & RELMAN, D.A. **Diversity of the human intestinal microbial flora.** *Science.*, 308: 1635-1638, 2005.
- EDWARDS, R. & GREENWOOD, D. **An investigation of beta-lactamases from clinical isolates of *Bacteroides* species.** *J. Med. Microbiol.*, 36: 89-95, 1992.
- EDWARDS, D.I. **Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms I. Mechanisms of action.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 31, 9-20, 1993.
- FANG, H.; EDLUND, C.; HEDBERG, M. & NORD, C.E. **New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group.** *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 19: 361-370, 2002.
- FELEK, G & FORLENZA, S. **Anaerobic infections: the basis for primary care physicians.** *Postgraduated. medicine.*, 89, 221-234, 1991.
- FERREIRA, E.O.; LOBO, L.A.; PETRÓPOLIS, D.; AVELAR, K.E.S.; FERREIRA, M.C.; FILHO, S.C.F. & DOMINGUES, R.M.C.P. **A *Bacteroides fragilis* surface glycoprotein mediates the interection between the bacterium and the extracellular matrix component laminin-1.** *Research. Microbiol.*, 157, 960-966, 2006.
- FERREIRA, L.Q.; AVELAR, K.E.S.; VIEIRA, J.M.B.D.; PAULA, G.R.; COLOMBO, A.P.V.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C.S. **Association Between the *cfxA* Gene and Transposon Tn4555 in *Bacteroides distasonis* Strains and Other *Bacteroides* Species.** *Curr. Microbiol.*, 54, 348–353, 2007.
- FERREIRA, M.C.S.; DOMINGUES, R.M.C.P & UZEDA, M. In: *Manual de Bacteriologia de Anaeróbios.*, Rio de Janeiro, Brasil, 2003.
- 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.
- GAL, M. & BRAZIER, J.S. **Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants.** *J. Antimicrob. Chemother.*, 54, 109-116, 2004.
- GIAMARELLOU, H. **Anaerobic infection therapy.** *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 16: 341-346, 2000.
- GIBSON, S.A.W. & MACFARLANE, G.T. **Studies on the proteolytic activity of *Bacteroides fragilis*.** *J. Gen. Microbiol.* 1988. 134: 19-27.
- GOLAN, Y.; MCDERMOTT, L.A.; JACOBUS, N.V.; GOLDSTEIN, E.J.C.; FINEGOLD, S.; HARRELL, L.J.; HETCHT, D.W.; JENKINS, S.G.; PIERSON, C.; VENEZIAS, R.; RIH, J.IANNINI, P.; GORBACH, S.L. & SNYDMAN, D.R. **Emergence of fluoroquinolones resistance among *Bacteroides* species.** *J. Antimicrob. Chemoter.*, 52, 208-213, 2003.
- GOLDSTEIN, E.J.; CITRON, D.M.; MERRIAM, C.V.; WARREN, Y.A.; TYRRELL, K.L. & FERNANDEZ, H.T. **Comparative in vitro susceptibilities of 396 unusual anaerobic strains to tigecycline and eight other antimicrobial agents.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 50: 3507-3513, 2006.
- GUTACKER, M.; VALSANGIACOMO, C. & PIFFARETTI, J.C. **Identification of twogroups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis:distribution of antibiotic resistance (*cfiA*, *cepA*) and enterotoxin (*bft*) encoding genes.** *Microbiology.*, 146, 1241–1254, 2000.
- HAGGOUD, A.; REYSSET G.; AZEDDOUG H. & SEBALD M. **Nucleotide Sequence Analysis of Two 5-Nitroimidazole Resistance Determinants from *Bacteroides* Strains and of a New Insertion Sequence Upstream of the two Genes.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1047-1051, 1994.
- HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S. & WHITE, D.G. **Genetics of antimicrobial resistance.** *Anim. Biotech.*, 17, 111-124, 2006.

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

HECHT, D.W. **Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments.** Clin. Infect. Dis., 39: 92-97, 2004.

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

HOOPER, L.V.; MIDVEDT, T. & GORDON, J.I. **How host-microbial interactions shape and the nutrition environmental of the mammalian intestine.** Annu. Rev. Nutr., 22: 283-307, 2002.

HULL, M.W. & CHOW, A.W. **Indigenous microflora and innate immunity of the head and neck.** Infect. Dis. Clin. North. Am., 21: 265-282, 2007.

INGHAM, H.R.; EATON, S.; VEANBLES, C.W. & ADAMS, P.C. ***Bacteroides fragilis* resistant to metronidazole after long-term therapy.** Lancet., 1: 124, 1978.

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

JONHSON, 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.

JOUSIMIES-SOMER, H.R.; SUMMAMEN, P.; CITRON, D.M.; BARON, E.J. WEXLER, H.M. & FINEGOLD, S.M. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 6 th Edition. Star Publishing Company, Belmont, CA. 2002.

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.

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

KAPER, J.B.; NATARO, J.P. & MOBLEY, H.L. **Pathogenic *Escherichia coli*.** Nat. Rev. Microbiol. 2: 123-40. 2004.

KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K. & UENO, K. **Association of *Bacteroides fragilis* with bacteremia.** Clin. Infect. Dis. 1996. 23: S83-S86.

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

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

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

LABBÉ, A.C.; BOURGAULT, A.M.; VINCELETTE, J.; TURGEON, P.L. & LAMOTHE, F. **Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of the *Bacteroides fragilis* group from 1992 to 1997 in Montreal, Canada.** Antimicrob. Agents. Chemother., 43: 2517-2519, 1999.

LEE, K.; CHONG, Y. & JEONG, S.H. **Emerging resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in South Korea.** Clin. Infect. Dis. 2, S73-77, 1996.

- LEY, R.E.; PETERSON, D.A. & GORDON, J.I. **Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine.** *Cell.*, 124: 837-848, 2006.
- LIU, C.Y.; HUANG, Y.T.; LIAO, C.H.; YEN, L.C.; LIN, H.Y. & HSUEH, P.R. **Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 52: 3161-3168, 2008.
- LIVINGSTON, S.J.; KOMINOS, S.D. & YEE, R.B. **New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group.** *J. Clin. Microbiol.*, 7: 448-453, 1978.
- LÖFMARK, S.; FANG, H.; HEDBERG, M. & EDLUND, C. **Inducible Metronidazole Resistance and *nim* genes in Clinical *Bacteroides fragilis* group isolates.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1253-1256, 2005.
- LUBBE M.M.; STANLEY, K. & CHALKLEY L.J. **Prevalence of *nim* genes in anaerobic/facultative anaerobic bacteria isolated in South Africa.** *FEMS. Microb. Letters.*, 172, 79-83, 1999.
- MACFARLANE, G.T. & GIBSON, G.R. **Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*.** *FEMS. Microbiol. Lett.*, 61: 289-293, 1991.
- MACPHERSON, A.J. & UHR, T. **Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria.** *Science.*, 303: 1662-1665, 2004.
- MARCHANDIN, H.; JEAN-PIERRE, H.; CAMPOS, J.; DUBREUIL, L.; TEYSSIER, C. & JUMAS-BILAK, E. ***nimE* Gene in metronidazole-Susceptible *Veillonella* sp. strain.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48, 3207-3208, 2004.
- MARSH, P.K.; MALAMY, M.H.; SHIMELL, M.J. & TALLY, F.P. **Sequence homology of clindamycin resistance determinants in clinical isolates of *Bacteroides* spp.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 23, 726-730, 1983.
- MAZMANIAN, S.K.; LIU, C.H.; TZIANABOS, A.O. & KASPER, D.L. **An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system.** *Cell.*, 122: 107-118, 2005.
- MAZMANIAN, S.K. & KASPER, D.L. **The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system.** *Nat. Rev. Immunol.*, 6: 849-858, 2006.
- MOAZED, D. & NOLLER, H.F. **Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyltransferase region of 23S ribosomal RNA.** *Biochemic.*, 69, 879-884, 1987.
- MONCRIEF, J.S.; DUNCAN, A.J.; WRIGHT, R.L.; BARROSO, L.A. & WILKINS, T.D. **Molecular characterization of the fragilysin pathogenicity islet of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*.** *Infect. Immun.*, 66: 1735-1739, 1998.
- MYERS, L.L.; FIREHAMMER, B.D.; SHOOP, D.S. & BORDER, M.M. ***Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs.** *Infect. Immun.*, 44: 241-244, 1984.
- MYERS, L.L.; SHOOP, D.S.; STACKHOUSE, L.L.; NEWMAN, F.S.; FLAHERTY, R.J.; LETSON, G.W. & SACK, R.B. **Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea.** *J. Clin. Microbiol.*, 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. Bakteriol.*, 281, 235-239, 1994.
- NEISH, A.S. **Microbes in gastrointestinal health and disease.** *Gastroenterology.*, 136: 65-80, 2009.
- NORD, C.E. & HEDBERG, M. **Resistance to β -lactams antibiotics in anaerobe bacteria.** *Rev. Infect. Dis.* 12, S231-234, 1990.

- NORD, C.E. **Mechanisms of beta-lactam resistance in anaerobic bacteria.** Rev. Infect. Dis., 8: S543-548, 1986.
- OBISO, R.J.; AZGHANI, A.O. & WILKINS, T.D. **The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells.** Infect. Immun., 65: 1431-1439, 1997.
- OH, H. & EDLUND, C. **Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria.** Clin. Microbiol. Infect.; 9: 512-517, 2003.
- OLSEN, I. & SHAH, H.N. **International committee on systematics of prokaryotes, subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 1051-1055, 2008.
- PANTOSTI, A.; PIERSIMONI, C. & PERISSI, G. **Detection of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the feces of a child with diarrhea.** J. Clin. Microbiol., 19: 809-810, 1994.
- PARKER, A.C. & SMITH, C.J. **Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A β -lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species.** Antimicrob. Agents. Chemother., 37, 1028-1036, 1993.
- PATRICK, S.; LUTTON, D.A. & CROCKARD, A.D. **Immune reactions of *Bacteroides fragilis* populations with three different types of capsule in a model of infection.** Microbiology., 141: 1969-1976, 1995.
- PATRICK, S. ***Bacteroides*.** In: Molecular Medical Microbiology. Edited by M. Sussman. London: Academic Press., pp. 1921-1948, 2002.
- 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.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A. & OWEN, R.J. **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** Letters. Appl. Microbiol., 8, 151-156, 1989.
- PODGLAJEN, I.; BREUIL, J. & COLLATZ, E. **Insertion of a novel DNA sequence, IS1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*.** Mol. Microbiol., 12, 105-114, 1994.
- PODGLAJEN, I.; BREUIL, J.; BORDON, F.; GUTMANN, L. & COLLATZ, E. **A silent carbapenemase gene in strains of *Bacteroides fragilis* can be expressed after a one-step mutation.** FEMS. Microbiol. Lett., 70, 21-30, 1992.
- PRUZZO, C.; DANIELLI, B. & RICETTI, M. **Piliated *Bacteroides fragilis* strains adhere to epithelial cells and more sensitive to phagocytosis by human neutrophils than nonpiliated strains.** Infect. Immun. 43, 189-194, 1984.
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A. & WEXLER, H.M. **The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach-or all three ?** Anaerobe., 12: 211-220, 2006.
- PUMBWE, L.; WAREHAM, D.W.; ADUSE-OPOKU, J.; BRAZIER, J.S. & WEXLER, H.M. **Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*.** Clin. Microbiol. Infect., 13: 183-189, 2006.
- RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. & TALLY, F.P. **Antimicrobiol Resistance in Anaerobes.** Clin. Infect. Dis., 24, 5110-5120, 1997.
- RASMUSSEN, B.A.; GLUZMAN, Y. & TALLY, F.P. ***Escherichia coli* chromosomal mutations that permit direct cloning of the *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase gene *ccrA*.** Mol. Microbiol., 5, 1121-1129, 1991.
- RASMUSSEN, J.L.; ODELSON, D.A. & MACRINA, F.L. **Complete nucleotide sequence of insertion element IS4351 from *Bacteroides fragilis*.** J. Bacteriol., 169: 3573-3580, 1994.

- RAWLS, J.F.; MAHOWALD, M.A.; LEY, R.E. & GORDON, J.I. **Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection.** *Cell.*, 127: 423-433, 2006.
- REYSSET, G. **Genetics of 5-Nitroimidazole Resistance in *Bacteroides* Species.** *Anaerobe.*, 2, 59-69, 1996.
- REYSSET, G.; HAGGOUD, A. & SEBALD, M. **Genetics of resistance of *Bacteroides* species to 5-nitroimidazole.** *Clin. Infect. Dis.*, 16, S401-S403, 1993.
- ROBERTS, M.C. **Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution.** *JMS. Microbiol. Rev.*, 19: 1-24, 1996.
- ROGEMOND, V. & GUINET, R.M. **Lectinlike adhesions in the *Bacteroides fragilis* group.** *Infect. Immun.*, 53: 99-102, 1986.
- 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.
- 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.
- SAKAMOTO, M.; KITAHARA, M. & BENNO, Y. ***Parabacteroides jonhsonii* sp. nov., isolated from human faeces.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 293-296, 2007.
- SALYERS, A.A. & SHOEMAKER, N.B. **Chromosomal gene transfer elements of the *Bacteroides* group.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11, 1032-1038, 1992.
- SALYERS, A.A. & SHOEMAKER, N.B. **Resistance Gene transfer in Anaerobes: New Insights, New Problems.** *Clin. Infect. Dis.*; 23: S36-43, 1996.
- SALYERS, A.A.; GUPTA, A. & WANG, Y. **Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes.** *Trends. Microbiol.*, 12, 412-416, 2004.
- SALYERS, A.A. ***Bacteroides* of the human lower intestinal tract.** *Ann. Rev. Microbiol.*, 38: 293-313, 1984.
- SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; STEVENS, A.M. & LI, L.Y. **Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements.** *Microbiol. Rev.*, 4, 579-590, 1995.
- SALYERS, A.A. **An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture.** *Anim. Biotechnol.*, 13: 1-5, 2002.
- SAN JOAQUIN, V.H.; GRIFFIS, J.C.; LEE, C. & SEARS, C.L. **Association of *Bacteroides fragilis* with childhood diarrhea.** *Scand. J. Infect. Dis.*, 27: 211-215, 1995.
- SCHAPIRO, J.M.; GUPTA, R.; STEFANSSON, E.; FANG, F.C. & LIMAYE, A.P. **Isolation of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* carrying the *nimA* nitroreductase gene from a patient in Washington State.** *J. Clin. Microbiol.*, 42, 4127 – 4129, 2004.
- SCOTTO D'ABUSCO, A.S.; DEL GROSSO, M.; 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: 607-612, 2000.
- SEARS, C.L. **A dynamic partnership: celebrating our gut flora.** *Anaerobe.*, 11, 247-251, 2005.
- SEARS, C.L. **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 22: 349-369, 2009.

- SEARS, C.L.; ISLAM, S.; SAHA, A.; ARJUMAND, M.; ALAM, N.H. FARUQUE, A.S.; SALAM, M.A.; SHIN, J.; HECHT, D.; WEINTRAUB, A.; SACK, R.B. & QADRI, F. **Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea.** Clin. Infect. Dis., 47: 797-803, 2008.
- SHAH, H.N. & COLLINS, M.D. **Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *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.
- SHAH, H.N.; OLSEN, I.; BERNARD, K.; FINEGOLD, S.M.; GHARBIA, S. & GUPTA, R.S. **Approaches to the study of the systematics of anaerobic, Gram-negative, non-sporeforming rods: Current status and perspectives.** Anaerobe., 15, 179-194, 2009.
- SHOEMAKER, N.B.; VLAMMAKIS, H.; HAYES, K. & SALYERS, A.A. **Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and other genera in the human colon.** Appl. Environ. Microbiol., 67, 561-568, 2001.
- 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., 2417-2422, 1999.
- SNYDMAN, D.R.; JACOBUS, N.V.; MCDERMOTT, L.A.; RUTHAZER, R.; GOLAN, Y.; GOLDSTEIN, E.J.; FINEGOLD, S.M.; HARRELL, L.J.; HECHT, D.W.; JENKINS, S.G.; PIERSON, C.; VENEZIA, R.; YU, V.; RIHS, J. & GORBACH, S.L. **National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004.** Antimicrob. Agents. Chemother., 51: 1649-1655, 2007.
- SÓKI, J.; GAL, M.; BRAZIER, J.S.; ROTIMI, V.O.; URBÁN, E.; NAGY, E. & DUERDEN, B.I. **Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains.** J. Antimicrob. Chemother., 57: 212-222, 2006.
- SONG, J.S.; JEON, J.H.; LEE, J.H.; JEONG, S.H.; JEONG, B.C.; KIM, S.J.; LEE, J.H. & LEE, S.H. **Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea).** J. Microbiol., 43: 172-178, 2005.
- SOUZA, W.G.S.; AVELAR, K.E.S.; ANTUNES, E.N.F.; ANTUNES, L.C.M.; LOBO, L.A.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C.S. **Resistance profile of *Bacteroides fragilis* isolated Brazil. Do they shelter the *cfiA* gene?** J. Microbiol. Chemother., 45, 475-781, 2000.
- SPEER, B.S.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance.** Clin. Microbiol. Rev., 5: 387-399, 1992.
- STEIN, G.E. & GOLDSTEIN, E.J.C. **Fluoroquinolones and anaerobes.** Clin. Infect. Dis., 42: 1598-1607, 2005.
- STEVENS, AM.; SHOEMAKER, N.B. & SALYERS, A.A. **The region of a *Bacteroides* conjugal chromosomal tetracycline resistance element which is responsible for production of plasmidlike forms from unlinked chromosomal DNA might also be involved in transfer of the element.** J. Bacteriol., 172, 4271-4279, 1990.
- STUBBS S.L.J.; BRAZIER J.S.; TALBOT P.R. & DUERDEN B.I. **PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of *Bacteroides* spp. And Characterization of Nitroimidazole Resistance Genes.** J. Clin. Microbiol., 3209-3213, 2000.

- SULLIVAN, A.; EDLUND, C. & NORD, C.E. **Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora.** Lancet. Infect. Dis., 1: 101-114, 2001.
- THOMPSON, J.S. & MALAMY, M.H. **Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between *cfiA* and *Bacillus cereus* β -lactamase II.** J. Bacteriol., 172, 2584-2593, 1990.
- TRIBBLE, G.D.; PARKER, AC. & SMITH, C.J. **Genetic structure and transcriptional analysis of a mobilizable, antibiotic resistance transposon from *Bacteroides*.** Plasmid., 42, 1-12, 1999.
- TRINH, S.; HAGGOU, A.; REYSSET, G. & SEBALD, M. **Plasmids pIP419 and pIP 421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements.** Microbiol., 141, 927-935, 1995.
- VAN TASSEL, R.L.; LYERLY, D.M. & WILKINS, T.D. **Purification and characterization of an enterotoxin from *Bacteroides fragilis*.** Infect. Immun., 60: 1343-1350, 1992.
- VEDANTAM,G. **Antimicrobial resistance in *Bacteroides* spp.: occurrence and dissemination.** Future. Microbiol., 4: 413-423, 2009.
- VERSTRAELEN, H. **Cutting edge: the vaginal microflora and bacterial vaginosis.** Verh. K. Acad. Geneesk. Belg., 70: 147-174, 2008.
- VIEIRA, J.M.B.D.; BOENTE, R.F.; MIRANDA, K.R.; AVELAR, K.E.S.; DOMINGUES, R,M,C,P. & FERREIRA, M.C.S. **Reduced susceptibility to nitroimidazoles among *Bacteroides* species in Brazil.** Curr. Microbiol., 52, 27-32, 2006.
- WALSH, C. **Molecular mechanism that confer antimicrobial drug resistance.** Nature., 406, 775-781, 2000.
- WANG, Y., WANG, G.R., SHELBY, A., SHOEMAKER, N.B., SALYERS, A.A. **A newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnERM1, contains genes also found in Gram-positive bacteria.** Appl. Environ. Microbiol., 69, 4595-4603, 2003.
- WATANABE, K.; UENO, K. & KATO, N. **In vitro susceptibility of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in Japan.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, 1069-1073, 1992.
- WEXLER, H.M. ***Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty.** Clin. Microbiol. Rev., 20: 593-621, 2007.
- WILLIS, A. **Abdominal sepsis.** In: B. I. Duerden & Drasar. B. S. (ed.), Anaerobes in human diseases, Edward Arnold, London. p. 197-223, 1991.
- WU, S., MORIN, P.J., MAOUYO, D., SEARS, C.L. ***Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation.** Gastroenterology., 124: 392-400, 2003.
- YAMAOKA, K.; WATANABE,K.; MUTO, Y.; KATOH, N.; UENO, K. & TALLY, F.P. **R-plasmid mediated transfer of β -lactams resistance in *Bacteroides fragilis*.** J. Antimicrob., 43, 1302-1306, 1990.

ANEXOS

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](#)