

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
MESTRADO EM GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**Débora Paula Ferreira**

**OCORRÊNCIA, DETECÇÃO DE LINHAGENS ENTEROTOXIGÊNICAS E PERFIL  
DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ANAERÓBIOS DO GRUPO  
*Bacteroides fragilis* NA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS APRESENTANDO  
OU NÃO DIARRÉIA AGUDA EM JUIZ DE FORA**

JUIZ DE FORA  
2009

**DÉBORA PAULA FERREIRA**

**OCORRÊNCIA, DETECÇÃO DE LINHAGENS ENTEROTOXIGÊNICAS E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ANAERÓBIOS DO GRUPO *Bacteroides fragilis* NA MICROBIOTA FECAL DE CRIANÇAS APRESENTANDO OU NÃO DIARRÉIA AGUDA EM JUIZ DE FORA**

Dissertação de Mestrado do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia

**Orientador: Prof Dr.Claudio Galuppo Diniz**

**JUIZ DE FORA  
2009**

A todas as pessoas que de alguma forma  
contribuíram com este momento, em  
especial, minha mãe, minha melhor amiga  
e confidente.

## **Agradecimento**

Em primeiro lugar a Deus, por ter me dado novamente a vida, permitido que eu continuasse e estivesse aqui hoje concluindo meu trabalho, não me deixando desanimar no período mais difícil da minha vida.

A minha família em especial minha mãe, pela garra, carinho e amor, por ter feito eu acreditar que a tempestade iria passar e eu pudesse estar aqui, vencendo mais uma etapa, me incentivando e encorajando a todo momento .

A minha vó, pelo amor incondicional por suas rezas e noites de sono perdidas.

Ao meu pai, pela atenção, carinho e incentivo.

A todas as crianças que contribuíram através da doação de seu material biológico. Sem elas este trabalho não poderia ser desenvolvido.

Aos professores e técnicos do laboratório de micro pelo conhecimento adquirido e amadurecimento profissional, pela oportunidade do desenvolvimento do meu projeto de mestrado, aguentando firme e forte o cheiro agradável produzido pelos meus experimentos.

Aos alunos do laboratório Felipe, Lucia, Thais, Mariana, Michele, Didier, Rafael, pela amizade adquirida ao longo destes anos.

As novas amizades feitas no curso, Priciane, Carol e em especial a Fernanda, pela cumplicidade, conselhos, longas horas penduradas ao telefone, sempre falando do mesmo assunto e pelo ombro amigo nos meus momentos de carência, nunca me deixando desanimar.

As eternas amigas Sarah e Geise, pelos conselhos, desabafos e força.

A Danielle, pela, imensa ajuda nos experimentos demorados, e principalmente pela sua preocupação, me ajudando e desenvolvendo o projeto no momento mais conturbado do mestrado coincidindo com a minha ausência nos experimentos.

A Vânia, pela ajuda e amizade.

Ao professor e orientador Cláudio pela competência, motivação na sua atuação como professor orientador, acreditando sempre no meu potencial. E claro sem poder esquecer de sua amizade, porque foi mais do que um orientador amigo foi um amigo orientador, me ajudando exaustivamente no meu período de ausência. Indo contra seus medos, como por exemplo, ate entrar em um hospital de pronto socorro. Obrigada por tudo.

## Resumo em Português

Manifestações clínicas no trato gastrointestinal como as diarreias agudas figuram como uma das principais causas de morte em crianças. Espécies do grupo *Bacteroides fragilis* são importantes constituintes da microbiota intestinal. Sua importância é reconhecida como agente etiológico de infecções endógenas associados ao trato gastrointestinal, além de outros sítios. Nosso objetivo foi avaliar a ocorrência e a distribuição de espécies do grupo *B. fragilis* em amostras fecais de crianças com e sem diarreia, seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e investigar a presença de linhagens enterotoxigênicas. Foram analisadas 175 amostras fecais provenientes de crianças apresentando (n=110) ou não (n=65) manifestações clínicas no trato gastrointestinal, com idade média de 2 anos de idade, obtidas em Juiz de Fora, MG. As amostras foram avaliadas por métodos bioquímico-fisiológicos e moleculares (PCR-Multiplex), e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado por metodologia de diluição em Agar, de acordo com CLSI. Dos isolados, foram identificadas 47 linhagens bacterianas representativas do grupo *B. fragilis*. Pelo método bioquímico, identificamos 8 espécies do grupo e 4 espécies foram identificadas pelo método de biologia molecular. Em 58,3% das amostras fecais, foram detectadas espécies do grupo *B. fragilis* pela técnica de PCR – Multiplex. Em relação a linhagens enterotoxigênicas, estas foram detectadas em 4,6% dos espécimes fecais, sendo em 3,7% das amostras diarreicas e em 6,15% das amostras controle. Observou-se resistência a todos os antimicrobianos testados (ampicilina, ampicilina/sulbactam piperacilina/tazobactam, meropenem, ceftriaxona, clindamicina e cloranfenicol). No entanto, as drogas mais eficazes foram ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam. Os resultados mostraram que o grupo *B. fragilis* é prevalente na microbiota fecal de crianças em Juiz de Fora, entretanto, em níveis superiores nas fezes não diarreicas. A metodologia molecular mostrou-se mais eficiente na identificação microbiana, quando comparada às técnicas bioquímico-fisiológicas. Os altos níveis de resistência observados suscitam reflexões sobre o uso indiscriminado de antimicrobianos. Estudos prospectivos são necessários para um melhor conhecimento do papel destas bactérias nas diarreias agudas em crianças.

## ABSTRACT

Clinical conditions in the gastrointestinal tract such as acute diarrhea are one of the major causes of death in children. Species of *Bacteroides fragilis* group are important constituents of the intestinal microbiota. Its importance is recognized as the etiologic agent of endogenous infections associated with gastrointestinal tract and other sites. Our objective was to evaluate the occurrence and distribution of species of *B. fragilis* group in fecal samples of children with and without diarrhea, their antimicrobial susceptibility patterns and to investigate enterotoxigenic strains. We analyzed 175 fecal samples from children presenting (n = 110) or not (n = 65) clinical manifestations in the gastrointestinal tract, with an average of 2 years of age, obtained in Juiz de Fora, MG. The samples were evaluated by biochemical-physiological and molecular (PCR-Multiplex) methods. The drug susceptibility patterns were determined by the agar dilution method according to CLSI. Of the isolates were identified 47 bacterial strains representative of *B. fragilis* group. By the biochemical-physiological methodology, 8 species of the group were identified and 4 were identified by the molecular genetics technique. In 58.3% of the fecal samples, *B. fragilis* group were detected by the Multiplex - PCR. Enterotoxigenic strains were detected in 4.6% of fecal specimens, of which 3.7% in the diarrheic and 6.15% in the control samples. Antimicrobial resistance was observed against all tested drugs (ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, meropenem, ceftriaxone, clindamycin and chloramphenicol), although the most effective drugs were ampicillin/sulbactam and piperacillin/tazobactam. The results showed that the *B. fragilis* group is prevalent in the fecal microbiota of children in Juiz de Fora, however, at higher levels in feces from health donors than in diarrheic samples. The molecular methodology was more effective in identifying microbial strains when compared to the biochemical and physiological techniques. The high levels of resistance observed raise thoughts about the indiscriminate use of antimicrobials. Prospective studies are needed to gain a better understanding on the role of these bacteria in acute diarrhea in children.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Aspecto característico do crescimento de colônias do grupo *B. fragilis* em ágar BBE, evidenciando a hidrólise da esculina 40
- Figura 2- Aspecto morfológico de esfregaço de cultura microbiana (*Bacteroides fragilis*) corado pelo método de Gram evidenciando as características morfológicas de células microbianas de representantes do grupo *B. fragilis*. 42
- Figura 3- Distribuição por idade do grupo de crianças cujas fezes foram amostradas neste estudo, após consentimento dos responsáveis. 53
- Figura 4- Eletroforegramas representativos da identificação de *Bacteroides* spp. por Multiplex-PCR isolados de amostras fecais. A – Reação G (230bp => Grupo I; 230 + 400bp => Grupo III). B – Reação para Grupo I: 420bp => *B. fragilis*; 250bp => *B. vulgatus*. C – Reação para Grupo III: 220bp => *B. distasonis*. Não foram identificadas espécies com padrão de identificação de Grupo II. PM – padrão de peso molecular 100 pb. 54
- Figura 5- Eletroforegramas representativos da identificação de *Bacteroides* spp. isolados de amostras fecais por PCR - Multiplex. A – Reação G (230bp => Grupo I; 230 + 450 => Grupo II; 230 + 400bp => Grupo III). B – Reação para Grupo I: 420bp => *B. fragilis*; 250bp => *B. vulgatus*; 610bp => *B. ovatus*. C – Reação para Grupo III: 220bp => *B. distasonis*. PM – padrão de marcador molecular 100 pb. 59
- Figura 6- Distribuição das espécies representativas do grupo *Bacteroides fragilis* detectadas nos espécimes fecais diarréicos avaliados diretamente por metodologia de biologia molecular. 61

Figura 7- Distribuição das espécies representativas do grupo *Bacteroides fragilis* detectadas nos espécimes fecais não diarréicos avaliados diretamente por metodologia de biologia molecular. 61

Figura 8- Eletroforegrama representativo da identificação de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico (ETBF) em amostras fecais. PM - padrão de peso molecular 100 pb; Canaleta 1 – controle negativo; canaleta 2 – controle positivo para ETBF (banda de 294pb); canaletas 3, 5 e 7 – amostras positivas; canaletas 4 e 6 – amostras negativas. 62

Figura 9-Distribuição de linhagens bacterianas de bastonetes Gram negativo do Grupo *Bacteroides fragilis* que apresentaram resistência ou resistência intermediária aos diferentes antimicrobianos testados. AMP, Ampicilina; AMS, Ampicilina/Sulbactam; CHL, Cloranfenicol; CLI, Clindamicina; CTR, Ceftriaxona; MEM, Meropenem; PTZ, Piperacilina/Tazobactam. 65

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Chave de identificação de espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, proposta por Diniz (1997), adaptado de Sutter, Citron e Finegold (1980); Summanen *et al.* (1993) e Holt *et al.* (1994). 43

Quadro 2- Iniciadores e locais de alinhamento, com indicação dos tamanhos dos amplicons produzidos por cada reação de PCR multiplex para identificação genética das diferentes espécies do grupo *B. fragilis*, de acordo com liu *et al.* (2003). 47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo, de acordo com acordo metodologia proposta por Liu *et al.* (2003) pra identificação de espécies do grupo *Bacteroides fragilis*. 46
- Tabela 2- Características da população amostrada. 52
- Tabela 3- Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia de biologia molecular dos espécimes fecais diarréicos ou não, cujas metodologias permitem identificação semelhante. 56
- Tabela 4- Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia de biologia molecular dos espécimes fecais diarréicos ou não, cuja metodologia bioquímico-fisiológica permite identificação bacteriana em mais de um grupo taxonômico. 57
- Tabela 5- Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia de biologia molecular dos espécimes fecais diarréicos ou não, cujas metodologias permitem identificação discordante. 57
- Tabela 6- Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia genética das amostras de fezes diarréicas ou não, cujas metodologias permitem identificação discordante e em mais de um grupo taxonômico. 58

Tabela 7- Valores de referência para interpretação dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de bastonetes Gram negativo anaeróbios, pelo método de diluição em ágar, segundo recomendações do NCCLS (2004). 63

Tabela 8- Concentrações inibitórias mínimas das drogas antimicrobianas testadas (em  $\mu\text{g/mL}$ ), obtidas pelo método de diluição em ágar, para as linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis* avaliadas. 64

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos das doenças diarréicas	22
2.2 Considerações sobre os microrganismos da microbiota residente e da microbiota transitória	26
2.3 Papel dos microrganismos do gênero <i>Bacteroides</i> na microbiota intestinal	28
2.4 Bastonetes Gram negativo anaeróbios do grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	29
2.4.1 Linhagens enterotoxigênicas de <i>Bacteroides fragilis</i>	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos Gerais	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. PACIENTES E MÉTODOS	38
4.1 Amostras fecais	39
4.2 Isolamento das linhagens bacterianas a partir de espécimes fecais aptos para cultura microbiológica	40
4.3 Identificação presuntiva das linhagens bacterianas	41
4.4 Identificação bioquímica das linhagens bacterianas	42

4.5 Identificação molecular das linhagens isoladas	45
4.6 Detecção de representantes do grupo <i>Bacteroides fragilis</i> e pesquisa do gene da enterotoxina ( <i>btf</i> ) diretamente nos espécimes fecais	48
4.7 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	50
5.RESULTADOS	51
5.1 População estudada	52
5.2 Isolamento e identificação de linhagens representativas do grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	54
5.3 Pesquisa do grupo <i>Bacteroides fragilis</i> diretamente nos espécimes fecais	59
5.4 Pesquisa de <i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênicos	62
5.5. Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	63
6.DISSCUSSÃO	66
6.1 Doença diarréica infantil	67
6.2 Identificação bioquímica e molecular das linhagens do grupo <i>B.fragilis</i>	68
6.3 Pesquisa do grupo <i>B.fragilis</i> diretamente nos espécimes fecais	72
6.4 Pesquisa de <i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênicos	74

6.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	76
7.CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9. ANEXOS	96

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças do trato gastrointestinal têm uma distribuição global e afetam milhões de indivíduos em todo mundo. A sua etiologia é variada e inclui microrganismos de grande relevância na medicina humana, como as bactérias, dentre outros agentes. Nos países em desenvolvimento, estas doenças figuram como uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em indivíduos de todas as faixas etárias e, especialmente, em crianças de pouca idade, ao considerar-se a etiologia bacteriana e viral.

Nos países desenvolvidos, estas doenças ainda permanecem como uma queixa muito comum, mas geralmente branda e auto-limitada, exceto em indivíduos muito jovens, em idosos e, sobretudo em imunocomprometidos. A maioria dos patógenos é encontrada em todo mundo, entretanto tais doenças podem ser adquiridas por viajantes e importadas para os seus países de origem, sobretudo considerando-se os processos de globalização. Neste sentido, observa-se a necessidade do mapeamento epidemiológico das áreas de ocorrência, bem como a definição dos agentes etiológicos envolvidos. Segundo a literatura disponível, muitos casos de doenças do trato gastrointestinal não são diagnosticados, seja devido a manifestações brandas e auto-limitadas em que os pacientes não procuram atendimento médico, ou porque existe uma sobrecarga na saúde pública, que dificulta a utilização dos recursos médicos e laboratoriais disponíveis.

Além disso, existe uma carência de dados científicos sobre a ocorrência e a epidemiologia destas doenças, o que pode interferir com as políticas de gerenciamento de recursos humanos e de infra-estrutura, especialmente nos países em desenvolvimento. O surgimento de formas graves extra-intestinais e disseminadas de doenças bacterianas de origem no trato gastrointestinal torna-se preocupante à medida que os profissionais da saúde não estão adequadamente preparados para o diagnóstico, intervenção e notificação precoces, pelo desconhecimento da ocorrência da doença nas diferentes regiões.

É reconhecida a importância das bactérias anaeróbias obrigatórias na etiologia das infecções humanas do trato gastrointestinal de seres humanos e de outros animais, dentre outras bactérias e grupos microbianos. Entre estes microrganismos, destacam-se os bastonetes Gram negativo do grupo *Bacteroides*

*fragilis* - considerado o grande vilão da medicina moderna. As bactérias anaeróbias estritas pertencentes ao grupo *B. fragilis* estão frequentemente associadas a doenças no trato gastrointestinal, principalmente em quadros de diarreia aguda e doenças inflamatórias intestinais, dentre outras. A predominância de bactérias anaeróbias em relação às aeróbias na microbiota intestinal de mamíferos, incluindo humanos e não humanos, é fato reconhecido, chegando a atingir, a proporção de mil para um.

Deve-se destacar, que a bacteriologia de anaeróbios demanda rotinas especiais, no que se refere à coleta, transporte e processamento de materiais biológicos para estudos envolvendo isolamento e identificação destes microrganismos. Neste sentido, torna-se essencial ao diagnóstico e à pesquisa epidemiológica da participação destes microrganismos nas doenças de trato gastrointestinal, o correto manejo dos espécimes clínicos. A busca por novas metodologias de estudo pode permitir o conhecimento mais exato da participação destes microrganismos nos diferentes ecossistemas.

Apesar dos vários estudos relacionados à virulência e a patogenicidade do *B. fragilis*, o conhecimento da epidemiologia de infecções causadas por estes microrganismos é limitado. Espécies de *B. fragilis*, em certas condições, podem produzir enterotoxinas, que têm sido relacionadas com diarreias e outras doenças intestinais em crianças, adultos jovens e idosos, além de outros animais. Estas linhagens são chamadas de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicas (ETBF) e o seu envolvimento como agente etiológico de doenças gastrointestinais tem sido destacado por vários cientistas nos últimos anos. De acordo com a literatura, esta enterotoxina está associada com a perda de fluidos, esfoliação e alteração do citoesqueleto de células intestinais e, ainda, associadas com a manifestação clínica de câncer de colo retal.

Assim, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de estudos prospectivos que visem a avaliação da ocorrência e a caracterização de linhagens de *Bacteroides* spp. enterotoxigênicas ou não e seu perfil de susceptibilidade a drogas, em estudos regionais para o conhecimento da distribuição e as implicações destas bactérias nas doenças relacionadas ao trato gastrointestinal nas diferentes regiões, especialmente considerando-se indivíduos de pouca idade cuja

susceptibilidade à complicações relacionadas às manifestações clínicas do trato gastrointestinal é maior.

Este projeto insere-se na linha de pesquisa “Epidemiologia das doenças infecto-parasitárias do trato gastrointestinal”, do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, em colaboração com a Secretaria de Saúde, Saneamento e Desenvolvimento Ambiental de Juiz de Fora, MG.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos das doenças diarréicas

Manifestações clínicas no trato gastrintestinal de etiologia bacteriana, como doenças diarréicas e doenças inflamatórias agudas permanecem um problema para milhões de seres humanos no mundo inteiro (DURMAZ, DALGALAR & DURMAZ, 2005). Em países em desenvolvimento essas doenças são uma das duas principais causas de morte infantil e contribuem para a severidade de deficiências relacionadas à desnutrição (PATHELA *et al.*, 2005). Apesar dos avanços da microbiologia clínica, o diagnóstico e a epidemiologia dessas doenças ainda é um grande problema e permanece como uma importante meta para o desenvolvimento de políticas de saúde pública (PATHELA *et al.*, 2005; SHELTON *et al.*, 2006).

Além disso, outras manifestações de doença bacteriana no trato gastrintestinal de grande relevância na medicina humana compreendem as doenças inflamatórias intestinais, que são consideradas inflamações crônicas. Estes processos clínicos geralmente se manifestam como doença de Crohn e colites ulcerativas, que podem ser diferenciadas, do ponto de vista clínico, pela aparência endoscópica e histológica (BASSET *et al.*, 2004). Segundo literatura científica recente, há de se considerar, também, o envolvimento de processos ou produtos bacterianos na etiologia de câncer de colo retal em seres humanos, como uma manifestação clínica no trato gastrintestinal associada a estes microrganismos (TOPRAK *et al.*, 2006).

Entre estas doenças, segundo dados da literatura, a diarréia é a segunda causa mais importante de morte no mundo, antecedida pela desnutrição. Apesar das diversas técnicas microbiológicas disponíveis, aproximadamente metade dos casos de diarréia permanecem sem definição da etiologia, o que dificulta a implantação de políticas e estratégias de mapeamento e controle das áreas endêmicas de ocorrência destes patógenos (DURMAZ, DALGALAR & DURMAZ, 2005).

A doença diarréica infantil é ainda nos dias de hoje uma síndrome frequente estando entre as principais causas de consulta, internação e letalidade (BERN *et al.*, 1992). A doença ocorre quando aumenta a proporção de água contida nas fezes e pode ser classificada em aguda ou persistente. A diarréia aguda é definida como um

processo sindrômico de duração igual ou inferior a 14 dias, de etiologia presumivelmente infecciosa (viral, bacteriana ou parasitaria) que provoca má absorção de água e eletrólitos, aumento do número de evacuações, três ou mais em um período de 24h, e aumento do volume do fluido fecal. O início da diarreia geralmente é súbito e a duração é menor que três semanas, a grande maioria resolvendo-se em menos de três a cinco dias (MITRA *et al.*, 1991; TEKA *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999). A diarreia persistente representa um episódio diarréico de início abrupto com duração superior a 14 dias (NAKANO *et al.*, 2006).

Alem da diarreia propriamente dita, é comum a ocorrência de desconforto abdominal, cólica, plenitude, excesso de flatos, mal estar generalizado, náusea e vômitos. Menos frequentemente, pode-se observar sangue, pus, muco e febre. A diarreia com perda de líquido, em pessoas debilitadas por outras doenças, em idosos ou em crianças, pode evoluir para desidratação. Nestes casos pode-se notar: ressecamento das mucosas, saliva escassa e espessa, sede excessiva, cansaço e sonolência (NAKANO *et al.*, 2006).

A diarreia pode apresentar-se com quadro clínico de desidratação grave e choque hipovolêmico (BONE *et al.*, 1992). Na condição clínica de choque por diarreia aguda é comum à introdução de antibioticoterapia dirigida para enterobacterias, associada à reposição de líquidos e uso de drogas vasoativas (TOBIN & WETZEL, 1996).

Uma das prioridades no tratamento dos pacientes com diarreia aguda e choque é a identificação através de indicadores clínicos ou laboratoriais na admissão do paciente em serviço de emergência ou unidade de terapia intensiva dos pacientes com risco maior de evoluir para óbito. Uma vez reconhecida a importância da doença diarréica como problema prioritário de saúde, há necessidade de combatê-la procurando formas de reduzir sua morbidade e mortalidade (PONTUAL *et al.*, 2006).

No perfil de morbidade típico das populações infantis dos países não desenvolvidos, a doença diarréica ocupa papel de grande relevância. A importância desta patologia decorre, em primeiro lugar, de sua participação nos coeficientes de mortalidade na infância, onde com frequência, a diarreia se destaca como a principal causa de morte. Também são os efeitos nocivos dos episódios diarréicos para o crescimento e desenvolvimento infantis. Não menos importante é a forte pressão

que a doença diarréica exerce sobre a demanda por assistência a saúde (BRANDÃO *et al.*, 2005).

Em muitos países a incidência de infecções diarréicas em seres humanos tem crescido de maneira significativa nos últimos anos. Em alguns países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, estima-se que a incidência destas doenças esteja na ordem de um a dois milhões de casos associados com 500 a 2000 óbitos por ano (CHIU, SU & CHU, 2004).

No mundo, a doença diarréica é uma causa importante de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos, com 1.4 bilhões de casos anuais sendo 1.3 bilhões de casos necessitando de cuidados domiciliares, 9 milhões de internações e 3.1 milhões de mortes (PONTUAL *et al.*, 2006). Números fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (2008) indicam que as diarréias matam, a cada ano, de 3 a 4 milhões de crianças, sobretudo na África, Ásia e América Latina.

Informações relativas à ocorrência de morbidade em geral e da doença diarréica em particular são escassas em nosso país. De acordo com Benício e colaboradores (2007), os poucos dados científicos disponíveis sobre a etiologia da diarréia estão associados a levantamentos de registros de serviços de saúde, o que torna problemática, sua utilização em inferência populacional ampla. Estatísticas de mortalidade por causas específicas da diarréia na população, consideram apenas casos muito graves da doença. Assim, a incidência da doença diarréica é virtualmente desconhecida no Brasil.

Em nosso país a mortalidade é expressiva no nordeste, cerca 10% e mais baixa no sudeste, cerca de 2.7%. Estima-se que anualmente 15 mil crianças vão a óbito no Brasil por consequência da doença diarréica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Dados do Ministério da Saúde confirmam que a diarréia ocupa o segundo lugar entre as causas de hospitalização. O número de mortes por diarréia é alto, mas houve uma redução nas décadas de 80 e 90 com o advento da terapia de reidratação oral. A Terapia de Reidratação Oral (TRO), administrada dentro do programa de assistência primária de saúde, é uma prática efetiva e de custo relativamente baixo para reduzir a mortalidade por desidratação causada por diarréia aguda. Porém, são indispensáveis outras formas de intervenção como, promoção do aleitamento materno, melhorias sanitárias, tratamento da diarréia persistente e imunização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A incidência de mortalidade é maior em crianças com menos de cinco anos e em adultos com mais de 60 anos. O risco de doença é maior em crianças que vivem em condições de pobreza em países em desenvolvimento. A dose infecciosa considerando-se a etiologia bacteriana é mais baixa em pessoas consideradas de alto risco devido à idade, imunossupressão, doenças subjacentes (leucemias, linfomas, anemia falciforme) ou a diminuição da acidez gástrica (MURRAY *et al.*, 2006). Apesar de muitos estudos apontarem os vírus como etiologia preponderante nos países desenvolvidos, a etiologia bacteriana é muito importante, sobretudo em crianças que vivem em países em desenvolvimento (TOPOROVSKI *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003). Dentre os fatores prognósticos ligados ao óbito em pacientes com diarreia aguda, a nutrição deficiente é destacada como um dos principais, ao lado da ausência de aleitamento e faixa etária menor que doze meses (MITRA *et al.*, 1991; TEKA *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1999).

## 2.2. Considerações sobre os microrganismos da microbiota residente e da microbiota transitória

Em um ambiente repleto de microrganismos, todos os animais tornam-se colonizados desde o momento do nascimento por toda a vida e, tanto o homem como outros seres vivos, albergam uma variedade de espécies bacterianas (SALYERS, 1984; ELDSTEIN, 1990).

Segundo alguns autores, especialmente considerando-se a espécie humana, o número de células bacterianas supera quantitativamente o número de células eucariotas em cerca de 10 vezes, embora o peso seco destes organismos associados não seja significativo. Assim, considerando-se o número de células bacterianas, sugere-se que o genoma procarioto supere o genoma eucarioto na espécie humana, em uma relação que considera nosso volume corporal constituído de 99% de genes bacterianos (WEXLER, 2007).

A colonização do corpo humano começa desde o início da vida e muitos destes microrganismos permanecem associados ao organismo por toda a vida, como o observado no cólon humano, que alberga uma população de bactérias que esta em torno de  $10^{13}$  unidades formadoras de colônias por grama de material fecal. A maioria desses microrganismos são anaeróbios, e destes, cerca de 65 % são do gênero *Bacteroides* (FINEGOLD, 1990; DOMINGUES, 2004).

Os microrganismos encontrados nos diversos sítios anatômicos do corpo humano e de outros animais sadios podem ser dispostos em dois grupos: microbiota residente e microbiota transitória. A microbiota residente, também chamada indígena ou autóctone, é composta por certos tipos microbianos relativamente fixos, encontrados com regularidade numa determinada área, em uma determinada condição fisiológica, com diversificada habilidade metabólica, que inclui o grau de sensibilidade ao oxigênio e outros fatores, que permitem tanto sua colonização em sítios específicos como a sua coexistência (SUMMANEN *et al.*, 1993).

A microbiota residente possui papel importante na manutenção da integridade do hospedeiro quando em equilíbrio em um sítio específico. Estes microrganismos oferecem barreira contra a colonização de patógenos, produzem substâncias utilizáveis pelo hospedeiro, degradam produtos tóxicos e participam da modulação do sistema imune do hospedeiro. A microbiota residente tem um caráter anfibiótico,

podendo se comportar como patógenos oportunistas no desequilíbrio ou ao serem introduzidos em áreas não colonizadas do corpo (SUMMANEM *et al.*, 1993; VOLLAARD & CLASENER, 1994; GRONLUND *et al.*, 2000).

A microbiota transitória, transiente ou alóctone é constituída, primariamente, de microrganismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos, encontrados em superfícies externas e internas durante algumas horas, dias ou mesmo semanas. Alguns componentes da microbiota transitória têm pouca importância, desde que a microbiota residente esteja em equilíbrio, mas, havendo alteração nesse equilíbrio, tanto os microrganismos transitórios quanto os residentes podem proliferar-se e causar doença (ELHAG *et al.*, 1986; VOLLAARD & CLASENER, 1994).

Tanto os microrganismos residentes quanto os transitórios, quando em contato com seus hospedeiros em sítios anatômicos específicos, como, por exemplo, o trato gastrointestinal, estão submetidos, permanentemente, a interferências inerentes à fisiologia do hospedeiro, mas, também, a uma variedade de fatores estressantes, como a limitação da disponibilidade e a diversificação de nutrientes, drogas antimicrobianas, agentes químicos e seus resíduos, que interferem nas interações microbianas, além do PH do meio, que passa a atuar como fator crítico para a seleção de bactérias (SALYERS, 1984).

Em termos populacionais, a sobrevivência bacteriana nos diversos sítios anatômicos dos seus hospedeiros está relacionada à sua capacidade de adaptação, incluindo a disseminação ou aquisição de genes, como os que codificam, por exemplo, a produção de toxinas ou a resistência a antimicrobianos, o que garante um reservatório de patógenos putativos de hospedeiros animais, visto que qualquer agente ou condição que possa alterar os padrões bioquímicos, fisiológicos e genéticos de indivíduos de uma população poderia alterar os padrões de virulência dessa população (LORIAN & GEMMELL, 1994; WITTE, 2000).

Define-se virulência ou patogenicidade como a capacidade de uma bactéria agredir um hospedeiro vivo, na maioria das vezes, em situação de infecção. Fator de virulência é o nome dado a um componente, produto bacteriano ou estratégia que contribua para a expressão da agressão (SALYERS & WHITT, 1994).

Os fatores de virulência podem ser classificados em duas categorias não excludentes: os que promovem a colonização e invasão bacteriana e aqueles que causam destruição tecidual no hospedeiro. No primeiro caso, citam-se cápsula,

fímbrias e adesinas; entre fatores de virulência que causam danos ao hospedeiro consideram-se o antígeno LPS (endotoxina), exotoxinas e enzimas hidrolíticas (SALYERS & WHITT, 1994).

### **2.3 Papel dos microrganismos do gênero *Bacteroides* na microbiota intestinal**

A microbiota intestinal possui um papel importante na saúde humana, fornecendo uma barreira contra a colonização de microrganismos exógenos e também de extrema importância no metabolismo realizando funções como fermentação, produção de energia, vitamina K, digestão e também responsável por estimular o desenvolvimento do sistema imune (GRONLUND *et al.*, 2000; FANARO *et al.*, 2003; PENDERS *et al.*, 2006).

O metabolismo microbiano no intestino humano pode resultar na produção de substâncias utilizáveis pelo hospedeiro, como carboidratos, aminoácidos e vitaminas, dentre outras substâncias. Estudos científicos mostram que animais isentos de germe necessitam de um acréscimo de 30% de calorias quando comparados com outros animais com microbiota associada ao intestino. Além disso, é aceito que estas bactérias são importantes para a modulação do sistema imunológico, por diferentes mecanismos (GRONLUND *et al.*, 2000; WEXLER, 2007).

Durante os estágios da vida, acontecem mudanças na composição da microbiota. Ao nascer, o intestino não apresenta microrganismos associados, e dentro de poucas horas, bactérias começam aparecer nas fezes. O trato gastrointestinal é colonizado primeiro por bactérias aeróbias facultativas, e o consumo gradual do oxigênio por estas bactérias muda a composição da microbiota, permitindo a sobrevivência de bactérias anaeróbias (PENDERS *et al.*, 2006; WEXLER, 2007)

A parte superior do intestino delgado possui um baixo nível populacional de microrganismos. Entretanto, a parte inferior contém uma microbiota bastante similar a do colón. O conteúdo bacteriano varia entre as diferentes partes do intestino grosso. Em adultos a massa constituída de bactérias anaeróbias esta em torno de  $10^{10}$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colônia por miligrama de fezes, mas em crianças este numero esta estritamente relacionado a idade (BEZIRTOGLOU, 1997).

Espécies de *Bacteroides* aparecem no neonato em aproximadamente dez dias depois do nascimento. Em crianças que estão em amamentação, eles não aparecem nas fezes nesta idade. A interação destes microrganismos com as células do intestino é facilitada pela presença de superfície celular componentes do estroma, mucinas e camadas da mucosa intestinal (WEXLER, 2007).

Bactérias que colonizam o intestino durante os primeiros dias de vida da criança são provenientes da mãe e do meio ambiente. Um dos primeiros determinantes da composição da microbiota é o tipo de parto. Em crianças nascidas de parto vaginal a colonização do seu intestino se dá através de bactérias presentes nas fezes das mães, enquanto que crianças nascidas de parto cirúrgico (cesariana) estarão expostas às bactérias do hospital e de seus cuidadores (WEXLER, 2007).

Segundo Penders e colaboradores (2006) em seu estudo sobre a composição da microbiota intestinal na primeira infância, o número de bactérias do grupo *Bacteroides fragilis* altera-se quando comparado o tipo de parto, alimentação das mães, uso de antibiótico no último mês de gestação, bem como o uso de antibióticos pelas crianças. A alimentação infantil é outro fator que altera a composição, uma vez que a proporção de bactérias do grupo *B.fragilis* em crianças que amamentam exclusivamente ao peito é menor quando comparadas as crianças que receberam alimentação artificial. Hábitos de higiene da mãe e a presença de animais domésticos é outro fator que influencia, mas de maneira discreta na microbiota infantil. Não sendo observado associação entre o nível de escolaridade das mães, o sexo das crianças e a presença de febre com a porcentagem de *Bacteroides* na microbiota fecal das crianças.

#### **2.4. Bastonetes Gram negativo anaeróbios do grupo *Bacteroides fragilis***

Bactérias anaeróbias podem ser descritas como aquelas que crescem em condições de baixo potencial de oxido-redução, usualmente relacionadas a reduzidas concentrações de oxigênio. Representam um grupo ecologicamente significativo da microbiota indígena de muitos mamíferos e sua notável habilidade e versatilidade metabólica lhes confere condições de agressores oportunistas (FINEGOLD, 1977; TANNOCK, 1988; FINEGOLD, 1990).

A predominância de bactérias anaeróbias em relação às aeróbias na microbiota indígena de seres humanos e outros animais é fato reconhecido em, praticamente, todas as áreas habitadas, como os tratos gastrintestinal e geniturinário, pele e a cavidade oral, chegando a atingir, em alguns sítios, a proporção de mil para um (FINEGOLD, 1995).

A grande maioria das doenças infecciosas por anaeróbios é causada por esses microrganismos anfíbios, sendo, portanto, de natureza endógena e polimicrobiana podendo ocorrer em todos os sítios anatômicos do corpo. Os processos infecciosos são amiúdes polimicrobianos, ou seja, as bactérias anaeróbias são encontradas em infecções mistas com outros anaeróbios ou anaeróbios facultativos (SUMMANEM,1993). Estas infecções podem ser derivadas de sítios como pele, intestino, nasofaringe e trato genital feminino (ANDERSON, MARR& BALLINGER, 1976; DUERDEN & DRASAR, 1991).

Anaeróbios são prevalentes da microbiota do hospedeiro, podendo ser encontrado nas superfícies de mucosas. A barreira que protege as mucosas pode sofrer traumas, devido a doenças, uso de medicamentos e terapias agressivas, como, quimioterapia e radioterapia, fornecendo assim uma oportunidade para os microrganismos anaeróbios escaparem das mucosas, invadirem tecidos e causar infecções. Em outros casos, os anaeróbios podem se mover de um sítio com microbiota abundante para uma outra área do corpo livre de microrganismos e produzir infecção neste sítio (FINEGOLD,1990).

Entre os anaeróbios, os bastonetes Gram negativo são os mais encontrados em processos patológicos e constituem cerca de um terço do total dos anaeróbios isolados de espécimes clínicos, sendo tais processos caracterizados por infecções que ocorrem, predominantemente, abaixo do diafragma, como abscessos intra-abdominais, hepáticos, úlceras, além de outros tipos de infecção, incluindo septicemia e necrose de tecidos. Há, também, relatos da participação destes microrganismos em abscessos pulmonares e em outros sítios (FINEGOLD,1977; ELHAG *et al.*,1986; DUERDEN & DRASAR,1991; JOTWANI *et al.*,1995; BROOK & FRAIZER,1999;CHANG *et al.*,1999).

As espécies do grupo *B. fragilis* se destacam na família *Bacteroidaceae*, que engloba os bastonetes Gram negativo anaeróbios, móveis ou imóveis, metabolizadores de carboidratos, peptonas e outros intermediários metabólicos, em

alguns casos com a produção de ácido (SALYERS,1984; FINEGOLD,1990). São constituintes da microbiota residente intestinal de seres humanos e outros animais e constituem cerca de 30% dos microrganismos encontrados nas fezes. Entre as diversas espécies do grupo, a espécie *B. fragilis* é considerada a de maior potencial patogênico (FINEGOLD, 1990). Essa espécie é normalmente comensal e acomete somente de 1% a 2% da microbiota humana, porém é o mais comum anaeróbio isolado de infecções do trato gastrointestinal. Portanto, estes microrganismos podem também ser responsáveis por causarem infecções com significativos índices de morbidade e mortalidade. Essas infecções estão associadas a presença do polissacarídeo capsular da espécie *B. fragilis* (WEXLER , 2007).

A virulência destas bactérias está associada à sua habilidade de aderir à superfície celular do hospedeiro, mediada pela expressão de cápsulas, fímbrias e adesinas; à produção de toxinas e enzimas hidrolíticas; além de componentes estruturais e metabólicos que atuam na agressão, estimulando a resposta inflamatória ou contribuindo para a persistência bacteriana frente às estratégias imunológicas, como polissacarídeos capsulares, endotoxinas (lipopolissacarídeos) e ácidos graxos de cadeia curta, que inibem a resposta de células T e interfere com a quimiotaxia, além de induzir apoptose em macrófagos e polimorfonucleares (EFTIMIADI *et al.*, 1991; TABAQCHALI & WILKS, 1992; SALYERS & WHITT, 1994; OBISO Jr *et al.*, 1997; GRONLUND, 2000; WEXLER, 2007).

A taxonomia do gênero *Bacteroides* vem sendo revista nos últimos 15 anos, com a inclusão e exclusão de espécies no gênero. Apesar das diferenças fisiológicas e genéticas, foi proposto que se limitasse à composição do gênero *Bacteroides* a um grupo que, é composto de dez espécies relacionadas: *B.caccae*, *B.distasonis*, *B.eggerthii*, *B.fragilis*, *B.merdae*, *B.ovatus*, *B.stercoris*, *B.thetaiotaomicron*, *B.uniformis*, *B.vulgatus* (DUERDEN& DRASAR,1991; SUMMANEM *et al.*,1993; BERGEY,1994). Entretanto, com o avanço dos estudos e com o desenvolvimento da bacteriologia de anaeróbios, através de técnicas como sequenciamento do gene codificador para RNAr 16S, grandes revisões taxonômicas no gênero *Bacteroides*, começaram a ser desenvolvidas e propuseram a reorganização do grupo (OLSEN & SHAH, 2001). Em 2005, várias espécies foram adicionadas ao gênero *Bacteroides*, incluindo *B. goldstenii*, *B. nordii* e *B. salyersai*, *B. plebeius*, *B. coprocola* e *B. massiliensis*. Recentemente, *B. goldsteinii*, *B.*

*distasonis* e *B. merdae* foram removidos para o gênero *Parabacteroides*. Contudo, a identificação como grupo *B. fragilis* ainda é reconhecida (WEXLER, 2007).

Assim, o grupo *B. fragilis* forma a maior parte da microbiota residente do trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais, além de colonizar outros sítios do corpo, especialmente superfícies de mucosas. Espécies do grupo podem ser potentes patógenos e são frequentemente isoladas de espécimes clínicos, particularmente a espécie *B. fragilis* (CUCHURAL & TALLY, 1986; ELHAG *et al.*, 1986; GOLDSTEIN & CITRON, 1988), embora todos os membros do grupo possam participar de infecções polimicrobianas com implicações óbvias na terapêutica. Contudo, devido à baixa frequência de isolados clínicos, muitos autores já colocaram em dúvida a patogenicidade dos *Bacteroides* que não a espécie *B. fragilis*. Entretanto, quando encapsuladas, estas bactérias também são capazes de causar doenças (BROOK, 1988; BROOK & FRAZIER, 1992; ALDRIDGE, 1995).

Dentre os microrganismos do grupo *B. fragilis*, a espécie *B. fragilis* é considerada a grande vilã da medicina por participar de diversas infecções no trato gastrointestinal, principalmente em quadros de diarreia aguda e doenças inflamatórias intestinais (JAWETZ, 2005). Dentre os processos inflamatórios intestinais, podemos citar a Colite Ulcerativa e a Doença de Crohn, que é caracterizada por uma inflamação crônica do trato gastrointestinal que pode contribuir para a formação de úlceras e granulomas. Alguns estudos revelaram que *E. coli* e *B. vulgatus* estão envolvidos neste processo patológico (FINEGOLD, 1990; WEXLER, 2007).

Quando os *Bacteroides* escapam do intestino, geralmente resultante da ruptura do epitélio gastrointestinal eles podem causar significativas patologias, incluindo formação de abscessos, no abdômen, pelve e bacteremia. A sepse intra-abdominal é a mais comum causa de infecção por *Bacteroides*. Durante os primeiros estágios de infecção, após aproximadamente 20h, anaeróbios facultativos como por exemplo *E. coli*, são os mais abundantes membros da infecção, reduzindo a taxa de oxigênio no tecido. Uma vez que o oxigênio tenha sido removido, espécies de anaeróbios como as espécies do grupo *B. fragilis*, se replicam e começam a predominar durante o segundo estágio da infecção (WEXLER, 2007).

Estes microrganismos são também responsáveis por causarem infecção no trato geniturinário, porém estas espécies não fazem parte da microbiota vaginal, mas podem ser ocasionalmente isolados de cultura. O envolvimento de anaeróbios em

endocardite não é comum, mas quando ocorrem podem causar sérias consequências, como por exemplo, arritmias, destruição valvular e choque cardiogênico, com uma taxa de mortalidade de 21 a 43% (FINEGOLD, 1990; WEXLER, 2007).

A incidência de bacteremias por anaeróbios decresceu na década de 80, porém na década de 90 houve um aumento progressivo. Procedimentos como quimioterapias podem causar danos nas mucosas e destruir as barreiras de proteção, fazendo com que estas bactérias possam se disseminar por todo o corpo. A taxa de mortalidade por bacteremia causada pelo grupo *B.fragilis* esta acima de 50%. Em crianças, a incidência de bacteremia por estes microrganismos parece ser menor do que em adultos (1 a 8%). Entretanto, a espécie *B. fragilis* é responsável por 36 a 64% dos casos. Infecções por anaeróbios em crianças podem estar relacionados a celulites, aspiração, pneumonia, botulismo infantil, conjuntivite e onfalite (WEXLER,2007).

Em outra abordagem, é aceito que linhagens de *Bacteroides*, presentes no cólon possam servir como reservatório de genes de resistência, os quais podem transferir para outras bactérias, ou entre elas mesmas. Esta elasticidade genética tem contribuído para o fenômeno de resistência múltipla a drogas observado nestas e em outras bactérias (NAKANO *et al.*, 2004; BETRIU *et al.*,2005; FILLE *et al.*, 2006; WEXLER, 2007).

Apesar dos vários estudos relacionados à virulência e a patogenicidade do grupo *B. fragilis*, o conhecimento da epidemiologia de infecções causadas por estes microrganismos é limitado. Muitos estudos têm se concentrado no desenvolvimento de métodos sorológicos e moleculares para a identificação inter e intraespecífica para diferenciação entre microrganismos do grupo, uma vez que as outras espécies do gênero também estão envolvidas em quadros clínicos (TABAQCHALI & WILKS, 1992).

A identificação de bactérias do grupo *Bacteroides* requer diversas técnicas e habilidades, como a coleta correta de espécimes evitando a contaminação com bactérias da microbiota, uso de meio de transporte adequado sem oxigênio, meio seletivo como *Bacteroides Bile Esculina* (BBE) e uso de técnicas moleculares, como Multiplex- PCR, com o uso de um grupo de iniciadores espécie específico, que identifica com rapidez e precisão as espécies do grupo *Bacteroides fragilis*(FINEGOLD,1995).

#### 2.4.1 Linhagens enterotoxigênicas de *Bacteroides fragilis*

A espécie *Bacteroides fragilis*, em certas condições, pode produzir enterotoxinas, que tem sido relacionadas com diarréias e outras doenças intestinais em animais, crianças, adultos jovens e idosos. Esta linhagem é chamada de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicas (ETBF), e seu envolvimento na etiologia de doenças gastrintestinais tem sido destacado por vários cientistas nos últimos vinte e cinco anos. Apesar disto, é sabido que os seres humanos podem ser portadores destas linhagens, e que para o desenvolvimento de doença clinicamente detectável é necessária a susceptibilidade do hospedeiro (PANTOSTI *et al.*, 1997; PRINDIVILLE *et al.*,2000).

Durante a última década, vários estudos têm enfatizado o papel das linhagens produtoras de enterotoxina como associadas à etiologia de doenças intestinais e extra-intestinais. Em 1984, Mayers e colaboradores relataram o isolamento da primeira linhagem de *B.fragilis* enterotoxigênica de amostra fecal de neonato.

A enterotoxina produzida por algumas linhagens de *B. fragilis* é uma metaloprotease, termolabil, dependente de zinco de aproximadamente 20kDa. É uma pró-toxina que se encontra no espaço periplasmático da parede celular bacteriana e precisa ser ativada para tornar toxina (MONCRIEF *et al.*,1995; OBISO *et al.*, 1997). Essa toxina recebe o nome de Fragilisina e é codificada pelo gene cromossomal *bft* é considerada um importante fator de virulência dentro e fora do lúmen intestinal podendo causar dano na mucosa, (JOTWANI *et al.*, 1995; PANTOSTI *et al.*, 1997). ETBF podem produzir 3 diferentes isótopos de enterotoxina, *bft-1*,*bft-2* e *bft-3* sendo os tipos mais comuns encontrados nos genes *bft-1* e *bft-2*. Estudos têm mostrado que o gene *bft-1* é predominantemente isolado em adultos com diarréia e o gene *bft-2* encontrado em crianças com esta doença (NAKANO *et al.*,2007).

A enterotoxina encontra-se nas chamadas ilhas de patogenicidade podendo assim ser transferidas através de transposons para outras linhagens ate então não enterotoxigenicas (WEXLER, 2007).

Considerando-se seus efeitos biológicos no hospedeiro, esta enterotoxina está associada à perda de fluidos por aumento da permeabilidade e secreção de cloretos pelas células epiteliais, esfoliação e alteração do citoesqueleto de células intestinais e, ainda, a manifestação clínica de câncer de colo retal. Estas alterações

fisiológicas produzidas pela enterotoxina têm sido associadas às condições clínicas relacionadas a doença diarréica em crianças, adultos e doença inflamatória do intestino (DURMAZ, DALGALAR & DURMAZ, 2005; NAKANO *et al.*, 2006; SHAOGUANG *et al.*, 2006; TOPRAK *et al.*, 2006).

Koshy e colaboradores (1996) demonstraram que o tratamento de células epiteliais HT29/C1 com a enterotoxina de *B. fragilis* resulta na redistribuição de microfilamentos de actina e também em um aumento do volume celular, mas sem causar injúria nas células. Foi sugerido que estas mudanças nos filamentos de actina podem ocasionar alterações na função do epitélio intestinal, contribuindo para a patogênese. Outros estudos sugerem que o alvo da Fragilisina seja a superfície celular de proteínas associadas à adesão célula a célula, causando a clivagem do domínio extracelular da E-caderina, seguida de uma completa degradação da mesma (WU *et al.*, 1998).

Estudos recentes demonstraram que entre 73 pacientes que apresentavam câncer de colo retal, 56 possuíam *B. fragilis*, sendo que em 21 deles, linhagens enterotoxigênicas foram detectadas. No grupo controle de 59 pacientes, 40 apresentaram *B. fragilis*, sendo que em 5 pacientes, foram detectados linhagens enterotoxigênicas. O papel desta enterotoxina no processo da carcinogênese tem sido estudado e sugere-se que o acúmulo de cateninas livres no citosol das células atingidas poderia provocar, o aumento da transcrição da oncogênese no núcleo (TOPRAK *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, a detecção das amostras de *B. fragilis* produtoras de enterotoxinas é feita pela cultura destes anaeróbios e ensaios de citotoxicidade. Estes experimentos apresentam limitações por serem dispendiosos e onerosos. Técnicas moleculares para detecção de genes, como o *bft*, relacionado à produção de enterotoxinas têm emergido como ferramenta de investigação epidemiológica para detecção de linhagens enterotoxigênicas isoladas de seres humanos e outros animais, além do ambiente (WU *et al.*, 2003; SHARMA & CHAUDHRY, 2006; ÁVILA-CAMPOS *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ocorrência e distribuição de espécies do grupo *Bacteroides fragilis* em amostras fecais de crianças com e sem manifestação clínica de doença diarréica por metodologia dependente de cultura microbiológica e/ou biologia molecular, seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e investigar a presença de linhagens produtoras de enterotoxina nas amostras fecais.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar por provas bioquímico-fisiológicas e por metodologia de biologia molecular, linhagens de *Bacteroides fragilis* a partir de amostras de fezes oriundas de crianças com e sem manifestação clínica de diarréia;
- Detectar linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis* diretamente nas amostras de fezes oriundas de crianças com e sem manifestação clínica de diarréia, por metodologia de biologia molecular, independente de cultivo microbiológico;
- Comparar a identificação microbiana por método bioquímico-fisiológico e biologia molecular das linhagens bacterianas isoladas;
- Detectar, pela amplificação de fragmento interno do gene *bft*, por biologia molecular, linhagens de *B. fragilis* enterotoxigênicas diretamente nas amostras de fezes;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de interesse clínico-microbiológico das linhagens bacterianas isoladas das amostras de fezes coletadas.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

## 4. PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1. Amostras fecais:

Foram avaliadas 175 amostras fecais provenientes de crianças apresentando (n=110) ou não (n=65) manifestações clínicas no trato gastrointestinal, de 0 a 5 anos de idade, obtidas em Juiz de Fora, MG, recebidas no Laboratório de Fisiologia Bacteriana e Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, vinculadas ao projeto “*Investigação epidemiológica de patógenos virais e bacterianos associados a manifestações clínicas no trato gastrointestinal em crianças e adultos na Zona da Mata Mineira*”. As amostras foram codificadas para preservar o anonimato dos doadores cujos responsáveis apresentaram consentimento pela leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1) no ato da coleta. Além disso, foi aplicado um questionário para coleta de dados epidemiológicos pertinentes à pesquisa (Anexo 2). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UFJF (parecer CEP/UFJF 281/2006 – Anexo 3).

Os critérios de inclusão deste trabalho foram, crianças na faixa etária de 0 a 5 anos e que não tinham sido tratadas com antibióticos nos últimos 30 dias. Sendo excluídas as crianças com idade superior a 5 anos e que nos últimos 30 dias tenham sido tratadas com antibióticos.

As fezes, *in natura*, foram coletadas em frascos descartáveis esterilizados contendo solução salina glicerinada tamponada pré-reduzida (NaCl 0,25%, Glicerina 10%, L-cisteína 0,1%, ágar 1%) e encaminhadas ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF, sob a orientação de que o tempo entre a coleta e o recebimento no laboratório eram determinantes para a pesquisa.

As amostras consideradas aptas para cultura microbiológica (até 4 horas entre coleta e processamento) foram codificadas para preservar o anonimato dos voluntários e, devidamente processadas para isolamento de linhagens

bacterianas representativas do grupo *B. fragilis*. As fezes consideradas não aptas para cultura microbiológica foram codificadas para preservar o anonimato dos voluntários, diluídas em solução salina e congeladas para pesquisa direta de espécies bacterianas do grupo *B. fragilis* por técnica de biologia molecular.

#### 4.2. Isolamento das linhagens bacterianas a partir de espécimes fecais aptos para cultura microbiológica

Os frascos descartáveis foram pesados antes e após a coleta para quantificar o material fecal coletado. A partir desse valor, foram feitas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  com salina estéril (NaCl, 0,85%). Entretanto, observou-se que as diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  eram adequadas para o isolamento microbiano, de acordo com a carga bacteriana das fezes. Assim, inoculou-se 100  $\mu$ L dessas diluições em placas de Petri contendo meio seletivo para anaeróbios do gênero *Bacteroides* - ágar *Bacteroides* Bile Esculina (BBE, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia), acrescido de gentamicina 100  $\mu$ g/mL (Schering-Plough S/A, Brasil). Após a inoculação, as placas foram incubadas anaerobicamente em dessecadores de vidro, com atmosfera de 90% de  $N_2$  e 10% de  $CO_2$ , a 37°C por 48/h.

Após o período de incubação, foram escolhidas as placas que apresentavam de 30 a 300 colônias de aspecto característico de bactérias do grupo *B. fragilis*, não importando se apresentavam ou não um enegrecimento do meio na área de crescimento bacteriano, fato este que caracteriza a hidrólise da esculina (Figura 1).



FIGURA 1 - Aspecto característico do crescimento de colônias do grupo *B. fragilis* em ágar BBE, evidenciando a hidrólise da esculina.

### 4.3. Identificação presuntiva das linhagens bacterianas

O crescimento bacteriano no ágar BBE de colônias de aspecto cremoso e translúcido com hidrólise ou não da esculina, e o crescimento apenas em anaerobiose (teste respiratório) associados aos aspectos morfotintoriais, permitiam a identificação presuntiva da amostra como pertencente ao grupo *B. fragilis* de acordo com Summanen e colaboradores (1993).

- *Teste Respiratório*

De cada placa de ágar BBE com crescimento bacteriano típico, eram selecionadas de duas a vinte colônias, dependendo da proporção de colônias seguramente isoladas apresentadas em cada placa, com características macroscópicas típicas, para posterior inoculação em caldo de enriquecimento – Caldo *Brain Heart Infusion* (Acumedia Manufactures, EUA) suplementado com L-cisteína, extrato de levedura, hemina e menadiona (caldo BHI-S).

O crescimento no caldo BHI-S era observado através de turvação do mesmo, e então essas culturas eram submetidas a testes respiratórios. Neste teste, as bactérias eram semeadas em duplicata em ágar BHI, incubando-se, posteriormente, uma das placas em anaerobiose (90% de N<sub>2</sub> e 10% de CO<sub>2</sub>), e a outra que apresentava as mesmas bactérias em aerobiose, a 37° C por 48/h.

Somente aqueles isolados que cresciam apenas em anaerobiose eram considerados anaeróbios estritos e, então, elegíveis para serem utilizados no estudo. As linhagens então obtidas eram armazenadas em condições adequadas para avaliações posteriores, criopreservadas em freezer a -20°C.

#### *Avaliação Microscópica*

Os anaeróbios estritos selecionados pelo teste respiratório foram submetidos à avaliação morfotintorial através de esfregaços corados pelo Método de Gram, evidenciando-se a característica típica do grupo *B. fragilis* - bastonetes Gram negativo, pleomórficos, com vacúolo central (Figura 2).

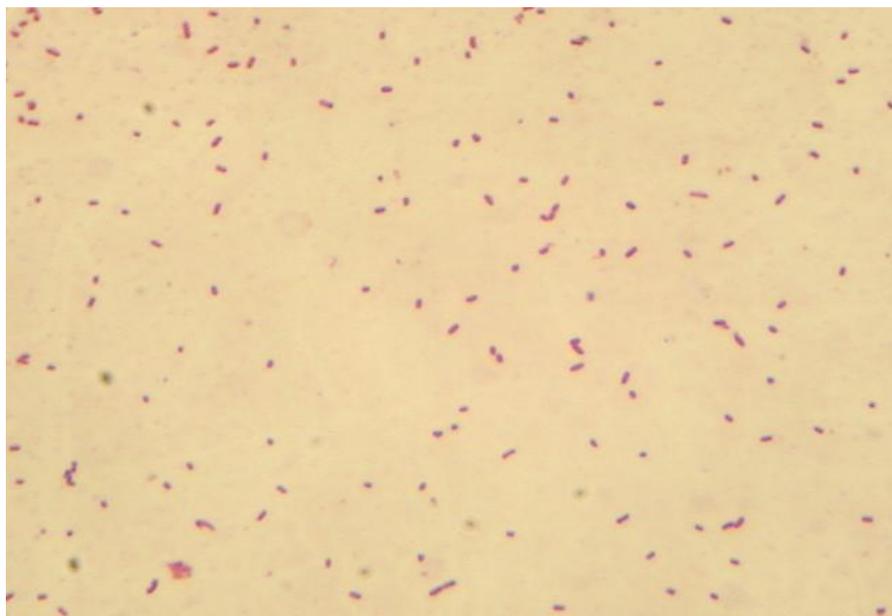


FIGURA 2 - Aspecto morfotintorial de esfregaço de cultura microbiana (*Bacteroides fragilis*) corado pelo método de Gram evidenciando as características morfológicas de células microbianas de representantes do grupo *B. fragilis*.

#### 4.4. Identificação bioquímica das linhagens bacterianas

A identificação bioquímica no nível específico das linhagens obtidas foi feita segundo recomendações metodológicas propostas por Summanen *et al.* (1993) e ratificadas por Diniz (1997), considerando-se os diferentes esquemas de identificação bioquímica disponíveis para o grupo *B. fragilis*. A linhagem *B. fragilis* ATCC 25285 foi incluída nos experimentos, como controle de qualidade.

Os testes utilizados permitiram verificar a produção de catalase, indol e ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), a hidrólise de esculina e a fermentação de carboidratos.

Os resultados foram interpretados de acordo com a chave de identificação proposta por Diniz (1997), como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Chave de identificação de espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, proposta por Diniz (1997), adaptado de Sutter, Citron e Finegold (1980); Summanen *et al.* (1993) e Holt *et al.* (1994).

ESPÉCIE	IND	CAT	ESC	H2S	ARA	CEL	RAM	SAC	TRE	XIA	XIL	SAL
<i>Bacteroides cacae</i>	-	-	+	-	+	+-	+-	+	+	-	+	+-
<i>Bacteroides distasonis</i>	-	+	+	+	+-	+	+-	+	+	-	+	+
<i>Bacteroides eggerthii</i>	+	+-	+	Nd	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Bacteroides merdae</i>	-	+-	+	+	+-	+-	+	+	+	-	+	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	+	+-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacteroides stercoris</i>	+	-	+	Nd	+-	+-	+	+	-	+-	+	-
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	+	+-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+-
<i>Bacteroides uniformis</i>	+	+-	+	Nd	+	+	+-	+	-	+-	+	+-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	-	+-	+-	+	+	-	+	+	-	+-	+	-

IND (indol); CAT (catalase); ESC (esculina); H2S (ácido sulfídrico); ARA (arabinose); CEL (celobiose); RAM (raminose); SAC (sacarose); TRE (trealose); XIA (xilano); XIL (xilose); SAL (salicina); nd (dados não disponíveis ou não testados).

**Indol:** Para pesquisar a produção de indol, inoculou-se com alça bacteriológica previamente flambada, a cultura crescida em caldo BHI por 24/h, em 5 mL de meio sulfeto-indol-motilidade (SIM), que foi incubado por 48/h, a 37°C, em anaerobiose. Após o período de incubação, a leitura foi realizada adicionando-se 3 gotas do reagente de Erlich, que tem como princípio ativo o grupo aldeído do *p*-dimetilaminobenzaldeído, que forma um complexo vermelho ao reagir com o indol.

**Catalase:** A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O teste para verificar a produção desta enzima foi realizado em lâminas de vidro, gotejando-se diretamente sobre fragmentos das colônias peróxido de hidrogênio a 10%, e observando-se a formação de bolhas de gás.

**Ácido Sulfídrico (H<sub>2</sub>S):** A produção de H<sub>2</sub>S foi pesquisada em meio SIM. Com auxílio da alça bacteriológica, a cultura crescida em caldo BHI foi inoculada em 5 mL deste meio que então foi incubado em anaerobiose, por 48/h, a 37°C. A reação envolve a degradação do tiosulfato de sódio em meio ácido com produção do gás sulfídrico.

Este gás reage com íons férricos do meio, formando um composto negro, que é o sulfeto ferroso.

*Esculina:* A esculina é um glicosídeo substituído que pode ser hidrolisado por certas bactérias para produzir glicose e esculetina, formando um complexo negro, devido à reação da esculetina com íons férrico presentes no meio (KONEMAN *et al.*, 2001). Dessa forma, para a pesquisa de hidrólise de esculina, inoculou-se 0,3 mL de cultura crescida em caldo BHI por 24/h, em 5 mL de meio Py (Peptone Yeast) + esculina, que foi incubado em anaerobiose, por 48/h, a 37°C. Após o crescimento bacteriano, o teste era revelado pela adição de algumas gotas de citrato férrico amoniacal. O desenvolvimento de cor negra, e a ausência de fluorescência sob luz ultravioleta indicam reação positiva.

*Fermentação de carboidratos:* Foram diluídos 4 mL de cultura crescida em caldo BHI por 24 h, em anaerobiose, em 96 mL de caldo Py. O meio foi homogeneizado e, em seguida 3,6 mL desta diluição foram adicionados a tubos teste, em duplicata, contendo 0,4 mL de solução de açúcar (solução estoque a 10%), obtendo-se a concentração final do carboidrato de 1% (raminose, xilose, salicina, xilano, celobiose e sacarose) e, também, 0,4 mL de solução dos açúcares arabinose e trealose (solução estoque a 5%), onde a concentração final do carboidrato era 0,5%. Para o controle da atividade fermentativa, foram inoculados, 4 mL da cultura diluída em tubos teste sem carboidrato, em duplicata. Os tubos foram incubados a 37°C, em anaerobiose, por 48h. Após este período, era medido o pH em pHmetro digital Gehaka 1800 (Indústria e Comércio Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda., SP), e determinava-se o Índice de Acidificação (IA), pela diferença da média do pH entre as culturas inoculadas sem carboidrato e a média do pH das mesmas culturas inoculadas com os carboidratos. Se:  $IA < 0,3 \rightarrow$  Reação Negativa (sem fermentação do carboidrato); Se:  $IA > 0,3 \rightarrow$  Reação positiva (fermentação do carboidrato).

#### 4.5. Identificação molecular das linhagens isoladas

Foi realizada a extração do DNA bacteriano para ser usado nas reações em cadeia da polimerase (PCR). A suspensão das linhagens bacterianas isoladas que estavam congeladas, em meio de congelamento apropriado, foram aliquotadas (200µL) e, posteriormente, centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante e o restante foi solubilizado em 50/ µL TE (Tris pH 8, 10 mM; EDTA pH 8, 1 mM) e submetido à fervura por 15 minutos. Para identificação das linhagens isoladas em cultura, foi utilizada a técnica de PCR Multiplex (LIU *et al.*, 2003), utilizando-se diferentes iniciadores (Tabela 1), de acordo com o esquema apresentado no Quadro 2. A técnica foi baseada na amplificação dos genes codificadores para o RNAr 16S e 23S, além da região variável espaçadora intergênica (ISR) destes microrganismos.

A reação de PCR foi realizada em 35 ciclos, utilizando-se 0,5µM de cada iniciador. Cada ciclo consistiu de 95°C por 20 s para a desnaturação, anelamento por 1 min a 52°C para o PCR-G, 62°C para o PCR-I, 60°C para o PCR-II, e 55°C para o PCR-III; a extensão foi realizada a 72°C por 30 s. Um ciclo de 72°C por 5 min foi adicionado na extensão final.

De acordo com essa técnica, as espécies foram divididas em três subgrupos a partir de um PCR inicial denominado PCR-G. Esta etapa direcionava as espécies, de acordo com o tamanho da banda visualizada, para três subgrupos de reações subsequentes (PCR-I, PCR-II, PCR-III) realizadas com uma mistura de primers espécie-específico que possibilitavam a identificação em nível de espécie.

Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida (5 %), em tampão Tris-borato EDTA 1X (Tris base; Ácido Bórico ; EDTA, pH8). Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio. Os perfis de amplificação gênica foram comparados a padrões já estabelecidos e entre si para detecção da ocorrência de linhagens bacterianas de interesse.

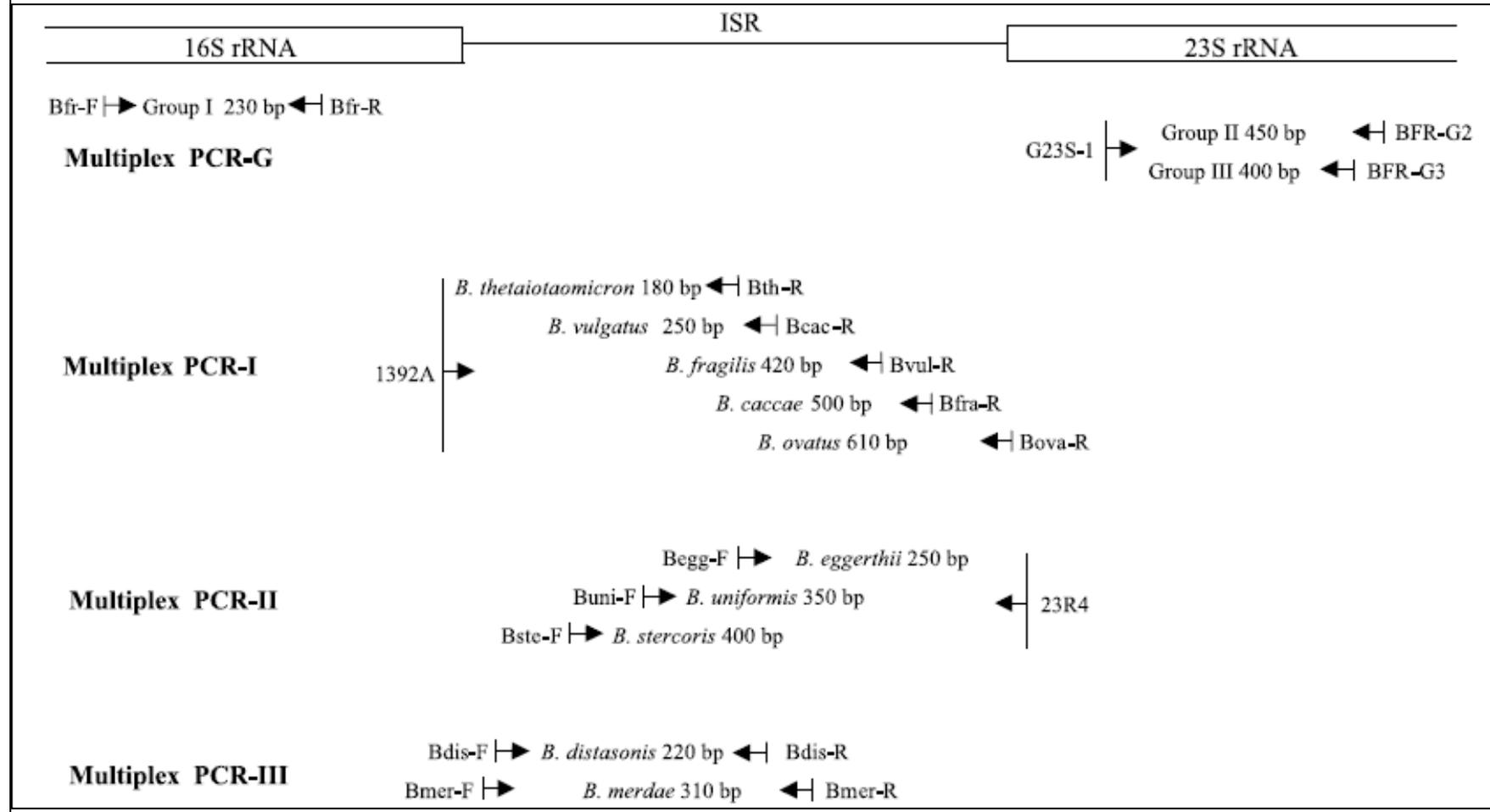
Linhagens bacterianas de referência representativas das 10 espécies que compõem o grupo *Bacteroides fragilis* foram incluídas como controle positivo na padronização dos experimentos: *Bacteroides caccae* ATCC 43185, *Bacteroides distasonis* VPI 4223, *Bacteroides eggerthii* VPI B851, *Bacteroides fragilis* ATCC

25285, *Bacteroides merdae* ATCC 43184, *Bacteroides ovatus* VPI 0435, *Bacteroides stercoris* ATCC 43183, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29148, *Bacteroides uniformis* VPI 0061, *Bacteroides vulgatus* VPI 4245

TABELA 1 - Oligonucleotídeos utilizados neste estudo, de acordo com metodologia proposta por Liu *et al.* (2003) para identificação de espécies do grupo *Bacteroides fragilis*.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
16S-2	AGTCGTAACAAGGTARCCGTA
23R4	GGGTTBCCCCATTCGG
G23S-1	GTTGGCTTAGAAGCAGC
G23S-2	CATTTTGCCGAGTTCCTT
Bfr-F	CTGAACCAGCCAAGTAGCG
Bfr-R	CCGCAAACCTTTCACTGACTTA
Bfr-G2	ATCAGGTTGACTCTTGCT
Bfr-G3	CCGTCAGCTGGCAGGA
1392A	GTACACACCGCCCGT
Bth-R	ACCTATGAAATCGTTGTTACG
Bvul-R	GGCTTCTTACTTTCTCTCTCCG
Bfra-R	GCTAATCCCCAATCATAC
Bcac-R	TCGTTTCCATTGCTGG
Bova-R	AATAATGCGTACTCGAACAC
Begg-F	GTCATATTAACGGTGGCG
Buni-F	TCCGTTTTCCACTTATAAGA
Bste-F	CTACGACATAGTCTTGGTGAG
Bdis-F	TGATCCCTTGCTGCT
Bdis-R	ATCCCCCTCATTGCGA
Bmer-F	GAGGTATGTAGCTCTCTGGTA
Bmer-R	TTTTTACCCCTTACGGAG

QUADRO 2 - Iniciadores e locais de alinhamento, com indicação dos tamanhos dos amplicons produzidos por cada reação de PCR multiplex para identificação genética das diferentes espécies do grupo *B. fragilis*, de acordo com Liu *et al.* (2003).



#### 4.6. Detecção de representantes do grupo *Bacteroides fragilis* e pesquisa do gene da enterotoxina (*btf*) diretamente nos espécimes fecais.

Alíquotas de 500/ $\mu$ l da diluição de  $10^{-1}$  das fezes solubilizadas em 1 ml de salina esterilizada foram utilizadas para extração do DNA, a ser usado como molde nas reações de PCR, para detecção de gene da enterotoxina *btf*, de acordo com metodologia descrita por Diniz e colaboradores (2004), com algumas modificações para clarificação do material fecal. As suspensões de material fecal foram acrescidas de 1000/ $\mu$ l de TES (10 mM; Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) e nova solução foi centrifugada a 14000/rpm por 15 minutos. Ao sedimento obtido foram adicionados 1,5ml de TES e a solução foi novamente centrifugada a 500/rpm por 1 mim para precipitação de restos alimentares e fibras. O sobrenadante foi coletado, transferido para novo tubo e o volume ajustado para 1,5ml com TES e a nova solução foi centrifugada a 12000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 500/ $\mu$ l de solução de lise fecal (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH 8.0, 4% SDS) foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos em banho- maria. Posteriormente 50/ $\mu$ l de SDS 20% foi adicionado e as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 500 $\mu$ l de fenol-tris-equilibrado pH 8.0 e clorofórmio-alcool isoamilico (24:1) e as amostras centrifugadas a 14000/rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada e colocada em novo tubo, novamente 500/ $\mu$ l de clorofórmio-alcool isoamilico (24:1) foi adicionado e as amostras centrifugadas a 14000/ rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada e transferida para novo tubo. A esta solução foram adicionados 50/  $\mu$ l de acetato de potássio (5M) e 1.2 mL de etanol gelado. A solução foi gentilmente homogeneizada e o sistema incubado por 30 minutos a -20°C para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 14000/ rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi desprezado e 200/  $\mu$ l de solução de TE foi adicionado para suspender o DNA.

A detecção das linhagens bacterianas a partir do DNA total extraído das fezes foi realizada de acordo com a metodologia escrita, segundo Liu e colaboradores (2003).

Para pesquisa da enterotoxina de *B. fragilis*, foi utilizado o método descrito por Pantosti e colaboradores (1997), com os iniciadores BF1 e BF2, e com as seguintes condições de amplificação utilizando-se 0,5 $\mu$ M de cada iniciador:

desnaturação inicial 95°C, 5 min seguido de 35 ciclos de 94°C, 1min - 52°C, 1min - 72°C, 1min e extensão final de 72°C, 5 min.

Os amplicons obtidos em cada reação foram separados em gel de poliacrilamida a 6 % nas mesmas condições já descritas e analisados em transluminador de luz ultravioleta, após tratamento com brometo de etídio. Após documentação, os perfis de amplificação gênica foram comparados a padrões já estabelecidos e entre si para detecção da ocorrência de linhagens bacterianas de interesse.

A linhagem bacteriana de referência *Bacteroides fragilis* enterotoxigênica ATCC 43859 foi utilizada como controle positivo na padronização dos experimentos.

#### 4.7. Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, antigo NCCLS, 2004 – norma específica para testes com bactérias anaeróbias), foram testadas as drogas: ampicilina (Medquímica Indústria Farmacêutica Ltda., Brasil), ceftriaxona (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil), clindamicina (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil), cloranfenicol (Medquímica Indústria Farmacêutica Ltda., Brasil), meropenem (AstraZeneca, Brasil), e as associações ampicilina/sulbactam (Strides Arcolab Limited, Índia) e piperazilina/tazobactam (Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda., Brasil).

Foram preparadas duas soluções estoque de cada droga (10 mg/mL e 5 mg/mL). Para ampicilina, ceftriaxona, clindamicina, meropenem, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam, o diluente utilizado foi a água destilada. No entanto, para o cloranfenicol, foi necessária para a diluição uma mistura de 95% de etanol e 5% de água (CLSI, 2007). Em seguida, as soluções foram esterilizadas por filtração com auxílio de filtro com membrana de 0,22 µm (Milipore Indústria e Comércio Ltda., Brasil).

Concentrações crescentes (de 0,06 µg/mL a 1024 µg/mL) das drogas foram adicionadas a frascos estéreis contendo 20 mL do meio de cultura fundido, o ágar Brucela (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia), que foi vertido em placas de Petri estéreis. Com o uso do Replicador de Steers (STEERS, FOLTZ e GRAVES, 1959), inóculos de cultura, previamente crescida por 24h em caldo BHI, foram adicionados às drogas (em duplicata), em ordem crescente de concentração. As placas então foram incubadas a 37°C, em anaerobiose. Incluíram-se também placas controle, ou seja, sem adição da droga, para assegurar a qualidade do teste. Usou-se para o controle de qualidade a linhagem padrão *B. fragilis* ATCC 25285.

A leitura foi feita após 48 horas de incubação, determinando-se a concentração inibitória mínima (MIC) da droga para cada isolado, que foi definida como a menor concentração de cada agente antimicrobiano que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano macroscópico, bem como a classificação quanto à susceptibilidade às drogas.

## 5 RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1 População estudada

Foram incluídas na investigação 110 crianças provenientes de serviços de atendimento pediátrico da cidade de Juiz de Fora, MG, com manifestação clínica de doença diarréica, além de 65 crianças sem manifestação clínica de doença diarréica, provenientes da comunidade, também em Juiz de Fora, MG. Os espécimes fecais foram recebidos e processados imediatamente, no período de maio de 2007 até dezembro de 2008, distribuídas aleatoriamente durante as diferentes estações do ano. As características da população estudada encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2 - Características da população amostrada.

Grupo de estudo	Com diarréia		Sem diarréia		Total	
	n	%	n	%	N	%
Sexo masculino	64	58	41	63	105	60
Sexo feminino	46	42	24	37	70	40
Idade média (meses)	27 meses		26 meses		26,5 meses	

Um total de 33% dos pacientes com diarréia e 32% das crianças do grupo controle encontravam-se na faixa etária de até 12 meses (FIGURA 3). Aproximadamente 52% das amostras foram obtidas nos meses chuvosos de dezembro a maio, entre elas 50% de pacientes com manifestação de doença diarréica e 55% de crianças do grupo controle. Em relação ao saneamento básico, 100% das famílias dispunham de água tratada em seus domicílios e existência de fossa asséptica ou rede de esgotos.

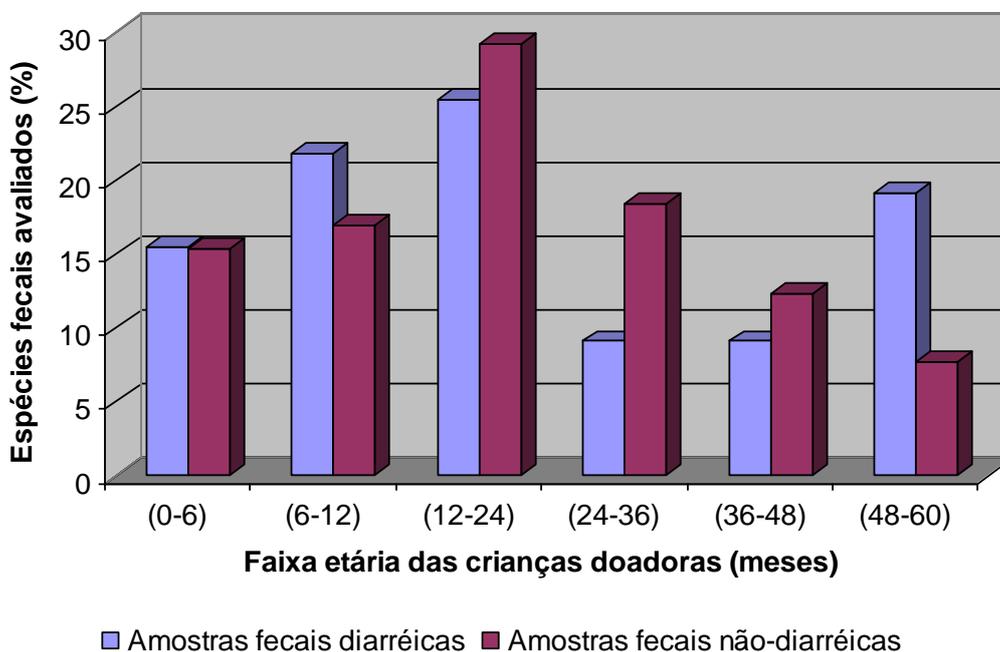


FIGURA 3 – Distribuição por idade do grupo de crianças cujas fezes foram amostradas neste estudo, após consentimento dos responsáveis.

Apesar de todos os responsáveis pelas crianças doadoras de material fecal, bem como os enfermeiros e pediatras colaboradores do estudo terem sido instruídos da importância do rápido processamento das amostras no laboratório para a recuperação *in vitro* de bactérias anaeróbias, houve uma grande variação do tempo de coleta até o processamento.

As fezes, diarréicas ou não, foram processadas sempre imediatamente após seu registro de recebimento, sendo que 23% das amostras foram manipuladas no intervalo de tempo de até quatro horas da sua coleta, enquanto que 77% das amostras foram manipuladas com mais de quatro horas após sua coleta, num período que variou de quatro horas até nove dias após a coleta, neste caso, as fezes foram consideradas não aptas para cultivo microbiológico. Assim, das 175 amostras fecais obtidas, apenas 40 espécimes foram considerados para isolamento de linhagens representativas do grupo *B. fragilis*.

## 5.2 – Isolamento e identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*

Considerando-se que apenas 40 espécimes fecais foram considerados aptos para isolamento e identificação de linhagens bacterianas, divididos entre espécimes diarréicos (43) e não diarréicos (4), totalizando 47 linhagens bacterianas do grupo *B. fragilis*. O método de caracterização bioquímica permitiu a identificação de oito espécies do grupo *B. fragilis* entre os isolados obtidos: *B. distasonis*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. caccae*, *B. stercoris*, *B. uniformis*, *B. merdae* e *B. thetaiotaomicron*. O método de biologia molecular permitiu a caracterização de quatro espécies do grupo entre os mesmos isolados: *B. distasonis*, *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *B. thetaiotaomicron* (FIGURA 4).

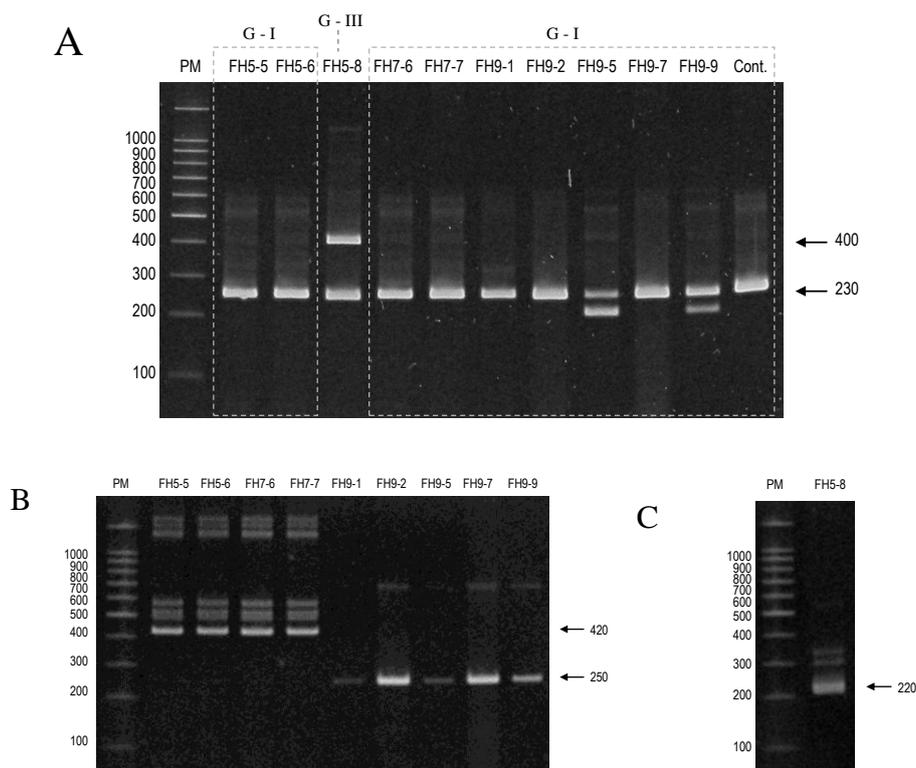


FIGURA 4 – Eletroforegramas representativos da identificação de *Bacteroides* spp. por Multiplex-PCR isolados de amostras fecais. A – Reação G (230bp => Grupo I; 230 + 400bp => Grupo III). B – Reação para Grupo I: 420bp => *B. fragilis*; 250bp => *B. vulgatus*. C – Reação para Grupo III: 220bp => *B. distasonis*. Não foram identificadas espécies com padrão de identificação de Grupo II. PM – padrão de peso molecular 100 pb.

Considerando-se as duas metodologias utilizadas, os resultados indicam diferentes situações encontradas: 25 amostras bacterianas foram igualmente identificadas utilizando-se as duas metodologias (TABELA 3); 05 amostras foram identificadas pela metodologia de biologia molecular, entretanto as mesmas amostras não foram corretamente caracterizadas pela metodologia bioquímico-fisiológica podendo ser, de acordo com esta metodologia, classificadas em diferentes grupos taxonômicos (TABELA 4); 09 amostras bacterianas foram identificadas pela metodologia molecular em diferentes grupos taxonômicos em relação à metodologia bioquímico-fisiológica, inclusive a linhagem controle *B. fragilis* ATCC 25285 (TABELA 5); 08 amostras bacterianas foram identificadas em diferentes grupos taxonômicos pelas duas metodologias, entretanto, pela metodologia bioquímico-fisiológica as amostras foram classificadas em mais de um grupo taxonômico (TABELA 6).

TABELA 3 – Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia de biologia molecular dos espécimes fecais, cujas metodologias permitem identificação semelhante.

<b>Código do espécime</b>	<b>Identificação genética</b>	<b>Identificação bioquímica</b>
<b>FC4-1</b>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i>
<b>FC14</b>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i>
<b>FC24</b>	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i>
<b>FH1-2</b>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i>
<b>FH4-2</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH4-5</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH4-6</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH4-9</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH5-1</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH5-3</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH5-8</b>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i>
<b>FH9-1</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH9-2</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH9-5</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH9-9</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH9-17</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH9-13</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH10-2</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<b>FH10-11</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i>
<b>FH25-11</b>		
<b>FH43</b>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i>
<b>FH49-1</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>
<b>FH49-2</b>	<i>B. thetataomicron</i>	<i>B. thetataomicron</i>
<b>FH49-3</b>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i>
<b>FH60</b>	<i>B. thetataomicron</i>	<i>B. thetataomicron</i>

TABELA 4 – Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia de biologia molecular dos espécimes fecais, cuja metodologia bioquímico-fisiológica permite identificação bacteriana em mais de um grupo taxonômico.

Código do espécime	Identificação genética	Identificação bioquímica
FH1-1	<i>B. distasonis</i>	<i>B. distasonis</i> <i>B. caccae</i> <i>B. merdae</i> <i>B. thetataomicron</i>
FH4-10	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i> <i>B. uniformis</i> <i>B. stercoris</i>
FH5-6	<i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i> <i>B. distasonis</i> <i>B. merdae</i>
FH9-7	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. stercoris</i> <i>B. vulgatus</i>
FH9-15	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i> <i>B. stercoris</i>

TABELA 5 – Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e biologia molecular dos espécimes fecais, cujas metodologias permitem identificação discordante.

Código do espécime	Identificação genética	Identificação bioquímica
FH4-1	<i>B. fragilis</i>	<i>B. distasonis</i>
FH5-5	<i>B. fragilis</i>	<i>B. distasonis</i>
FH9-11	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. caccae</i>
FH10-1	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. caccae</i>
FH10-7	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. caccae</i>
FH10-12	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. caccae</i>
FH10-16	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. fragilis</i>
FH10-4	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. uniformis</i>
FC4-6	<i>B. fragilis</i>	<i>B. merdae</i>
ATCC 25285	<i>B. fragilis</i>	<i>B. distasonis</i>

TABELA 6 – Identificação de linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis*, por método bioquímico-fisiológico e metodologia de biologia molecular dos espécimes fecais, cujas metodologias permitem identificação discordante e em mais de um grupo taxonômico.

<b>Código do espécime</b>	<b>Identificação genética</b>	<b>Identificação bioquímica</b>
<b>FH7-6</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. uniformis</i> <i>B. vulgatus</i>
<b>FH7-7</b>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. caccae</i> <i>B. uniformis</i>
<b>FH9-14</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. merdae</i> <i>B. caccae</i> <i>B. stercoris</i>
<b>FH10-3</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. caccae</i> <i>B. stercoris</i> <i>B. uniformis</i>
<b>FH10-9</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. fragilis</i> <i>B. stercoris</i>
<b>FH10-10</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. uniformis</i> <i>B. stercoris</i> <i>B. fragilis</i>
<b>FH10-13</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. distasonis</i> <i>B. caccae</i>
<b>FH10-19</b>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. stercoris</i> <i>B. uniformis</i>

### 5.3 Pesquisa do grupo *Bacteroides fragilis* diretamente nos espécimes fecais

Quando a avaliação foi feita diretamente dos espécimes fecais, por biologia molecular, sem o passo de cultivo e identificação presuntiva, espécies do grupo *Bacteroides fragilis* foram detectadas em 90 (51,5%) dos espécimes avaliados considerando-se fezes diarréicas e não diarréicas (Figura 5).

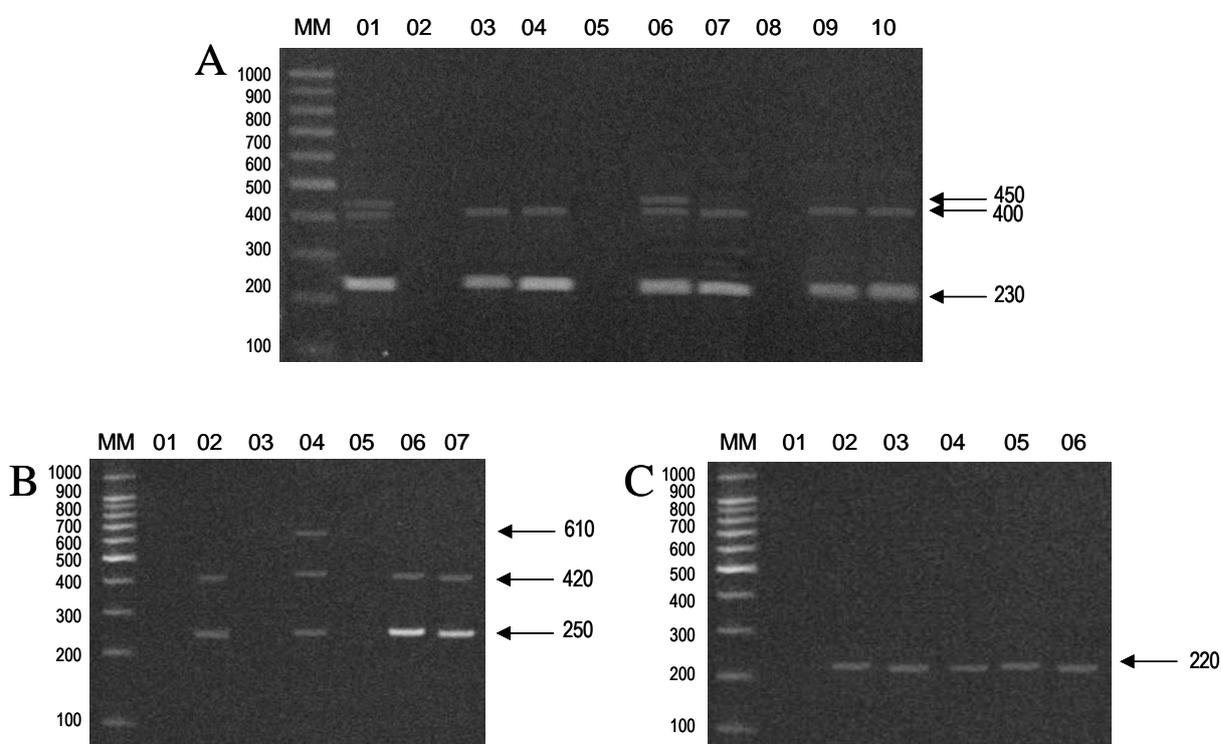


FIGURA 5 – Eletroforegramas representativos da identificação de *Bacteroides* spp. isolados de amostras fecais por PCR - Multiplex. A – Reação G (230bp => Grupo I; 230 + 450 => Grupo II; 230 + 400bp => Grupo III). B – Reação para Grupo I: 420bp => *B. fragilis*; 250bp => *B. vulgatus*; 610bp => *B. ovatus*. C – Reação para Grupo III: 220bp => *B. distasonis*. MM – padrão de marcador molecular 100 pb.

Considerando-se somente as fezes diarréicas, espécies do grupo (*B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae* e *Bacteroides* sp.) foram detectadas em 49 (44%) dos espécimes e distribuídas como representado na figura 6.

Em 61 (56%) espécimes fecais obtidos de pacientes apresentando manifestações clínicas no trato gastrointestinal, representantes do grupo *B. fragilis* não foram detectados, pela observação de ausência de amplicons obtidos nas reações de PCR.

Considerando-se somente as fezes não diarréicas, espécies do grupo (*B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* e *Bacteroides* sp.) foram detectadas em 41 (63%) dos espécimes e distribuídas como representado na figura 7.

Tal como observado nas amostras provenientes de pacientes apresentando manifestações clínicas no trato gastrointestinal, representantes do grupo *B. fragilis* não foram detectados em 24 (37%) amostras fecais avaliadas.

Neste estudo foi considerado a detecção de *Bacteroides* sp. para os casos onde foi observado amplicons sugestivos de *Bacteroides* na reação definida como reação G, isso é, amplicons de 230, 400 ou 450 pb, mas não houve amplificação de fragmentos esperados nas reações I, II e III, mesmo após repetição dos experimentos,

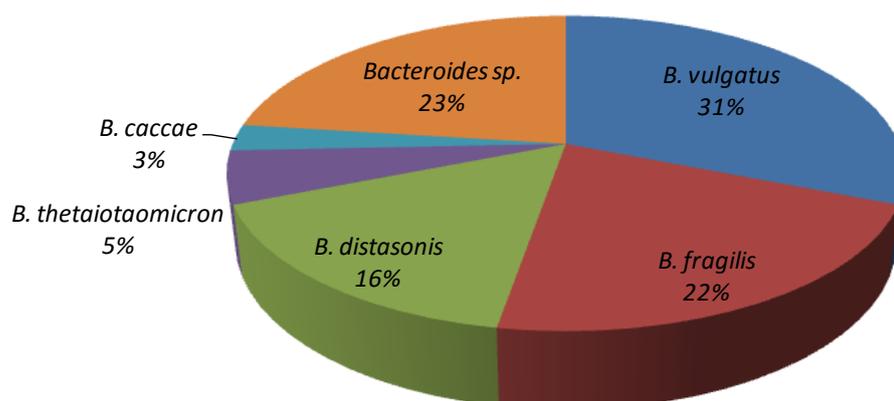


FIGURA 6 – Distribuição das espécies representativas do grupo *Bacteroides fragilis* detectadas nos espécimes fecais diarréicos avaliados diretamente por metodologia de biologia molecular.

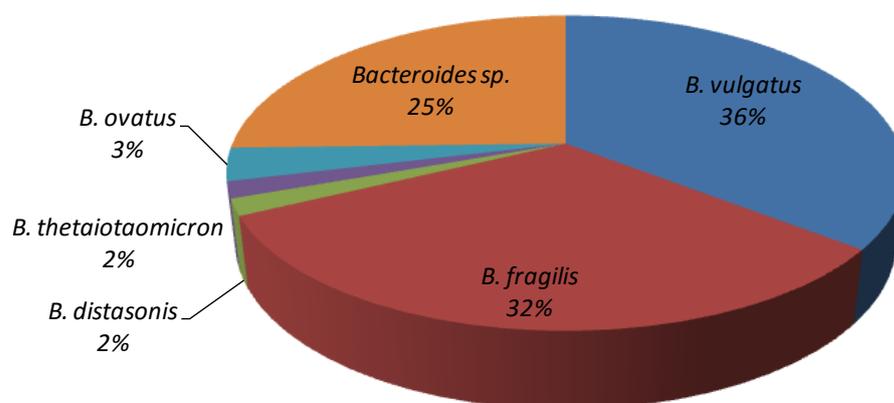


FIGURA 7 – Distribuição das espécies representativas do grupo *Bacteroides fragilis* detectadas nos espécimes fecais não diarréicos avaliados diretamente por metodologia de biologia molecular.

#### 5.4 Pesquisa de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos

Pela metodologia empregada, *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos (ETBF) foram detectados em 4.6% dos espécimes fecais avaliados, sendo 4 em espécimes fecais diarréicos (3,7% neste grupo) e 4 em espécimes fecais não diarréicos (6,15%), considerando-se a amplificação do fragmento de 294pb referente a segmento do gene *bft* codificador da enterotoxina na espécie (Figura 8).

Ainda que a enterotoxina tenha sido detectada em número reduzido de espécimes fecais, considerando-se o sexo dos doadores de espécime clínico para análise, 62,5% (n=5) das fezes positivas foram obtidas de crianças do sexo feminino, enquanto que 37,5% (n=3) foram obtidas de crianças do sexo masculino. Em relação à idade dos doadores, tanto no grupo diarréico quanto no grupo controle a idade média foi de 2 anos.

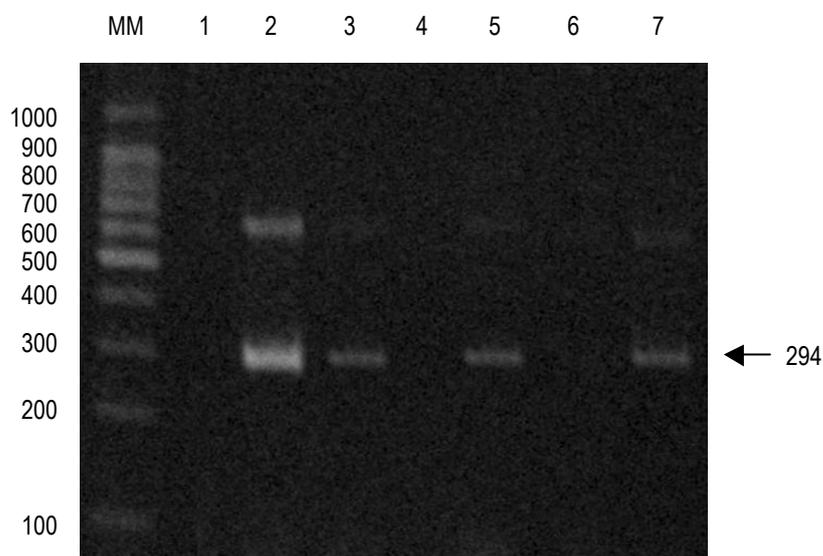


FIGURA 8 – Eletroforegrama representativo da identificação de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico (ETBF) em espécimes fecais. PM - padrão de peso molecular 100 pb; Canaleta 1 – controle negativo; canaleta 2 – controle positivo para ETBF (banda de 294pb); canaletas 3, 5 e 7 – espécimes positivos; canaletas 4 e 6 – espécimes negativos.

## 5.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Com relação ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados do grupo *B. fragilis* avaliados e às recomendações de interpretação dos resultados segundo o manual do NCCLS (2004), observou-se resistência bacteriana a todos os antimicrobianos testados, sendo que as drogas menos eficazes foram: ampicilina (82,1% de resistência, embora 13,3% das linhagens tenham apresentado níveis de resistência intermediária); clindamicina (62,2% de resistência, embora 40% das linhagens tenham apresentado níveis de resistência intermediária); ceftriaxona (57,7% de resistência, embora 37,7% das linhagens tenham apresentado níveis de resistência intermediária); cloranfenicol (48,8% de resistência, embora 33,3% das linhagens tenham apresentado níveis de resistência intermediária) e meropenem (44,3% de resistência, embora 26,6% das linhagens tenham apresentado níveis de resistência intermediária).

Por outro lado, as drogas mais eficazes foram as associações ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam, para as quais a resistência foi observada em níveis de 17,7% para a associação ampicilina/sulbactam, sendo que 6,6% refere-se à resistência intermediária e 8,8% de resistência à associação piperacilina/tazobactam, sendo que 6,6% refere-se à resistência intermediária a esta associação (Tabelas 7 e 8, Figura 9).

TABELA 7 – Valores de referência para interpretação dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de bastonetes Gram negativo anaeróbios, pelo método de diluição em ágar, segundo recomendações do NCCLS (2004).

Droga Antimicrobiana	Concentração do antimicrobiano em µg/ml		
	Sensibilidade	Resistência intermediária	Resistência
Ampicilina	≤0,5	1	≥2
Ampicilina/sulbactam	≤8/4	16/8	≥32/16
Ceftriaxona	≤16	32	≥64
Clindamicina	≤2	4	≥8
Meropenem	≤4	8	≥16
Piperacilina/tazobactam	≤32/4	64/4	≥128/4
Cloranfenicol	≤8	16	≥32

TABELA 8 - Concentrações inibitórias mínimas das drogas antimicrobianas testadas (em µg/mL), obtidas pelo método de diluição em ágar, para as linhagens representativas do grupo *Bacteroides fragilis* avaliadas.

Linhagem	AMP	AMS	CTR	CLI	MEM	PTZ	CHL
FH1-1	4	4	1	2	2	4	4
FH1-2	1	1	256	2	4	0,48	8
FH4-1	0,48	1	32	2	2	0,48	4
FH4-2	0,48	1	16	2	2	2	8
FH4-5	0,48	1	8	2	4	2	8
FH4-6	0,48	1	32	2	4	2	8
FH4-9	2	1	32	2	2	0,48	8
FH4-10	1	1	32	2	2	2	8
FH5-1	1	1	32	2	2	2	8
FH5-3	1	2	32	2	2	2	0,24
FH5-5	32	2	32	4	4	2	16
FH5-6	32	32	32	4	4	1	16
FH5-8	8	32	32	4	8	0,48	4
FH7-6	2	4	32	4	4	0,48	4
FH7-7	2	32	32	4	8	0,48	16
FH9-2	2	1	32	2	8	0,48	4
FH9-7	4	0,12	0,06	2	16	1	4
FH9-11	4	4	16	4	8	1	16
FH9-13	4	4	4	4	4	4	16
FH9-14	4	4	4	4	8	4	16
FH9-15	8	4	16	4	16	32	16
FH9-17	8	4	16	4	8	2	16
FH10-1	0,24	0,24	0,06	8	16	4	32
FH10-2	0,24	0,24	0,48	4	8	1	4
FH10-3	2	1	32	4	8	64	32
FH10-4	2	0,06	0,12	4	32	4	16
FH10-7	0,06	0,06	0,24	4	16	4	8
FH10-9	512	16	8	8	8	4	16
FH10-11	2	1	32	8	4	4	32
FH10-12	1	8	16	8	16	4	8
FH10-13	2	1	32	8	16	2	16
FH10-16	1	1	32	2	16	1	8
FH10-19	0,24	0,12	0,06	8	8	4	32
FH25-11	512	16	32	8	8	64	32
FH43-8	4	16	64	4	2	16	16
FH49-1	16	8	128	4	2	8	16
FH49-4	16	4	64	1	1	128	32
FH49-5	8	4	64	1	1	16	8
FH49-6	32	4	64	8	0,24	8	8
FH49-7	16	2	64	16	0,48	8	16
FH49-8	4	1	128	0,24	0,48	8	4
FH60-5	4	4	128	0,24	1	8	4
FC4-1	32	32	4	8	8	4	16
FC4-6	128	32	8	4	4	64	32
ATCC 25285	4	4	16	4	4	2	8

AMP, Ampicilina; AMS, Ampicilina/Sulbactam; CTR, Ceftriaxona; CLI, Clindamicina; MEM, Meropenem; PTZ, Piperacilina/Tazobactam; CHL, Cloranfenicol.

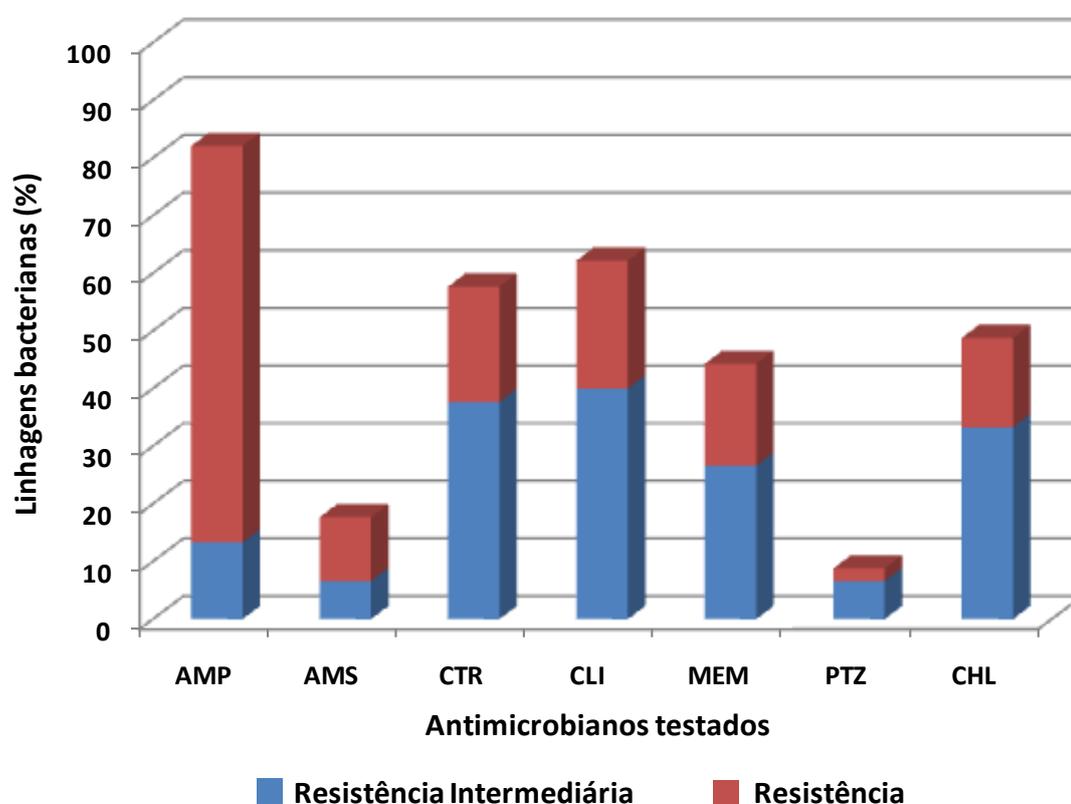


FIGURA 9 – Distribuição de linhagens bacterianas de bastonetes Gram negativo do Grupo *Bacteroides fragilis* que apresentaram resistência ou resistência intermediária aos diferentes antimicrobianos testados. AMP, Ampicilina; AMS, Ampicilina/Sulbactam; CHL, Cloranfenicol; CLI, Clindamicina; CTR, Ceftriaxona; MEM, Meropenem; PTZ, Piperacilina/Tazobactam.

## 6 DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Doença diarréica infantil

A diarréia infecciosa é uma condição clínica associada a grande morbidade e mortalidade no mundo todo, afetando principalmente crianças. A morbidade por diarréia é um indicador utilizado na avaliação do nível de saúde de uma população e varia de acordo com as diferentes regiões, localidades e grupos populacionais. Essas variações regionais estão intimamente relacionadas com a profunda desigualdade de vida de seus habitantes referentes à renda familiar, serviços públicos essenciais, assistência a saúde e a educação (NGUYEN *et al.*, 2005).

A diarréia está associada à patógenos entéricos, que incluem vírus, bactérias e parasitas. Rotavírus e as *Escherichia coli* enteropatogênicas são consideradas os agentes etiológicos mais comuns, sendo as linhagens patogênicas de *E. coli* especialmente importantes em países em desenvolvimento. Os rotavírus estão associados a gastroenterites no mundo todo e são responsáveis por aproximadamente 20% das mortes associadas à diarréia em crianças menores de 5 anos de idade. Além disso, outros agentes bacterianos têm sido reconhecidos como enteropatógenos potencial como *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp, e os bastonetes Gram negativo anaeróbios *Bacteroides fragilis*, especialmente as linhagens enterotoxigênicas (JAFARI *et al.*,2008;KIM *et al.*,2008; PATRZALEK, 2008)

Além das condições de higiene sanitária associadas à transmissão e persistência da doença diarréica em populações susceptíveis, após o nascimento, microrganismos podem ser adquiridos de fontes ambientais, contato oral ou microrganismos cutâneos maternos que podem ser transferidos às crianças por vários processos como aleitamento materno (aproximadamente  $10^9$  células microbianas por litro de leite em mães saudáveis), beijo, carinho, etc. Além disso, as crianças estão expostas a outros microrganismos que ganham acesso ao trato gastrintestinal pela alimentação (THOMPSON-CHAGOYÁN; MALDONADO e GIL, 2007).

Apesar do declínio do número de hospitalização por diarréia aguda em todo o mundo com o advento da terapia de reidratação oral e do conseqüente

decréscimo da mortalidade pela doença em crianças menores de cinco anos, a diarreia ainda permanece como importante causa de hospitalização entre a população infantil (PONTUAL *et al.*, 2006 ; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

No nosso estudo, foi avaliada a microbiota fecal de crianças apresentando manifestação clínica de doença diarreica e sem manifestação clínica da doença na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, considerando-se a ocorrência de representantes de anaeróbios obrigatórios do grupo *Bacteroides fragilis*, enterotoxigênicos ou não.

Da avaliação demográfica dos pacientes e doadores saudáveis, observou-se que cerca de 33% das crianças com diarreia aguda tinham até um ano de idade e 60% das crianças tinham menos de 2 anos de idade, corroborando com os dados da literatura. A média de idade baixa da população estudada reflete a frequência elevada de diarreia aguda em crianças menores de dois anos de idade e a maior gravidade da doença nesta fase da vida, o que leva a procura de atendimento médico (ARANHA- MICHEL & GIANELLA, 1999; ORLANDI *et al.*, 2001; NGUYEN *et al.*, 2005; BALAMURUGAN *et al.*, 2008).

A obtenção dos espécimes fecais foi distribuída homogênea nos meses chuvosos e secos do ano. De acordo com a literatura, a maioria dos casos de diarreia associados às bactérias acontece nos meses chuvosos e quentes, possivelmente porque a temperatura mais elevada favorece a multiplicação bacteriana no ambiente, e a chuva contribui na disseminação do agente etiológico nas águas superficiais (PODEWILS *et al.*, 2004; QUADRI *et al.*, 2005). Apesar da renda familiar das famílias não ter sido investigada, todas as famílias possuíam condições de saneamento básico nas moradias, como água tratada e sistema fechado de esgoto de fezes.

## **6.2 Identificação bioquímica e molecular das linhagens do grupo *B.fragilis***

O trato gastrointestinal humano alberga uma grande variedade de bactérias, mais de 400 espécies, sendo o total de células microbianas neste sítio anatômico superior ao número de células no corpo humano (TURRONI *et al.*, 2008). A grande maioria destas bactérias são importantes para saúde humana produzindo e degradando nutrientes e substâncias nocivas ao hospedeiro, prevenindo a

colonização por microrganismos patogênicos e participando na modulação do sistema imunológico (THOMPSON-CHAGOYÁN; MALDONADO e GIL, 2007; BALAMURUGAN *et al.*, 2008).

O ecossistema intestinal pode ser definido como um órgão microbiano dentro do organismo do hospedeiro que atua em uma associação dinâmica e intensa dependente de fatores microbianos, do hospedeiro e da dieta. O estudo deste complexo ecossistema tem sido baseado em métodos microbiológicos clássicos que envolvem cultivo microbiano em meios de cultura específicos e técnicas bioquímicas e fisiológicas de identificação. Entretanto estas técnicas não permitem a recuperação de todos os grupos microbianos (BOTTARI *et al.*, 2006).

Bactérias anaeróbias compreendem uma grande população da microbiota da pele, trato genital, gastrintestinal e membranas internas de mucosas. Como microrganismos oportunistas, eles frequentemente participam de infecções endógenas. Apesar do reconhecimento clínico-epidemiológico destes microrganismos, muitos laboratórios de microbiologia clínica não percebem a necessidade de identificar corretamente os anaeróbios ou realizam tal identificação de modo incorreto (BROOK, 2002; PANG *et al.*, 2005).

Segundo a literatura disponível, a frequência exata destes microrganismos é difícil de ser determinada, devido ao uso inconsistente de métodos tradicionais clássicos para isolamento e identificação. Entre os pontos positivos dos métodos de diagnóstico dependentes de cultivo destacam-se os custos, a possibilidade de quantificação microbiana e a possibilidade de futuras investigações bioquímicas e fisiológicas das linhagens isoladas. Por outro lado, estas são técnicas laboriosas e que demandam muito tempo e são dependentes do processamento das amostras clínicas e das condições de cultivo (FURRIE, 2006; BALAMURUGAN *et al.*, 2008).

Os métodos clássicos de identificação realizados inicialmente neste estudo, como o isolamento em meio seletivo e técnicas de coloração de Gram, são tradicionalmente bem estabelecidos nos manuais de bacteriologia clínica para isolamento e identificação de anaeróbios. O diagnóstico direto baseado no isolamento e cultivo microbiano permite o uso dos isolados em investigações posteriores com grande importância clínico-científica como a determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e estudos epidemiológicos. Considera-se, ainda, que a análise da coloração de Gram e informações preliminares de cultura da amostra recebida podem revelar o tipo e o número relativo de microrganismos, bem

como células do hospedeiro presentes, o que pode orientar o diagnóstico clínico e a terapia precoce (SUMMANEN *et al.*, 1993; FINEGOLD, 1995).

Alguns sistemas comerciais semi-automatizados permitem fazer a identificação das diferentes espécies de anaeróbios utilizando numerosas provas bioquímicas, por meio da ação de enzimas bacterianas pré-formadas, podendo fazer o diagnóstico em até 4 horas. De acordo com o Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecção em Serviços de Saúde, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), os sistemas mais frequentemente utilizados são: API, Vitek e Microscan. Estes métodos são caros e não são fundamentais para o diagnóstico dos grupos bacterianos e para uma orientação terapêutica adequada. Como alternativa aos métodos microbiológicos clássicos para identificação de anaeróbios, testes de identificação rápida têm sido utilizados. Estes métodos são baseados ou em sorologia ou biologia molecular (ZHANG e WEINTRAUB, 1997).

O desenvolvimento de métodos moleculares tem permitido alternativas para investigação de comunidades microbianas, como a microbiota intestinal humana e de outros animais, sem a necessidade de cultivo microbiológico. Assim, novas técnicas tem sido propostas para diagnóstico de microrganismos entéricos e reclassificação de grupos microbianos previamente identificados em espécies e gêneros já estabelecidos (FURRIE, 2006).

Entre as técnicas moleculares independentes de cultivo microbiológico para detecção e identificação bacteriana destacam-se métodos relacionados ao desenvolvimento de sondas e oligonucleotídeos iniciadores homólogos a regiões de DNA que codificam RNA ribossômico microbiano (PCR, técnicas convencionais de hibridização, FISH, microarranjos de DNA), estudo de comunidades pela associação de técnicas de PCR e eletroforese com gradientes de desnaturação (DGGE) ou temperatura (TGGE), estudos envolvendo PCR em tempo real quantitativo ou qualitativo e metagenômica (TURRONI *et al.*, 2008)

Como observado neste estudo, em relação às amostras de anaeróbios isoladas e presuntivamente identificadas como *Bacteroides*, o método de caracterização bioquímica permitiu a identificação de oito espécies do grupo *B. fragilis* entre os isolados obtidos enquanto que o método de biologia molecular (PCR- Multiplex) baseado na amplificação de segmentos dos genes codificadores para o RNAr 16S e 23S, conservados no grupo, além da região variável espaçadora intergênica destes microrganismos, utilizada na diferenciação específica das

linhagens, permitiu a caracterização de quatro espécies do grupo entre os mesmos isolados. Considerando-se as duas metodologias utilizadas, os resultados indicam diferentes situações encontradas relacionadas a identificação coincidente entre as duas metodologias, identificação semelhante, ou discordante.

Segundo Summanen e colaboradores (1993), algumas das espécies dentro do grupo *B. fragilis* são muito similares bioquimicamente, o que dificulta o processo de identificação das mesmas. Neste estudo, os testes de fermentação dos carboidratos revelaram resultados bastante semelhantes entre as diferentes linhagens, o que provocou a dificuldade na identificação microbiana de acordo com as chaves de identificação disponíveis. No entanto, estas técnicas são ainda utilizadas, como relata, por exemplo, Antunes e colaboradores (2002), que, após identificar presumivelmente colônias de *B. fragilis* através de teste da esculina positiva, realizou a coloração pelo método de Gram e testes para verificar a produção de catalase, indol, bem como a produção de ácidos a partir de alguns carboidratos, como trealose, raminose, manitol, glicose e sacarose.

De maneira geral, ao compararmos os dois métodos de identificação utilizados, o método bioquímico não identificou corretamente 46% (17) das espécies analisadas em relação ao método molecular, sendo que 32.5% (13) das espécies apresentaram caracterização em diferentes grupos taxonômicos pela técnica bioquímica. No entanto considerando-se a técnica molecular como uma técnica mais acurada, sabe-se que o diagnóstico genético representa um método mais dispendioso para a aplicação na microbiologia clínica, o que dificulta sua realização de forma rotineira. Por outro lado a técnica molecular permitiu a detecção de microrganismos em amostras fecais, para as quais o método de cultura microbiológica clássica não pode ser aplicado ou não possibilitou a recuperação de amostras representativas do grupo *B. fragilis*.

Apesar das bactérias indígenas terem um papel importante na fisiologia do hospedeiro, quando o balanço do ecossistema intestinal for rompido, esses microrganismos podem causar complicações como patógenos oportunistas que vão desde infecções intestinais a doenças em outros sítios anatômicos. As doenças associadas aos anaeróbios da microbiota residente estão relacionadas ao seu caráter anfibiótico no desequilíbrio homeostático ou ao serem introduzidos em áreas não colonizadas do corpo (TANNOCK,1988; VOLLAARD,1994;HOOPER *et al.*,1998;PENDERS *et al.*, 2006).

O grupo *B. fragilis* inclui espécies bacterianas que constituem a maior parte da microbiota residente do trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais. Apesar disso, são os microrganismos anaeróbios mais comuns associados às infecções endógenas abaixo do diafragma, especialmente a espécie *B. fragilis*. Entretanto, já é reconhecido o potencial agressor das outras espécies do grupo, o que sugere antibioticoterapia específica, visto que as infecções causadas por anaeróbios são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade (FINEGOLD, 1990; SUMMANEN *et al.*, 1993).

Considerando-se a importância das doenças diarreicas na infância e que a etiologia de 20 a 50% das manifestações clínicas continua ainda sem diagnóstico, o conhecimento da população de microrganismos específicos do ecossistema intestinal poderia ajudar na compreensão da dinâmica microbiana na agressão (NGUYEN, 2005). Segundo Thompson-Chagoyán, Maldonado e Gil (2007) a manutenção da microbiota intestinal é necessária à prevenção de doenças infecciosas neste sítio anatômico. Tem sido demonstrado que animais isentos de germe são mais susceptíveis a infecções se comparados a animais colonizados com microbiota. Esta informação permite sugerir que o balanço microbiano é necessário para manutenção da saúde do hospedeiro.

### **6.3 Pesquisa do grupo *B. fragilis* diretamente nos espécimes fecais**

Neste trabalho, as amostras fecais analisadas de crianças com doença diarreica através da técnica de PCR Multiplex diretamente da amostra fecal, revelaram que 44% dos espécimes clínicos contêm representantes do grupo *B. fragilis* associados a sua microbiota fecal, enquanto que 63% dos espécimes coletados de crianças sem manifestação clínica de doença diarreica apresentaram bactérias representativas do grupo *B. fragilis*. Tanto os microrganismos isolados e identificados, quanto a detecção genética do grupo diretamente nas amostras fecais, permitiram a identificação de representantes das espécies do grupo *B. fragilis* tais como *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae*, *B. ovatus*, além de 23-25% de *Bacteroides sp.*

As amostras identificadas confirmam os dados da literatura, onde as espécies mais frequentemente isoladas de infecções clínicas ou microbiota residente de

indivíduos saudáveis da espécie humana são descritas como *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis* e *B. vulgatus*, principalmente (LIU *et al.*, 2003).

Considerando-se que o grupo *B. fragilis* compõe a maior parte da microbiota anaeróbica do trato gastrointestinal, quando avalia-se a frequência de recuperação ou detecção destes microrganismos diretamente nos espécimes clínicos, pelo menos duas observações devem ser feitas: (i) O baixo isolamento de linhagens de *Bacteroides* nas fezes pode refletir as dificuldades para recuperação de anaeróbios em laboratório, uma vez que a coleta e o transporte adequados de espécimes são cruciais. A identificação destes microrganismos nas amostras biológicas é um processo difícil, pois são fastidiosos, requerem aproximadamente 48 horas de cultivo em cultura anaeróbica e o processamento das amostras não pode exceder 2 horas da coleta do material fecal. Neste trabalho, das 175 amostras de fezes recebidas, apenas 40 foram consideradas aptas para cultura microbiológica, apesar das orientações dadas aos participantes do estudo. O transporte apropriado começa com o acondicionamento da amostra sob condições anaeróbicas em meio de transporte que garanta baixo potencial de óxido-redução. Tais dificuldades podem resultar em alterações nos testes convencionais de isolamento e identificação fisiológica. (ii) Considerando-se a metodologia molecular utilizada e seu fundamento baseado na detecção de sequências de DNA pela amplificação em cadeia da polimerase, é plausível admitir que falhas metodológicas possam estar associadas à amplificação inespecífica de segmentos gênicos ou a não amplificação de segmentos em detrimento à concentração do DNA alvo na amostra considerando-se o protocolo de amplificação proposto, ou ainda a presença de substâncias inibidoras da enzima DNA *taq* polimerase. Além disso, dever-se-á considerar os protocolos de extração e purificação do DNA, ainda que sejam métodos ditos já estabelecidos na literatura disponível.

Por outro lado, considerando-se a observação destes microrganismos em maior frequência nas amostras fecais provenientes de doadores sem manifestação clínica de doença diarréica em comparação à sua observação nas amostras fecais diarréicas, dados da literatura disponível sugerem que de fato em episódios de diarréia aguda pode ocorrer uma diminuição significativa de anaeróbios do grupo *B. fragilis* na microbiota fecal (BALAMURUGAN, 2008).

Segundo Balamurugan e colaboradores (2008), pouca informação encontra-se disponível sobre a microbiota residente durante a diarréia aguda em crianças.

Considerando-se os métodos quantitativos de estudos moleculares, percebe-se uma diminuição significativa neste momento, de anaeróbios, sobretudo *Bacteroides* dentre outros gêneros. Estas observações são atribuídas a um provável crescimento exacerbado de outros microrganismos e alterações nos potenciais de oxido-redução no cólon. Além disso, a observação é suportada pela diminuição na quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (produto de metabolismos de bactérias anaeróbias) encontrada nas fezes durante a diarreia aguda. Esta diminuição da microbiota anaeróbia incluindo os *Bacteroides* pode ser importante para a fisiopatologia da diarreia. Cada componente da microbiota anaeróbia contribui com o metabolismo de diferentes carboidratos no intestino. A produção de ácidos graxos de cadeia curta como o butirato, pelo metabolismo de carboidratos não absorvíveis pelo hospedeiro (amido resistente a amilase, por exemplo) contribui para a manutenção da saúde do hospedeiro. Neste sentido, acredita-se que a terapia com estes carboidratos tenha um efeito prebiótico na evolução do paciente com diarreia aguda estimulando o crescimento de microrganismos residentes benéficos como os anaeróbios.

#### **6.4 Pesquisa de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicos**

Algumas linhagens de *B. fragilis* (ETBF) podem produzir uma enterotoxina que está associada com a manifestação diarreica e outras doenças inflamatórias do trato gastrointestinal em seres humanos ( WU *et al.*, 2003; SEARS *et al.*, 2008). Acredita-se que esta enterotoxina, descrita em 1984 esteja associada à diarreia aguda principalmente em pacientes na faixa etária de zero a cinco anos, sobretudo e nos primeiros 12 meses de vida, relacionada à perda de fluidos, esfoliação e alteração do citoesqueleto em células intestinais. Além disso, existem evidências epidemiológicas de que os ETBF estejam associados a animais domésticos como gado, galinhas, carneiros e outros animais (CHUNG *et al.*, 1999; NAKANO *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, identificamos 4,6% de linhagens ETBF nas amostras fecais. Considerando-se as amostras diarreicas, a detecção de ETBF foi de 3,7% e considerando-se as fezes não diarreicas a detecção de ETBF foi de 6,15%. De maneira geral a frequência de detecção de ETBF foi baixa quando comparado com outros países. Estudos confirmaram a presença de ETBF em 6 a 12% de crianças nos EUA, 11% na Itália e Turquia, 12% na Suíça, entre 5 a 15% no Japão, 7% no

Vietnã, cerca de 6% na Índia e 2 a 6% em Bangladesh (ZHANG *et al.*, 1999; DURMAZ, DALGALAR E DURMAZ, 2005; NGUYEN *et al.*, 2005; SHARMA & CHAUDHRY, 2006; COHEN *et al.*, 2006).

No Brasil, existe uma carência de dados científicos sobre a epidemiologia da ocorrência de ETBF na nossa população. Dados recentes mostram a ocorrência destes microrganismos em crianças apresentando quadro clínico de diarreia e em crianças HIV positivo no estado de São Paulo, entretanto as frequências não foram informadas pelos autores (NAKANO *et al.*, 2007). Além disso, o mesmo grupo relata frequências de 3,7% de ETBF em bezerros ainda no estado de São Paulo, avaliando-se amostras fecais diarreicas e não diarreicas (ALMEIDA, NAKANO E ÁVILA-CAMPOS, 2007).

Segundo dados da literatura internacional cerca de 16% das crianças menores de 2 anos de idade serão ou foram infectadas com linhagens de ETBF em algum momento deste período da vida, sem, necessariamente desenvolver síndrome clínica, o que torna necessário estudos prospectivos sobre a frequência de ocorrência destas bactérias nas diferentes populações (DURMAZ, DALGALAR E DURMAZ, 2005; NGUYEN *et al.*, 2005; PATHELA *et al.*, 2005).

O envolvimento de *B. fragilis* produtor de enterotoxina tem sido objeto de investigação nos últimos 25 anos, e estudos sugerem que ETBF pode ter um importante papel na doença diarreica em diferentes populações (DURMAZ, DALGALAR & DURMAZ, 2005). Sua detecção fisiológica em amostras fecais depende, entre outros fatores, da produção da toxina, da sensibilidade da análise e da sua estabilidade, uma vez que a enterotoxina é susceptível a degradação por proteases (BRESSANE, 2001). Condições de vida e diferenças geográficas também podem afetar a frequência de ETBF na população (FINEGOLD, 1990). Estudos futuros são necessários para entender o papel do ETBF na doença diarreica e processos inflamatórios intestinais (SEARS *et al.*, 2008).

De acordo com nossos resultados pode-se observar que foram detectados linhagens ETBF em amostras fecais não diarreicas, o que pode indicar a presença de portadores saudáveis que podem servir de reservatório destas linhagens microbianas para populações susceptíveis.

Sabe-se que as condições ambientais como a disponibilidade nutricional, o pH, potencial redox e a presença de outras substâncias xenobióticas podem modular os perfis de expressão gênica em bactérias anaeróbias o que poderia, nestes casos

assegurar a não produção de toxinas por estas linhagens bacterianas, mas sua persistência na população (DINIZ *et al.*, 2004; SILVA, 2007; BALAMURUGAN, 2008).

### 6.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Sabe-se que as drogas antimicrobianas podem induzir alterações na microbiota indígena pelo seu uso independente da participação destes microrganismos em doenças infecciosas, pela seleção de linhagens bacterianas resistentes que podem aparecer como patógenos oportunistas em diferentes situações (BEZIRTOGLOU,1997).

Embora os testes de susceptibilidade a antimicrobianos na bacteriologia de anaeróbios terem sido úteis para a terapia antimicrobiana, estes testes ainda não tem sido amplamente incorporados na prática clínica. Algumas razões apontadas, compreendem, a dificuldade de cultivo destes microrganismos, a natureza polimicrobiana associada às infecções anaeróbias, e a carência de estudos associando os resultados laboratoriais e resultados de clínica (NGUYEN *et al.*, 2000).

Pelo caráter anfibiótico dos microrganismos residentes e sua participação em infecções de origem endógena, bactérias do grupo *B. fragilis* têm sido alvo de diversos estudos, devido seu alto grau de resistência aos antimicrobianos e, ainda a metais pesados. Estas últimas substâncias têm sido reconhecidas como marcadores de resistência múltipla a drogas, geralmente mediada pela aquisição de novas informações genéticas associada a elementos extracromossomais (SALYERS, 1984; AVILA-CAMPOS *et al.*,1991).

A resistência bacteriana a drogas pode ser intrínseca quando é espécie ou gênero específica ou mesmo adquirida, associada a mutações durante a multiplicação bacteriana ou eventos de recombinação genética como a conjugação, transformação e a transdução. Segundo dado da literatura já é bem estabelecido a transferência de marcadores de resistência bacteriana entre os anaeróbios e outros grupos microbianos como os bastonetes Gram negativo anaeróbios facultativos, como por exemplo a transferência de plasmídeos em *Bacteroides spp* que tem um papel importante na disseminação de resistência a antibióticos (RILEY & MEE, 1982; RUDRIK *et al.*,1985).

Nos últimos 20 anos, variações geográficas e aumento de resistência a antimicrobianos tradicionais além de novos beta-lactâmicos têm sido relatado como um problema global. Assim monitoramento periódico dos padrões de susceptibilidade a drogas nestes organismos tem sido recomendado para disponibilizar conhecimento para subsidiar a escolha de antibioticoterapia apropriada (NGUYEN *et al.*, 2000; LIU, 2003; SNYDMAN,2007;BETRIU *et al.*, 2008).

Considerando-se o caráter regional desse estudo, a observação de resistência bacteriana a todos os antimicrobianos testados, representa dado relevante a ser considerado na terapia empírica, sobretudo em situações clínicas nas quais o aspecto da doença possa sugerir o envolvimento de bactérias anaeróbias, como representantes do grupo *B. fragilis*. Embora o reconhecimento das diferentes espécies do grupo como agentes potencialmente associados a doenças de origem endógena, sugira antibioticoterapia específica (BROOK,1988; BROOK & FRAZIER,1992; ALDRIDGE,1995), nossos dados permitem sugerir homogeneidade nos perfis de susceptibilidade a drogas entre as diferentes linhagens bacterianas recuperadas e avaliadas neste estudo.

Entre os antimicrobianos disponíveis contra bactérias anaeróbias, especialmente o grupo *B. fragilis*, destacam-se o metronidazol, a clindamicina, os beta-lactâmicos e a associação beta-lactâmico e inibidor de beta-lactamase, drogas nas quais aumento da resistência tem sido relatado em vários países (FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Observamos, entre as linhagens isoladas de espécimes fecais de crianças com idade média de dois anos de idade considerando aquelas com e sem manifestação clínica de doença diarréica, resistência bacteriana a todos os antimicrobianos testados como: ampicilina, ceftriaxona e meropenem, drogas representativas dos beta-lactâmicos, além de ampicilina/sulbatam e piperacilina/tazobactam, representativas de associação beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamase; clindamicina e cloranfenicol. Entre os níveis de resistência observados, destaca-se a alta resistência intermediária aos antimicrobianos o que sugere alerta do ponto de vista clínico, sobretudo pela origem das amostras. Estes microrganismos podem ser representativos da população bacteriana circulante na comunidade, assumindo-se a baixa diversidade de antimicrobianos a que crianças menores de 2 anos de idade deveriam ser expostas.

Entre os agentes beta-lactâmicos testados, observa-se a baixa eficiência das penicilinas (ampicilina), seguido das cefalosporinas (ceftriaxona) e carbapenêmicos (meropenem). Considerando-se os baixos níveis de resistência observados para os beta-lactâmicos associados a inibidores de beta-lactamases, sugere-se que a maioria das amostras bacterianas recuperadas sejam produtoras de enzimas beta-lactamases, como já bem estabelecido para o grupo *B. fragilis*, sendo a associação piperacilina-tazobactam, ainda bastante efetiva com baixos níveis de resistência relatada (BETRIU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008). A resistência dos *Bacteroides* aos beta-lactâmicos como as penicilina, foi inicialmente observada em 1966 e a produção de diferentes tipos de enzimas beta-lactamases já descritas representam o mais importante mecanismo de resistência destes microrganismos a estas drogas (FILLE *et al.*, 2006).

O aumento da resistência de alguns agentes antimicrobianos, incluindo tetraciclina, clindamicina e ceftriaxona, reflete a capacidade de *B. fragilis* em desenvolver resistência por vários mecanismos diferentes. A resistência entre os isolados de *Bacteroides* a clindamicina tem aumentado em vários países. Onde a vigilância epidemiológica é mais intensa a literatura reporta que a resistência à clindamicina tem aumentado significativamente nas últimas 2 décadas. Esta droga foi considerada de escolha na terapia de infecções anaeróbias por um longo período. Segundo dados da literatura as taxas de resistência à clindamicina variam, hoje entre 20-48% (ALDRIDGE *et al.*, 2001, WEXLER *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ *et al.*, 2007; BETRIU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008).

Apesar de neste estudo ter sido verificada resistência à clindamicina em níveis próximos aos 35%, como esperado para realidade brasileira e de outros países da América do Sul como a Argentina (FERNÁNDEZ *et al.*, 2007), os estudos de vigilância epidemiológica não descrevem com clareza a fonte das amostras bacterianas. Considerando-se a fonte das amostras no nosso trabalho, este número torna-se expressivo. Além disso, nossos resultados indicam altos níveis de resistência intermediária a este antimicrobiano nas linhagens isoladas de crianças, sem história recente de uso terapêutico do antimicrobiano ou outra lincosamida.

A taxa do uso de cloranfenicol tem reduzido em muitos países devido a toxicidade da droga que causa distúrbios intestinais, depressão e anemia. Por outro lado, no nosso país, esta droga é amplamente consumida e no nosso estudo foi observada alta taxa de resistência para este antimicrobiano (BETRIU *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura recente, nas regiões que a droga ainda é utilizada para o tratamento de infecções nas quais o grupo *B. fragilis* está envolvido observa-se níveis de até 11% de resistência, embora, nem todos os autores considerem a resistência intermediária, de acordo com os níveis de susceptibilidade observados (BETRIU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008).

Apesar dos testes de susceptibilidade *in vitro* de bactérias anaeróbias não ser rotineiramente considerada para decisões clínicas, alguns autores defendem o monitoramento laboratorial dos níveis de resistência microbiana, para estes grupos bacterianos, fundamentalmente por três razões: (i) já está bem documentado que a resistência aos antimicrobianos pelos *Bacteroides* tem aumentado significativamente, e sua participação em infecções polimicrobianas endógenas tem sido reconhecida; (ii) existe uma certa disparidade nos níveis e resistência entre as diferentes drogas e as diferentes regiões ou instituições baseado nos protocolos e regras para uso de antimicrobianos; (iii) estudos clínicos mostram que embora existam limitações na extrapolação entre resultados de experimentos *in vitro* e realidade clínica *in vivo*, a resistência a antimicrobianos de anaeróbios como os *Bacteroides* spp. pode ser correlacionada com a falha terapêutica clínica resultando em aumento de morbidade e mortalidade (NGUYEN *et al.*, 2000).

Assim, considerado-se os resultados apresentados neste trabalho sobre a distribuição e perfil de susceptibilidade de representantes do grupo *B. fragilis*, bem como as dificuldades metodológicas apresentadas para seu isolamento e identificação, seja por métodos microbiológicos dependentes de cultivo ou métodos de genética molecular, percebe-se a necessidade de estudos prospectivos para caracterizar melhor o papel destes microrganismos na manutenção da saúde ou produção de doença em seres humanos, bem como estudos de vigilância epidemiológica para monitoramento constante dos seus perfis de susceptibilidade a antimicrobianos de interesse clínico-microbiológico.

## 7 CONCLUSÕES

## 7.CONCLUSÕES

- Bactérias do grupo *Bacteroides fragilis* ocorrem na microbiota fecal de crianças, em Juiz de Fora, em maior taxa naquelas sem manifestação clínica de doença diarréica;
- A metodologia de biologia molecular se mostrou menos duvidosa na identificação microbiana específica, comparada às técnicas bioquímico-fisiológicas dependente de cultivo;
- Dada a diversidade bioquímica e fisiológica bacteriana e a sua resposta a variações ambientais, os métodos bioquímicos suscitam dúvidas na identificação destes microrganismos considerando-se as chaves de identificação disponíveis;
- A metodologia de biologia molecular permite a detecção qualitativa de *Bacteroides* sp. diretamente nos espécimes fecais, minimizando a ação deletéria do tempo, pela exposição ao oxigênio, para o processamento das amostras, desde sua coleta;
- Linhagens de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicas ocorrem na população amostrada, entretanto neste estudo não foi possível correlacionar a sua presença como etiologia de diarreia aguda na população amostrada, uma vez que outros enteropatógenos não foram avaliados;

- A observação de portadores saudáveis de linhagens enterotoxigênicas de *B. fragilis* indica a circulação comunitária destes microrganismos. Assim, seres humanos podem atuar como reservatórios na população amostrada;
- As amostras bacterianas representativas do grupo *B. fragilis* que circulam na nossa região mostram-se altamente resistentes aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados na terapia antianaeróbica;
- Associações de drogas beta-lactâmicas e inibidores de beta-lactamase como piperacilina/tazobactam, e mesmo ampicilina/sulbactam permanecem, ainda, como alternativas terapêuticas, para tratamento de infecções envolvendo o grupo *B. fragilis*, devido aos baixos níveis de resistência observados;
- Os altos níveis de resistência intermediária nas amostras bacterianas estudadas, suscitam reflexões sobre o uso indiscriminado de antimicrobianos na nossa região, especialmente considerando-se isolados de crianças com idade média de 2 anos de idade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIDGE, K.E. 1995. The occurrence, virulence and antimicrobial resistance of anaerobes in polymicrobial infections. **Am. J.Surg**, **169**:p.2-7.

ALDRIDGE, K.E.; ASHCRAFT, D.; CAMBRE, K.; PIERSON,C.L.; JENKINS, S.G.; ROSENBLATT, J.E. 2001. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. **Antimicrob Agents Chemother**, **45**.

ALMEIDA, F.S.; NAKANO,V.; AVILA-CAMPOS,M.J. 2007. Occurrence of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in calves and evaluation of their antimicrobial susceptibility.**FEMS Microbiol Lett**, **272**:p.15-21.

ANDERSON, C.B.; MARR, J. & BALLINGER, W.F. 1976.Anaerobic infections in surgery: clinical review. **Surgery**, **79**: p.313-324.

ANDRADE, J.A.; OLIVEIRA, J.O.; FAGUNDES NETO, U.1999. Lethality in hospitalized infants ,**45**:p.121-127.

ANTUNES, E. N. F.; FERREIRA, E. O.; VALLIM, D. C.; PAULA, G. R.; SELDIN, L.; SABRA, A.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. 2002.Pattern Non-toxigenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) Strains in Brazil. **Anaerobe**, **8**, n. 1: p. 17-22.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde – Módulo V: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**, 1ª Ed., Brasília: Editora da ANVISA, 93p.

ARANHA-MICHEL. J& GIANELLA,R.A. 1999.Acute diarrhea a practical review. **Am J méd**, **106**:p.670-676.

AVILA-CAMPOS, M.J.; CARVALHO, M.A.R.; DAMASCENO, C.A.V.; CHARTONE-SOUZA, E.; CISALPINO, E.O. 1991. Population stability in species of the *Bacteroides fragilis* group, under mercuric chloride action. **Rev Microbiol**, **22**: p.93-96.

AVILA-CAMPOS, M.J.; NAKANO, V. 2007. Survey of Antimicrobial Susceptibility Patterns of the Bacteria of the *Bacteroides fragilis* Group Isolated from the Intestinal Tract of Children. **Rev. Mem Inst Oswaldo Cruz**, **99**: p.319-324.

BALAMURUGAN,R.;NANDA KUMAR,N.S.; JAYAKANTHAN,K.; PULIMMOD,A.; PUZAZHENDHI,S.;RAMAKRISHNA,B.S.2008.Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis.**J.Gastroenterol Hepatol**,**12**:p. 1834-1839.

BASSET, C.; HOLTON, J.; BAZEOS, A.; VAIRA, D. AND BLOOM, S. 2004. Are *Helicobacter* Species and Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Involved in Inflammatory Bowel Disease? **Digestive Dis. Sciences**, **49**, n.9: p. 1425–1432.

BENICIO, M.H.A.; MONTEIRO, C.A.; ZUNIGA, H.P.P.; RIO, E.M.B. 2007. A study of children's health in S.Paulo city (Brazil). **Rev. Saúde Pública**, **21** no.1 São Paulo Feb.

BERGEYS.; KREIG, N.R.& HOLT, J.G.1994. Manual of Systematic Bacteriology, **Baltimore, 1**.

BERN, C.; MARTINES, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R.I. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull WHO**: p.705-714.

BETRIU, C.E.; CULEBRAS, M.; GOMEZ, I.; RODRIGUEZ-AVIAL, AND PICAZO, J. J.2005. In vitro activity of tigecycline against *Bacteroides species*. **J. Antimicrob Chemother**, **56**: p.349–352.

BETRIU,C.E.; GOMEZ,M.; LOPES,F.; RODRIGUES-AVIAL,I.; PIAZO,J.J. 2008. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period,1997-2006.**Antimicrob Agents Chemother**,**52**:p.2686-2690.

BEZIRTOGLOU, E. 1997. The intestinal Microflora During the first week of life. **Anaerobe**, **3**, n.2: p.173-177.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, F.B.; DELLINGER, R.P.; FEIN, A.M.; KNAUS, W.A. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, **101**:p.1644-1655.

BOTTARI, B.; ERCOLINI, D.; GATTI, M.; NEVIANI, E. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. **Microbiol Biotechnol**, **73**:p.485-494.

BRANDÃO, M.B.; LOPES, C.E.; MORCILLO, A. M.; BARACAT, E.C.E. 2005. O óbito em crianças com diarreia aguda e choque em UTI. **Assoc Méd Brás**, **51**: p.237-240.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. Datasus. Causa-CID-10: Diarreia e gastroenterite presumível; morbidade hospitalar do SUS por local de internação-Brasil. In: Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 05 de novembro de 2008.

BRESSANE, M.A.; DURIGON, L.E.; AVILA-CAMPOS, M.J. 2001. Prevalence of the *Bacteroides fragilis* group and Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in immunodeficient children. **Anaerobe**, **7**:p.277-81.

BROOK, I. 1988. Pathogenicity of capsulate and non-capsulate members of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides melaninogenicus* groups in mixed infection with *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes*. **J. Med. Microbiol**, **27**: p.191-198.

BROOK, I. & FRAIZER, E.H. 1992. Recovery of *Bacteroides fragilis* group clinical specimens following antimicrobial therapy. **Can. J. Microbiol**, **38**: p.226-229.

BROOK, I. & FRAIZER, E.H. 1999. Aerobic and anaerobic microbiology of axillary hidradenitis suppurativa. **J. Med. Microbiol**, **48**, n.1:p.103-105.

BROOK, I. 2002. Anaerobic infections in children. **Microbes Infect**, **4**, n. 12: p. 1271-1280.

CHANG, P.S.; Y.H.; LIN, W.T.; LEE, C.Y. & CHANG, M.H. 1999. Isolation of *Eikenella corrodens* from polymicrobial hepatic abscess: report of one case. **Chung Hua. Min. Kuo. Hisao. Erth. Ko. I Hsueh. Hui. Tsa. Chih**, **40**, n.1: p.50-52.

CHIU, C.H.; SU, L.H. AND CHU, C. 2004. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. **Clin. Microbiol**, **17**, n.2:p.311-322.

CHUNG,G.; FRANCO,A.A.; WU,S.; RHIE,G.; CHENG,R.; SEARS,C.L.1999. Identification of a Third Metalloprotease Toxin Gene in Extraintestinal Isolates of *Bacteroides fragilis*. **Infection and immunity**,**67**:p.4945-4949.

CLSI.Clinical Laboratory Standards Institute.2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Seventeenth Informational Supplement.CISI document M 100-S17.Pensylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COHEN, S.H.; SHETAB,R.; TANG-FELDMAN,Y.J.; SARMA,P.;SILVA,Jr.J.; PRINDIVILLE,T.P. 2006. Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in hospital-acquired diarrhea.**Diag Microbiol Infect Dis**,**55**:p.251-254.

CUCHURAL. G.J.; JR.& TALLY, F.P.1986. *Bacteroides fragilis*: current susceptibilities, mechanisms of drug resistance, and principles of antimicrobial therapy. **Drug Intel. Clin. Pharm**,**20**, n.7-8: p.567-573.

DINIZ, C.G.1997.Susceptibilidade a antimicrobianos em bactérias anaeróbias do grupo *B.fragilis*, isolados da microbiota de calitriquios sadios.Monografia.Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DINIZ, C.G.;FARIAS, L.M.;CARVALHO,M.A.R.;ROCHA, E.R.;SMITH,C.J.2004. Differential gene expression in a *B.fragilis* metronidazole-resistant mutant. **J Antimicrob Chemother**,**54**, n.1:p.100-108.

DOMINGUES, R.M.C.P. 2004. *Bacteroides*.In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM,F. **Microbiologia**, 4 Ed., São Paulo: Atheneu.cap.53: p.391-394.

DUERDEN, B.I. & DRASAR, B.S.1991. Anaerobes in Human Disease. Edward Arnold, a division of Holder & Stoughton. London, **Melbourne, Auckland**.

DURMAZ, B.; DALGALAR, M. AND DURMAZ, R.2005. Prevalence of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with diarrhea: A controlled study. **Anaerobe**,**11**: p.318-321.

EFTIMIADI, C.; STASHENKO, P.; TONETTI, M.; MANGIANTE, P.E.; MASSARA, R.; ZUPO, S. & FERRARINI, M. 1991.Divergent effect of the anaerobic bacteria by-product butyric acid on the immune response: suppression of T-lymphocyte proliferation and stimulation of interleukin-1 beta production. **Oral Microbiol. Immunol**,**6**: p. 17-23.

ELDSTEIN, M.A.C. 1990. Anaerobic Gram-negative bacilli. In: Baron, E.J. **Diagnostic Microbiology**, **36**: p.529-548.

ELHAG, K.M.; ALWAN, M.H.; AL-ADNANI, M.S & SHERIF, R.A. 1986. *Bacteroides fragilis* is a silent pathogen in acute appendicitis. **J. Med. Microbiol**, **21**: p.245-249.

FANARO, S.; CHIERICI, R.; GUERRINI, P.; VIGI, V. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. **Rev. Acta Paediatr**, **441**: p.48-55.

FERNÁNDEZ, C. L.; CASTELLO, L.; GRECO, G.; LEGARIA, M.C.; LITTERIO, M.; PREDARI, S.C.; ROLLET, R.; ROSSETTI, A.; CARLONI, G.; SARCHI, M.I.; BIANCHINI, H. 2007. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group isolates from Buenos Aires, Argentina. **Rev Argent Microbiol**, **39**: p.156-60.

FILLE, M.; MANGO, M.; LECHNER, M.; SCHAUMANN, R. 2006. *Bacteroides fragilis* Group: **Trends in Resistance**, **52**: p. 349–352.

FINEGOLD, S.M. 1977. *Anaerobic Bacteria in Human Disease*. **Academic Press**, Inc. N.Y: p.534.

FINEGOLD, S.M. 1990. Anaerobes: problems and controversies in bacteriology, infections and susceptibility testing. **Rev. Infec. Dis**, **12**: p.223-230.

FINEGOLD, S.M. 1995. Overview of clinically important anaerobes. **Clin. Infect. Dis**, **20**, suppl.2: p.205-207.

FURRIE, M. 2006. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Rev Gut**, **55**: p.141-143.

GOLDSTEIN, E.J.C. & CITRON, D.M. 1988. Annual incidence, epidemiology, and comparative in vitro susceptibilities to cefoxitin, cefotetan, cefmetazole and ceftizoxime of recent community-acquired isolates of the *Bacteroides fragilis* group. **J. Clin. Microbiol**, **26**, n.11: p.2361-2366.

GRÖNLUND, M.M.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; LEHTONEN, O.P AND ISOLAURI. 2000. E Importance of intestinal colonisation in the prospective follow up study of healthy infants aged maturation of humoral immunity in early infancy: a 0-6 months, **83**:p.186-192.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S.T. 1994. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9<sup>a</sup> Ed., Baltimore: Williams and Wilkins, 754p.

HOOPER, L.V.; BRY, L.; FALK, P.G. & GORDON, J.I. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. **Bio Essays**, **20**: p.236-243.

JAFARI, F.; GARCIA-GIL, L.J.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; SHOKRZADEH, L.; ASLANI, M.M.; POURHOSEINGHOLI, M.A.; DERAKHSHAN, F.; ZALI, M.R. 2008. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. **J infect**.

JAWETZ, E. 2005. *Microbiologia Médica*, 22<sup>a</sup>. ed., Mc Graw Hill, Rio de Janeiro, RJ.

JOTWANI, R.; KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K.; UENO, K. 1995. Detection of *Bacteroides fragilis* in clinical specimens by polymerase chain reaction amplification of the neuraminidase gene. **Curr Microbiol**, **31** :p. 215-219.

KIM, C.H., SUK, K.T.; KIM, J.W. 2008. A case of sepsis and acute renal failure associated with *salmonella enterocolitis*. **Korean J Gastroenterol**, **52**:p.110-114.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C., WINN JR., W. C. *Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido*. 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: medsi, 2001. 1465p.

KOSHY, S.S.; MONTROSE, M.H.; SEARS, C.L. 1996. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrated actin rearrangement in response to metalloprotease toxin of *B. fragilis*. **Infect Immun**, **64**: p.5022–5028.

LIU, C., SONG, Y., MCTEAGUE, M.; VU, A.W.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S.M. 2003. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, **222**.

LIU, C.Y.; Huang,Y.T.; Liao,C.H.; Yen,L.C.;Lin,H.Y.2008. Increasing Trends in Antimicrobial Resistance among Clinically Important Anaerobes and *Bacteroides fragilis* Isolates Causing Nosocomial Infections: Emerging Resistance to Carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,**52**:p.3161-3168.

LORIAN, V. & GEMMELL, C.G. 1994.Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Lorian, V., Ed.) Williams & Wilkins, **Baltimore**: p.493-549.

MAYERS, L.L.; FIREHAMMER, B.D.; SHOOP, D.S.; BORDER, M.M.1984 . *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrhoeal disease in newborn lamb. **Infect Immun**, **44** : p.241-4.

MIGUEL, M.C.C AND AMORIM, R.F.B. 2004.Multifuncionalidade da beta-catenina e suas implicações na patologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**,**3**, n4. Ministério da Saúde.2001. Informações de saúde. Disponível em: [http//www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). [2005 Set 19].

MITRA, A.K.; KHAN, M.R.; ALAM, A.N.1991. Complications and outcome of disease in patients admitted to the intensive care unit of a diarrhoeal diseases hospital in Bangladesh. **Trans R Soc Trop Med Hyg**,**85**:p.685-7.

MONCRIEF, J.S.; OBISO, R. JR.; BARROSO, L.A.; KLING, J.J.; WRIGHT, R.H.;VAN TASSELL, D.M. 1995.The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. **Infect Immun** , **63** :p. 175-81.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S. AND PFALLER, M.A. 2006.n, 5a. ed., **Elsevier**, Rio de Janeiro, RJ.

NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J.2004. Virulence Markers and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria of the *Bacteroides fragilis* Group Isolated from Stool of Children with Diarrhea in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **99**, n. 3: p. 307-312.

NAKANO, V.; GOMES, D.A.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. AND AVILA-CAMPOS, M.J. 2006.Evaluation of the Pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* Toxin Gene Subtypes in Gnotobiotic Mice. **Current Microbiol**,**53**:p.113-117.

NAKANO, V.; GOMES,T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; FERREIRA,R.C.;AVILA-CAMPOS,M.J. 2007. bft gene subtyping in enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from children with acute diarrhea. **Anaerobe** ,**13**:p.1-5.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004.**Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Anaerobic Bacteria**. 6th ed., NCCLS publication m11-a6. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NGUYEN, M.H.; YU,V.L.; ARTHUR, J.; MORRIS,A.J.; DERMOTT,L.Mc.; WAGENER,M.W.; SNYDMAN,D.R.2000. Antimicrobial Resistance and Clinical Outcome of *Bacteroides* Bacteremia: Findings of a Multicenter Prospective Observational Trial. **Clinical Infectious Diseases**,**30**:p.870–6.

NGUYEN, T.V.; VAN, P.L.; HUY, C.L.; GIA, K.N.; WEINTRAUB.A. 2005. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. **Elsevier**, **10**:p.298-308.

OBISO, R.J.; LYERLY, D.M.; VAN TASSEL & WILKINS, T.D. 1997. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage in vivo. **Infect. Immunity**,**63**, n.10:p.3820-3826.

OLSEN, I& SHAH, H.N. 2001.Review and outcome of the meetings held in Manchester, UK, June 2000 by the International Committee on the Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Gram negative Anaerobic Rods. **Anaerobe**,**7**:p.329-331.

ORLANDI, P.P.; SILVA, T.; MAGALHAES ,G.F .; ALVES,F.; CUNHA,R.P. A.; DRRLACHER,R.;PEREIRA,L.H.2001.Enterophogrnd associatete with diarrheal disease in infants of poor urban áreas of Porto Velho, Rondonia. **Mem inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **96**: p. 621-625.

PANG,X.; DING,D.; WEI,G.; ZHANG,M.; WANG,L.; ZHAO,L.2005. Molecular profiling of *Bacteroides* spp. in human feces by PCR-temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, **61**:p. 413– 417.

PANTOSTI, A.; MALPELI, M.; WILKS, M.; MENOZZI, M.G. & D'AMBROSI, F. 1997.Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by PCR. **J. Clin. Microbiol**,**35**, n.10: p.2482-2486.

PATHELA, P.; HASAN, K.Z.; ROY, E.; ALAM, K.; HUQ, F.; SIDDIQUE, A.K.; AND SACK, R. B.2005. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* – Associated Diarrhea in Children 0–2 Years of Age in Rural Bangladesh. **J. Infect. Dis**,**191**: p.1245-1252.

PATRZALEK, M.2008 The cases of rotaviral diarrhea from Kielce and Kielce district, hospitalized in Kielce Voivodeship Children Hospital in 2002-2006, **Przegl Epidemiol**,**62**: p.557-563.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P. A.; STOBBERINGH, E.E.2006. Factors influencing the composition of the microbiota in early infancy. **Rev. Pediatrics**,**118**: p 511-521.

PODEWILS,L.J.; MINTZ,E.D.;NATARO,J.P.; PARASHAR,U.D. 2004. Acute infectious diarrhea among children in developing countries. **Semin Pediatr Infect Dis**, **15**: p.155- 168.

PONTUAL, J.P.S.; FALBO, A.R.; GOUVEIAS,J.S. 2006. Etiological study of diarrhea in children hospitalized at Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, in Recife, Pernambuco. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**,**6**: p.11-17.

PRINDIVILLE, T.; SHEIKH, R.; COHEN, S.; TANG, Y.; CANTRELL, M.; SILVA, J. 2000.*Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. **Emerg Infect Dis**, **6**: p.171–174.

QUADRI,F.; SVENNERHOLM,A.M.; FARUQUE,A.S.G.; SACK,R.B. 2005. *Enterotoxigenic Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, an Prevention. **Clin Microbiol Rev**, **18**.3: p.465-483.

RILEY, T.V.; MEE, B.J. 1982. Susceptibility of *Bacteroides* spp. to heavy metals. **Antimicrob Agents Chemother**,**22**: p.889-892.

RUDRIK, J.T.; BAWDON, R.E.; GUSS, S.P. 1985. Determination of mercury and organ mercurial resistance in obligate anaerobic bacteria **Can J Microbiol**,**31**:p.276-281.

SALYERS, A.A. 1984.*Bacteroides* of the human lower intestinal tract. **Ann. Rev. Microb**,**38** : p.293-313.

SALYERS, A.A. AND WHITT, D.D.1994. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. Washington D.C. **ASM Press**:p.418.

SAUDE, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL. 2008. Removing obstacles to healthy development. URL: <http://www.who.org/infectious-disease-report/>.

SEARS, L.; SALEQUL, I.;AMIT, S.; ARJUMAND,N.U.R.; HAQUE ALAM, A. S. G.;FARUQUE, M. A.; SALAM, J.A.I.; SHIN, H.T.; ANDREJ WEINTRAUB, R.; BRADLEY SACK, AND FIRDAUSI QADRI.2008 Association of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Infection with Inflammatory DiarrheaCynthia **Clinical Infectious Diseases**, **47**:p.797–803.

SHAOGUANG, W.; SHIN, J.; ZHANG, G.; COHEN, M.; FRANCO, A.; SEARS, C.L. 2006.The *Bacteroides fragilis* toxin bind to a specific intestinal epithelial cell receptor. **Rev. Infection and Immunit**, **74**: p.5382-5390.

SHARMA,N.; CHAUDHRY, R.2006. Rapid detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in diarrhoeal faecal samples. **Rev. Indian J Med**,**124**: p 575-582.

SHELTON, D.R.; KARNS, J.S.; HIGGINS, J.A.; VAN KESSEL, J.A.S.; PERDUE, M.L.; BELT, K.T.; RUSSELL-ANELLI, J. AND DEBROY, C.2006. Impactof microbial diversity on rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in surfacewaters. **FEMS Microbiol. Lett**,**261**: p. 95–101.

SILVA, V.L.2007.Adaptações fisiológicas e moleculares em resposta ao estresse oxidativo:implicações na virulência de *Fusobacterium nucleatum*.Tese de doutorado(Doutorado em ciências biológicas)Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SNYDMAN, D. R.; JACOBUS, N. V.; McDERMOTT, L. A.; RUTHAZER, R.; GOLAN, Y.; GOLDESTAIN, E. J. C.; FINEGOLD S. M.; HARRELL, L. J.; HECHT, D. W.; JENKINS, S. G.; PIERSON, C.; VENEZIA, R.; YU, V.; RIHS, J.; GORBACH, S. L.2007. National Survey on the Susceptibility of the *Bacteroides fragilis* Group: Report and Analysis of the Trends in the United States from 1997 to 2004. **Antimicrob Agents Chemother**,**51**, n. 5: p. 1649-1655.

SOUZA, M.B.; RACZ, M.L.; LEITE, J.P.; SOARES, C.M.; MARTINS, R.M.; MUNFORD, V. AND CARDOSO, D.D. 2003.Molecular and serological characterization of group a *Rothavirus* isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**,**22**, n.7: p.441-443.

STEERS, E.; FOLTZ, E.; GRAVES, B.1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, **9**: p. 307-311.

SUMMANEN, P.; BARON, E.J.; CITRON, D.M.; STRON, C.A.; WEXLER,H.M. AND FINEGOLD, S.M.1993. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. Star Publishing Company, Belmont, California: p.230.

SUTTER, V. L.; CITRON, D. M.; FINEGOLD, S. M.1980. **Wadsworth anaerobic Bacteriology Manual**, 3th Ed., St. Louis: C. V. Mosby.

TABAQCHALI, S. AND WILKS, M. 1992.Epidemiological aspects of infections by *Bacteroides fragilis* and *Clostridium difficile*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**,**11**: p.1049-1057.

TANNOCK, G.W. 1988.The normal microflora: new concepts in health promotion. **Microbiol. Scien**,**5**:p.4-8.

TEKA, T.; FARUQUE, A.S.G.; FUCHS, G.J.1996. Risk factors for deaths in under-age-five,**85**:p.1070-5.

THOMPSON-CHAGOYAN,O.C.; MALDONADO,J.;GIL,A.2007. Colonization and Impact of Disease and Other Factors on Intestinal Microbiota. **Dig Dis Sci**, **52**:p.2069–2077.

TOBIN, J.R.; WETZEL, R.C. 1996.Shock and multi-organ system dysfunction. In: Rogers MC. Textbook of pediatric intensive care. 3rd ed. **Baltimore**: Williams & Wilkins: p.555-606.

TOPOROVSKI, M. S.; MIMICA, I.; CHIEFFI, P.P.; PASCHOALOTTI, M.A.; DIAS, A.M.; SILVA, C.B. 2002.Diarréia aguda em crianças menores de três anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle. **J Pediatr**,**75**:p. 97-104.

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

TURRONI,S.;VITALI,B.;PERNA,F.;LAMMERS,K.;GIONCHETTI,P.;BRIGIDI,P.  
2008.Immunoregulatory activity of rifaximin associated with a resistant mutant of  
*Bifidobacterium infantis*.**J Antimicrob Agents**.

VOLLAARD, E.J. AND CLASENER, H.A.L.1994. Colonization and resistance.  
**Antimicrob. Agents Chemother**,**38**, n.3: p.409-414.

WEXLER, H.M.; MOLITORIS, D.; FINEGOLD, S.M.2001. In vitro activity of  
gatifloxacin against 238 strains of anaerobic bacteria. **Anaerobe** ,**7**:p. 285-289.

WEXLER, H.M. *Bacteroides*: 2007.The Good, the bad, and the nitty- gritty.**Clinical  
Microbiology**:p.593-621.

WITTE, W. 2000.Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex  
microflora: environment. **Int. J. Antimicrob. Agents**,**14**: p.321-325.

WU, S.; LIM, K.C.; HUANG, J.; SAIDI, R.F.; SEARS, C.L. 1998.*Bacteroides fragilis*  
enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. **Proc Natl Acad Sci  
USA**,**95**: p.14979–14984.

WU, S.; MORIN, P.J.; MAUYO, D.J.I.K.; SEARS, C.2003. *Bacteroides fragilis*  
enterotoxin induces c-myc expression and cellular proliferation.  
**Gastroenterology**,**124**:p. 392–400.

ZHANG, G.; WEINTRAUB, A. 1997.Identification of *Bacteroides fragilis* by Co-  
agglutination, Using a Specific Monoclonal Antibody. **Anaerobe**,**3**, n. 5: p. 295-300.

ZHANG, G.; SVENUNGSSON, B.; RNELL, A.; WEINTRAUB, A. 1999.Prevalence of  
enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in adult patients with diarrhea and healthy  
controls. **Clin Infect Dis** ,**29**:p.590–594.





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFORME CAPÍTULO IV DA RESOLUÇÃO Nº. 196 DE 10 DE OUTUBRO 1996  
DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

**“Investigação epidemiológica de patógenos virais, bacterianos e parasitas associados a manifestações clínicas no trato gastrointestinal, em crianças e adultos, na Zona da Mata Mineira.”**

Responsável: Prof. Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Tel.: 32293213.  
Instituto de Ciências Biológicas - UFJF

### Informações às participantes:

- O objetivo deste estudo é avaliar a ocorrência de vírus, bactérias e parasitas que possam estar associados à doenças do trato gastrointestinal em indivíduos que apresentam manifestação clínica no trato gastrointestinal, para fins epidemiológicos. Este estudo permitira ações voltadas para estruturação de políticas de saúde que visem uma diminuição do risco de ocorrência e disseminação destas doenças na comunidade, além da produção de conhecimento para educação sanitária da população geral.
- Os participantes, voluntários, não serão submetidos a nenhum procedimento clínico invasivo. Uma alíquota de material fecal será obtida através de doação para análise científica nos laboratórios do ICB/UFJF. Não existe contato físico com os doadores e nem a possibilidade de qualquer risco físico para os participantes deste estudo.
- Os resultados da pesquisa serão sigilosos e divulgados apenas em veículos científicos sem nenhum tipo de identificação dos participantes;
- Este Termo foi elaborado em duas vias que devem ser preenchidas e assinadas pelos responsáveis legais dos menores e pelo pesquisador responsável. Uma das vias será entregue aos participantes e a outra será arquivada pelo pesquisador responsável.

### Termo de consentimento pós-informação

Declaro que fui suficientemente informado a respeito dos objetivos da pesquisa e da ausência de contato físico e risco biológico e constrangimento moral durante ou após a realização da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade na investigação sobre a ocorrência de vírus, bactérias e parasitas associados a manifestações clínicas no trato gastrointestinal, em Juiz de Fora, que não recebi qualquer tipo de pressão para que isso ocorresse e que os custos dos experimentos para pesquisa não serão de minha responsabilidade.

Estou ciente de que tenho a liberdade de desistir a qualquer momento de colaborar voluntariamente com a cessão do material clínico proveniente do menor sob minha responsabilidade na pesquisa em curso; não receberei qualquer pagamento e não haverá qualquer prejuízo pela colaboração voluntária neste estudo. Declaro, ainda, meu consentimento na utilização deste material para estudos futuros no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

Responsável:		Assinatura:	
RG:	Endereço:	Telefone:	
Nome do menor:			

Pesquisador responsável:	Assinatura:
--------------------------	-------------

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa/UFJF – Atendimento de segunda a sexta-feira, de 08:00 às 12:00  
Pró-reitoria de Pesquisa – Campus Universitário, Cep: 36036-900 - Juiz de Fora. Tel. 32293784.



**Universidade Federal de Juiz de Fora**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia**  
**Núcleo de Pesquisas em Doenças Infecto-Parasitárias**

**FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS PARA INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA**

**Responsável:** \_\_\_\_\_

**Criança:** \_\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_ **anos**    **Sexo:** [M] [F]    **Cor da pele:** [ ] Branca [ ] Negra [ ] Parda

**Endereço:** \_\_\_\_\_    **Data de início da doença:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Data da coleta de fezes:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_    **Local da coleta:** \_\_\_\_\_

**Colhidas fezes dos contactantes:** [S] [N]                      **Vacina contra rotavírus:** [S] N° de doses [ ] - [N]

**Medicamentos nos últimos 30 dias:**

**Antibióticos:** [S] Citar \_\_\_\_\_ [N]                      **Antieméticos:** [S] - Oral [ ] Parenteral [ ] - [N]

**Sintomas:** [ ] Vômito [ ] Diarréia [ ] Febre (>37,8°C) [ ] Dor abdominal [ ] Dor de cabeça [ ] Coriza [ ] Tosse

**1º Sintoma:** [ ] Vômito [ ] Diarréia [ ] Febre (>37,8°C) [ ] Dor abdominal [ ] Dor de cabeça [ ] Coriza [ ] Tosse

**Número de episódios de diarréia em 24h:** [ ] 0-3 [ ] 3-5 [ ] Mais que 5

**Número de episódios de vômito em 24h:** [ ] 0-3 [ ] 3-5 [ ] Mais que 5

**Desidratação:** [S] [N]                      **Hidratação venosa:** [S] [N]                      **Hospitalização:** [S] [N]

**Durante o dia a criança freqüenta:** [ ] Creche pública [ ] Creche privada [ ] Escola pública [ ] Escola privada [ ] Berçário [ ] Domicílio com os pais [ ] Domicílio com babás [ ] Outros \_\_\_\_\_

**Contactantes com sintomas semelhantes:** [ ] Pai [ ] Mãe [ ] Irmão menor de 5 anos [ ] Irmão maior de 5 anos [ ] Babá [ ] Avós [ ] Tios [ ] Primos [ ] Cozinheira [ ] Colegas da escola [ ] Colegas da creche

**Exame complementar de fezes:** [S] [N]                      **Diagnóstico etiológico:** [S] [N]

**Hipótese diagnóstica:** [ ] Doença viral [ ] Doença bacteriana [ ] Doença parasitária [ ] Intolerância alimentar [ ] Intoxicação alimentar [ ] Outros \_\_\_\_\_



