

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DE
PIPERACILINA/AZOBACTAM, METRONIDAZOL E
CLINDAMICINA NA PATOGENICIDADE DE *Bacteroides fragilis*
RECUPERADOS DE INFECÇÕES INTRA-ABDOMINAIS**

MARCELA ABREU MENEZES

Belo Horizonte

2018

MARCELA ABREU MENEZES

**EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DE
PIPERACILINA/AZOBACTAM, METRONIDAZOL E
CLINDAMICINA NA PATOGENICIDADE DE *Bacteroides fragilis*
RECUPERADOS DE INFECÇÕES INTRA-ABDOMINAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Simone Gonçalves dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias

Belo Horizonte

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Dissertação de Mestrado

Defesa da dissertação de mestrado de Marcela Abreu Menezes, intitulada:
**“EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO SUB-INIBITÓRIA DE
PIPERACILINA/TAZOBACTAM, METRONIDAZOL E CLINDAMICINA NA
PATOGENICIDADE DE *Bacteroides fragilis* RECUPERADOS DE
INFECÇÕES INTRA-ABDOMINAIS”**, orientada pela Professora Simone
Gonçalves dos Santos, apresentada à banca examinadora em 28 de fevereiro
de 2018.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata

_____ .

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos - ICB/UFMG – Orientadora

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira - ICB/UFMG

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli - ICB/UFMG

Belo Horizonte

2018

COLABORAÇÃO

Prof. Ricardo Gonçalves

Laboratório de Patologia de Leishmaniose do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Dra. Cristina Dutra Vieira

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Priscila Simão Costa

Doutoranda do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Cássia Lopes Silva

Josimara Eugênio Rodrigues

Alunas de Iniciação Científica do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois sem Ele eu não teria superado todos os obstáculos para alcançar meus objetivos. Aos meus pais, irmão e cunhada pelo amor incondicional e por sempre estarem presentes me incentivando durante essa jornada.

À minha orientadora, Simone, que me ajudou no desenvolvimento desse trabalho, estando sempre disposta a contribuir na minha formação acadêmica. Também à Paula e ao Luiz, que me receberam muito bem no laboratório e deram conselhos enriquecedores ao trabalho.

Aos colegas do laboratório, pelos ensinamentos, dicas, materiais emprestados e muitas risadas. Em especial, à Priscila, pela enorme contribuição ao trabalho, estando presente aos finais de semana, feriados e madrugadas; e ao meu desenvolvimento pessoal, pois, principalmente com você, aprendi que existem pessoas que fazem o bem, sem pedir nada em troca. Agradeço, também, às minhas alunas de iniciação científica, Cássia e Josi, que me ajudaram na preparação dos materiais e na realização dos experimentos.

Ao professor Ricardo e à sua ex-aluna Tassiane, do Laboratório de Patologia de Leishmaniose, pelo suporte na realização dos experimentos com macrófagos; à Cris, pelas análises estatísticas do trabalho e pelo apoio; e aos alunos de outros laboratórios, principalmente o Rafa, Paulo e Léo, pela ajuda com alguns protocolos de experimentos e pelos conselhos.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro, CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRPq.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão do meu mestrado.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento da amostra de referência (*B. fragilis* ATCC 25285) sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Gráfico 2 - Curva de crescimento da amostra clínica P34 sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Gráfico 3 - Curva de crescimento da amostra clínica P50 sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Gráfico 4 - Tamanho do halo de inibição da amostra clínica (P34) cultivada previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)

Gráfico 5 - Tamanho do halo de inibição da amostra clínica (P50) cultivada previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)

Gráfico 6 - Tamanho do halo de inibição das amostras (ATCC, P34 e P50) no teste realizado em meio contendo sub-CIM dos antimicrobianos (2X) nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)

Gráfico 7 - Tamanho do halo de inibição das amostras de referência e clínicas sem sub-CIM nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)

Gráfico 8 - Coeficiente da divisão da DO das amostras (ATCC, P34 e P50) sem sub-CIM pela DO do controle negativo

Gráfico 9 – Coeficiente da divisão da DO das amostras clínicas (P34 e P50) cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina pela DO do controle negativo

Gráfico 10 - Hidrofobicidade das amostras (ATCC, P34 e P50) cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Gráfico 11 - Viabilidade dos macrófagos na presença das amostras de *B. fragilis* (ATCC, P34 e P50) cultivadas previamente sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos avaliados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Redução do MTT a formazan, com mudança de coloração de amarelo para violeta, indicando atividade mitocondrial e a viabilidade dos macrófagos

Figura 2 – Morfologia típica de *B. fragilis* na coloração de Gram

Figura 3 - Coloração de Gram das amostras (ATCC, P34 e P50) com sub-CIM de piperacilina/tazobactam

Figura 4 - Coloração de Gram das amostras (ATCC, P34 e P50) com sub-CIM de metronidazol

Figura 5 – Foto demonstrativa do teste de atividade hemolítica em sangue de carneiro das amostras ATCC, P34 e P50 cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Figura 6 – Visualização do produto da PCR das amostras de referência e clínicas para os genes de hemolisinas A, B, C, E e III

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do teste de formação de biofilme

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina para as amostras de *B. fragilis*

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima das amostras de *B. fragilis* cultivadas previamente com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC – “American Type Culture Collection”
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLI - Clindamicina
- CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”
- CTAB - Brometo de Cetil Trimetil Amônio
- DMEM – “Dulbecco’s modified Eagle’s médium”
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DO - Densidade óptica
- DOa - Densidade óptica da amostra
- DOc - Densidade óptica do controle negativo
- ESBL – Betalactamase de espectro ampliado
- GC – Conteúdo de guanina e citosina
- IIA – Infecções intra-abdominais
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MATS – “Microbial Adhesion to Solvents”
- MET – Metronidazol
- Mid-log - Fase log intermediária
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
- PBP - Proteína de ligação da penicilina
- PBS - Solução salina tamponada com fosfato
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PSA – Polissacarídeo A
- PSB – Polissacarídeo B
- PTZ – Piperacilina/Tazobactam
- SDS - Dodecilsulfato de sódio
- STET - Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, Triton X-100 0,1%
- Sub-CIM – Concentrações sub-inibitórias
- TSA – Ágar triptona soja
- UFC – Unidade formadora de colônia
- UTI – Unidade de terapia intensiva
- VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina

RESUMO

As bactérias do gênero *Bacteroides* são os anaeróbios obrigatórios mais frequentemente associados a doenças infecciosas, principalmente a espécie *B. fragilis*. Apesar de representar apenas 0,5% da microbiota do cólon humano, este é o anaeróbio obrigatório mais frequentemente recuperado de infecções intra-abdominais (IIA), devido a sua patogenicidade, como presença de cápsula, resistência ao estresse oxidativo, formação de biofilme, produção de hemolisinas e enterotoxinas e resistência a antimicrobianos. Piperacilina/tazobactam (PTZ), metronidazol (MET) e clindamicina (CLI) são utilizados no tratamento de doenças infecciosas por *B. fragilis*, porém, em concentrações sub-inibitórias (sub-CIM) são potencialmente capazes de interferir de forma positiva ou negativa na sua patogenicidade. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de sub-CIM de PTZ, MET e CLI na patogenicidade de *B. fragilis*. Foram incluídas duas amostras clínicas de *B. fragilis* isoladas de pacientes com IIA, além de uma amostra de referência (*B. fragilis* ATCC 25285). Nestas amostras, cultivadas previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, foram realizados testes fenotípicos para a pesquisa de alterações na morfologia celular; de resistência ao peróxido de hidrogênio; de formação de biofilme; de hidrofobicidade da superfície celular; de viabilidade dos macrófagos; de hemaglutinação; e de atividade hemolítica. Também foi realizada, por reação em cadeia da polimerase, a avaliação da presença dos genes codificadores das hemolisinas A, B, C, E e III. Sub-CIM de MET e CLI causaram atrasos significativos no tempo de início da fase log de crescimento das amostras. Sub-CIM de PTZ e MET causaram alterações na morfologia celular. No geral, sub-CIM dos três antimicrobianos diminuiu a resistência ao estresse oxidativo. Sub-CIM de MET diminuiu a hidrofobicidade das três amostras e de CLI diminuiu a hidrofobicidade de duas amostras testadas; e sub-CIM de PTZ aumentou a hidrofobicidade das duas amostras clínicas. Sub-CIM de CLI possibilitou uma maior sobrevivência dos macrófagos cultivados com suspensão bacteriana de duas amostras. Por outro lado, sub-CIM de PTZ diminuiu a viabilidade dos macrófagos cultivados com suspensão bacteriana das três amostras, e sub-CIM de MET diminuiu a viabilidade dos macrófagos cultivados com suspensão bacteriana das duas amostras clínicas. Todas as amostras apresentaram hemólise em todos os tipos sanguíneos testados, exceto a amostra clínica P34, cultivada previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, quando testada com sangue de carneiro. As amostras de *B. fragilis* de referência e as clínicas foram positivas para os cinco genes testados. Dessa forma, as alterações na patogenicidade apontam para os riscos de uma terapia antimicrobiana inadequada, sendo capazes de provocar diferentes interações entre o hospedeiro e a bactéria, além de poder afetar no diagnóstico e no tratamento das doenças infecciosas por *B. fragilis*.

Palavras chave: *Bacteroides fragilis*, patogenicidade, antimicrobianos, concentrações sub-inibitórias.

ABSTRACT

The genus *Bacteroides* consists of anaerobic bacteria most commonly associated with infectious diseases, particularly *B. fragilis*. Despite representing only 0.5% of the microbiota of the human colon, this is the anaerobe most often recovered of intra-abdominal infections (IAI), due to your virulence, such as presence of capsule, resistance to oxidative stress, biofilm formation, hemolysin and enterotoxin production and antimicrobial resistance. Piperacillin/tazobactam (PTZ), metronidazole (MET) and clindamycin (CLI) are used in the treatment of infectious diseases by *B. fragilis*, however in subinhibitory concentrations (sub-MIC) are potentially capable of interfering positively or negatively with their pathogenicity. The objective of this study was to evaluate the effects of sub-MIC of PTZ, MET and CLI on the virulence of *B. fragilis*. Two clinical strains of *B. fragilis* isolated from IAI patients were included, in addition to a reference strain (*B. fragilis* ATCC 25285). In these strains, previously cultivated in the medium without and with sub-MIC of the three antimicrobials, phenotypic tests were performed to investigate changes in cell morphology; hydrogen peroxide resistance; biofilm formation; cell surface hydrophobicity; viability of macrophages; hemagglutination; and hemolytic activity. The presence of hemolysin-encoding genes A, B, C, E and III were also evaluated by polymerase chain reaction. Sub-MIC of MET and CLI caused significant delays in log phase growth of the strains. Sub-MIC of PTZ and MET caused cell morphology changes. Overall, sub-MIC of the three antimicrobials decreased oxidative stress resistance. Sub-MIC of MET decreased the hydrophobicity of the three strains and CLI decreased the hydrophobicity of two strains tested; and sub-MIC of PTZ increased the hydrophobicity of the two clinical strains. Sub-MIC of CLI allowed a greater survival of macrophages cultured with bacterial suspension of two strains. On the other hand, sub-MIC of PTZ reduced the viability of macrophages cultured with bacterial suspension of the three strains, and sub-MIC of MET reduced the viability of macrophages cultured with bacterial suspension of the two clinical strains. All strains showed haemolysis in all blood types tested, except the P34 clinical strain, previously cultured in medium without and with sub-MIC of the three antimicrobials, when tested with sheep's blood. The *B. fragilis* reference strain and the clinical strains were positive for the five genes tested. Thus, virulence changes lead to the risks of an inadequate antimicrobial therapy, being able to induce different interactions in host-bacteria relationships, besides being able to affect in the diagnosis and treatment of infectious diseases by *B. fragilis*.

Keywords: *Bacteroides fragilis*, virulence, antimicrobials, subinhibitory concentrations.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 Características gerais do gênero <i>Bacteroides</i> | 17 |
| 2.1.1 Aspectos taxonômicos..... | 17 |
| 2.1.2 Aspectos fisiológicos e ecológicos | 19 |
| 2.2 Fatores de patogenicidade | 20 |
| 2.2.1 Cápsula polissacarídica..... | 21 |
| 2.2.2 Resistência ao estresse oxidativo | 22 |
| 2.2.3 Formação de biofilme | 24 |
| 2.2.4 Hidrofobicidade da superfície celular | 25 |
| 2.2.5 Hemaglutinação | 26 |
| 2.2.6 Atividade hemolítica | 27 |
| 2.3 Infecções intra-abdominais (IIA)..... | 29 |
| 2.3.1 Conceito e tipos de infecções..... | 29 |
| 2.3.2 Aspectos epidemiológicos e etiológicos | 30 |
| 2.3.3 Diagnóstico clínico e laboratorial..... | 32 |
| 2.3.4 Tratamento | 33 |
| 2.3.5 Resistência aos antimicrobianos | 34 |
| 2.4 Efeitos das concentrações sub-inibitórias (sub-CIM) dos antimicrobianos. 36 | |
| 2.4.1 Piperacilina/Tazobactam (PTZ) | 38 |
| 2.4.2 Metronidazol (MET) | 40 |
| 2.4.3 Clindamicina (CLI)..... | 41 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 43 |
| 4 OBJETIVOS | 44 |
| 4.1 Objetivo geral | 44 |
| 4.2 Objetivos específicos | 44 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 5.1 Amostras bacterianas..... | 45 |
| 5.2 Antimicrobianos e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina para <i>B. fragilis</i> | 45 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.3 | Curvas de crescimento das amostras de <i>B. fragilis</i> de referência (ATCC 25285) e clínicas (P34 e P50) sem e com concentrações sub-inibitórias de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina..... | 46 |
| 5.4 | Testes fenotípicos de avaliação da patogenicidade das amostras de <i>B. fragilis</i> cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina | 47 |
| 5.4.1 | Morfologia celular | 47 |
| 5.4.2 | Detecção de cápsula | 47 |
| 5.4.3 | Resistência ao Peróxido de Hidrogênio..... | 48 |
| 5.4.4 | Formação de Biofilme..... | 48 |
| 5.4.5 | Hidrofobicidade da superfície celular | 49 |
| 5.4.6 | Viabilidade dos macrófagos | 50 |
| 5.4.7 | Hemaglutinação | 52 |
| 5.4.8 | Atividade hemolítica | 52 |
| 5.5 | Avaliação da presença de genes codificadores de hemolisinas por PCR convencional | 53 |
| 5.5.1 | Amostras bacterianas utilizadas na pesquisa..... | 53 |
| 5.5.2 | Extração de DNA..... | 53 |
| 5.5.3 | Preparo do Master-Mix..... | 54 |
| 5.5.4 | Condições de amplificação do DNA | 54 |
| 5.6 | Análise Estatística | 55 |
| 6 | RESULTADOS | 56 |
| 6.1 | Determinação da concentração de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina capazes de inibirem o crescimento (CIM) das linhagens de <i>B. fragilis</i> avaliadas..... | 56 |
| 6.2 | Curvas de crescimento das amostras de <i>B. fragilis</i> cultivadas sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina | 57 |
| 6.3 | Testes fenotípicos de avaliação da patogenicidade das amostras de <i>B. fragilis</i> cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina | 59 |
| 6.3.1 | Morfologia celular | 59 |
| 6.3.2 | Detecção de cápsula | 60 |
| 6.3.3 | Resistência ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 60 |
| 6.3.4 | Formação de biofilme | 64 |
| 6.3.5 | Hidrofobicidade da superfície celular | 66 |
| 6.3.6 | Viabilidade dos macrófagos | 67 |

| | |
|--|----|
| 6.3.7 Hemaglutinação | 68 |
| 6.3.8 Atividade hemolítica | 68 |
| 6.4 Avaliação da presença de genes codificadores de hemolisinas por PCR convencional | 69 |
| 7 DISCUSSÃO | 71 |
| 8 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO..... | 80 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |
| 10 ANEXOS | 93 |

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal humano abriga uma população simbiótica de microrganismos complexa, composta principalmente por bactérias, mas também por fungos, vírus e protozoários. Esses microrganismos desempenham um papel importante na manutenção da saúde do corpo humano, ajudando na digestão dos alimentos, na produção de vitaminas, na regulação do sistema imune e na proteção contra patógenos (Ipci et al., 2017; Yang & Duan, 2018).

As bactérias anaeróbias formam a maior e mais diversificada comunidade microbiana, principalmente do trato intestinal. Os experimentos metagenômicos demonstram que a maioria das bactérias intestinais pertence aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Ormerod et al., 2016; Alves et al., 2017).

Apesar dos vários benefícios promovidos pela microbiota, sua desregulação pode causar complicações, como doenças inflamatórias intestinais e doenças autoimunes. De acordo com algumas hipóteses, a dieta moderna composta de alimentos processados aliada a uma vida sedentária; o uso de antimicrobianos; e os estresses, psicológico e físico, resultam em alterações no crescimento e metabolismo das bactérias. Elas liberam produtos potencialmente tóxicos, que desempenham um papel importante em muitas doenças crônicas e degenerativas (Geva-Zatorsky et al., 2015; Ipci et al., 2017).

A microbiota indígena pode ser patogênica durante um desequilíbrio do sistema imune ou quando esta é introduzida em áreas estéreis do corpo humano. Esse desequilíbrio pode ser causado por imunocomprometimento, doenças infecciosas ou não infecciosas, ou uma terapia antimicrobiana de longo prazo. As doenças infecciosas em seres humanos, causadas por anaeróbios obrigatórios, incluem abscessos, osteomielite, miosite, pneumonia por aspiração e peritonite. As bactérias do gênero *Bacteroides* são os anaeróbios obrigatórios mais frequentemente associados a essas doenças, principalmente a espécie *B. fragilis* (Diniz et al., 2000; Silva et al., 2014).

A espécie *B. fragilis* está presente na maioria dos casos de sepse, abscessos intra-abdominais e peritonites secundárias e terciárias. Sua análise genômica revelou uma capacidade intrínseca para promover a variação estrutural do envelope celular, em resposta aos diversos estresses, contribuindo para sua capacidade de se adaptar às diferentes condições durante a doença infecciosa (Boente et al., 2016; Alves et al., 2017).

O sucesso da patogenicidade de *B. fragilis* ainda não está completamente elucidado, porém, fatores como presença de cápsula, adesão aos tecidos, produção de proteases, neuraminidase, enterotoxina, lipopolissacarídeos, inibição da fagocitose, aquisição de ferro pela sua atividade hemolítica e resistência ao estresse oxidativo desempenham um papel importante (Lobo et al., 2013; Yoshizaki et al., 2014).

O tratamento das doenças infecciosas, geralmente, é acompanhado de concentrações sub-inibitórias (sub-CIM) dos antimicrobianos nos pacientes, podendo causar diversas alterações nas características da bactéria, incluindo a morfologia, os componentes da parede celular, além dos fatores de patogenicidade, como alterações na hidrofobicidade da superfície celular e na formação de biofilme (Veloso et al., 2013; De Andrade et al., 2016).

O conhecimento das alterações em *B. fragilis*, provocadas pela sub-CIM dos antimicrobianos testados neste estudo, pode ser útil para alertar sobre a necessidade de um tratamento com doses apropriadas dos antimicrobianos. Dessa forma buscou-se ampliar o conhecimento dessas alterações nos fatores de patogenicidade de *B. fragilis*, a fim de encontrarmos algum mecanismo que possa ser importante no diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais do gênero *Bacteroides*

O gênero *Bacteroides* pertence ao filo Bacteroidetes, classe Bacteroidetes, ordem Bacteroidales e família Bacteroidaceae. Ele é composto por bastonetes Gram negativos pleomórficos, anaeróbios obrigatórios, com extremidades arredondadas, que ocorrem isoladamente ou em pares. Apresentam colônias medindo de 1 a 3 mm de diâmetro, lisas, circulares, coloração branca a cinza. São sacarolíticos, não formadores de esporos e consiste no gênero mais abundante da microbiota intestinal humana. As espécies mais frequentemente isoladas da microbiota são *Bacteroides vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* e, menos frequentemente, *B. eggerthii* e *B. fragilis*. Entretanto, a espécie *B. fragilis* é a que mais se destaca, devido ao seu potencial patogênico (Liu et al., 2003; Sakamoto & Benno, 2006; Shah et al., 2009; Remacle et al., 2014).

2.1.1 Aspectos taxonômicos

Na década de 1980, o gênero *Bacteroides* abrangia mais de 60 espécies. Estas espécies apresentavam uma variedade na morfologia celular e eram bioquímica e fisiologicamente heterogêneas. A aplicação de técnicas de biologia molecular no final da década de 1980, como hibridização de DNA e sequenciamento genético do RNA ribossômico 16S, ajudou a esclarecer a estrutura do gênero *Bacteroides* (Shah et al., 2009).

Bacillus fragilis foi descrito em 1898 e reclassificado como *Bacteroides fragilis* em 1919. Até 1978 eram consideradas subespécies de *B. fragilis* todos os bastonetes Gram negativos, anaeróbios obrigatórios, sacarolíticos e capazes de crescer na presença de bile 20%. Posteriormente, esses anaeróbios obrigatórios, Gram negativos, sacarolíticos, resistentes a bile, com porcentagens de guanina e citosina (GC) em torno de 40% a 48%, entre outras características, foram incluídos dentro do chamado "grupo *B. fragilis*", que compreendia dez espécies: *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* e *B. vulgatus* (Rodriguez et al., 2006).

O gênero *Bacteroides* passou por uma grande revisão em 1989, em que foi proposta a restrição às espécies fortemente relacionadas ao *B. fragilis*, com base no conteúdo GC genômico e nas características bioquímicas. As espécies sensíveis à bile, sacarolíticas, pigmentadas e não pigmentadas foram transferidas para o gênero *Prevotella*; e as espécies assacarolíticas pigmentadas foram transferidas para o gênero *Porphyromonas* (Wexler, 2007; Gajdács et al., 2017). Poucos anos depois, novas restrições foram feitas ao gênero *Bacteroides*, visto que uma série de outros gêneros foram descritos: *Dialister*, *Megamonas*, *Mitsuokella*, *Tissierella*, *Tannerella*, *Alistipes* e *Parabacteroides*. Como exemplos, a espécie *Bacteroides forsythus* foi reclassificada em *Tannerella forsythensis* em 2002; a espécie *Bacteroides putredinis* foi transferida para o gênero *Alistipes* em 2003; e as espécies *B. goldsteinii*, *B. distasonis* e *B. merdae* foram transferidas para o gênero *Parabacteroides* em 2006. Além disso, em 2005 novas espécies foram adicionadas ao gênero *Bacteroides*, como *B. plebeius* e *B. coprocola*, isoladas do intestino humano. Em 2016, as espécies *B. caecicola* e *B. gallinaceum*, isoladas do ceco (intestino grosso) de uma galinha saudável, também foram adicionadas ao gênero (Jousimies-Somer & Summanen, 2002; Karlsson et al., 2011; Tyrrell et al., 2011; Irisawa et al., 2016).

As espécies atualmente descritas no gênero *Bacteroides*, baseadas nas características bioquímicas e genéticas, incluem membros do “grupo *B. fragilis*” (não é uma denominação taxonômica formal, sendo relacionada às 10 espécies propostas em 1989 para restringir o gênero) e outras espécies que foram descritas posteriormente (Euzéby, 2018). De acordo com a lista de nomenclatura de procariotos criada por Euzéby, cuja atualização é mensal, o gênero *Bacteroides* possui 49 espécies, entre elas: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *B. eggerthii*, *B. caccae*, *B. stercoris*, *B. coprocola*, e *B. plebeius*. Com isso, o “grupo *B. fragilis*” foi desfeito, sendo que algumas espécies continuaram no gênero *Bacteroides*, e outras foram transferidas para outros gêneros (Shah et al., 2009; Euzéby, 2018)

2.1.2 Aspectos fisiológicos e ecológicos

As bactérias anaeróbicas representam um grupo ecologicamente significativo da microbiota humana e de outros animais, e geralmente apresentam uma relação positiva no intestino do hospedeiro, principalmente no cólon, atingindo uma proporção de mil anaeróbios obrigatórios para cada bactéria anaeróbia facultativa. Também colonizam a boca, trato respiratório superior e, ocasionalmente, o trato genital feminino. O gênero *Bacteroides* está diretamente envolvido em vários processos benéficos ao hospedeiro, como na degradação de polissacarídeos, na proteção do epitélio intestinal contra a colonização de patógenos, no desenvolvimento do trato intestinal, na maturação do sistema imune, na atividade proteolítica, entre outros. No entanto, esta relação simbiótica nem sempre é benéfica. Geralmente, a doença infecciosa ocorre quando a bactéria é translocada do intestino, ou seja, quando ela é deslocada para sítios estéreis, como resultado de alguma doença subjacente, cirurgia ou trauma (Boente et al., 2010; Lobo et al., 2013; Ndamukong et al., 2013; Freitas et al., 2015).

O interesse pelo *B. fragilis* evoluiu na década de 1970, com o reconhecimento de que estas bactérias eram os principais anaeróbios obrigatórios encontrados em infecções da corrente sanguínea e estavam relacionados com a formação de abscessos intra-abdominais. A posterior compreensão de que *B. fragilis* é relativamente aerotolerante, ou seja, capaz de tolerar ambientes com concentrações entre 2–8% de oxigênio, explica, em parte, o seu sucesso na colonização da mucosa (onde a tensão de oxigênio é mais elevada); a sua sobrevivência após perfuração do cólon, quando exposta à cavidade peritoneal antes da formação do abscesso; e sua probabilidade de causar sepse (Sears et al., 2014, Alves et al., 2017).

As espécies do gênero *Bacteroides* são importantes patógenos oportunistas, frequentemente associadas a doenças infecciosas polimicrobianas, sendo o *B. fragilis* responsável por 63% das doenças causadas pelo gênero. *B. fragilis* é considerada a espécie mais patogênica do gênero devido aos seus fatores de patogenicidade e predominância em doenças infecciosas mono e polimicrobianas no cérebro, pulmão, abscessos intra-abdominais e intra-

pélvicos, peritonite e sepse (Liu et al., 2003; Nakano & Avila-Campos, 2004; Tierney et al., 2016).

Apesar de fazer parte da microbiota do intestino, o gênero *Bacteroides* é importante não só pela sua alta frequência, mas também pela resistência aos principais agentes antimicrobianos usados no tratamento. Geralmente os mecanismos de resistência resultam de alterações na fisiologia celular e estrutura bacteriana, devido a alterações no padrão genético ou na regulação da expressão gênica (Rodriguez et al., 2006; Freitas et al., 2015).

2.2 Fatores de patogenicidade

Em resposta às condições do tecido e aos mecanismos de defesa do hospedeiro durante uma doença infecciosa, as bactérias podem realizar várias atividades adaptativas de regulação e metabólicas, que interferem na sua patogenicidade. Além disso, sua capacidade de incorporar fragmentos de DNA (provenientes de fagos, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis) em seu próprio código genético, conhecida como transferência horizontal de genes, contribui para que esta bactéria se adapte a uma ampla variedade de pressões ambientais e ecológicas, incluindo aos antimicrobianos. Numerosos fatores contribuem para que *B. fragilis* permaneça no intestino, tais como a capacidade de utilizar polissacarídeos da dieta, tolerância à bile, a formação da cápsula e a presença de antígenos variáveis de superfície, que permitem que as bactérias escapem da resposta imune do hospedeiro (Dos Santos et al., 2007; Silva et al., 2014; Boente et al., 2016; Tajkarimi & Wexler, 2017).

A espécie *B. fragilis* é muito estudada por causa do seu caráter anfibiótico, ou seja, ela possui a capacidade de agir como simbiote ou patobionte, dependendo da expressão ou secreção de algumas moléculas. Embora o *B. fragilis* constitua apenas 0,5% da microbiota da luz do cólon humano, ele é o patógeno anaeróbio mais comumente isolado, principalmente devido a sua patogenicidade. Esta pode ser subdividida em três categorias: aquela envolvida na adesão aos tecidos; na proteção à resposta imune do hospedeiro (tais como toxicidade do oxigênio e fagocitose); ou na destruição dos tecidos. *B. fragilis* pode possuir todas essas características. Suas fímbrias e aglutininas

funcionam como adesinas, permitindo que ele se estabeleça no tecido hospedeiro. A cápsula polissacarídica, o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa da parede celular e uma variedade de enzimas o protegem da resposta imune do hospedeiro. Enzimas histolíticas encontradas no *B. fragilis* podem interferir na destruição dos tecidos (Wexler, 2007; Sears et al., 2014; Alves et al., 2017).

A capacidade de adesão às superfícies das células permite que as bactérias superem os mecanismos de defesa da mucosa. Embora a adesão seja essencial para manter a microbiota do hospedeiro, ela também faz parte do primeiro estágio de qualquer doença infecciosa (Wexler, 2007; Nakano et al., 2008).

A análise genômica de *B. fragilis* revelou uma capacidade intrínseca de promover a variação estrutural do seu envelope celular em resposta às alterações ambientais e aos estímulos durante uma doença infecciosa. Outros fatores de patogenicidade também foram observados em *B. fragilis*, como a indução de hemaglutinação, a produção de proteases, neuraminidase, enterotoxina, a inibição da fagocitose, a resistência ao estresse oxidativo e a resistência a antimicrobianos e íons metálicos, como chumbo e níquel, devido ao uso de metais na indústria, agricultura, hospitais e medicamentos. O sucesso da agressão ao hospedeiro por *B. fragilis* ainda não está totalmente elucidado, porém, seus fatores de patogenicidade desempenham um importante papel (Nakano & Avila-Campos, 2004; Lobo et al., 2013; Boente et al., 2016).

2.2.1 Cápsula polissacarídica

A presença da cápsula está relacionada com a patogenicidade das espécies de *Bacteroides*, funcionando como proteção contra o sistema imune do hospedeiro, induzindo a formação de abscessos e participando nos processos de hemaglutinação e de adesão às células e mucosas. A cápsula de *B. fragilis* mostra-se como fator anti-fagocitário e possui atividade contra a ação bactericida do soro (Nakano et al., 2008).

A formação do abscesso é um exemplo de resposta do hospedeiro à invasão bacteriana, em que uma membrana fibrosa envolve os neutrófilos mortos, os restos celulares e a população de bactérias. Quando não tratado, o abscesso pode se expandir e causar obstrução tecidual, deterioração de vasos sanguíneos e formação de fístula, podendo também se romper e resultar em sepse (Wexler, 2007; Reis et al., 2014).

B. fragilis produz oito diferentes polissacarídeos capsulares (A-H), que parecem ser antígenicamente distintos. A caracterização molecular dos dois primeiros polissacarídeos purificados da superfície de *B. fragilis* – polissacarídeo A (PSA) e polissacarídeo B (PSB) – mostrou que a carga e a estrutura do PSA são suficientes para a formação de abscessos em ratos. O PSA possui um equilíbrio entre o grupo amino, carregado positivamente, e o grupo carboxila, carregado negativamente. O PSB também possui grupos de cargas opostas, porém menos potentes que o PSA na formação de abscessos (Sears et al., 2014).

O PSA também exerce a função de modular o sistema imune do hospedeiro, por meio do aumento das funções fagocíticas dos macrófagos, a indução dos linfócitos T reguladores e a indução de uma resposta protetora pela produção de interleucina 10, em modelos experimentais (Geva-Zatorsky et al., 2015; Deng et al., 2016).

As espécies de *Bacteroides* que apresentam cápsula são frequentemente encontradas em abscessos abdominais e na corrente sanguínea, porém existem relatos da presença de cápsula em amostras isoladas da microbiota intestinal indígena. O polímero capsular pode, primeiramente, proteger *B. fragilis* da fagocitose e, em seguida, quando produzido em maiores quantidades, pode favorecer a adesão ao epitélio (Nakano et al., 2008; Reis et al., 2014).

2.2.2 Resistência ao estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidativas e as substâncias antioxidantes, em favor da primeira.

Assim, uma condição que conduz ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio ou a uma redução dos compostos antioxidantes, constitui um estresse oxidativo. Com isso, durante a doença infecciosa, *B. fragilis* precisa ser capaz de suportar as espécies reativas de oxigênio produzidas pelas defesas do hospedeiro e de persistir nos tecidos oxigenados da cavidade peritoneal (Dos Santos et al., 2007; Teixeira et al., 2013).

A aerotolerância não é um fator de patogenicidade óbvio, porém, é provável que a capacidade de sobreviver ao estresse oxidativo seja importante para a bactéria iniciar ou persistir no processo infeccioso. Durante as fases iniciais de uma doença infecciosa que segue do lúmen intestinal para outros compartimentos do corpo, as bactérias anaeróbias obrigatórias passam de condições anaeróbicas para um meio mais oxigenado. Este estresse oxidativo é inevitável, podendo ocorrer uma resposta adaptativa para a sobrevivência da bactéria (Dos Santos et al., 2007; Wexler, 2007).

Sabe-se que as bactérias anaeróbias facultativas desenvolveram uma variedade de mecanismos de regulação para adaptar-se a mudanças na disponibilidade de oxigênio. Metodologias recentes também verificaram estas respostas em anaeróbios obrigatórios, tais como *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Clostridium perfringens* e *Fusobacterium nucleatum*. As bactérias anaeróbias obrigatórias são capazes de desenvolver mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo, sendo uma resposta adaptativa importante durante a doença infecciosa, permitindo que elas resistam não somente às novas condições ambientais, mas também aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Dos Santos et al., 2007; Dos Santos et al., 2012).

B. fragilis é altamente aerotolerante, apresentando a contagem de células viáveis aumentada mais de 8 vezes após 12 horas de exposição a níveis atmosféricos de oxigênio, e diminuída gradativamente com poucas células sobreviventes após 72 horas de exposição. Durante as fases iniciais da resposta ao estresse oxidativo, o gene regulatório OxyR (da família LysR) controla a indução de genes para as enzimas de desintoxicação, como a catalase, superóxido dismutase e tiorredoxina peroxidase. Essas enzimas são as primeiras a responder ao estresse oxidativo e fornecem proteção rápida aos

danos causados pelos radicais livres (Ndamukong et al., 2013; Teixeira et al., 2013; Deng et al., 2016).

Quando o estresse oxidativo persiste, há uma resposta transcricional que modula a expressão de mais de mil genes, responsáveis pela codificação de várias funções celulares, incluindo o metabolismo, a utilização de carboidratos e a geração de energia. Esta resposta ao estresse oxidativo prolongado é importante durante a transição do cólon anaeróbico para o ambiente extra-intestinal aeróbico (Ndamukong et al., 2013).

Além disso, a adaptação ao estresse oxidativo provoca alterações fisiológicas, como alterações em vias metabólicas, cujos produtos são utilizados para a identificação do microrganismo. Ela também pode interferir em outras habilidades do microrganismo, relacionadas com sua patogenicidade (Da Silva et al., 2007; Teixeira et al., 2013).

2.2.3 Formação de biofilme

O biofilme consiste em um consórcio de bactérias envolvidas por uma matriz polimérica produzida por elas mesmas, composta por polissacarídeo, proteína e DNA, sendo aderido a uma superfície inerte ou viva. Ele permite que as bactérias sejam capazes de sobreviver em ambientes hostis e aumentam a resistência aos antimicrobianos devido à sua dificuldade de penetração no biofilme, à atividade metabólica diversa dos microrganismos contidos no biofilme e às diferenças nos padrões de expressão gênica quando comparado com as bactérias planctônicas (livres) (Reis et al., 2014; Silva et al., 2014).

A formação do biofilme, geralmente, consiste em cinco etapas: as células planctônicas se aderem à superfície de forma reversível; as células começam a se multiplicar, tornando-se mais firmemente ligadas e, conseqüentemente, ficam imobilizadas na superfície, de forma irreversível; as células crescem umas em cima das outras, sendo denominadas microcolônias, e começam a produzir a matriz polimérica circundante; as microcolônias aumentam de tamanho e se aderem para formar macrocolônias; a partir daí, elas podem se

dispersar, formando um novo biofilme ou tornando-se células planctônicas (Sun et al., 2013).

A capacidade de formar biofilme é uma característica da maioria dos microrganismos. As bactérias em biofilmes são mais resistentes à resposta imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos, tornando-as fontes de doenças infecciosas crônicas (Reis et al., 2014; Silva et al., 2014).

As bactérias em biofilmes são responsáveis por 80% das doenças infecciosas do corpo humano, principalmente as crônicas e recorrentes. Além disso, geralmente, eles demoram a causar sintomas evidentes, e podem durar meses, anos ou a vida inteira em um ou mais locais do corpo humano (Sun et al., 2013).

De acordo com estudos realizados para a formação de biofilme, entre os anaeróbios obrigatórios Gram negativos testados, *B. fragilis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* e *Veillonella* spp. foram fortemente aderentes; *Prevotella oralis* foi moderadamente aderente; e *Parabacteroides distasonis* foi fracamente aderente. Entre os anaeróbios obrigatórios Gram positivos, *Clostridium baratii*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. bifermentans* e *Finogoldia magna* foram fortemente aderentes; e apenas o *Clostridium difficile* foi moderadamente aderente. Além disso, quando essas bactérias foram testadas aos pares (*Fusobacterium necrophorum* + *Veillonella* spp.; *B. fragilis* + *F. magna*; e *C. difficile* + *F. magna*) foi observada uma interação sinérgica das espécies, com aumento da formação de biofilme. *B. fragilis* é o principal anaeróbio obrigatório isolado de doença infecciosa intestinal de seres humanos que pode formar biofilmes, de modo a manter uma população ótima e utilizar bombas de efluxo para expulsar agentes nocivos, incluindo os antimicrobianos (Pumbwe et al., 2008; Donelli et al., 2012).

2.2.4 Hidrofobicidade da superfície celular

A interação entre bactérias patogênicas e as células hospedeiras resulta em um balanço de várias forças atrativas e repulsivas, que operam entre os componentes da superfície celular de procariotos e eucariotos. Essas forças

incluem a interação entre as adesinas e um receptor complementar sobre as membranas das células hospedeiras; e a hidrofobicidade das superfícies celulares. Esta desempenha um papel importante na adesão aos tecidos, que é um processo de múltiplas etapas que envolve o contato da membrana celular bacteriana e das superfícies interativas do hospedeiro (Ofek et al., 1983; Haapasalo et al., 1990; Kos et al., 2003).

Os bastonetes Gram negativos anaeróbios obrigatórios têm uma variedade de componentes em sua superfície, como lipopolissacarídeo, cápsula e fímbrias, que podem influenciar na hidrofobicidade da superfície celular. As cápsulas bacterianas são geralmente hidrofílicas, contribuindo, portanto, para a baixa hidrofobicidade da superfície celular (Haapasalo et al., 1990; Reis et al., 2014).

É importante que os métodos para medir a hidrofobicidade sejam capazes de detectar a disponibilidade quantitativa e qualitativa dos diferentes resíduos lipofílicos nas superfícies bacterianas. Portanto, a compreensão da função dos resíduos lipofílicos requer a identificação do resíduo específico, bem como o esclarecimento dos mecanismos pelos quais esses resíduos estão ligados nas superfícies bacterianas (Ofek et al., 1983).

2.2.5 Hemaglutinação

A hemaglutinação bacteriana está relacionada com a adesão do microrganismo às células hospedeiras. A capacidade de adesão da maioria das bactérias é frequentemente associada com a presença de fímbrias, que agem como hemaglutininas, indicando seu potencial patogênico (Chandad & Mouton, 1995).

Há uma grande variação entre a atividade de hemaglutinação das bactérias contra os diferentes tipos de células sanguíneas, como as de humano, de coelho, de ave, de ovelha, de rato, entre outras, sugerindo que adesinas ou proteínas da membrana externa poderiam ser responsáveis pela hemaglutinação. Alguns estudos demonstram que *B. fragilis* não encapsulados aglutinam eritrócitos humanos (grupos sanguíneos A, B e O), de cavalo, de coelho, de ovelha, de rato e de galinha, enquanto que em amostras com

cápsulas grandes não há hemaglutinação. Além disso, outros estudos têm apresentado evidências de uma ligação entre a atividade da neuraminidase do *B. fragilis* e a capacidade de aglutinar eritrócitos e aderir aos tecidos (Patrick et al., 1996; Reis et al., 2014; Rajkumar et al., 2016).

A enzima neuraminidase catalisa a hidrólise do ácido siálico a partir de glicoproteínas, glicolípídeos e oligo e polissacarídeos. Várias amostras de *B. fragilis* apresentam atividade de neuraminidase, e estudos sugerem que essa atividade desempenha um papel na adesão bacteriana às células animais e na hemaglutinação (Nakano et al., 2006).

B. fragilis possui muitos fatores capazes de perturbar os mecanismos de defesa do hospedeiro e iniciar a destruição dos tecidos, como, por exemplo, as hemaglutininas. Também possui diversas vesículas, presentes na membrana externa, que apresentam atividades biológicas, como atividade enzimática, toxicidade para células hospedeiras e ligação a superfícies, a outras bactérias e eritrócitos. Com isso, essas vesículas possuem a capacidade de hemaglutinação. Esta pode ser relevante em situações de infecção intra-abdominal, em que a adesão às células peritoneais pode impedir a eliminação das bactérias da cavidade peritoneal (Namavar et al., 1991; Patrick et al., 1996; Nakano et al., 2008).

2.2.6 Atividade hemolítica

B. fragilis possui a capacidade de produzir hemolisinas, que proporcionam à bactéria uma vantagem, devido à sua atividade citotóxica de deteriorar a membrana celular. Uma de suas principais funções é a destruição de eritrócitos e leucócitos, aumentando a sobrevivência da bactéria e diminuindo a resposta imune do hospedeiro. Essa espécie pode conter nove genes homólogos de hemolisinas (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC*, *hlyD*, *hlyE*, *hlyF*, *hlyG*, *hlyI* e *hlyIII*), porém, apesar do potencial de patogenicidade, o seu papel na infecção extra-intestinal ainda não está claro. Essa variedade de hemolisinas proporciona ao *B. fragilis* um maior potencial de causar doença infecciosa do que qualquer outro anaeróbio obrigatório que coloniza o corpo humano (Robertson et al., 2006; Lobo et al., 2013).

A presença dos diversos genes de hemolisina sugere que eles podem desempenhar um papel importante nas infecções extra-intestinais e, possivelmente, na fisiologia do trato intestinal. As hemolisinas atuam como toxinas que lisam os eritrócitos e outras células do hospedeiro para obter a fração heme (fonte de ferro) e liberar hemoglobina. O aumento da hemoglobina livre intraperitoneal pode ser de relevância clínica, pois a hemoglobina é um potente inibidor da atividade de óxido nítrico, e sua produção pelos leucócitos atua como uma defesa do hospedeiro contra o processo infeccioso bacteriano. Além disso, tanto o ferro como a hemoglobina são reconhecidos como adjuvantes para o crescimento bacteriano. Com isso, é possível que o grande número de hemolisinas de *Bacteroides* atue não apenas no processo infeccioso, mas que também contribuam para a capacidade da bactéria de dominar a colonização do trato intestinal humano devido ao seu potencial bactericida, utilizado para inibir o crescimento de outros procariotos e eucariotos em ambientes altamente competitivos (Robertson et al., 2006; Sato et al., 2012).

Os mecanismos de deterioração da integridade da membrana pelas hemolisinas podem ser classificados em três grupos principais: a atividade enzimática, citolisina formadora de poros, ou surfactante. Estas características, além de promoverem a sobrevivência do patógeno com o enfraquecimento do sistema imune, também proporcionam o acesso aos nutrientes (Robertson et al., 2006; Lobo et al., 2013).

Um ponto interessante é que o oxigênio molecular inibe fortemente a expressão de hemolisinas. Fato que pode ser comprovado pela menor expressão nas primeiras 24 horas da infecção extra-intestinal em contraste com a maior expressão após 4 a 8 dias da doença, indicando o período de adaptação de *B. fragilis* à transição do ambiente aeróbio para o anaeróbio (Lobo et al., 2013). Isto demonstra que a resposta ao estresse oxidativo é essencial para a proliferação de *B. fragilis* na fase inicial de formação do abscesso no tecido extra-intestinal oxigenado até que condições anaeróbias sejam formadas para a expressão de fatores de patogenicidade com a função de manter o processo infeccioso (Robertson et al., 2006; Lobo et al., 2013).

Outro aspecto importante é que existe uma grande variação entre a atividade hemolítica e a hemaglutinação das bactérias frente aos diferentes grupos sanguíneos humanos e aos diferentes tipos de animais, como eritrócitos de cavalo, de coelho, de rato, entre outros (Rajkumar et al., 2016).

2.3 Infecções intra-abdominais (IIA)

2.3.1 Conceito e tipos de infecções

As IIA são caracterizadas pela presença de secreções purulentas na cavidade intra-abdominal ou peritonite generalizada. Elas são muito frequentes e, geralmente, causadas pelas bactérias da microbiota intestinal, por meio de perfuração da parede do intestino ou após a inflamação de órgãos intra-abdominais, como na apendicite, colecistite, colite e diverticulite, com posterior migração das bactérias entéricas para a cavidade peritoneal, provocando peritonite (Garcia-Sanchez et al., 2013; Prabhu et al., 2017).

Elas são classificadas em peritonites primária, secundária e terciária, nas formas não complicadas e complicadas. A peritonite primária é resultado da proliferação bacteriana da via hematogênica para o peritônio, sem perda da integridade do trato gastrintestinal, sendo rara, e ocorre principalmente na infância ou em pacientes adultos com cirrose. A peritonite secundária ocorre por necrose ou perfuração de órgão intra-abdominal, frequentemente como resultado de perfuração da úlcera duodenal ou invasão direta da apendicite gangrenosa; é a forma mais comum de peritonite, e quando associada à sepse grave ou choque séptico, possui taxas de mortalidade de aproximadamente 30%. E a peritonite terciária é uma doença infecciosa recorrente da cavidade peritoneal, que é resultado da peritonite primária ou secundária (Sartelli, 2010; Jovanovic et al., 2015).

A forma não complicada das IIA envolve um único órgão e não se estende para o peritônio; os pacientes podem ser tratados com antimicrobianos ou ressecção cirúrgica. Quando a doença é efetivamente solucionada pela cirurgia, 24 horas de profilaxia geralmente são suficientes. No caso da forma complicada, o processo infeccioso acomete além do órgão, causando peritonite localizada ou

difusa, e representa uma importante causa de morbidade, sendo, frequentemente, associada com um mau prognóstico. Seu tratamento envolve tanto o controle da fonte da infecção quanto a terapia antimicrobiana (Sartelli et al., 2012).

As IIA também são classificadas em infecções adquiridas na comunidade, que são adquiridas fora do ambiente hospitalar; e infecções relacionadas à assistência à saúde, que se desenvolvem em pacientes hospitalizados ou em internação domiciliar, e são caracterizadas por um aumento da taxa de mortalidade, devido tanto ao estado de saúde do paciente quanto à infecção ser causada, geralmente, por microrganismos multidrogas resistentes (Jovanovic et al., 2015).

2.3.2 Aspectos epidemiológicos e etiológicos

As IIA são consideradas uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo e são a segunda causa de sepse grave em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). A etiologia microbiana dessa doença infecciosa depende do local de rompimento do trato gastrointestinal, órgãos intra-abdominais afetados, estado imunológico do paciente, possíveis alterações na microbiota condicionada pela administração prévia de antimicrobianos e as doenças associadas (Ferreira et al., 2016).

Em relação ao local de rompimento do trato gastrointestinal, a peritonite está geralmente associada com espécies da microbiota gastrointestinal do paciente. Quando originada do esôfago, estômago, duodeno e intestino delgado proximal, predominam as bactérias Gram positivas (estreptococos, *Lactobacillus* spp., cocos anaeróbios obrigatórios) e *Candida* spp.. Quando originada da perfuração do íleo, são isoladas enterobactérias e alguns anaeróbios obrigatórios. E quando originada do cólon, predominam os anaeróbios obrigatórios (principalmente *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp.) sobre os anaeróbios facultativos, como *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterococcus* spp. (Sartelli, 2010; Garcia-Sanchez et al., 2013).

A peritonite de origem comunitária, em pacientes que não receberam antimicrobianos previamente, é causada por anaeróbios obrigatórios (principalmente *B. fragilis*, mas também podem estar envolvidos *Parabacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Clostridium* spp., *Bilophila wadsworthia*, *Finnegoldia* spp. e *Veillonella* spp.) e por anaeróbios facultativos, como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia marcescens* e *Streptococcus* spp. Já na peritonite adquirida em hospitais ou na comunidade, com tratamento prévio de antimicrobiano, estão envolvidos microrganismos mais resistentes. Predominam os anaeróbios facultativos, com diminuição da porcentagem de *E. coli* e aumento de *Enterobacter* spp. As bactérias não fermentadoras (principalmente *Pseudomonas aeruginosa*), *Enterococcus* spp. e leveduras (*Candida albicans* e *C. glabrata*) predominam sobre as enterobactérias (Garcia-Sanchez et al., 2013; Brook, 2016).

As enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro ampliado (ESBL), de betalactamases AmpC ou de carbapenemases; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA); *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE); e *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multidrogas resistentes são isolados em 15% das peritonites secundárias adquiridas na comunidade e relacionadas à assistência à saúde. Os fatores de risco mais importantes para a seleção de enterobactérias produtoras de ESBL são a exposição prévia a antimicrobianos, principalmente cefalosporinas de terceira geração, e as doenças associadas (Garcia-Sanchez et al., 2013; Ferreira et al., 2016).

Durante a fase aguda da peritonite (cerca de 20 horas), os anaeróbios facultativos, como a *E. coli*, são os microrganismos mais ativos, que estabelecem a destruição preliminar do tecido e a redução do potencial de óxido-redução do tecido oxigenado. Uma vez que quantidade suficiente de oxigênio é removida, as espécies de *Bacteroides* começam sua replicação, predominando na fase crônica da doença. *B. fragilis* é frequentemente encontrado nas infecções polimicrobianas, com uma taxa de mortalidade acima de 19% (Wexler, 2007; Brook, 2016; Jeverica et al., 2017).

2.3.3 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico precoce da infecção intra-abdominal é importante para avaliar a gravidade da doença e para melhorar sua evolução. Fatores que influenciam no prognóstico da doença envolvem a idade avançada, desnutrição, doenças pré-existentes, uso de imunossupressores, peritonite prolongada, a patogenicidade do microrganismo agressor, além de fatores que prolongam a hospitalização e aumentam a suscetibilidade do paciente a infecções relacionadas à assistência à saúde (Ferreira et al., 2016).

Um exame físico combinado com uma ultrassonografia do abdômen representa a investigação inicial em pacientes com dor abdominal aguda. Este, geralmente, é o sintoma predominante, a menos que sua percepção seja mascarada pela administração de analgésicos ou pela presença de uma ferida cirúrgica recente. As manifestações sistêmicas incluem: a temperatura corporal acima de 38°C ou abaixo de 36°C; frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto; a frequência respiratória acima de 20 respirações por minuto (em pacientes não ventilados) ou a pressão parcial de CO₂ abaixo de 32 mmHg (em pacientes ventilados); e a contagem de leucócitos acima de 12.000, abaixo de 4.000 ou com 10% de leucócitos imaturos (Jovanovic et al., 2015).

Apesar do diagnóstico da peritonite ser principalmente clínico, o exame microbiológico é essencial para estabelecer a etiologia da doença. São obtidos o líquido ascítico ou o exsudato purulento, para análise microscópica e cultivo do material, por punção abdominal, utilizando a ultrassonografia, laparoscopia ou abordagem cirúrgica. Porém, a aplicação de métodos moleculares apresenta maior sensibilidade na identificação microbiana do que a cultura (Dos Santos et al., 2004; Garcia-Sanchez et al., 2013; Ferreira et al., 2016).

As doenças infecciosas causadas por anaeróbios obrigatórios podem ser facilmente ignoradas, principalmente devido aos requisitos especiais para a sua coleta, transporte e processamento pelo laboratório. A necessidade de utilização de meios de cultura diferenciados, de geração de atmosfera anaeróbica e o tempo prolongado de cultivo são os elementos mais críticos para o sucesso do seu isolamento no laboratório. Em infecções polimicrobianas,

a identificação menos exigente de anaeróbios facultativos resulta, frequentemente, em um diagnóstico etiológico incompleto, com subnotificação das doenças infecciosas causadas por anaeróbios obrigatórios (Alves et al., 2017; Jeverica et al., 2017).

2.3.4 Tratamento

O tratamento das infecções por anaeróbios obrigatórios é complicado, devido ao crescimento lento do microrganismo *in vitro*, à doença infecciosa ser, geralmente, de natureza polimicrobiana e à seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos. A alta taxa de mortalidade por sepse está diretamente relacionada com o tratamento inadequado da infecção intra-abdominal. Esta, por sua vez, quando mal controlada, pode causar inflamação excessiva, levando ao mecanismo do choque séptico. O foco do tratamento deve ser o de permitir que as defesas do hospedeiro controlem a doença, mantendo a inflamação excessiva sob controle, o qual pode ser alcançado por terapia antimicrobiana adequada (Brook, 2016; Ferreira et al., 2016).

A terapia antimicrobiana desempenha um papel importante no tratamento das IIA, principalmente em pacientes graves, que necessitam de terapia empírica imediata. A abordagem antimicrobiana adequada envolve um equilíbrio entre a otimização da terapia empírica e a redução do uso excessivo de antimicrobianos. O tratamento inadequado é uma das variáveis mais fortemente associadas ao mau prognóstico da doença (Sartelli et al., 2012; Prabhu et al., 2017).

As espécies do gênero *Bacteroides* são, geralmente, isoladas das doenças infecciosas mistas causadas por aeróbios e anaeróbios, como as infecções intra-abdominais. Porém, a maioria dos laboratórios clínicos não costuma realizar a identificação bacteriana e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos para os anaeróbios obrigatórios, devido aos custos e dificuldade técnica. Por este motivo, o tratamento das doenças infecciosas por anaeróbios obrigatórios, incluindo o *B. fragilis*, é feito empiricamente, com base em perfis de resistência internacionais, que podem não refletir os padrões locais (Dos Santos et al., 2004; Sartelli, 2010; Prabhu et al., 2017).

A terapia antimicrobiana das IIA deve cobrir, principalmente, as enterobactérias e os anaeróbios obrigatórios. Para as infecções leves a moderadas adquiridas na comunidade por adultos, os agentes recomendados são: ticarcilina/clavulanato, carbapenêmicos, combinações de metronidazol com cefazolina, ceftriaxona ou cefotaxima, combinações de metronidazol com levofloxacina ou ciprofloxacina, cefoxitina e as quinolonas mais novas (trovafloxacina, clinafloxacina e moxifloxacina); das espécies do gênero *Bacteroides*, 15 a 40% são resistentes à clindamicina em muitos hospitais dos Estados Unidos e em outros lugares, porém ela ainda é utilizada no tratamento. Para as infecções de alto risco adquiridas na comunidade por adultos, os agentes recomendados são: carbapenêmicos, piperacilina/tazobactam, combinações de metronidazol com levofloxacina ou ciprofloxacina e combinações de metronidazol com ceftazidima ou cefepime (Fang et al., 2002; Brook, 2016).

Os antimicrobianos mais prescritos para as IIA causadas por espécies do gênero *Bacteroides* incluem betalactâmicos (podendo estar combinado com um inibidor de betalactamase), carbapenêmicos, metronidazol e clindamicina. As fluoroquinolonas também são usadas, em combinação com clindamicina ou metronidazol (Yehya et al., 2013).

2.3.5 Resistência aos antimicrobianos

Estudos demonstram que o uso incorreto de antimicrobianos é comum, e seu uso excessivo tem contribuído para a seleção e propagação de microrganismos resistentes. Com isso, aumentam a duração da internação hospitalar, a internação mais frequente na UTI e os gastos com o tratamento do paciente. Além disso, a ameaça da resistência a antimicrobianos torna-se o maior desafio no tratamento das doenças infecciosas (Sartelli et al., 2012; Prabhu et al., 2017).

Uma grande dificuldade no tratamento das IIA é a resistência à clindamicina, uma vez que ela é frequentemente prescrita para complicações por anaeróbios obrigatórios. Outro antimicrobiano bastante prescrito é o metronidazol, porém

dados da literatura também apontam para o surgimento de resistência em *B. fragilis* (Dos Santos et al., 2004; Ferreira et al., 2016; Narimani et al., 2016).

Nos últimos anos, o aumento da resistência a antimicrobianos pelos anaeróbios obrigatórios tem sido um problema mundial. Existe um número crescente de relatos que descrevem a seleção de resistência antimicrobiana por *B. fragilis* e outras espécies do gênero. Em 2013 foi relatado o isolamento de *B. fragilis* multidroga resistente em um paciente hospitalizado na Índia. A bactéria mostrou resistência a muitos antimicrobianos utilizados no seu tratamento, incluindo clindamicina, imipenem, metronidazol, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam. *B. fragilis* multidroga resistente também foi encontrado na Europa (Sartelli, 2010; Tierney et al., 2016).

Portanto, a prática de registros geográficos e temporais do perfil de sensibilidade dos antimicrobianos é essencial para a terapia empírica adequada, uma vez que o diagnóstico microbiológico e o teste de suscetibilidade para anaeróbios obrigatórios raramente são feitos. Esses registros têm sido realizados ao longo dos anos nos Estados Unidos, Europa e alguns países em desenvolvimento (Boyanova et al., 2015; Szekely et al., 2015; Ferreira et al., 2016; Prabhu et al., 2017).

Com isso, de maneira geral, foi identificado que as bactérias do gênero *Bacteroides* são quase completamente resistentes aos betalactâmicos simples (penicilinas e cefalosporinas) e tetraciclinas; possuem resistência moderada para cefoxitina, amoxicilina/clavulanato, clindamicina e moxifloxacina; e a resistência é pequena para carbapenêmicos, piperacilina/tazobactam, metronidazol e tigeciclina. Esse processo de resistência é devido, principalmente, à capacidade do *B. fragilis* de transferir seus genes de resistência na forma de transposons conjugativos, elementos genéticos integrados e plasmídeos conjugativos e móveis (Meggersee & Abratt, 2015; Szekely et al., 2015).

Os genes específicos de resistência aos antimicrobianos de *B. fragilis* que podem estar relacionados com os principais fenótipos de resistência são: *cepA* (codifica uma betalactamase) para os betalactâmicos simples (penicilinas e

cefalosporinas), *cfxA* para cefoxitina, *cfiA* (codifica uma metalobetalactamase) para carbapenêmicos, *ermF* e *ermB* (codificam metilases de rRNA 23S) para clindamicina e *nimA-G* para metronidazol (Quesada-Gomez et al., 2013; Kangaba et al., 2015; Meggersee & Abratt, 2015; Szekely et al., 2015).

A resistência à clindamicina pode ocorrer por meio da metilação da adenina do RNA ribossomal pelas enzimas metilases, que são codificadas pelo gene *erm*. A resistência ao metronidazol pode ser devido a uma mutação nas vias metabólicas, levando à diminuição das enzimas ferredoxinas e, com isso, impedem a redução do metronidazol e a produção de resíduos tóxicos, que são necessários para a atividade do antimicrobiano; ou devido a outros mecanismos, incluindo a expressão de bomba de efluxo, a expressão da proteína RecA e a deficiência de FeoAB. Já a resistência aos betalactâmicos, na maioria das bactérias Gram negativas, pode ser mediada pela produção de betalactamase (enzima que degrada o anel betalactâmico), porém outros mecanismos de resistência incluem alterações nas proteínas de ligação à penicilina, diminuição da permeabilidade da membrana ou aumento da atividade das bombas de efluxo (Souza Filho et al., 2012; Akhi et al., 2017).

Dessa forma, percebe-se um aumento da resistência a antimicrobianos em *B. fragilis* ao longo das últimas décadas e o perfil de suscetibilidade tornou-se menos previsível. Portanto, os estudos periódicos e locais de vigilância são necessários para a terapia empírica mais adequada, e reforçam que as IIA associadas ao *B. fragilis* não devem ser tratadas com um único agente terapêutico (Yim et al., 2015; Ferreira et al., 2016).

2.4 Efeitos das concentrações sub-inibitórias (sub-CIM) dos antimicrobianos

Para atingir níveis satisfatórios de antimicrobianos em abscessos e tecidos com pouca perfusão ou necrosados, são recomendadas doses maiores por períodos prolongados de tempo. A má gestão deste parâmetro pode resultar na presença de sub-CIM de antimicrobianos, podendo ser incapaz de eliminar o patógeno. Porém, pode alterar diversos aspectos da fisiologia microbiana e interferir no tratamento da doença. Assim, a eficácia do tratamento das

doenças infecciosas com antimicrobianos depende não apenas dos seus efeitos bactericida ou bacteriostático, mas também da sua capacidade de impedir a expressão de fatores de patogenicidade (Otto et al., 2013; Veloso et al., 2013).

Há várias situações em que os microrganismos são submetidos à sub-CIM de antimicrobianos durante períodos de tempo variáveis, resultando em falha do tratamento e seleção de bactérias resistentes. Os antimicrobianos podem interferir na microbiota indígena quando são utilizados de forma incorreta ou quando não são absorvidos completamente. Quantidades residuais podem ser detectadas na saliva, bile ou muco, prejudicando não só o equilíbrio da microbiota local, mas também outros grupos de microrganismos, quando esses fármacos ou seus resíduos são liberados no meio ambiente. Além disso, quando estes são inativados, seus resíduos podem ser suficientes para afetar o equilíbrio da bactéria com seu hospedeiro, principalmente no intestino (Veloso et al., 2013; Freitas et al., 2015).

Os microrganismos, frequentemente, crescem na presença de sub-CIM de antimicrobianos, que, embora não sejam capazes de inativá-los, são potencialmente capazes de alterar as características químicas e físicas da parede celular e, conseqüentemente, diminuem a expressão de alguns fatores de patogenicidade, como a adesão, a formação de biofilme, hidrofobicidade e motilidade. Além disso, sub-CIM de antimicrobianos causam vários efeitos sobre os microrganismos, incluindo alterações morfológicas e estruturais, no comportamento bioquímico e na capacidade de ligação, além do aumento da suscetibilidade à fagocitose. As alterações parecem variar, dependendo do microrganismo e do antimicrobiano envolvidos, podendo, inclusive, aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Isto explica a discrepância entre a eficácia do tratamento *in vivo* e a atividade do antimicrobiano *in vitro*, podendo explicar também o motivo de se obter o efeito terapêutico, mesmo em concentrações sub-inibitórias (Cialdella et al., 1986; Silvestro et al., 2006; Silva et al., 2014; De Andrade et al., 2016).

As alterações na fisiologia do *B. fragilis* associadas à sub-CIM de diferentes antimicrobianos sugerem uma resposta à pressão seletiva do meio, refletindo

seu potencial patogênico. Além disso, essas alterações podem interferir no diagnóstico e tratamento das doenças por *B. fragilis*. Portanto, a avaliação dos efeitos da sub-CIM de antimicrobianos enfatiza o risco de um tratamento inadequado, não só relacionado com a resistência bacteriana, mas também com implicações na microbiologia clínica e na evolução de doenças infecciosas (Freitas et al., 2015).

2.4.1 Piperacilina/Tazobactam (PTZ)

A piperacilina, penicilina semi-sintética de amplo espectro, é combinada com o inibidor de betalactamase tazobactam, a fim de expandir sua atividade contra anaeróbios facultativos Gram negativos e Gram positivos, e contra anaeróbios obrigatórios, incluindo patógenos produtores de betalactamases. Este antimicrobiano é recomendado para o tratamento de doenças infecciosas intra-abdominais, do trato respiratório inferior, da pele e ginecológicas (Dos Santos et al., 2010; Veloso et al., 2013; De Andrade et al., 2016).

O anel betalactâmico presente na piperacilina possui semelhança estrutural com um substrato natural de proteínas de ligação da penicilina (PBP), permitindo sua ligação a essas enzimas, que atuam na síntese da camada de peptidoglicano. Com isso, levam à desregulação da síntese da parede celular bacteriana e à ativação da lise celular. O tazobactam é um derivado sulfonado do ácido penicilânico e inibidor da betalactamase, que contém um anel betalactâmico que se liga irreversivelmente ao sítio ativo da betalactamase ou próximo dele, protegendo a piperacilina da ação desta enzima (Zhanel et al., 2014).

Em estudos realizados com sub-CIM de PTZ, foi demonstrado um atraso de 15 horas na fase logarítmica da curva de crescimento e diminuição da densidade de células de *B. fragilis*, e um atraso de 4 horas na fase logarítmica da curva de crescimento e diminuição da densidade de células de *E. coli*, existindo evidências de que a menor taxa de crescimento seja decorrente da diminuição de enzimas relacionadas com o metabolismo da energia. Houve também o aumento e diminuição de várias proteínas envolvidas nos processos biológicos de *B. fragilis*, sugerindo alterações proteômicas destinadas à adaptação a

condições ambientais adversas. Uma destas alterações foi o aumento das subunidades alfa, beta e alfa tipo V da enzima ATP sintase em *B. fragilis*, o que sugere uma resposta adaptativa para eliminar o antimicrobiano. Estes dados demonstram que sub-CIM de antimicrobianos contribuem para a seleção de microrganismos resistentes (Veloso et al., 2013; De Andrade et al., 2016).

A ocorrência de formas filamentosas em bactérias Gram negativas induzidas por betalactâmicos já foi relatada em vários estudos. A PTZ age na PBP-3, que é responsável pela septação da bactéria durante a divisão celular. Desta forma, quando em contato com sub-CIM do antimicrobiano, as bactérias continuam o processo de divisão, porém sem a formação de septos, devido a inibição da PBP-3, levando ao aparecimento de células filamentosas. Foi observado em *E. coli* o aparecimento de alterações morfológicas após 16 horas de crescimento, com 82% das células alteradas. Em *Fusobacterium nucleatum* houve alteração morfológica em 85% das células (Souza Filho et al., 2012; De Andrade et al., 2016).

Foram observados que sub-CIM de PTZ diminuem a tolerância de *E. coli* e *P. aeruginosa* ao estresse oxidativo. Acredita-se que as bactérias submetidas a antimicrobianos diminuem a produção de peroxidases e catalases, que protegem a célula de danos causados por espécies reativas de oxigênio. Portanto, nestas condições, as bactérias são mais vulneráveis à liberação de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose (Fonseca et al., 2004; De Andrade et al., 2016).

Estes estudos também demonstraram que sub-CIM de PTZ inibe a formação de biofilme por *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo a inibição mais acentuada quando as bactérias estão na forma filamentosa. Além da influência na capacidade de adesão aos tecidos, a sub-CIM pode afetar outros fatores necessários para a formação do biofilme, como o sistema “quorum sensing”, que é a chave para a comunicação entre as células e é fundamental para a formação e manutenção do biofilme. Amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium também apresentaram diminuição da formação de biofilme, além de redução na produção de exopolissacarídeos (Fonseca et al., 2004; De Andrade et al., 2016). E em 2012, Souza Filho e colaboradores demonstraram

uma redução significativa na formação de biofilme por *Fusobacterium nucleatum* expostos à sub-CIM de PTZ, provavelmente devido a uma diminuição na concentração de adesinas na superfície celular ou na secreção de poli- γ -glutamato.

2.4.2 Metronidazol (MET)

O Metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) é um derivado nitroimidazol amplamente utilizado para tratar doenças por protozoários e por bactérias anaeróbicas, incluindo *Bacteroides*. Sob condições anaeróbicas, o metronidazol é reduzido a nitro radicais citotóxicos, que inativam o DNA e outros componentes celulares do microrganismo. Ele é prescrito em concentrações diferentes, de acordo com a etiologia da doença infecciosa (Diniz et al., 2000; Diniz et al., 2003; Akhi et al., 2017).

Desde 1940, vários autores observaram que os bastonetes Gram positivos expostos a baixas concentrações de penicilina e outros antimicrobianos apresentaram alteração da morfologia, indicativa de células bacterianas irregulares. Posteriormente, foi demonstrado que essas células irregulares também poderiam ocorrer em bactérias Gram negativas e leveduras. No gênero *Bacteroides*, a ocorrência de forma celular irregular causada pelo tratamento com baixas ou altas concentrações de antimicrobianos, como o metronidazol, também foi demonstrada como sendo indicativa de alterações das propriedades celulares. Essas alterações na forma da célula podem levar a possíveis diferenças nos fatores de patogenicidade dos microrganismos e nas suas relações com as defesas do hospedeiro (Diniz et al., 2000).

Em alguns estudos, foram observadas células alongadas de *B. fragilis* na presença de metronidazol, devido à inibição das enzimas autolíticas que iniciam a separação. No entanto, as consequências dessas alterações na patogenicidade de *Bacteroides* não são claras. Por outro lado, não foram observadas modificações estruturais em *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* na presença de sub-CIM de metronidazol, porém houve diminuição dos valores de adesão de *F. nucleatum* (Diniz et al., 2000; Okamoto et al., 2002; Diniz et al., 2003).

Além disso, Gerber e colaboradores (2008) demonstraram, *in vitro*, que sub-CIM de metronidazol induz a transcrição de genes responsáveis pela produção das toxinas A e B na fase exponencial do crescimento de *Clostridium difficile*, que é um bastonete Gram positivo, anaeróbio obrigatório.

2.4.3 Clindamicina (CLI)

A clindamicina, que pertence à classe das lincosamidas, inibe a síntese proteica bacteriana e age especificamente na subunidade 50S do ribossomo da bactéria. Ela também causa alterações morfológicas, como alongamento e, em alguns casos, promove a morfologia fusiforme em aeróbios Gram negativos, e aumenta o tamanho dos cocos Gram positivos (Silvestro et al., 2006; Gerber et al., 2008).

Sub-CIM de clindamicina tem a capacidade de diminuir a regulação das propriedades de adesão de *Bacteroides*. Em *B. fragilis*, pode diminuir o tamanho da cápsula e o número de células com cápsula, aumentar o número de células alongadas e filamentosas, inibir o crescimento celular, fragmentar o DNA, produzindo fragmentos de baixo peso molecular, e aumentar a resistência à clindamicina. Essas alterações podem ser indicativas de uma possível modificação das estruturas envolvidas na patogênese da bactéria, que não afetam a viabilidade do microrganismo, porém aumentam a sua suscetibilidade em relação às defesas do hospedeiro. Algumas dessas alterações são: o aumento da suscetibilidade de *S. aureus* e *E. coli* à fagocitose por leucócitos polimorfonucleares e o aumento da sensibilidade ao soro por *E. coli* (Cialdella et al., 1986; Silvestro et al., 2006; Freitas et al., 2015).

Em um estudo realizado por Otto e colaboradores (2013), foi demonstrado que sub-CIM de clindamicina diminuiu, *in vitro*, a produção da proteína A e das exoproteínas alfa-hemolisina e leucocidina de Panton-Valentine de *S. aureus* resistente à meticilina/oxacilina, que são toxinas formadoras de poros com propriedades citotóxicas. Essa diminuição na produção de exoproteínas estafilocócicas ocorre, principalmente, no nível de ribossomo, por meio do bloqueio da tradução do RNA mensageiro. No entanto, também foi observada

uma diminuição no nível de RNA mensageiro, sugerindo um efeito inibitório da clindamicina na transcrição de genes de fatores de patogenicidade.

Além disso, sub-CIM inibe a síntese de proteínas do *Fusobacterium nucleatum*, interferindo no ribossomo 50S. Em relação às alterações morfológicas, *F. nucleatum* apresentou apenas 8,8% de células alteradas. No entanto, aumentou a agregação entre as células, levando à ocorrência de grandes coágulos. Quanto à formação de biofilmes, houve um aumento, provavelmente, devido à produção de adesinas na superfície da bactéria ou à secreção de poli- γ -glutamato, que, quando ligado à superfície, atua como uma cápsula (Souza Filho et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de *B. fragilis* representar apenas 0,5% da microbiota do cólon humano, ele é o principal anaeróbio causador de infecções intra-abdominais, devido aos seus diversos fatores de patogenicidade, como a presença da cápsula polissacarídica, a adesão aos tecidos, a produção de proteases, a inibição da fagocitose e a formação de biofilme, além da resistência a vários agentes antimicrobianos usados no tratamento.

Os antimicrobianos piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina são bastante utilizados para o tratamento de doenças infecciosas por *B. fragilis*, e há várias situações durante o processo infeccioso, nas quais a bactéria é submetida à sub-CIM de antimicrobianos, durante períodos de tempo variáveis. A presença de sub-CIM pode não ser capaz de eliminar o microrganismo, porém pode alterar diversos aspectos da fisiologia microbiana (conseqüentemente, interferir na expressão de alguns fatores de patogenicidade) e prejudicar o tratamento da doença. Outro fator agravante é a seleção e propagação de microrganismos resistentes, aumentando os gastos e a dificuldade no tratamento do paciente.

Alterações na patogenicidade de *B. fragilis*, na presença de sub-CIM desses três antimicrobianos propostos, podem demonstrar seu potencial patogênico, podendo provocar diferentes interações entre o hospedeiro e a bactéria. Além disso, essas alterações podem interferir no diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas por *B. fragilis*. Sendo assim, esse estudo pode contribuir para o sistema de saúde, possibilitando um maior conhecimento quanto à patogenicidade de *B. fragilis* frente à sub-CIM de antimicrobianos durante o tratamento das doenças infecciosas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos das concentrações sub-inibitórias de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina na patogenicidade de linhagens de *Bacteroides fragilis* recuperados de infecções intra-abdominais.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Analisar por métodos fenotípicos, os efeitos de concentrações sub-inibitórias de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina na patogenicidade de amostras de *B. fragilis* sob os seguintes parâmetros:

- Morfologia celular;
- Presença de cápsula;
- Resistência ao peróxido de hidrogênio;
- Capacidade de formação de biofilme;
- Hidrofobicidade da superfície celular;
- Capacidade de causar danos em macrófagos;
- Hemaglutinação;
- Atividade hemolítica.

4.2.2 Analisar por métodos genotípicos a presença dos genes relacionados à expressão de hemolisinas A, B, C, E e III nas amostras de *B. fragilis* incluídas no estudo;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras bacterianas

Foram avaliadas amostras de *Bacteroides fragilis*, uma de referência (ATCC 25285) e duas amostras clínicas, uma isolada (denominada P34) de um paciente com apendicite aguda, internado no Hospital Risoleta Neves e a outra (denominada P50) de um paciente externo com coleção abdominal após um mês de cirurgia de pancreatemia parcial, nefrectomia esquerda e esplenectomia, atendido no Centro especializado em Ultrasonografia, ambas são instituições de Belo Horizonte, MG, Brasil. Estas amostras clínicas foram isoladas em estudo anterior, realizado por Ferreira e colaboradores (2016), submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o número ETIC 0097.0.203.000-10. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -80°C (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA), no caldo Brucella (BBL, Sparks, MD, EUA) acrescido de 10% de glicerol.

Durante a realização dos testes, as amostras foram cultivadas em meios de cultura especificados em cada ensaio e incubadas em câmara anaeróbica (Forma Scientific Company, Marietta, OH, EUA), contendo uma atmosfera de 85% de N_2 , 10% de H_2 e 5% de CO_2 , à temperatura de 37°C .

5.2 Antimicrobianos e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina para *B. fragilis*

Neste trabalho foram utilizados os seguintes antimicrobianos: piperacilina/tazobactam (PTZ), metronidazol (MET) e clindamicina (CLI), cujos respectivos fabricantes são Aurobindo Pharma (medicamento genérico fabricado em Hyderabad, Andhra Pradesh, Índia) e Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) para os dois últimos.

As soluções antimicrobianas foram preparadas de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2017. A Concentração Inibitória Mínima dos antimicrobianos foi determinada pelo método de diluição em ágar, segundo recomendações do CLSI de 2017. As concentrações dos antimicrobianos avaliados abrangeram os pontos de corte

interpretativos das CIM para o microrganismo em questão, utilizando-se também algumas diluições acima e abaixo dos pontos de corte, sendo que piperacilina/tazobactam foi de 0,25 a 4,0 µg/mL, metronidazol foi de 0,25 a 8,0 µg/mL e clindamicina foi de 0,125 a 2.048 µg/mL.

As amostras bacterianas foram descongeladas em ágar Brucella (Becton Dickinson - BD, Sparks, EUA) suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, do qual após 48 horas foi transferida uma alíquota para obtenção de um inóculo final com a concentração de 10^5 UFC por ponto em solução salina 0,85%. Com o auxílio de um replicador de *Steers*, as amostras diluídas foram transferidas (10 µl por ponto), em ordem crescente de concentração e em duplicata para uma placa contendo ágar Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona e 5% de sangue de carneiro, além do antimicrobiano nas diferentes concentrações. As placas foram incubadas por 42-48h, a 37°C, em câmara anaeróbica. Como controles positivos foram utilizados duas placas com meio de cultura, mas sem antimicrobiano, com a mesma quantidade de inóculo, e para controles negativos foram usadas duas placas com meio sem antimicrobiano e sem inóculo bacteriano.

A CIM foi considerada como aquela concentração na qual não foi detectado nenhum crescimento visível da amostra e os resultados obtidos foram interpretados de acordo com critérios do CLSI de 2017.

Este teste foi repetido três vezes para confirmação do resultado. Realizou-se também, o mesmo teste com as amostras cultivadas em meios com sub-CIM dos três antimicrobianos separadamente, para avaliação da seleção de resistência.

5.3 Curvas de crescimento das amostras de *B. fragilis* de referência (ATCC 25285) e clínicas (P34 e P50) sem e com concentrações sub-inibitórias de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Na tentativa de padronização da leitura de cada amostra, foi determinado o tempo em que as culturas bacterianas chegariam entre a fase log intermediária (mid-log) e o início da fase estacionária, para realização dos testes. Foram

realizadas curvas de crescimento das amostras na ausência e na presença de sub-CIM de PTZ, MET e CLI, cujos valores foram pré-definidos como descrito no item 5.2.

Pré-inóculos em caldo Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, com crescimento em anaerobiose a 37°C por 24 horas, foram diluídos em 90 mL do mesmo meio sem e com sub-CIM de cada antimicrobiano, até a densidade óptica (DO) de 0,01 a 550 nm, em leitura realizada no espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, Vantaa, Finlândia). Posteriormente os frascos foram incubados em câmara anaeróbica a 37°C, e a multiplicação bacteriana foi monitorada. Em diferentes intervalos de tempo, de acordo com a resposta das amostras a cada antimicrobiano, alíquotas de 100 µL de cada cultura bacteriana foram retiradas, em triplicata, para leitura da densidade óptica a 550 nm. Como branco foi utilizado o caldo Brucella sem inóculo bacteriano (Dos Santos et al., 2007; Veloso et al., 2013; De Andrade et al., 2016).

5.4 Testes fenotípicos de avaliação da patogenicidade das amostras de *B. fragilis* cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

5.4.1 Morfologia celular - As bactérias foram cultivadas em ágar Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, na presença ou ausência dos antimicrobianos em sub-CIM e incubadas em anaerobiose a 37°C, por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). Em seguida, foi feito um esfregaço a partir das colônias crescidas e realizada a coloração de Gram para avaliação morfotintorial em microscopia óptica com objetiva de imersão (aumento 1000x) (Freitas et al., 2015).

5.4.2 Detecção de cápsula - As cápsulas foram detectadas usando o método de coloração de Hiss com modificações (Nakano et al., 2008; Reis et al., 2014). Cada amostra de *B. fragilis* foi cultivada anaerobicamente em extrato de levedura e peptona com glicose a 1%, na presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM e incubadas em anaerobiose a 37°C, por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). Uma

gota dessa suspensão bacteriana foi depositada sobre uma lâmina de microscopia. Em seguida, esta foi coberta com cristal violeta, por 5 minutos. Cada lâmina foi lavada com sulfato de cobre 20% e deixada para secar ao ar. A cápsula foi visualizada por microscopia óptica com objetiva de imersão (1000X), por meio da verificação de uma área livre em torno das bactérias.

5.4.3 Resistência ao Peróxido de Hidrogênio – Este teste foi realizado em ensaios de difusão em disco (Ndamukong et al., 2013; De Andrade et al., 2016). As amostras foram cultivadas em ágar Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, na presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM, e incubadas em anaerobiose a 37°C, por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). Em seguida, uma suspensão bacteriana a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foi inoculada, com a ajuda de um *swab*, em placas com ágar Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona. As amostras provenientes do meio com sub-CIM foram testadas em ágar sem (1X) e com sub-CIM dos respectivos antimicrobianos (2X). Discos de papel filtro estéreis de 6 mm foram colocados sobre a placa acrescentados de 5 µL do agente estressor peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha) nas concentrações de 1%, 5%, 10% e 20%. Após incubação em anaerobiose a 37°C durante a noite, os diâmetros das zonas de inibição do crescimento foram medidos. Os testes foram realizados em duplicata e repetidos em três ocasiões diferentes.

5.4.4 Formação de Biofilme – Utilizou-se o método de adesão em microplaca (Donelli et al., 2012). Após o crescimento das amostras bacterianas em anaerobiose em ágar Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona a 37°C por 48 horas, foi preparada uma suspensão bacteriana com turvação de 0,5 na escala McFarland em salina 0,85%. Foram adicionados 20 µL dessa suspensão a 180 µL de caldo Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, com a presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM, previamente determinados, e acondicionadas em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, em quadruplicata. As microplacas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). Após incubação, o conteúdo de cada

poço foi aspirado e, em seguida, lavado gentilmente três vezes com 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), para remover células planctônicas, e mantido em temperatura ambiente até completa secagem. Foram adicionados em cada poço 300 µL de metanol PA 99% v/v (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos, para fixação da massa celular. Após os 10 minutos, o sobrenadante foi descartado. As bactérias remanescentes foram coradas com 300 µL de cristal violeta (NewProv, Pinhais, PR, Brasil) por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois desse período, os poços foram lavados mais três vezes com PBS, para remover o excesso de cristal violeta que não corou as bactérias aderidas. Foram adicionados, então, 200 µL de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos para solubilizar o cristal violeta que corou o biofilme. Após este período, foram transferidos 150 µL da solução contida em cada poço para uma placa nova, seca e limpa. A absorbância foi quantificada no espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum, Vantaa, Finlândia), em comprimento de onda de 550 nm (Pumbwe et al., 2007; Maestre et al., 2012). Os testes foram realizados em quadruplicata e repetidos em três ocasiões diferentes. Como controle negativo foi utilizado apenas o caldo Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona. A interpretação do teste foi obtida a partir da divisão da densidade óptica da amostra (DOa) pela densidade óptica do controle negativo (DOc), sendo as amostras classificadas de acordo com a tabela 1 (Donelli et al., 2012).

Tabela 1 - Classificação do teste de formação de biofilme

| | |
|--------------------------|------------------------|
| $DOa \leq DOc$ | Não aderente |
| $DOc < DOa \leq 2xDOc$ | Fracamente aderente |
| $2xDOc < DOa \leq 4xDOc$ | Moderadamente aderente |
| $4xDOc < DOa$ | Fortemente aderente |

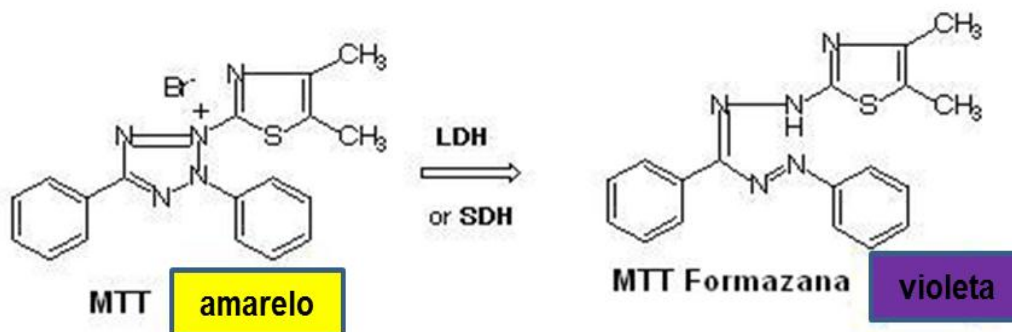
Legenda: DOa – densidade óptica da amostra, DOc – densidade óptica do controle negativo.

5.4.5 Hidrofobicidade da superfície celular - A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada pelo método de adesão microbiana a solventes (Microbial Adhesion to Solvents - MATS), de acordo com Kos e colaboradores (2003). As bactérias foram cultivadas em caldo Brucella suplementado com

0,1% de hemina e menadiona, na presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM, e incubadas em anaerobiose a 37°C, por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). Posteriormente, foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e ressuspensas em solução de KNO₃ 0,1 M (pH 6,2) para obtenção da densidade óptica a 600 nm, no espectrofotômetro. Posteriormente, 60 µL de xileno (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) foram adicionados a 360 µL da suspensão bacteriana, que foi ajustada a uma densidade óptica de 0,100 (A0). Após uma pré-incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, o sistema de duas fases foi homogeneizado em vórtex por 2 minutos e, em seguida, mantido em repouso durante 50 minutos. Após este período, a fase aquosa foi removida e a densidade óptica a 600 nm foi avaliada (A1). A MATS foi calculada pela porcentagem de bactérias associadas ao xileno de acordo com a fórmula: $MATS = 1 - (A1/A0) \times 100$. As amostras foram classificadas em altamente hidrofóbicas (MATS > 70%), moderadamente hidrofóbicas (70% ≤ MATS ≤ 50%) ou pouco hidrofóbicas (MATS < 50%). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos em duas ocasiões diferentes.

5.4.6 Viabilidade dos macrófagos – Foi realizada a técnica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), utilizando-se o protocolo para células aderentes (Felipe et al., 2011). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelas amostras de *B. fragilis* em estudo no metabolismo celular de glicídios, usualmente pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade dos macrófagos, é quantificada pela redução do MTT (sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração violeta e insolúvel em água) pela atividade das enzimas mencionadas acima (FIGURA 1). Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade dos macrófagos.

Figura 1 – Redução do MTT a formazan, com mudança de coloração de amarelo para violeta, indicando atividade mitocondrial e a viabilidade dos macrófagos



Fonte: Felipe et al., 2011.

Para a realização do teste foi preparada uma suspensão de macrófagos alveolares da linhagem J774 na concentração final de $5,0 \times 10^5$ células/poço, utilizando-se o meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) simples suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Foram adicionados, em duplicata, 200 μ L desta suspensão em cada poço da placa de 96 poços de fundo chato. A placa foi incubada na estufa de CO₂ pelo período de 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, e as células foram tratadas com 100 μ L das suspensões bacterianas na concentração de $5,0 \times 10^7$ UFC/poço, na presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM. Como controles, foram utilizados dois poços com macrófagos sem a suspensão bacteriana e dois poços com o meio sem macrófagos e sem suspensão bacteriana (branco). A placa foi incubada novamente na estufa de CO₂ pelo período de 9 horas. Após este tempo, foram retirados 10 μ L de cada poço e adicionados 10 μ L da solução de MTT 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e a placa foi incubada na estufa de CO₂ pelo período de 3 horas. Depois foi retirado todo o líquido de cada poço e adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) puro (Merck, Darmstadt, Alemanha). A placa foi agitada por 5 minutos e esperaram-se mais 5 minutos para estabilização da cor. A leitura da densidade óptica a 550 nm foi realizada no espectrofotômetro. Foi calculada a média de absorbância de todos os testes, inclusive do branco e do controle. Posteriormente, foi subtraída a média da absorbância do branco de todos os testes. O valor obtido pela subtração da média do controle pela média

do branco foi considerado como 100% de células viáveis. Para os demais testes, foi feita uma regra de três (valor obtido pela subtração da média dos testes pela média do branco) para obter o percentual de células viáveis (Felipe et al., 2011; Sekot et al., 2011; Maredia et al., 2012).

5.4.7 Hemaglutinação – As bactérias foram cultivadas em caldo Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, na presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM, e incubadas em anaerobiose a 37°C, por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). Em seguida, os *pellets* foram coletados, centrifugados (12.000 rpm/10.000 g, 5 min) e lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS). A suspensão bacteriana foi ajustada a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em paralelo, eritrócitos de seres humanos voluntários adultos (A+, B+, AB+ e O+), de cavalo e de carneiro foram lavados três vezes (5.000 rpm/600 g, 4°C, 5 min) e, finalmente ressuspensas em PBS. A hemaglutinação foi testada qualitativamente por mistura de 50 uL de suspensão bacteriana com 50 uL de suspensão de eritrócitos em uma placa de microtitulação de 96 poços (em forma de U). Duas diluições em série da suspensão bacteriana, de um volume final de 50ul/poço, foram realizadas. Em seguida, 50ul de eritrócitos foram adicionados a cada diluição e a placa foi agitada suavemente, sendo incubada, primeiro a 37°C, durante 1h, e depois a 4°C, durante a noite. Os títulos de atividade de hemaglutinação são expressos por meio do recíproco da maior diluição de atividade mostrando aglutinação bacteriana (Nakano & Avila-Campos, 2004; Rajkumar et al., 2016).

5.4.8 Atividade hemolítica – A pesquisa da produção de hemolisina foi realizada em *ágar triptona soja* (TSA, Becton Dickinson - BD, Sparks, EUA) enriquecido com 0,1% de hemina e menadiona e 5% de sangue de cavalo, carneiro ou seres humanos voluntários adultos (A+, B+, AB+ e O+). As amostras foram cultivadas em ágar Brucella suplementado com 0,1% de hemina e menadiona, na presença e ausência dos antimicrobianos em sub-CIM, e incubadas em anaerobiose a 37°C, por tempos distintos (determinados na curva de crescimento – 30, 48, 72 e 96 horas). As placas foram inoculadas em duplicata usando replicador de Steers, com inóculo final de 10^5 UFC/spot, e,

em seguida, incubadas em anaerobiose a 37°C, durante uma semana. A atividade hemolítica foi identificada através da verificação de uma zona clara em torno do crescimento bacteriano. Como controle positivo foi utilizado *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (Nakano & Avila-Campos, 2004; Rajkumar et al., 2016).

5.5 Avaliação da presença de genes codificadores de hemolisinas por PCR convencional

5.5.1 Amostras bacterianas utilizadas na pesquisa

As amostras de *B. fragilis* (de referência e as duas amostras clínicas) foram submetidas à pesquisa dos genes codificadores das hemolisinas A, B, C, E e III, utilizando-se os iniciadores descritos abaixo:

HlyA-forward 5'GGAGGCTATCGGTATATTCTGG^{3'}

HlyA-reverse 5'CCCGAGTTCAATAGTGGTAGGC^{3'}

HlyB-forward 5'CGAAAGCTCCGAAGCACTAC^{3'}

HlyB-reverse 5'ACCTCCAACCTTGCATCCAG^{3'}

HlyC-forward 5'GTCTTTCATTGCCTCTTGC^{3'}

HlyC-reverse 5'ATAGATGACCGGAGCGGAGA^{3'}

HlyE-forward 5'GGGAATGGAGATTGCTTTTG^{3'}

HlyE-reverse 5'GTTATTCCCGACCAACATGG^{3'}

HlyIII-forward 5'GGCGAAGAGCTGTCCAATAC^{3'}

HlyIII-reverse 5'CCCCACCAGATAAGCCAGTA^{3'}

5.5.2 Extração de DNA

O DNA das amostras de *B. fragilis* (clínicas e de referência) foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio (Fox et al., 1985). O pellet, após centrifugação, foi ressuspensionado em tampão sacarose 8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, Triton X-100 0,1% (STET) pH 8,0. A seguir, foram adicionados dodecilsulfato de sódio (SDS) 1,5% e RNase A (0,02µg/µL). Após incubação por uma hora, a 37°C, foi adicionada proteinase K (0,7 µg/µL). A suspensão foi homogeneizada

e incubada a 37°C, por 24 horas. Em seguida, foram adicionados NaCl (0,7 µmol/µl) e uma solução contendo partes iguais de detergente catiônico Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) 5% e NaCl 0,7M e a suspensão foi agitada delicadamente e incubada por 10 minutos, a 56°C. O DNA foi extraído em igual volume de fenol e clorofórmio (1:1) e precipitado com acetato de sódio 0,3M (2,6 µmol/µL) e, aproximadamente, dois volumes de etanol absoluto, a -20°C, por 24 horas (Avila-Campos et al., 1999; Schander & Kenneth, 2003; Burger et al., 2005).

A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm (10.000 g) por 75 minutos, à temperatura de 4°C e, após a evaporação do etanol residual, foram acrescentados dois volumes de etanol 70%. O material foi, novamente, centrifugado a 12.000 rpm, por 25 minutos, e o sedimento de DNA diluído em 50µL de água Milli-Q estéril e estocado a -20°C. A concentração de DNA de cada amostra foi medida em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000, empregando-se comprimento de onda de 260 nm (Avila-Campos et al., 1999; Schander & Kenneth, 2003; Burger et al., 2005).

5.5.3 Preparo do Master-Mix

Nesta etapa, foi utilizado o kit Pré-Mix 2X (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil), contendo Taq DNA polimerase, os nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e MgCl₂. Cada reação ocorreu com um volume final de 25 µL sendo 12,5 µL de Pré-Mix + 10 pMoles de *primers Forward e Reverse* + 50 ng de DNA bacteriano + água livre de nuclease para completar o volume de 25 µL.

5.5.4 Condições de amplificação do DNA

As condições de amplificação do DNA para todos os genes pesquisados foram: desnaturação inicial 94°C, 3min; 32x - 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 45s; extensão final 72°C, 10min (Lobo et al., 2013). Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1,2%, após terem sido submersos em 1 µL de tampão Gel Red 10.000X (BIOTIUM®, EUA) + 100 mL de tampão TBE 1X sob agitação durante 30 minutos, e as imagens foram capturadas sob luz

ultravioleta em fotodocumentador. Como padrão de DNA, foi utilizado o marcador de DNA *ladder* 100 pb (Promega®, MADISON-WI, EUA).

5.6 Análise Estatística

Para realização da estatística descritiva, foi utilizado o programa SPSS (versão 19.0), Excell e o programa Stata versão 12.0 (STATA Corp., TX, EUA). Este último programa foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Foram consideradas como variáveis resposta ou variáveis dependentes alguns parâmetros como o tamanho do halo de inibição (mm), a formação de biofilme e a hidrofobicidade. Escolheu-se a análise de regressão linear para comparar a variável resposta com as variáveis independentes: três amostras bacterianas submetidas ou não a concentrações sub-inibitórias de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina e a concentração do peróxido de hidrogênio (1%, 5%, 10% e 20%). Esta última variável foi utilizada para comparar alterações no tamanho do halo de inibição. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Determinação da concentração de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina capazes de inibirem o crescimento (CIM) das linhagens de *B. fragilis* avaliadas

A CIM dos três antimicrobianos testados para as amostras de *B. fragilis* de referência (ATCC 25285) e das duas clínicas (P34 e P50) foi determinada de acordo com o CLSI 2017, e os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima de piperacilina/tazobactam, metronidazol e clindamicina para as amostras de *B. fragilis*

| Amostras | Piperacilina/Tazobactam (µg/mL) | Metronidazol (µg/mL) | Clindamicina (µg/mL) |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>B. fragilis</i> ATCC 25285 | 1,0 | 1,0 | 0,5 |
| P34 | 1,0 | 2,0 | 0,25 |
| P50 | 1,0 | 4,0 | 1.024 |

A sub-CIM foi definida como a metade da concentração inibitória mínima, exceto para a amostra P50 cultivada na presença de clindamicina, cuja concentração sub-inibitória foi de $\frac{1}{4}$ da CIM.

As amostras cultivadas previamente em meio com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina não apresentaram aumento ou diminuição significativa da CIM (TABELA 3), quando comparadas a elas mesmas sem sub-CIM, sendo que é considerada uma mudança significativa da CIM, quando ocorrem variações superiores ao limite de precisão do teste, que é de uma diluição acima ou abaixo (1:2). Ou seja, a variação da CIM de 2,0 µg/mL para 1,0 µg/mL ou para 4,0 µg/mL não é considerada significativa (Freitas et al., 2015).

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima das amostras de *B. fragilis* cultivadas previamente com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

| Amostras | Piperacilina/Tazobactam (µg/mL) | Metronidazol (µg/mL) | Clindamicina (µg/mL) |
|-------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| ATCC + PTZ | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| ATCC + MET | 1,0 | 1,0 | 0,5 |
| ATCC + CLI | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| P34 + PTZ | 1,0 | 1,0 | 0,5 |
| P34 + MET | 1,0 | 2,0 | 0,5 |
| P34 + CLI | 1,0 | 2,0 | 0,5 |
| P50 + PTZ | 1,0 | 2,0 | 1.024 |
| P50 + MET | 1,0 | 4,0 | 1.024 |
| P50 + CLI | 1,0 | 2,0 | 1.024 |

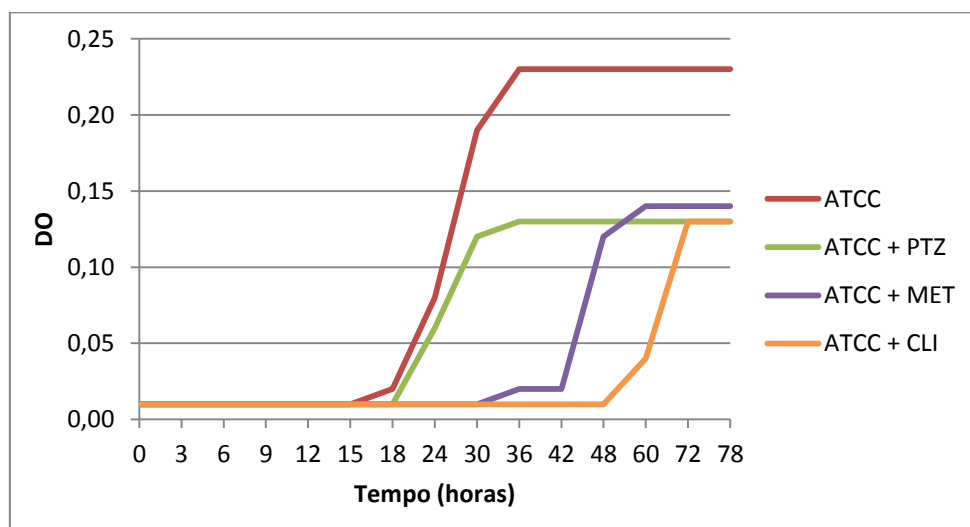
6.2 Curvas de crescimento das amostras de *B. fragilis* cultivadas sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

Os tempos para leitura de cada amostra foram determinados a partir da curva de crescimento (visando o intervalo entre a fase mid-log e o início da fase estacionária), sendo estabelecidos como: 30 horas para as amostras de referência ATCC, ATCC + PTZ; e clínicas P34, P34 + PTZ; P50, P50 + PTZ e P50 + CLI; tempo de 48 horas para a amostra ATCC + MET; 72 horas para as amostras ATCC + CLI, P34 + CLI e P34 + MET; e 96 horas para a amostra P50 + MET.

Em relação à amostra de referência (*B. fragilis* ATCC 25285), no início da fase log de crescimento, houve um atraso de 15 horas quando esta foi cultivada em meio com sub-CIM de metronidazol, e de 33 horas quando cultivada em meio com sub-CIM de clindamicina (GRÁFICO 1). Quanto à amostra clínica P34, observou-se um atraso de 36 horas quando esta foi cultivada em meio com sub-CIM de metronidazol, e de 30 horas quando cultivada em meio com sub-CIM de clindamicina (GRÁFICO 2). Já a amostra clínica P50, apresentou um atraso de 60 horas quando cultivada em meio com sub-CIM de metronidazol, e

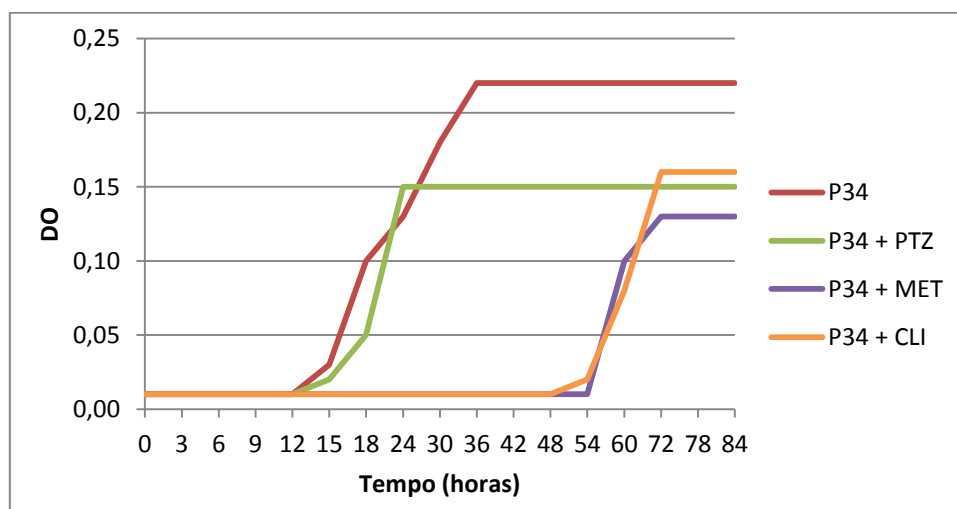
de 9 horas quando cultivada em meio com sub-CIM de clindamicina (GRÁFICO 3). Por outro lado, não houve atraso expressivo das amostras de referência e clínicas quando cultivadas com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, porém, houve diminuição da densidade óptica de todas as amostras cultivadas em sub-CIM dos três antimicrobianos, quando comparadas a elas mesmas sem antimicrobianos (GRÁFICOS 1, 2 e 3).

Gráfico 1 - Curva de crescimento da amostra de referência (*B. fragilis* ATCC 25285) sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina



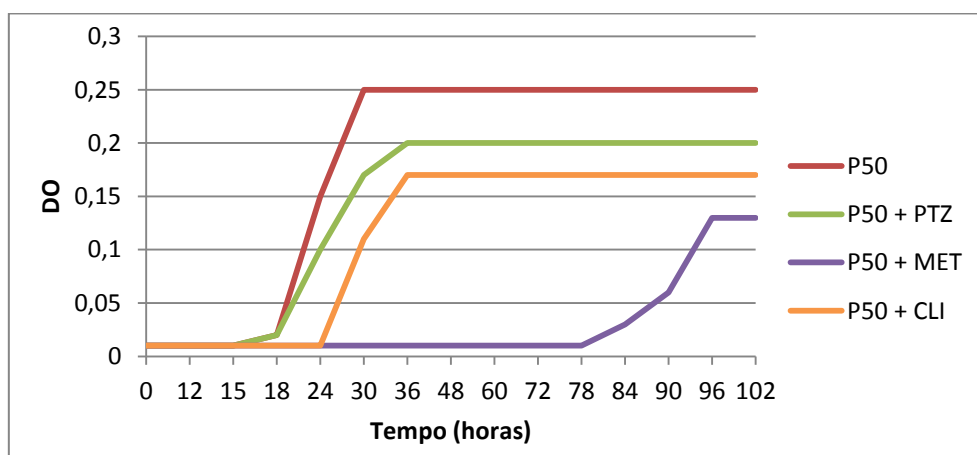
Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

Gráfico 2 - Curva de crescimento da amostra clínica P34 sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina



Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

Gráfico 3 - Curva de crescimento da amostra clínica P50 sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina



Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

6.3 Testes fenotípicos de avaliação da patogenicidade das amostras de *B. fragilis* cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

6.3.1 Morfologia celular

As três amostras em estudo, cultivadas em meios sem sub-CIM ou em meios com sub-CIM de clindamicina, apresentaram-se na coloração pelo Gram como bastonetes Gram negativos pleomórficos, com extremidades arredondadas (morfologia típica dessas bactérias) (FIGURA 2). Por outro lado, o Gram das colônias provenientes dos meios com sub-CIM de piperacilina/tazobactam (FIGURA 3) e metronidazol (FIGURA 4) mostrou células com aspecto filamentoso.

Figura 2 – Morfologia típica de *B. fragilis* na coloração de Gram

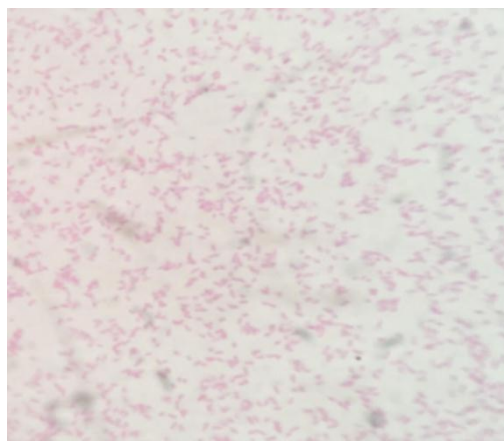
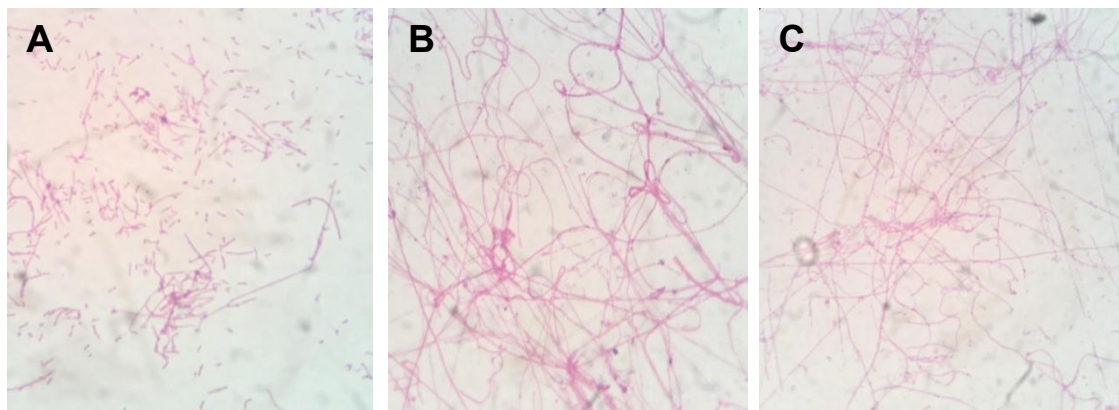
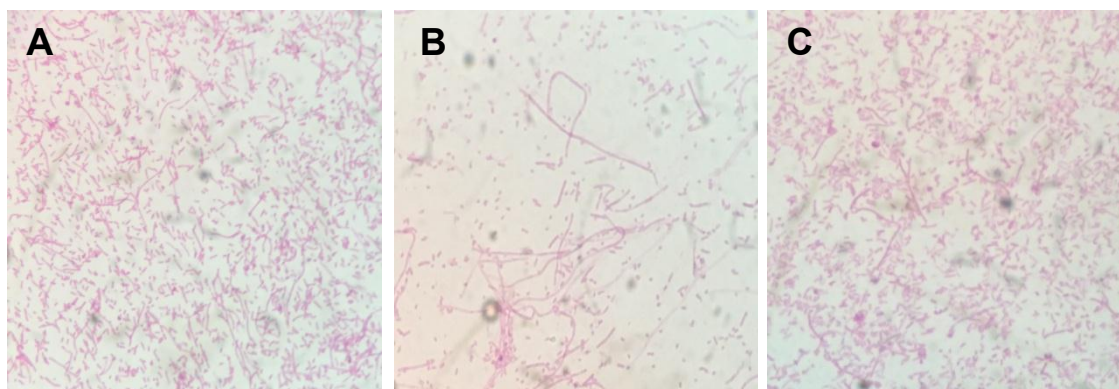


Figura 3 - Coloração de Gram das amostras (ATCC, P34 e P50) com sub-CIM de piperacilina/tazobactam



Legenda: A – Amostra ATCC + PTZ; B – Amostra P34 + PTZ; C – Amostra P50 + PTZ. PTZ - piperacilina/tazobactam.

Figura 4 - Coloração de Gram das amostras (ATCC, P34 e P50) com sub-CIM de metronidazol



Legenda: A – Amostra ATCC + MET; B – Amostra P34 + MET; C - Amostra P50 + MET. MET – metronidazol.

6.3.2 Detecção de cápsula

Não foi possível visualizar a presença de cápsula nas amostras de *B. fragilis* com a metodologia utilizada.

6.3.3 Resistência ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A comparação entre as variáveis tamanho do halo (variável dependente) com as variáveis independentes amostras de *B. fragilis* (referência e clínicas) e as concentrações de H₂O₂ utilizadas (1%, 5%, 10% e 20%), o programa estatístico gerou uma constante que representou o tamanho do halo de inibição (mm)

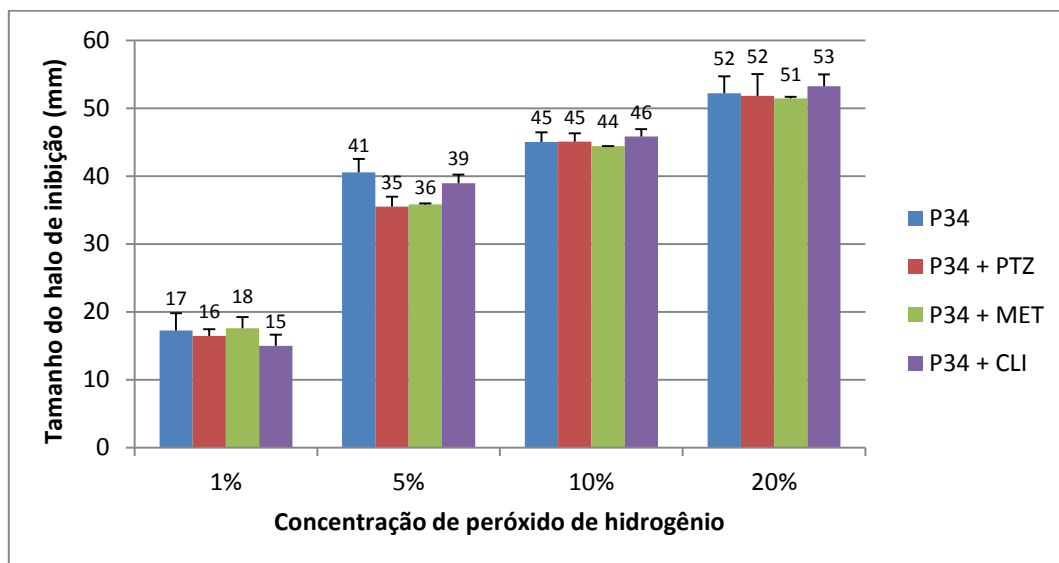
obtido pela amostra de referência, sem exposição a antimicrobianos, na presença da menor concentração de H_2O_2 (1%). Assim, nas quatro concentrações utilizadas, foi observada diferença estatisticamente significativa entre elas ($p < 0,01$) (ANEXO A).

Ao se comparar o tamanho do halo de inibição observado na amostra de referência sem exposição prévia a antimicrobianos, com os tamanhos dos halos das outras amostras, foi possível afirmar que a amostra P50 cultivada previamente em sub-CIM de piperacilina/tazobactam apresentou um halo de inibição maior do que o da amostra de referência ($p < 0,01$), sendo considerada a mais sensível dentre todas as amostras testadas. Já a amostra de referência submetida a sub-CIM de clindamicina e a P50 exposta a sub-CIM de metronidazol foram as que apresentaram um menor halo de inibição, quando comparadas com a referência, sendo consideradas as mais resistentes dentre todas as amostras testadas ($p < 0,01$) (ANEXO A).

As amostras clínicas P34 e P50 cultivadas previamente em sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina, quando comparadas a elas mesmas sem antimicrobiano, não passaram por tratamento estatístico devido ao pequeno número de amostras. Porém, é possível perceber variações no tamanho dos halos de inibição quando as amostras foram cultivadas previamente sem e com sub-CIM. A amostra P34, quando cultivada previamente com sub-CIM de clindamicina, apresentou aumento do tamanho do halo de inibição nas concentrações de 10% e 20% de H_2O_2 e diminuição do halo nas concentrações de 1% e 5%, em relação à mesma sem sub-CIM. Além disso, na concentração de 5% de H_2O_2 , P34 apresentou diminuição dos halos, quando cultivada previamente com sub-CIM dos três antimicrobianos, em relação à mesma sem sub-CIM (GRÁFICO 4).

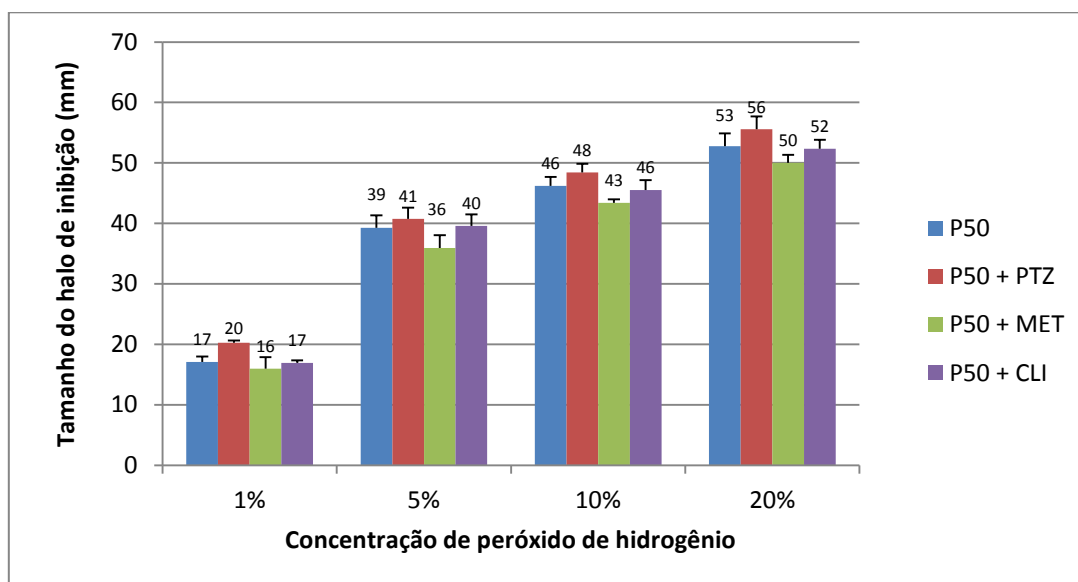
Quanto à amostra P50, em todas as concentrações de H_2O_2 , quando associada ao PTZ, apresentou aumento dos halos e, quando associada ao MET, apresentou diminuição no tamanho dos halos de inibição, em relação à mesma sem sub-CIM (GRÁFICO 5).

Gráfico 4 - Tamanho do halo de inibição da amostra clínica (P34) cultivada previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)



Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

Gráfico 5 - Tamanho do halo de inibição da amostra clínica (P50) cultivada previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)



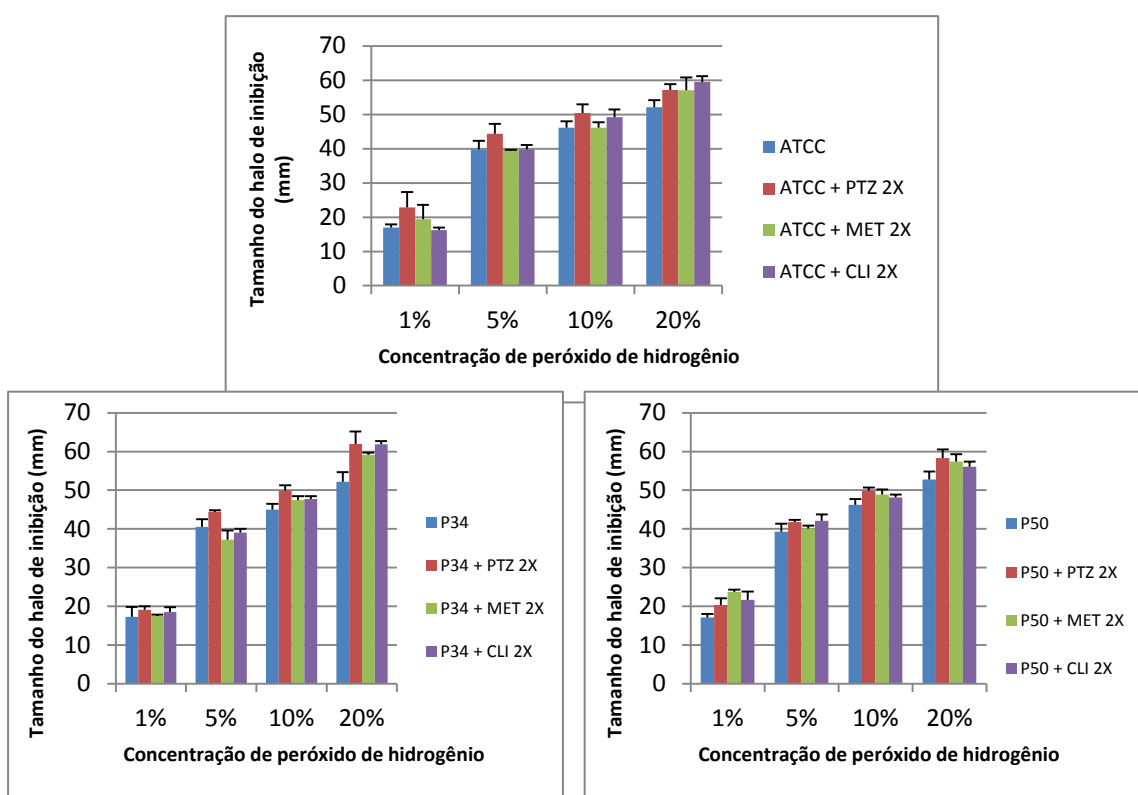
Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

Quando o teste foi realizado em meio de cultura também contendo sub-CIM dos três antimicrobianos (teste denominado de 2X) e as amostras cultivadas previamente na presença dos mesmos antimicrobianos, foi possível observar

variações no tamanho dos halos de inibição em todas as concentrações de H_2O_2 avaliadas, tanto para as amostras clínicas quanto para a de referência.

No entanto, apenas na concentração de 20% de H_2O_2 , foi possível observar aumento do tamanho dos halos de inibição das três amostras (de referência e das duas amostras clínicas) previamente cultivadas com os três antimicrobianos testados (GRÁFICO 6).

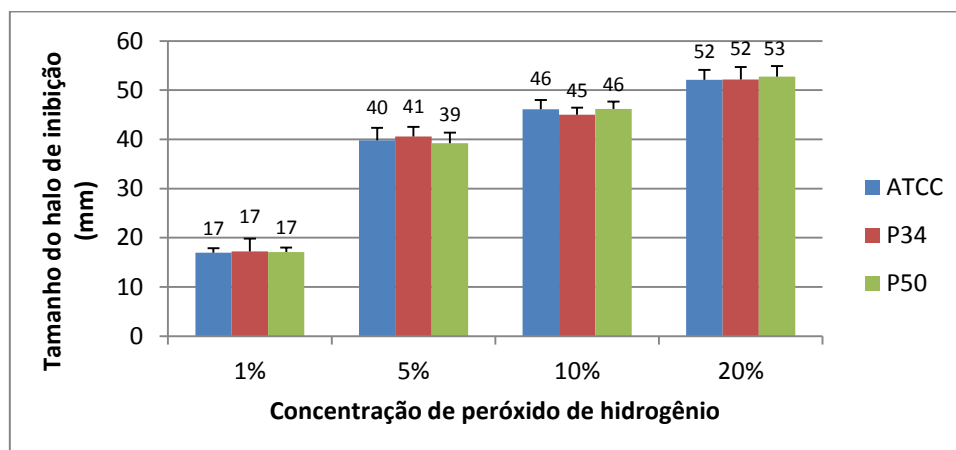
Gráfico 6 - Tamanho do halo de inibição das amostras (ATCC, P34 e P50) no teste realizado em meio contendo sub-CIM dos antimicrobianos (2X) nas diferentes concentrações de H_2O_2 (1%, 5%, 10% e 20%)



Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

As amostras clínicas P34 ($p=0,52$) e P50 ($p=0,90$), sem exposição à sub-CIM de antimicrobianos, não apresentaram diferença significativa no tamanho do halo de inibição nas concentrações de peróxido de hidrogênio testadas, quando comparadas com a amostra de referência sem sub-CIM (GRÁFICO 7).

Gráfico 7 - Tamanho do halo de inibição das amostras de referência e clínicas sem sub-CIM nas diferentes concentrações de H₂O₂ (1%, 5%, 10% e 20%)

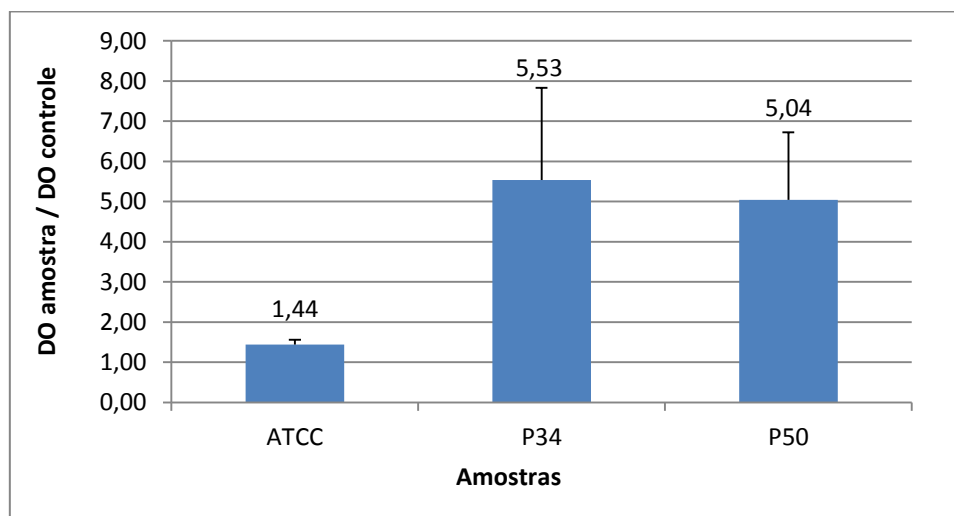


6.3.4 Formação de biofilme

Utilizando a análise de regressão linear e considerando a variável formação de biofilme como variável dependente (valor obtido a partir da divisão da DO da amostra pela DO do controle negativo) e comparando a variável independente amostra bacteriana, a constante obtida foi representada pela amostra *B. fragilis* ATCC 25285 sem exposição prévia a antimicrobianos e o valor médio da divisão da DO encontrado foi de 1,5. Quando se comparou a constante com os demais resultados obtidos, foi possível afirmar que as amostras P34, P34 + MET, P50, P50 + PTZ e P50 + CLI, tiveram um aumento nos valores de DO ($p < 0,05$), significando uma maior formação de biofilme por essas amostras (ANEXO B).

Além disso, é possível verificar que as amostras clínicas formaram mais biofilme que a amostra de referência. Enquanto a amostra de referência foi classificada como fracamente aderente ($DO_a = 1,44 \times DO_c$), as amostras P34 ($DO_a = 5,53 \times DO_c$) e P50 ($DO_a = 5,04 \times DO_c$) foram fortemente aderentes (GRÁFICO 8).

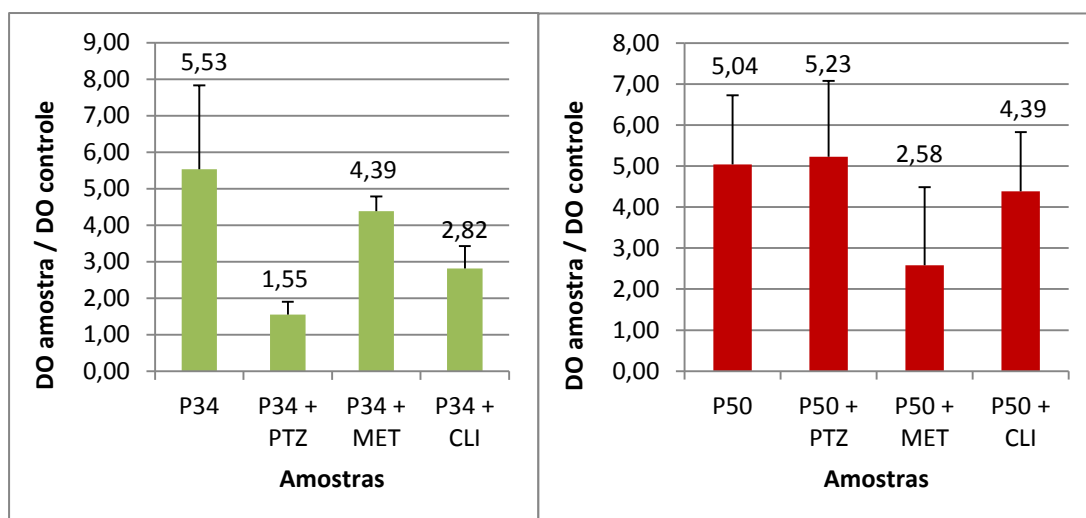
Gráfico 8 - Coeficiente da divisão da DO das amostras (ATCC, P34 e P50) sem sub-CIM pela DO do controle negativo



Legenda: DO – densidade óptica, PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

Já as amostras P34 + PTZ, P34 + CLI e P50 + MET apresentaram os menores coeficientes da divisão de sua DO pela DO do controle negativo, quando comparados com suas respectivas amostras na ausência de sub-CIM (GRÁFICO 9). Ou seja, houve menor formação de biofilme por essas amostras.

Gráfico 9 – Coeficiente da divisão da DO das amostras clínicas (P34 e P50) cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina pela DO do controle negativo



Legenda: DO – densidade óptica, PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

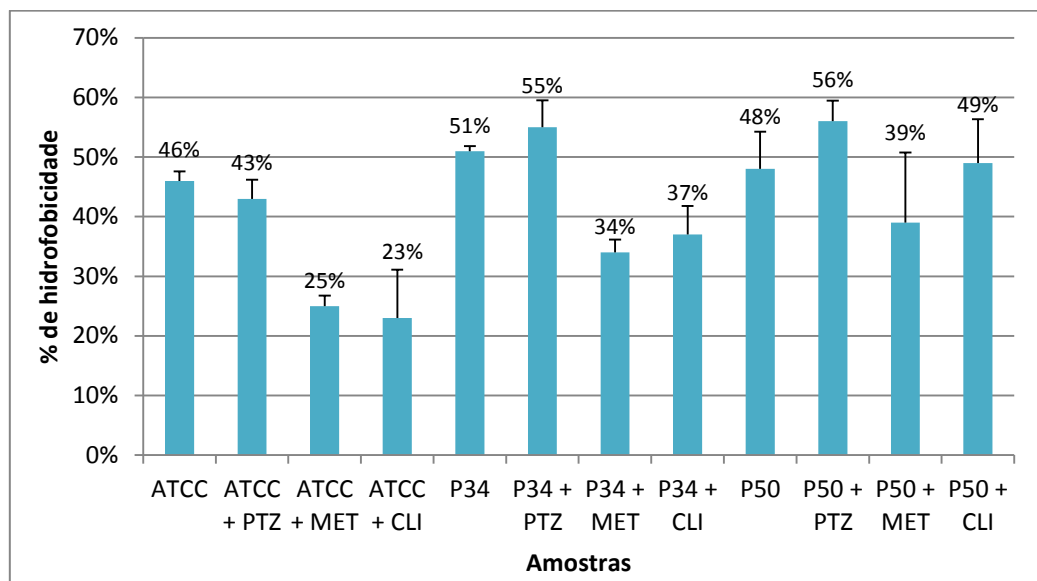
6.3.5 Hidrofobicidade da superfície celular

A comparação da variável dependente hidrofobicidade com as amostras bacterianas apresentou uma constante que representa o percentual médio de hidrofobicidade (46%) da amostra *B. fragilis* ATCC 25285 sem exposição prévia a antimicrobianos (ANEXO C). Quando se comparou esta constante aos demais resultados obtidos, foi possível afirmar que a amostra de referência cultivada previamente em sub-CIM de clindamicina ($p=0,01$) e de metronidazol ($p=0,03$) apresentou menor hidrofobicidade que a constante. Quanto às amostras clínicas, apenas a amostra P34 cultivada previamente em sub-CIM de metronidazol apresentou redução no percentual de hidrofobicidade ($p=0,05$). Já a amostra clínica P50 cultivada previamente em sub-CIM de piperacilina/tazobactam foi a que apresentou o maior acréscimo em sua hidrofobicidade (10,5% em relação à constante; $p=0,08$), porém não sendo estatisticamente significativa pelo valor de p considerado no presente trabalho ($p<0,05$), mas cujo resultado é importante ressaltar (GRÁFICO 10).

Quando se comparou as amostras ATCC, P34 e P50 sem sub-CIM, as amostras clínicas foram mais hidrofóbicas que a amostra de referência, sendo que a P34 foi classificada como moderadamente hidrofóbica (MATS = 51%), enquanto a ATCC e a P50 foram classificadas como fracamente hidrofóbicas (MATS = 46% e 48%, respectivamente) (GRÁFICO 10).

Quanto às amostras clínicas, a amostra P34 (51%) diminuiu o percentual de hidrofobicidade, quando cultivada previamente em sub-CIM de metronidazol e clindamicina (34% e 37%, respectivamente), com relação a ela mesma sem antimicrobiano. Já a amostra P50 (48%) também diminuiu o percentual de hidrofobicidade, quando cultivada previamente em sub-CIM de metronidazol (39%), com relação a ela mesma sem antimicrobiano. Porém, as duas amostras clínicas (P34 e P50) aumentaram a hidrofobicidade, quando cultivadas previamente em sub-CIM de piperacilina/tazobactam (55% e 56%, respectivamente), com relação a elas mesmas sem antimicrobiano (GRÁFICO 10). Vale-se mencionar que não foi possível aplicar tratamento estatístico na comparação das amostras clínicas selvagens com as mesmas desafiadas pelos antimicrobianos devido ao pequeno número de amostras testadas.

Gráfico 10 - Hidrofobicidade das amostras (ATCC, P34 e P50) cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina



Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

6.3.6 Viabilidade dos macrófagos

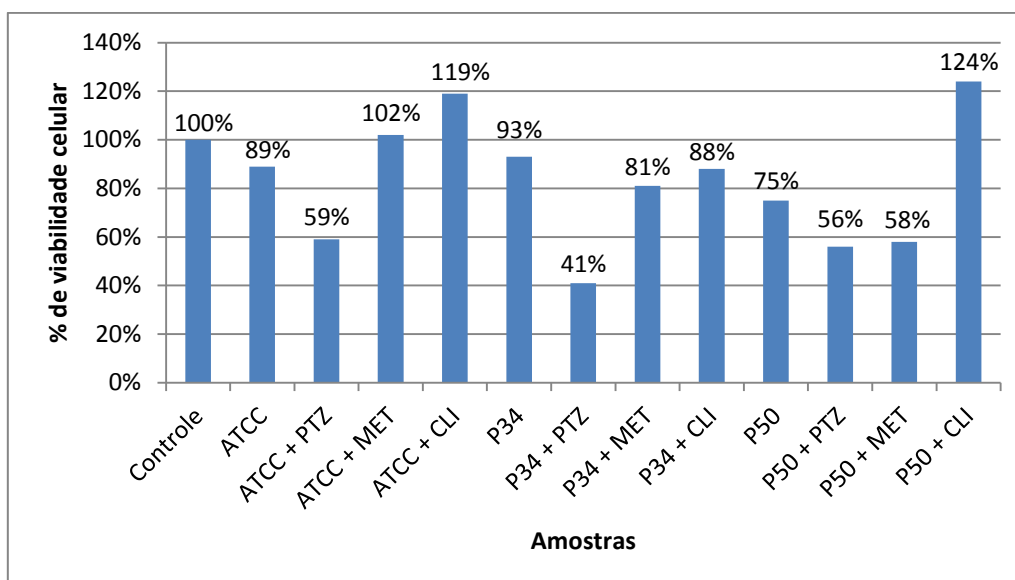
Não foi possível realizar a análise de regressão linear da variável viabilidade dos macrófagos devido ao número de repetições realizados (01) ter sido insuficiente. Apesar disto, foi possível perceber que as amostras de *B. fragilis* de referência (89%) e a clínica P34 (93%), sem sub-CIM, apresentaram variações pequenas nos valores de viabilidade celular, quando comparadas entre elas e em relação ao controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana (100%). Porém, a amostra clínica P50 (75%), sem sub-CIM, apresentou uma diminuição na viabilidade dos macrófagos, quando comparada com a amostra de referência e com o controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana (GRÁFICO 11).

Além disso, a amostra de referência e as duas clínicas, quando cultivadas previamente em sub-CIM de PTZ (ATCC + PTZ – 59%, P34 + PTZ – 41% e P50 + PTZ – 56%), diminuíram a viabilidade dos macrófagos, quando comparadas a elas mesmas sem antimicrobiano e ao controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana. E, quando cultivadas previamente em sub-CIM de MET, as duas amostras clínicas (P34 e P50) também diminuíram a

viabilidade dos macrófagos (81% e 58%, respectivamente), quando comparadas a elas mesmas sem antimicrobiano e ao controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana (GRÁFICO 11).

Por outro lado, as amostras ATCC + CLI (119%) e P50 + CLI (124%) apresentaram uma maior quantidade de macrófagos sobreviventes, em relação a elas mesmas sem sub-CIM e ao controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana (GRÁFICO 11).

Gráfico 11 - Viabilidade dos macrófagos na presença das amostras de *B. fragilis* (ATCC, P34 e P50) cultivadas previamente sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos avaliados.



Legenda: PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

6.3.7 Hemaglutinação

Nenhuma amostra apresentou hemaglutinação nos seguintes tipos sanguíneos testados: humano (A+, B+, AB+ e O+), de carneiro e de cavalo.

6.3.8 Atividade hemolítica

Nesse teste, foram avaliados os seguintes tipos sanguíneos: humano (A+, B+, AB+ e O+), de carneiro e de cavalo. Todas as amostras apresentaram hemólise em todos os tipos sanguíneos testados após seis dias de incubação em anaerobiose a 37°C, exceto a amostra P34 cultivada previamente na

ausência e presença de sub-CIM de PTZ, MET ou CLI, em relação apenas ao sangue de carneiro (FIGURA 5).

Figura 5 – Foto demonstrativa do teste de atividade hemolítica em sangue de carneiro das amostras ATCC, P34 e P50 cultivadas previamente sem e com sub-CIM de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina

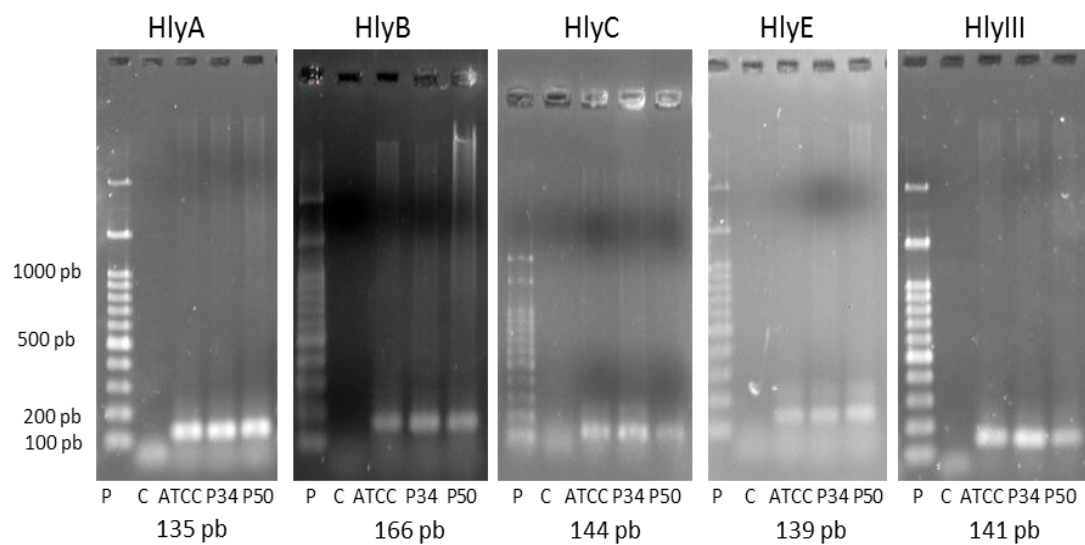


Legenda: Ordem das amostras da esquerda para a direita, de cima para baixo - ATCC, P34, P50, ATCC + PTZ, P34 + PTZ, P50 + PTZ, ATCC + MET, P34 + MET, P50 + MET, ATCC + CLI, P34 + CLI e P50 + CLI. PTZ - piperacilina/tazobactam, MET - metronidazol e CLI – clindamicina.

6.4 Avaliação da presença de genes codificadores de hemolisinas por PCR convencional

Todas as amostras foram positivas para os cinco genes testados (FIGURA 6).

Figura 6 – Visualização do produto da PCR das amostras de referência e clínicas para os genes de hemolisinas A, B, C, E e III



Legenda: P – padrão; C – controle negativo; Pb – pares de base.

7 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, foram utilizadas duas amostras clínicas de *Bacteroides fragilis*: uma proveniente de um paciente sob internação hospitalar (P34) e uma recuperada de um paciente externo (P50). Além da amostra de referência de *B. fragilis* ATCC 25285, utilizada como controle das reações. Essas amostras foram cultivadas em meios de cultura sem ou com concentrações sub-inibitórias de piperacilina/tazobactam, metronidazol ou clindamicina, totalizando 12 amostras avaliadas.

As espécies do gênero *Bacteroides* estão presentes em abundância na microbiota intestinal, porém, a espécie *B. fragilis* representa a minoria. Apesar disso, ele é o principal anaeróbio causador de infecções intra-abdominais, devido aos seus diversos fatores de patogenicidade, como a presença da cápsula polissacarídica, a adesão aos tecidos, a produção de proteases, lipopolissacarídeos da membrana externa da parede celular e formação de biofilme, além da resistência aos principais agentes antimicrobianos utilizados no tratamento (Boente et al., 2016; Alves et al., 2017).

Um aspecto biológico importante das bactérias, relacionado à sua permanência nos tecidos do hospedeiro, é o crescente surgimento de resistência aos antimicrobianos. De modo geral, os mecanismos de resistência adquirida resultam de alterações na fisiologia celular ou da estrutura microbiana, devido a alterações no padrão genético normal ou na regulação da expressão gênica (Freitas et al., 2015). Além disso, os antimicrobianos atuam na seleção de microrganismos resistentes, sendo que o desenvolvimento e a propagação da resistência tornou-se um problema mundial de saúde pública. Em todos os casos, estas bactérias podem apresentar uma suscetibilidade diminuída, até mesmo a substâncias similares que compartilham os mesmos mecanismos de resistência (Dos Santos et al., 2007; Souza Filho et al., 2012).

De acordo com estudos sobre resistência a antimicrobianos realizados com *B. fragilis*, as taxas de resistência à clindamicina de vários países são relatadas entre 24% e 56% (Karlowsky et al., 2012; Marchand-Austin et al., 2014; Jamal et al., 2015; Kangaba et al., 2015). Por outro lado, existem poucos relatos de

resistência a piperacilina/tazobactam e metronidazol (Székely et al., 2015; Yim et al., 2015). No presente estudo, a amostra clínica P34 foi sensível aos três antimicrobianos testados, e a amostra P50 apresentou resistência apenas à clindamicina (CIM = 1.024 µg/mL).

A capacidade do antimicrobiano de alcançar a concentração inibitória mínima no sítio de infecção do paciente depende de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Há várias situações durante o processo infeccioso em que o microrganismo é submetido às concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos durante períodos de tempo variáveis, podendo não ser capazes de eliminar o microrganismo, porém, pode interferir na expressão de alguns fatores de patogenicidade, prejudicar o tratamento da doença e resultar na seleção de bactérias resistentes. Essas alterações na patogenicidade de *B. fragilis*, na presença de sub-CIM, demonstram seu potencial patogênico, sendo capaz de provocar diferentes interações entre o hospedeiro e a bactéria (Souza Filho et al., 2012; Veloso et al., 2013).

Freitas e colaboradores (2015) afirmam que sub-CIM de ampicilina, ampicilina/sulbactam, cloranfenicol e clindamicina são capazes de diminuir a sensibilidade de *B. fragilis* a esses antimicrobianos. As bactérias expressaram diferentes mecanismos de resistência, resultando em alteração do seu metabolismo, alteração em alvos celulares dos antimicrobianos, ativação de bombas de efluxo e produção de enzimas que interferem na estrutura do antimicrobiano (Souza Filho et al., 2012; Freitas et al., 2015).

Em nosso estudo, não foi possível observar nenhuma alteração na CIM quando as amostras de *B. fragilis* (ATCC, P34 e P50) foram previamente cultivadas em meio com sub-CIM de PTZ, MET ou CLI, pois estudos demonstram que a seleção de bactérias resistentes pode ser obtida, *in vitro*, por meio de gradiente de concentração do antimicrobiano, sendo repetido até a CIM ultrapassar o ponto de corte do antimicrobiano, ou por várias passagens (em torno de 10) em meio de cultura contendo concentração sub-inibitória (Dos Santos et al., 2010; Freitas et al., 2015). Portanto, com base nestes autores, nossos achados não excluem a possibilidade de seleção de bactérias resistentes nos pacientes que,

por algum motivo, tenham sido submetidos (durante o tratamento) a concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos testados em nosso estudo.

A literatura relata aumento no tempo de crescimento de bactérias submetidas à sub-CIM de alguns antimicrobianos e a diferentes estresses. Veloso e colaboradores (2013) observaram um atraso de 15 horas para o início da fase log de crescimento de *B. fragilis* cultivado em sub-CIM de PTZ, fato que não foi corroborado em nosso estudo. Além disso, outro estudo observou que *E. coli*, quando cultivada em sub-CIM de PTZ, atinge o pico de células filamentosas com 16 horas de crescimento, apresentando 82% das células alteradas em morfologia e complexidade (De Andrade et al., 2016).

Quanto à nossa curva de crescimento, foram observados atrasos para o início da fase log de crescimento tanto da amostra de referência quanto das clínicas (P34 e P50) quando foram cultivadas em meio com sub-CIM de metronidazol e de clindamicina, e houve diminuição da densidade óptica quando estas foram cultivadas em sub-CIM dos três antimicrobianos. Alguns autores acreditam na hipótese de que isto seja devido à diminuição de enzimas relacionadas ao metabolismo energético da bactéria (Veloso et al., 2013; De Andrade et al., 2016).

A formação de células filamentosas encontradas nas amostras cultivadas em meio com sub-CIM de PTZ pode estar relacionada com o fato de este antimicrobiano interferir na síntese da parede celular bacteriana, ligando-se à proteína de ligação da penicilina 3 (PBP-3), que é responsável pela septação celular durante a divisão. Desse modo, as amostras continuam o processo de divisão quando em contato com a sub-CIM, mas a septação não ocorre (De Andrade et al., 2016). Por outro lado, em relação à sub-CIM de MET, as alterações na morfologia bacteriana parecem estar relacionadas à inibição de enzimas autolíticas que iniciam a septação (Diniz et al., 2000; Freitas et al., 2015).

No entanto, quando as amostras no estado filamentosas foram cultivadas em meio sem sub-CIM, as células retornaram à sua forma típica, indicando que a mudança morfológica foi um estado transitório. Por isso, é possível que as

células filamentosas representem as subpopulações mais sensíveis que foram inibidas pelo antimicrobiano. Porém, as consequências dessas alterações morfológicas como fatores de patogenicidade e para o diagnóstico clínico não são bem estabelecidas (Freitas et al., 2015; De Andrade et al., 2016).

A cápsula polissacarídica de *B. fragilis* é um dos mais importantes fatores de patogenicidade dessa bactéria, sendo responsável pelo seu sucesso na formação de abscesso, além de atuar na proteção contra o sistema imune do hospedeiro e na adesão às células e mucosas (Nakano et al., 2008; Reis et al., 2014; Sears et al., 2014). Em nosso estudo, não foi possível visualizar a presença de cápsula nas amostras com a metodologia utilizada, porém, não significa que estas amostras não apresentam cápsula. Devido a isso, foi utilizada a coloração da tinta da China com fuccina diluída (Molinaro et al., 2009), porém, também não foi possível visualizá-las.

Dentro dos primeiros 30 minutos de exposição ao oxigênio (O_2) ou ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), *B. fragilis* induz a expressão de pelo menos 28 proteínas como parte de uma resposta complexa ao estresse oxidativo, e a magnitude desta resposta parece estar relacionada com o nível de concentração do agente estressor. Essas proteínas incluem enzimas que desintoxicam espécies reativas de oxigênio, protegem o DNA e fornecem energia para a síntese de novas proteínas. Alguns dos primeiros genes induzidos durante a exposição ao O_2 ou ao H_2O_2 são membros do gene regulador OxyR, proporcionando uma reação protetora imediata ao estresse (Rocha et al., 2003; Sund et al., 2008).

No teste de resistência ao estresse oxidativo, pela exposição ao H_2O_2 , no nosso estudo, apesar de não ter sido possível aplicar tratamento estatístico na comparação das amostras clínicas de *B. fragilis* sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, devido ao pequeno número de amostras, foi possível verificar que as amostras (ATCC + PTZ, ATCC + MET, P34 + CLI e P50 + PTZ) cultivadas previamente em meio com sub-CIM, apresentaram maior sensibilidade a essa substância, em relação a elas mesmas sem sub-CIM, principalmente na concentração de 20%. Esta maior sensibilidade foi observada em todas as amostras, quando o meio de cultura da placa teste

também continha sub-CIM dos antimicrobianos (2X), concordando com os resultados de Fonseca e colaboradores (2004).

O aumento dos halos de inibição devido à presença de concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos no meio de cultura, acredita-se ser por causa de uma diminuição da produção de enzimas como as peroxidases e a catalase, que são responsáveis por proteger a bactéria dos danos causados pelo peróxido de hidrogênio, além de também ser devido a uma maior suscetibilidade das amostras à ação do antimicrobiano. A diminuição dessas enzimas pode explicar a menor capacidade da bactéria de sobreviver e multiplicar-se perante o estresse oxidativo (Fonseca et al., 2004; De Andrade et al., 2016).

Somente as amostras ATCC + CLI e P50 + MET foram significativamente ($p < 0,01$) resistentes ao H_2O_2 , ou seja, apresentaram diminuição dos halos, porém os motivos não foram elucidados, devido à escassez de estudos relacionando sub-CIM com estresse oxidativo. Além disso, como a sub-CIM de clindamicina e de metronidazol não diminuíram o halos das outras amostras testadas, não é possível afirmar que estes antimicrobianos aumentam a resistência ao estresse oxidativo.

De acordo com a literatura, os antimicrobianos podem interferir na adesão bacteriana tanto às células epiteliais como às intestinais, assim como na expressão de outros fatores de patogenicidade em várias espécies bacterianas (Freitas et al., 2015). Alguns antimicrobianos podem diminuir significativamente o processo de adesão bacteriana a determinados tipos de superfícies, o que pode ser explicado por uma alteração na hidrofobicidade da superfície celular; na inibição da motilidade; ou na possível diminuição das adesinas na superfície celular bacteriana decorrente da indução de células filamentosas (Fonseca et al., 2004).

Juntamente com a adesão, a hidrofobicidade e a motilidade, a formação de biofilmes está relacionada com a patogenicidade bacteriana. As concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos, além de interferirem nestes processos, podem afetar outros fatores necessários para a formação de biofilmes, como o

sistema *quorum sensing*, que é fundamental para a comunicação entre as células e é essencial para a formação adequada e a manutenção do biofilme (Okamoto et al, 2002; Fonseca et al., 2004; De Andrade et al., 2016).

Apesar de alguns estudos demonstrarem que sub-CIM de piperacilina/tazobactam e metronidazol diminuem a formação de biofilmes e que clindamicina pode aumentar, nossos resultados não foram capazes de demonstrar esses efeitos, provavelmente devido ao baixo número de amostras testadas (Okamoto et al., 2002; Souza Filho et al., 2012; De Andrade et al., 2016).

As três amostras cultivadas previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos mostraram um caráter hidrofílico. Isto pode ser devido à presença de cápsula em *B. fragilis*, que são geralmente hidrófilas e podem contribuir para a baixa hidrofobicidade das amostras (Reis et al., 2014). Embora não tenha sido possível aplicar tratamento estatístico na comparação da hidrofobicidade das amostras clínicas de *B. fragilis* sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, devido ao pequeno número de amostras, em nosso estudo foi possível observar que sub-CIM de metronidazol diminuiu a hidrofobicidade das três amostras, e de clindamicina diminuiu a hidrofobicidade da amostra de referência e da amostra clínica P34, em relação a essas amostras sem sub-CIM. Esta diminuição da hidrofobicidade pode ocorrer por alguma alteração nas estruturas da superfície bacteriana, principalmente perda das fímbrias e adesinas (Fonseca et al., 2004). Porém, não há estudos que relacionem a hidrofobicidade com sub-CIM de metronidazol ou clindamicina, portanto, não podemos esclarecer essa menor hidrofobicidade.

Apesar do nosso estudo ter encontrado um aumento de 10,5% na hidrofobicidade da amostra P50 cultivada previamente em sub-CIM de piperacilina/tazobactam em relação à amostra de referência sem sub-CIM, e um aumento da hidrofobicidade das duas amostras clínicas, em relação a elas mesmas sem sub-CIM, Andrade e colaboradores (2016) observaram uma diminuição significativa na hidrofobicidade de *E. coli* com sub-CIM de PTZ. Fonseca e colaboradores (2004) também observaram uma diminuição na hidrofobicidade de *P. aeruginosa* com sub-CIM de PTZ, atribuindo este fato às

mudanças na estrutura da superfície bacteriana, em particular as fímbrias, que contribuem para a hidrofobicidade de *P. aeruginosa*. Portanto, não há relatos que expliquem o aumento da hidrofobicidade por PTZ.

Devido ao fato das nossas amostras serem classificadas como fracamente a moderadamente hidrofóbicas, é possível que a hidrofobicidade não exerça influência significativa na adesão aos tecidos e, conseqüentemente, na formação de biofilmes por *B. fragilis*. Okamoto e colaboradores (2002) observaram que a hidrofobicidade em *Fusobacterium nucleatum* não foi associada à adesão nas células bucais do hospedeiro, e sugerem que o mecanismo de adesão bacteriana em *F. nucleatum* tenha sido influenciado pela presença de adesinas localizadas na parede celular ou na membrana externa.

No presente estudo, apesar de não ter sido possível aplicar tratamento estatístico no teste de viabilidade dos macrófagos devido ao número insuficiente de repetições (01), foi possível observar que a amostra P50 sem antimicrobiano apresentou um efeito citotóxico nos macrófagos em relação à amostra de referência e ao controle de macrófagos. E as amostras ATCC + PTZ, P34 + PTZ, P34 + MET, P50 + PTZ e P50 + MET também diminuíram a viabilidade dos macrófagos em relação a elas mesmas sem sub-CIM e ao controle.

Porém, a amostra de referência e a amostra clínica P50, cultivadas previamente na presença de sub-CIM de clindamicina possibilitaram uma maior sobrevivência dos macrófagos, em relação a elas mesmas sem sub-CIM e ao controle. Um ensaio de MTT indicou que a quantidade de macrófagos de células de mamíferos foi significativamente aumentada quando testados com *Tannerella forsythia*, que pode ser internalizada por macrófagos e estimular receptores intracelulares. Embora o mecanismo exato que levou a este aumento não esteja claro, acredita-se que ele pode ser importante para proporcionar uma viabilidade duradoura das células hospedeiras, o que é crítico para uma resposta imune eficaz e a depuração bacteriana apropriada, segundo Sekot e colaboradores (2011). Por outro lado, a amostra de referência e as amostras clínicas cultivadas previamente em sub-CIM de piperacilina/tazobactam diminuíram a viabilidade dos macrófagos, quando

comparadas com elas mesmas sem antimicrobiano e em relação ao controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana, demonstrando um efeito citotóxico dessas amostras. No entanto, são necessários testes complementares para se explicar esse mecanismo.

Enquanto um estudo observou atividade de hemaglutinação em 84% das amostras clínicas de *B. fragilis*, outros observaram esta capacidade em pouca ou nenhuma amostra, nos diferentes tipos sanguíneos, como o humano, de cavalo, de carneiro, de coelho, de cachorro, entre outros (Nakano & Avila-Campos, 2004; Reis et al, 2014). Em nosso estudo, não foi observada hemaglutinação em nenhuma amostra cultivada previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos avaliados, em todos os tipos sanguíneos testados. Nakano e Avila-Campos (2004) sugerem que as adesinas ou proteínas da membrana externa da bactéria podem ser responsáveis pela hemaglutinação.

A atividade hemolítica das bactérias contribui para a aquisição de heme (fonte de ferro) a partir das hemácias. Porém, a natureza precisa e as ações de cada gene de hemolisina ainda necessitam ser totalmente determinadas (Suzuki et al., 2012). Robertson e colaboradores (2006) verificaram que a hemolisina *hlyA* de *B. fragilis* produziu alfa hemólise; e beta hemólise quando produzida em conjunto com *hlyB*. Eles também sugeriram que *hlyA* e *hlyB* de *B. fragilis* se combinam para formar uma hemolisina de dois componentes, aumentando, assim, suas atividades hemolíticas individuais contra as hemácias. Porém, Suzuki e colaboradores (2012) sugerem que a hemolisina codificada pelo gene *hlyA* de *Prevotella intermedia* pode atuar de maneira diferente da codificada pelo gene *hlyA* de *B. fragilis*.

Em nosso estudo, todas as amostras cultivadas previamente em meio sem ou com sub-CIM dos três antimicrobianos, apresentaram hemólise em todos os tipos sanguíneos testados após seis dias de incubação, exceto a amostra clínica P34, cultivada previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, que não apresentou hemólise quando testada com sangue de carneiro. Um estudo realizado por Robertson e colaboradores (2006) observou que três amostras de *B. fragilis*, incluindo a amostra de referência ATCC

25285, apresentaram hemólise em sangue humano, de carneiro e de cavalo. No entanto, uma amostra apresentou hemólise em sangue de cavalo, mas não em sangue humano e de carneiro. Essas diferenças sugerem que a atividade hemolítica produzida por *B. fragilis* pode ser influenciada pela diversidade das amostras, a origem das hemácias e as condições de crescimento. Além disso, o longo período de incubação para que se possa visualizar a hemólise das amostras (6 dias) sugere que a aparente falta de fenótipo hemolítico em amostras clínicas de *B. fragilis* pode ser consequência do curto período de incubação (48h) que geralmente é utilizado para o diagnóstico laboratorial (Lobo et al., 2013). Este fato foi observado por Reis e colaboradores (2014), pois o teste de hemólise em sangue de cavalo foi negativo para as treze amostras de *B. fragilis* utilizadas no estudo.

Quanto à nossa avaliação da presença de genes codificadores de hemolisinas, a amostra de referência e as duas amostras clínicas apresentaram os cinco genes testados (A, B, C, E e III). Portanto, a ausência de hemólise em sangue de carneiro da amostra P34 não pode ser correlacionada com estes cinco genes. Porém, não há estudos que explicam a presença ou ausência de hemólise nos diferentes tipos sanguíneos. O papel completo das hemolisinas em *B. fragilis* ainda precisa ser esclarecido.

8 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

- Não houve aumento da CIM das amostras cultivadas previamente em meio com sub-CIM dos três antimicrobianos avaliados (PTZ, CLI, MET).
- A sub-CIM de metronidazol e clindamicina causaram atrasos significativos no tempo de início da fase log de crescimento das amostras de referência e as clínicas (P34 e P50). E a sub-CIM dos três antimicrobianos diminuíram a densidade óptica das três amostras.
- O Gram das colônias das três amostras, provenientes dos meios com sub-CIM de piperacilina/tazobactam e metronidazol, mostrou células com aspecto filamentosas.
- No geral, a sub-CIM dos três antimicrobianos testados em nosso estudo diminuiu a resistência das amostras ao peróxido de hidrogênio.
- Nossos resultados de formação de biofilme não foram capazes de demonstrar um padrão de aumento ou diminuição quando as amostras foram cultivadas previamente na presença de sub-CIM dos três antimicrobianos.
- A Sub-CIM de metronidazol diminuiu a hidrofobicidade das três amostras e a de clindamicina diminuiu a hidrofobicidade de duas amostras testadas (P34 e a de referência). Enquanto sub-CIM de piperacilina/tazobactam aumentou a hidrofobicidade das duas amostras clínicas (P34 e P50).
- A sub-CIM de clindamicina possibilitou uma maior sobrevivência dos macrófagos cultivados com suspensão bacteriana da amostra de referência e da amostra clínica P50. Por outro lado, sub-CIM de piperacilina/tazobactam diminuiu a viabilidade dos macrófagos cultivados com suspensão bacteriana das três amostras, e sub-CIM de metronidazol diminuiu a viabilidade dos macrófagos cultivados com suspensão bacteriana das duas amostras clínicas, quando comparadas com elas mesmas sem antimicrobiano e em relação ao controle de macrófagos sem a suspensão bacteriana.
- Nenhuma amostra, cultivada previamente sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, apresentou hemaglutinação nos diferentes tipos sanguíneos testados (de humano, de carneiro e de cavalo).

- Todas as amostras, cultivadas previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, apresentaram hemólise em todos os tipos sanguíneos testados, exceto a amostra clínica P34, cultivada previamente em meio sem e com sub-CIM dos três antimicrobianos, quando testada com sangue de carneiro.
- As amostras de *B. fragilis* de referência e as clínicas foram positivas para os cinco genes testados.

Algumas alterações encontradas nas amostras de *B. fragilis* devido à presença de sub-CIM dos antimicrobianos testados em nosso estudo, podem refletir o potencial patogênico desses microrganismos, levando a diferentes interações entre a bactéria e o hospedeiro. Além disso, as alterações fisiológicas podem afetar o diagnóstico e o tratamento das infecções por *B. fragilis*. Portanto, nossos dados advertem para os riscos de um tratamento inadequado, não apenas relacionado à seleção de resistência aos antimicrobianos, mas também relacionadas às implicações para a microbiologia clínica e a evolução das doenças infecciosas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHI, M. T.; GHOTASLOU, R.; ALIZADEH, N.; YEKANI, M.; BEHESHTIROUY, S.; ASGHARZADEH, M.; PIRZADEH, T.; MEMAR, M. Y. A gene-independent metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* in surgical site infections. **GMS Hyg Infect Control**, v. 12, Aug 17 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3205/dgkh000298> >.

ALVES, J; PERES, S; GONÇALVES, E; MANSINHO, K. Anaerobic Bacteria with Clinical Relevance: Morphologic and Taxonomic Classification, Distribution among Human Microbiota and Microbiologic Diagnosis. **Acta Med Port**, v. 30, n. 5, p. 409-417, May 31 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.20344/amp.8098> >.

AVILA-CAMPOS, M. J. et al. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **J Periodontol**, v. 70, n. 10, p. 1202-1208, Oct 1999. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1999.70.10.1202> >.

BOENTE, R. F. et al. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 190-194, Jun 2010. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.02.003> >.

BOENTE, R. F. et al. Differential proteomic analysis of outer membrane enriched extracts of *Bacteroides fragilis* grown under bile salts stress. **Anaerobe**, v. 39, p. 84-90, Jun 2016. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.03.003> >.

BOYANOVA, L.; KOLAROV, R.; MITOV, I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. **Anaerobe**, v. 31, p. 4-10, Feb 2015. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.004> >.

BROOK, I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. **J Infect Chemother**, v. 22, n. 1, p. 1-13, Jan 2016. ISSN 1341-321x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2015.10.010> >.

BURGER, M. F.; SONG, E. Y.; SCHUMM, J. W. Buccal DNA samples for DNA typing: new collection and processing methods. **Biotechniques**, v. 39, n. 2, p. 257-61, Aug 2005. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHANDAD, F.; MOUTON, C. Antigenic, structural, and functional relationships between fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun**, v. 63, n. 12, p. 4755-4763, Dec 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CIALDELLA, J. I.; VAVRA, J. J.; MARSHALL, V. P. Susceptibility of bacteria to serum lysis or phagocytosis following growth in subinhibitory levels of

lincosaminide or spectinomycin related antibiotics. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 39, n. 7, p. 978-84, Jul 1986. ISSN 0021-8820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed., M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, 2017.

DA SILVA, V. L. et al. Physiological alterations of a *Fusobacterium nucleatum* strain exposed to oxidative stress. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 1, p. 20-26, Jul 2007. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03236.x> >.

DE ANDRADE, J. P.; FARIAS, L. M.; FERREIRA, J. F.; ROMERO, O. B.; DE SOUZA, D. G.; CARVALHO, M. A.; DOS SANTOS, K. V. Sub-Inhibitory Concentration of Piperacillin-Tazobactam May be Related to Virulence Properties of Filamentous *Escherichia coli*. **Curr Microbiol**, v. 72, n. 1, p. 19-28, Jan 2016. ISSN 0343-8651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-015-0912-9> >.

DENG, H. et al. A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. **Sci Rep**, 6 July 2016. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/srep29401> >.

DINIZ, C. G.; ARANTES, R. M.; CARA, D. C.; LIMA, F. L.; NICOLI, J. R.; CARVALHO, M.A.; FARIAS, L. M. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes Infect**, v. 5, n. 1, p. 19-26, Jan 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DINIZ, C. G.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M.A. Effect of Metronidazole on the Pathogenicity of Resistant *Bacteroides* Strains in Gnotobiotic Mice. In: (Ed.). **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p.2419-2423, 2000. ISBN 0066-4804. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DONELLI, G.; VUOTTO, C.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 65, n. 2, p. 318-25, Jul 2012. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x> >.

DOS SANTOS, K. V.; DINIZ, C. G.; COUTINHO, S. C.; APOLÔNIO, A. C.; DE SOUSA-GAIA, L. G.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M. DE CARVALHO, M. A. In vitro activity of piperacillin/tazobactam and ertapenem against *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* in pure and mixed cultures. **J Med Microbiol**, v. 56, p. 798-802, Jun 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47112-0> >.

DOS SANTOS, K. V. et al. In Vitro Selection of ertapenem and piperacillin/tazobactam - Resistant Strains of *Bacteroides fragilis* and Analysis of their Virulence in Gnotobiotic mice. **J Chemother**, v. 22, n. 4, p. 259-263, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2010.22.4.259> >.

DOS SANTOS, S. G. et al. Antimicrobial susceptibility of microorganisms recovered from intraabdominal infections at Belo Horizonte, Brazil. **Am J Infect Control**, v. 32, n. 7, p. 414-6, Nov 2004. ISSN 0196-6553 (Print)0196-6553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/s019665530400447x> >.

DOS SANTOS, S. G. et al. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection in gnotobiotic mice. **J Med Microbiol**, v. 56, n. 3, p. 289-297, Mar 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46748-0> >.

DOS SANTOS, S. G. et al. Differentially regulated proteins in *Prevotella intermedia* after oxidative stress analyzed by 2D electrophoresis and mass spectrometry. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 76-82, Feb 2012. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.008> >.

EUZÉBY, J. P. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/> >. Acesso em: 19/01/2018.

FANG, H.; EDLUND, C.; HEDBERG, M.; NORD, C. E. New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group. **Int J Antimicrob Agents**, v. 19, n. 5, p. 361-70, May 2002. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FELIPE, K. B.; KVIECINSKI, M. R.; PEDROSA, R. C. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT. 2011. Disponível em: < <http://ppgbqa.ufsc.br/files/2011/06/protocolo-MTT.docx> >.

FERREIRA, J. F. G. et al. Microbiota Evaluation and Extracellular Cytokine Profile in Patients Affected with Intra-abdominal Infection. **Br J Med Med Res**, v. 15, n. 4, p. 1-14, 2016. Disponível em: < <http://sciencedomain.org/download/MTQzMDIAQHBm> >.

FONSECA, A. P.; EXTREMINA, C.; FONSECA, A. F.; SOUSA, J. C. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol**, v. 53, n. 9, p. 903-910, Sep 2004. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45637-0> >.

FOX, C. H. et al. Formaldehyde fixation. **J Histochem Cytochem**, v. 33, n. 8, p. 845-853, Aug 1985. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FREITAS, M. C.; SILVA, V. L.; GAMEIRO, J.; FERREIRA-MACHADO, A. B.; COELHO, C. M.; CARA, D. C.; DINIZ, C. G. *Bacteroides fragilis* response to subinhibitory concentrations of antimicrobials includes different morphological, physiological and virulence patterns after in vitro selection. **Microb Pathog**, v. 78, p. 103-113, Jan 2015. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.12.002> >.

GAJDÁCS, M; SPENGLER, G; URBÁN, E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical

Microbiology? **Antibiotics (Basel)**, v. 6, n. 4, Nov 7 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics6040025> >.

GARCIA-SANCHEZ, J. E.; GARCIA, M. I.; GARCIA-GARROTE, F.; SANCHEZ-ROMERO, I. [Microbiological diagnosis of intra-abdominal infections]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 31, n. 4, p. 230-9, Apr 2013. ISSN 0213-005x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.023> >.

GERBER, M.; WALCH, C.; LÖFFLER, B.; TISCHENDORF, K.; REISCHL, U.; ACKERMANN, G. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 6, p. 776-783, Jun 2008. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47739-0> >.

GEVA-ZATORSKY, N. et al. In vivo imaging and tracking of host-microbiota interactions via metabolic labeling of gut anaerobic bacteria. **Nat Med**, v. 21, n. 9, p. 1091-1100, Sep 2015. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3929> >.

HAAPASALO, M.; KEROSUO, E.; LOUNATMAA, K. Hydrophobicities of human polymorphonuclear leukocytes and oral *Bacteroides* and *Porphyromonas* spp., *Wolinella recta* and *Eubacterium yurii* with special reference to bacterial surface structures. **Scand J Dent Res**, v. 98, n. 6, p. 472-481, Dec 1990. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

IPCI, K.; ALTINTOPRAK, N.; MULUK, N. B.; SENTURK, M.; CINGI, C. The possible mechanisms of the human microbiome in allergic diseases. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 274, n. 2, p. 617–626, Feb 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-016-4058-6> >.

IRISAWA, T. et al. *Bacteroides caecicola* sp. nov. and *Bacteroides gallinaceum* sp. nov., isolated from the caecum of an Indonesian chicken. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 3, p. 1431-1437, Mar 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JAMAL, W.; AL HASHEM, G.; ROTIMI, V. O. Antimicrobial resistance among anaerobes isolated from clinical specimens in Kuwait hospitals: comparative analysis of 11-year data. **Anaerobe**, v. 31, p. 25-30, Feb 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.012> >.

JEVERICA, S.; KOLENC, U.; MUELLER-PREMRU, M.; PAPST, L. Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015. **Anaerobe**, v. 47, p. 64-69, Oct 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.04.007> >.

JOVANOVIC, D.; LONCAR, Z.; DOKLESTIC, K.; KARAMARKOVIC, A. Intra-Abdominal Infection And Acute Abdomen-Epidemiology, Diagnosis And General

Principles Of Surgical Management. **Sanamed**, v. 10, n. 1, 2015. Disponível em: < <http://www.sanamed.rs/OJS/index.php/Sanamed/article/view/20> >.

JOUSIMIES-SOMER, H.; SUMMANEN, P. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram-negative bacteria (excluding spirochetes). **Clin Infect Dis**, v. 35, n. Suppl 1, p. 17-21, Sep 1 2002. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/341915> >.

KANGABA, A. A.; SAGLAM, F. Y.; TOKMAN, H. B.; TORUN, M.; TORUN, M. M. The prevalence of enterotoxin and antibiotic resistance genes in clinical and intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates in Turkey. **Anaerobe**, v. 35, p. 72-76, Oct 2015. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.07.008> >.

KARLOWSKY, J. A.; WALKTY, A. J.; ADAM, H. J.; BAXTER, M. R.; HOBAN, D. J.; ZHANEL, G. G. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD surveillance study. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1247-1252, Mar 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1128/AAC.05823-11> >.

KARLSSON, F. H. et al. A closer look at *Bacteroides*: phylogenetic relationship and genomic implications of a life in the human gut. **Microb Ecol**, v. 61, n. 3, p. 473-485, Apr 2011. ISSN 0095-3628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9796-1> >.

KOS, B.; SUSKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J Appl Microbiol**, v. 94, n. 6, p. 981-987, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIU, C.; SONG, Y.; MCTEAGUE, M.; VU, A. W.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S. M. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. **FEMS Microbiol Lett**, v. 222, n. 1, p. 9-16, May 16 2003. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOBO, L. A.; JENKINS, A. L.; SMITH, C. J., ROCHA, E. R. Expression of *Bacteroides fragilis* hemolysins in vivo and role of HlyBA in an intra-abdominal infection model. **Microbiology open**, v. 2, n. 2, p. 326-337, Apr 2013. ISSN 2045-8827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.76> >.

MAESTRE, J. R.; AGUILAR, L.; MATEO, M.; GIMÉNEZ, M. J.; MÉNDEZ, M. L.; ALOU, L.; GRANIZO, J. J.; PRIETO, J. In vitro interference of tigecycline at subinhibitory concentrations on biofilm development by *Enterococcus faecalis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 5, p. 1155-8, May 2012. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks014> >.

MARCHAND-AUSTIN, A.; RAWTE, P.; TOYE, B.; JAMIESON, F. B.; FARRELL, D. J.; PATEL, S. N. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic

bacteria in Ontario, 2010-2011. **Anaerobe**, v. 28, p. 120-125, Aug 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.015> >.

MAREDA, R. et al. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. **Sci World J**, v. 2012, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1100/2012/402919> >.

MEGGERSEE, R.; ABRATT, V. The occurrence of antibiotic resistance genes in drug resistant *Bacteroides fragilis* isolates from Groote Schuur Hospital, South Africa. **Anaerobe**, v. 32, p. 1-6, Apr 2015. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.11.003> >.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Capítulo 3: Bacteriologia. **Fund Oswaldo Cruz**, 2009. Disponível em: < http://www.fiocruz.br/ioc/media/ConceitosMetodos_volume4.pdf >.

NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Virulence markers and antimicrobial susceptibility of bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from stool of children with diarrhea in Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 307-312, May 2004. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/S0074-02762004000300012> >.

NAKANO, V. et al. Adherence and invasion of *Bacteroidales* isolated from the human intestinal tract. **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 10, p. 955-963, Oct 2008. ISSN 1198-743x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02069.x> >.

NAKANO, V.; FONTES PIAZZA, R. M.; AVILA-CAMPOS, M. J. A rapid assay of the sialidase activity in species of the *Bacteroides fragilis* group by using peanut lectin hemagglutination. **Anaerobe**, v. 12, n. 5-6, p. 238-241, Oct-Dec 2006. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.07.003> >.

NAMAVAR, F.; VERWEIJ-VAN VUGHT, M. A.; MACLAREN, D. M. A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. **J Gen Microbiol**, v. 137, n. 6, p. 1431-1435, Jun 1991. ISSN 0022-1287. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-137-6-1431> >.

NARIMANI, T.; DOURAGHI, M.; OWLIA, P.; RASTEGAR, A.; ESGHAEI, M.; NASR, B.; TALEBI, M. Heterogeneity in resistant fecal *Bacteroides fragilis* group collected from healthy people. **Microb Pathog**, v. 95, p. 1-6, Mar 2 2016. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.017> >.

NDAMUKONG, I. C.; GEE, J.; SMITH, C. J. The extracytoplasmic function sigma factor EcfO protects *Bacteroides fragilis* against oxidative stress. **J Bacteriol**, v. 195, n. 1, p. 145-155, Jan 2013. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01491-12> >.

OFEK, I.; WHITNACK, E.; BEACHEY, E. H. Hydrophobic interactions of group A streptococci with hexadecane droplets. **J Bacteriol**, v. 154, n. 1, p. 139-145, Apr 1983. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OKAMOTO, A. C.; JARDIM, E. G.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. **Braz. J Microbiol**, v. 33, n. 2, p. 178-184, 2002. ISSN 1517-8382. Disponível em: < <http://www.scielo.br> >.

ORMEROD, K. L. et al. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. **Microbiome**, v. 4, n. 36, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0181-2> >.

OTTO, M. P. et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 7, p. 1524-1532, Jul 2013. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt073> >.

PATRICK, S.; MCKENNA, J. P.; O'HAGAN, S.; DERMOTT, E. A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. **Microb Pathog**, v. 20, n. 4, p. 191-202, Apr 1996. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PRABHU, V. S.; SOLOMKIN, J. S.; MEDIC, G.; FOO, J.; BORSE, R. H.; KAUF, T.; MILLER, B.; SEN, S. S.; BASU, A. Cost-effectiveness of ceftolozane/tazobactam plus metronidazole versus piperacillin/tazobactams initial empiric therapy for the treatment of complicated intra-abdominal infections based on pathogen distributions drawn from national surveillance data in the United States. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 6, n. 107, Oct 27 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-017-0264-2> >.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J.; PIAZZA, R. M.; WEXLER, H. M. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. **Microb Pathog**, v. 43, n. 2-3, p. 78-87, Aug-Sep 2007. ISSN 0882-4010 (Print)0882-4010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2007.04.002> >.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A.; WEXLER, H. M. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. **Microb Ecol**, v. 56, n. 3, p. 412-9, Oct 2008. ISSN 0095-3628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-007-9358-3> >.

QUESADA-GOMEZ, C.; RODRIGUEZ-CAVALLINI, E.; RODRIGUEZ, C. Scarce detection of mobile erm genes associated with tetQ in *Bacteroides* and *Parabacteroides* from Costa Rica. **Anaerobe**, v. 21, p. 18-21, Jun 2013. ISSN

1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.006> >.

RAJKUMAR, H. R. V.; DEVAKI, R.; KANDI, V. Comparison of Hemagglutination and Hemolytic Activity of Various Bacterial Clinical Isolates Against Different Human Blood Groups. **Cureus**, v. 8, n. 2, 2016. ISSN 2168-8184. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.489> >.

REIS, A. C. M.; SILVA, J. O.; LARANJEIRA, B. J.; PINHEIRO, A. Q.; CARVALHO, C. B. M. Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts. In: (Ed.). **Braz J Microbiol**, v.45, p.647-650, 2014. ISBN 1517-8382 Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

REMACLE, A. G.; SHIRYAEV, S. A.; STRONGIN, A. Y. Distinct interactions with cellular E-cadherin of the two virulent metalloproteinases encoded by a *Bacteroides fragilis* pathogenicity island. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113896> >.

ROBERTSON, K. P.; SMITH, C. J.; GOUGH, A. M.; ROCHA, E. R. Characterization of *Bacteroides fragilis* Hemolysins and Regulation and Synergistic Interactions of HlyA and HlyB. In: (Ed.). **Infect Immun**, v.74, p.2304-16, 2006. ISBN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROCHA, E. R.; HERREN, C. D.; SMALLEY, D. J.; SMITH, C. J. The complex oxidative stress response of *Bacteroides fragilis*: the role of OxyR in control of gene expression. **Anaerobe**, v. 9, n. 4, p. 165-173, Aug 2003. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00118-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00118-5) >.

RODRÍGUEZ, E.; GAMBOA, M. M.; RODRÍGUEZ, C.; VARGAS, P. *Bacteroides fragilis* group in non-diarrheal human feces and its antimicrobial susceptibility. **Rev Esp Quimioter**, v. 19, n. 4, p. 357-362, Dec 2006. ISSN 0214-3429. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. 7, p. 1599-1605, Jul 2006. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64192-0> >.

SARTELLI, M. A focus on intra-abdominal infections. **World J Emerg Surg**, v. 5, n. 1, p. 1, Mar 19 2010. ISSN 1749-7922. Disponível em: < <http://wjeb.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-7922-5-9> >.

SARTELLI, M.; CATENA, F.; COCCOLINI, F.; PINNA, A. D. Antimicrobial management of intra-abdominal infections: Literature's guidelines. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 9, p. 865-71, Mar 7 2012. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i9.865> >.

SATO, T.; KAMAGUCHI, A.; NAKAZAWA, F. Purification and characterization of hemolysin from *Prevotella oris*. **J Oral Biosci**, v. 54, n. 2, p. 113–118, May 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2012.03.002> >.

SCHANDER, C.; KENNETH, H. M. DNA, PCR and formalinized animal tissue – a short review and protocols. **Org Divers Evol**, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1439609204700689> >.

SEARS, C. L.; GEIS, A. L.; HOUSSEAU, F. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. **J Clin Invest**, v. 124, n. 10, p. 4166-4172, Oct 2014. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci72334> >.

SEKOT, G.; POSCH, G.; MESSNER, P.; MATEJKA, M.; RAUSCH-FAN, X.; ANDRUKHOV, O.; SCHÄFFER, C. Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. **J Dent Res**, v. 90, n. 1, p. 109-114, Jan 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0022034510384622> >.

SHAH, H. N. et al. Approaches to the study of the systematics of anaerobic, gram-negative, non-sporeforming rods: current status and perspectives. **Anaerobe**, v. 15, n. 5, p. 179-194, Oct 2009. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.003> >.

SILVA, J. O.; REIS, A.C. M.; QUESADA-GÓMEZ, C.; PINHEIRO, A. Q.; FREIRE, R. S.; ORIÁ, R. B.; DE CARVALHO C. B. In vitro effect of antibiotics on biofilm formation by *Bacteroides fragilis* group strains isolated from intestinal microbiota of dogs and their antimicrobial susceptibility. **Anaerobe**, v. 28, p. 24-28, Aug 2014. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.010> >.

SILVESTRO, E. M.; NAKANO, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; MARQUES, M. V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 257, n. 2, p. 189-94, Apr 2006. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00162.x> >.

SOUZA FILHO, J. A. et al. Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials. **Anaerobe**, v. 18, n. 6, p. 566-575, Dec 2012. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.007> >.

SUND, C. J.; ROCHA, E. R.; TZIANABOS, A. O.; WELLS, W. G.; GEE, J. M.; REOTT, M. A.; O'ROURKE, D. P.; SMITH, C. J. The *Bacteroides fragilis* transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence. **Mol Microbiol**, v. 67, n. 1, p. 129-142, Jan 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06031.x> >.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 877-86, Jul 2013. ISSN 1746-0913. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.13.58> >.

SUZUKI, N.; FUKAMACHI, H.; ARIMOTO, T.; YAMAMOTO, M.; IGARASHI, T. Contribution of hly homologs to the hemolytic activity of *Prevotella intermedia*. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 350-356, Jun 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.005> >.

SZEKELY, E.; EITEL, Z.; MOLNÁR, S.; SZÁSZ, I. É.; BILCA, D.; SÓKI, J. Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. **Anaerobe**, v. 31, p. 11-4, Feb 2015. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.001> >.

TAJKARIMI, M.; WEXLER, H. M. CRISPR-Cas Systems in *Bacteroides fragilis*, an Important Pathobiont in the Human Gut Microbiome. **Front Microbiol**, v. 8, n. 2234, Nov 23 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02234> >.

TEIXEIRA, F. L.; SILVA, D. N.; PAUER, H.; FERREIRA, L. Q.; FERREIRA, E. O.; DOMINGUES, R. M.; LOBO, L. A. The role of BmoR, a MarR Family Regulator, in the survival of *Bacteroides fragilis* during oxidative stress. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 8, p. 443-448, Dec 2013. ISSN 1438-4221. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.05.007> >.

TIERNEY, D.; COPSEY, S. D.; MORRIS, T.; PERRY, J. D. A new chromogenic medium for isolation of *Bacteroides fragilis* suitable for screening for strains with antimicrobial resistance. **Anaerobe**, v. 39, p. 168-172, Jun 2016. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.003> >.

TYRRELL, K. L.; WARREN, Y. A.; CITRON, D. M.; GOLDSTEIN, E.J. Re-assessment of phenotypic identifications of *Bacteroides putredinis* to *Alistipes* species using molecular methods. **Anaerobe**, v. 17, n. 3, p. 130-134, Jun 2011. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.002> >.

VELOSO, L. C.; DOS SANTOS, K. V.; DE ANDRADE, H. M.; PIRES, S. F.; DOS SANTOS, S.G.; TRINDADE M. J. V.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. Proteomic changes in *Bacteroides fragilis* exposed to subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam. **Anaerobe**, v. 22, p. 69-76, Aug 2013. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.007> >.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 4, p. 593-621, Oct 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00008-07> >.

YANG, H.; DUAN, Z. The Local Defender and Functional Mediator: Gut Microbiome. **Digestion**, v. 97, n. 2, p. 137-145, Jan 8 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1159/000484687> >.

YEHYA, M.; HAMZE, M.; MALLAT, H.; DABBOUSI, F. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolated from stool samples in North Lebanon. In: (Ed.). **Braz J Microbiol**, v.44, p.807-12, 2013. ISBN 1517-8382. . Disponível em: < <http://dx.doi.org> >.

YIM, J. et al. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group organisms recovered from 2009 to 2012 in a Korean hospital. **Ann Lab Med**, v. 35, n. 1, p. 94-98, Jan 2015. ISSN 2234-3806. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.94> >.

YOSHIZAKI, S.; UMEMURA, T.; TANAKA, K.; WATANABE, K.; HAYASHI, M.; MUTO, Y. Genome-wide evidence of positive selection in *Bacteroides fragilis*. **Comput Biol Chem**, v. 52, p. 43-50, Oct 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.09.001> >.

ZHANEL, G. G. et al. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Drugs**, v. 74, n. 1, p. 31-51, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-013-0168-2> >.

10 ANEXOS

Anexo A - Análise de regressão linear da variável dependente tamanho do halo, comparada às variáveis independentes amostra e concentração do peróxido de hidrogênio

```
. regress Halo1X i.Amostra i.Concentraçãooperóxido
```

| Source | SS | df | MS | Number of obs | = | 132 |
|----------|------------|-----|------------|---------------|---|--------|
| Model | 23957.0584 | 14 | 1711.21845 | F(14, 117) | = | 515.20 |
| Residual | 388.614256 | 117 | 3.32148937 | Prob > F | = | 0.0000 |
| | | | | R-squared | = | 0.9840 |
| | | | | Adj R-squared | = | 0.9821 |
| Total | 24345.6726 | 131 | 185.844829 | Root MSE | = | 1.8225 |

| Halo1X | Coef. | Std. Err. | t | P> t | [95% Conf. Interval] | |
|-----------------------|-----------|-----------|-------|-------|----------------------|-----------|
| Amostra | | | | | | |
| 2 | .5516667 | .7440306 | 0.74 | 0.460 | -.921847 | 2.02518 |
| 3 | -.58 | .7440306 | -0.78 | 0.437 | -2.053514 | .8935137 |
| 4 | -2.321667 | .7440306 | -3.12 | 0.002 | -3.79518 | -.848153 |
| 5 | -.4875 | .7440306 | -0.66 | 0.514 | -1.961014 | .9860137 |
| 6 | -1.531667 | .8318515 | -1.84 | 0.068 | -3.179105 | .1157717 |
| 7 | -1.416667 | .8318515 | -1.70 | 0.091 | -3.064105 | .2307717 |
| 8 | -.4841667 | .7440306 | -0.65 | 0.516 | -1.95768 | .989347 |
| 9 | .0866667 | .7440306 | 0.12 | 0.907 | -1.386847 | 1.56018 |
| 10 | 2.5175 | .7440306 | 3.38 | 0.001 | 1.043986 | 3.991014 |
| 11 | -2.410417 | .8318515 | -2.90 | 0.004 | -4.057855 | -.7629783 |
| 12 | -.1466667 | .7440306 | -0.20 | 0.844 | -1.62018 | 1.326847 |
| Concentraçãooperóxido | | | | | | |
| 2 | 21.85364 | .4486673 | 48.71 | 0.000 | 20.96507 | 22.7422 |
| 3 | 28.78939 | .4486673 | 64.17 | 0.000 | 27.90083 | 29.67796 |
| 4 | 35.78333 | .4486673 | 79.75 | 0.000 | 34.89477 | 36.6719 |
| _cons | 17.12758 | .5935311 | 28.86 | 0.000 | 15.95212 | 18.30303 |

Legenda: Amostras: 2 – ATCC + PTZ, 3 – ATCC + MET, 4 – ATCC + CLI, 5 – P34 (sem antimicrobiano), 6 – P34 + PTZ, 7 – P34 + MET, 8 – P34 + CLI, 9 – P50 (sem antimicrobiano), 10 – P50 + PTZ, 11 – P50 + MET, 12 – P50 + CLI; Concentração H₂O₂: 2 – 5%, 3 – 10%, 4 – 20%; _cons – ATCC (sem antimicrobiano) com 1% de H₂O₂; PTZ – piperacilina/tazobactam, MET – metronidazol e CLI – clindamicina.

Anexo B - Análise de regressão linear da variável dependente biofilme, comparada à variável independente amostra bacteriana.

```
. regress biofilme i.Amostra
```

| Source | SS | df | MS | Number of obs | = | 34 |
|----------|------------|----|------------|---------------|---|--------|
| Model | 86.8521546 | 11 | 7.89565042 | F(11, 22) | = | 4.52 |
| Residual | 38.4316655 | 22 | 1.74689389 | Prob > F | = | 0.0013 |
| | | | | R-squared | = | 0.6932 |
| | | | | Adj R-squared | = | 0.5399 |
| Total | 125.28382 | 33 | 3.7964794 | Root MSE | = | 1.3217 |

| biofilme | Coef. | Std. Err. | t | P> t | [95% Conf. Interval] |
|----------|-----------|-----------|-------|-------|----------------------|
| Amostra | | | | | |
| 2 | .5999999 | 1.079164 | 0.56 | 0.584 | -1.63805 2.83805 |
| 3 | -.2666667 | 1.079164 | -0.25 | 0.807 | -2.504717 1.971383 |
| 4 | -1.88e-15 | 1.079164 | -0.00 | 1.000 | -2.23805 2.23805 |
| 5 | 4.066667 | 1.079164 | 3.77 | 0.001 | 1.828617 6.304717 |
| 6 | .0833333 | 1.206543 | 0.07 | 0.946 | -2.418883 2.585549 |
| 7 | 2.933333 | 1.206543 | 2.43 | 0.024 | .4311171 5.435549 |
| 8 | 1.366667 | 1.079164 | 1.27 | 0.219 | -.8713833 3.604717 |
| 9 | 3.6 | 1.079164 | 3.34 | 0.003 | 1.36195 5.83805 |
| 10 | 3.733333 | 1.079164 | 3.46 | 0.002 | 1.495283 5.971383 |
| 11 | 1.1 | 1.079164 | 1.02 | 0.319 | -1.13805 3.33805 |
| 12 | 2.933333 | 1.079164 | 2.72 | 0.013 | .6952833 5.171383 |
| _cons | 1.466667 | .7630845 | 1.92 | 0.068 | -.1158737 3.049207 |

Legenda: Amostras: 2 – ATCC + PTZ, 3 – ATCC + MET, 4 – ATCC + CLI, 5 – P34 (sem antimicrobiano), 6 – P34 + PTZ, 7 – P34 + MET, 8 – P34 + CLI, 9 – P50 (sem antimicrobiano), 10 – P50 + PTZ, 11 – P50 + MET, 12 – P50 + CLI; _cons – ATCC (sem antimicrobiano); PTZ – piperacilina/tazobactam, MET – metronidazol e CLI – clindamicina.

Anexo C - Análise de regressão linear da variável dependente hidrofobicidade, comparada à variável independente amostra bacteriana.

```
. regress Hidrofob i.Amostra
```

| Source | SS | df | MS | Number of obs | = | 24 |
|----------|------------|----|------------|---------------|---|--------|
| Model | 2679.33333 | 11 | 243.575758 | F(11, 12) | = | 7.82 |
| Residual | 374 | 12 | 31.1666667 | Prob > F | = | 0.0006 |
| | | | | R-squared | = | 0.8775 |
| | | | | Adj R-squared | = | 0.7652 |
| Total | 3053.33333 | 23 | 132.753623 | Root MSE | = | 5.5827 |

| Hidrofob | Coef. | Std. Err. | t | P> t | [95% Conf. Interval] |
|----------|-------|-----------|-------|-------|----------------------|
| Amostra | | | | | |
| 2 | -2.5 | 5.582711 | -0.45 | 0.662 | -14.66368 9.663683 |
| 3 | -21 | 5.582711 | -3.76 | 0.003 | -33.16368 -8.836317 |
| 4 | -23.5 | 5.582711 | -4.21 | 0.001 | -35.66368 -11.33632 |
| 5 | 4.5 | 5.582711 | 0.81 | 0.436 | -7.663683 16.66368 |
| 6 | 9 | 5.582711 | 1.61 | 0.133 | -3.163683 21.16368 |
| 7 | -12.5 | 5.582711 | -2.24 | 0.045 | -24.66368 -.3363168 |
| 8 | -9.5 | 5.582711 | -1.70 | 0.115 | -21.66368 2.663683 |
| 9 | 2 | 5.582711 | 0.36 | 0.726 | -10.16368 14.16368 |
| 10 | 10.5 | 5.582711 | 1.88 | 0.084 | -1.663683 22.66368 |
| 11 | -6.5 | 5.582711 | -1.16 | 0.267 | -18.66368 5.663683 |
| 12 | 3.5 | 5.582711 | 0.63 | 0.542 | -8.663683 15.66368 |
| _cons | 46 | 3.947573 | 11.65 | 0.000 | 37.39898 54.60102 |

Legenda: Amostras: 2 – ATCC + PTZ, 3 – ATCC + MET, 4 – ATCC + CLI, 5 – P34 (sem antimicrobiano), 6 – P34 + PTZ, 7 – P34 + MET, 8 – P34 + CLI, 9 – P50 (sem antimicrobiano), 10 – P50 + PTZ, 11 – P50 + MET, 12 – P50 + CLI; _cons – ATCC (sem antimicrobiano); PTZ – piperacilina/tazobactam, MET – metronidazol e CLI – clindamicina.