



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**JANICE OLIVEIRA SILVA**

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTEROIDALES DE  
MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES E O EFEITO DE CONCENTRAÇÕES  
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME *in*  
*vitro***

**FORTALEZA**  
**2015**

**JANICE OLIVEIRA SILVA**

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTEROIDALES DE  
MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES E O EFEITO DE CONCENTRAÇÕES  
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME *in  
vitro***

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Cibele Barreto Mano de Carvalho

**FORTALEZA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

S58s Silva, Janice Oliveira.

Sensibilidade a antimicrobianos de Bacteroidales de microbiota intestinal de cães e o efeito de concentrações subinibitórias de antimicrobianos na formação de biofilme *in vitro*. / Janice Oliveira Silva. – 2012.

71f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Ciências Biológicas.

Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

1. Bacteroides fragilis. 2. Biofilmes. 3. Anti-Infeciosos. 4. Cães. I. Título.

CDD 615.329

---

JANICE OLIVEIRA SILVA

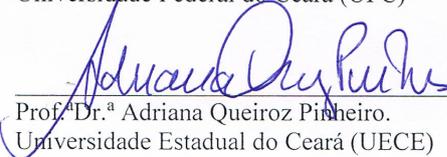
**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTEROIDALES DE  
MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES E O EFEITO DE CONCENTRAÇÕES  
SUBINIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

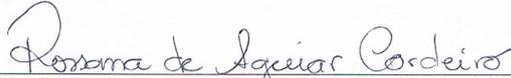
Aprovada em: 21/12/2012

BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Cibele Barreto Mano de Carvalho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Adriana Queiroz Pinheiro.  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

  
Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima da Silva Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

  
Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTO

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e como cidadã, ao lidar com pessoas e instituições que foram fundamentais a essa construção. Agradeço a Universidade Federal do Ceará e Universidade Estadual do Ceará pela estrutura na qual pude desenvolver esse trabalho.

Agradeço profundamente à Direção e meus professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos, empenho e dedicação.

Meu agradecimento e minha homenagem carinhosa a Cibele Barreto Mano de Carvalho. Mais que minha professora e orientadora no Mestrado, agradeço por sua cumplicidade e responsabilidade direta na construção desta dissertação.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, especialmente ao José Olavo Moraes pela agilidade no apoio técnico e pelas palavras de carinho.

A secretária do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, Carolinda Vilma Soares de Oliveira pela paciência, atendimento e esclarecimentos prestados.

A Clínica Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, ao Dr. Reginaldo Pereira e a Dra. Érica Carvalho, pois sem eles este trabalho não teria acontecido.

Ao Prof. Reinaldo Barreto Oriá, seu aluno Tiê Bezerra Costa e Rosemary Souza Freire pela ajuda no manuseio do microscópio confocal.

A banca formada por Prof. Adriana Queiroz Pinheiro, Prof Rossana Aguiar e Prof. Maria Fátima da Silva Teixeira pelas correções deste trabalho.

Aos meus irmãos e principalmente a minha irmã Jamile Oliveira Silva pela força diária que tem me dado, que foi essencial para a minha trajetória.

Preciso homenagear, ainda, os amigos queridos que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. Em nome de Ana Catarina Martins Reis, Bruno Laranjeira, Camila Alencar Moreira,

Carlos Eduardo Teixeira, Cecília Costa Leite, Nayara Santos de Oliveira, Thially Braga Gonçalves e Ramila Brito Macedo, agradeço e homenageio a todos.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

À todos, muito obrigada!

## RESUMO

Os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* estão envolvidos em doenças graves como abscessos e bacteremia em humanos e animais. Estas bactérias são caracterizadas pela resistência antimicrobiana e *B. fragilis* é a principal bactéria anaeróbica isolada do intestino que pode formar biofilme. O objetivo deste trabalho foi isolar *Bacteroides* e *Parabacteroides* do trato intestinal de cães, para avaliar a sensibilidade antimicrobiana e a ação de concentrações subinibitórias de antimicrobianos sobre a formação de biofilme. Um total de 30 amostras foram avaliadas neste estudo. Os ensaios foram realizados de acordo com os métodos e as diretrizes de Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) e outras metodologias estabelecidas. Os antimicrobianos testados contra *Bacteroides* e *Parabacteroides* foram: penicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefoxitina, imipenem, clindamicina, ciprofloxacina, enrofloxacin, tetraciclina, cloranfenicol e metronidazol. Quinze cepas de *B. fragilis* foram testadas para a formação de biofilme e as quatro cepas mais produtoras de biofilmes foram escolhidas para avaliar o efeito de concentrações subinibitórias (1/2 e 1/4CIM) de seis antimicrobianos sobre a formação de biofilme. *B. fragilis* foi a bactéria mais frequentemente isolada seguida por *P. distasonis* e *B. vulgatus*. Os isolados foram uniformemente sensíveis ao metronidazol, imipenem e cloranfenicol e foram resistentes à penicilina. Tetraciclina e clindamicina foram ativas contra 50% e 33% das cepas, respectivamente. A produção de biofilme de todas as quatro cepas foi uniforme e significativamente menor ( $P < 0,05$ ) após crescimento com 1/2 e 1/4CIM de imipenem e metronidazol. A indução da formação de biofilme foi observada em duas cepas com 1/2 e 1/4 CIM de enrofloxacin.

Palavras-chave: *B. fragilis*; Biofilme; Antimicrobianos; Cães.

## ABSTRACT

The *Bacteroides* and *Parabacteroides* spp are involved in serious diseases like abscesses and bacteremia in humans and animals. These bacteria are characterized by antimicrobial resistance and *B. fragilis* is the main anaerobic bacteria isolated from the intestine which can form biofilm. The aim of this study was to isolate *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains from dogs intestinal tract, to investigate the antimicrobial susceptibility and to evaluate the action of antimicrobials subinhibitory concentrations on biofilm formation. A total of 30 strains were evaluated in this study. The assays were performed in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines and other established methods. Antimicrobial susceptibility was observed against penicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ceftiofur, imipenem, clindamycin, ciprofloxacin, enrofloxacin, tetracycline, chloramphenicol and metronidazole. Fifteen *B. fragilis* strains were tested for biofilm formation and the stronger four biofilm producer strains were chosen to evaluate the effect of subinhibitory concentrations ( $1/2$  and  $1/4$ MIC) of six antimicrobials on biofilm formation. *B. fragilis* was the most frequently isolated anaerobic bacteria followed by *P. distasonis* and *B. vulgatus*. The isolates were uniformly susceptible to metronidazole, imipenem and chloramphenicol and were penicillin resistant. Tetracycline and clindamycin were active against 50% and 33% of the strains respectively. The biofilm production of all four strains was uniformly and significantly lower ( $P < 0.05$ ) after growth with  $1/2$  MIC and  $1/4$  MIC of imipenem and metronidazole. The induction of biofilm formation was observed in two isolates at  $1/2$  MIC and  $1/4$  MIC of enrofloxacin.

Key words: *B. fragilis*; biofilm; antimicrobials; dogs.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Morfologia da espécie <i>B. fragilis</i> observada pela coloração de Gram (bacilos curtos pleomórficos Gram-negativos). Foto obtida por meio de microscopia óptica em um aumento de 100x .....	18
Figura 2. Cápsulas (A= grande, B= pequena e C= eletrodensa) estudadas na espécie <i>B. fragilis</i> .....	19
Figura 3. Morfologia colonial da espécie <i>B. fragilis</i> semeada em Agar <i>Bacteroides</i> Bile Esculina .....	21
Figura 4. Etapas de formação do biofilme .....	28
Figura 5. Formação de biofilme por cepas de <i>B. fragilis</i> sobre a ação de concentração subinibitória de antibióticos .....	47
Figura 6. Ação de 1/2 CIM de antibióticos sobre a formação de biofilme de quatro cepas da espécie <i>B. fragilis</i> no período de 48 horas .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para espécies dos gêneros <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i> isoladas de microbiota normal de cães .....	50
Tabela 2. Formação de biofilme de cepas <i>B. fragilis</i> sobre a ação concentração subinibitória de diferentes antibióticos em 48 horas .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHL - N-Acilhomo-serina Lactona

BBE - Agar *Bacteroides* Bile Esculina

BHI - *Brain Heart Infusion*

CEUA - Comitê de Ética para o Uso de Animais

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPS - Substância Polimérica Extracelular

LPS - Lipopolissacarídeo

MATE - *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*

tampão fosfato (PBS)

PBS - Tampão Fosfato

RND - *Resistance-Nodulation-Division*

RNAr – Ácido ribonucleico ribossômico

sp. - Espécie

spp. – Espécies

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFC/mL - Unidade Formadora de Colônia / mililitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

< - Menor

°C - Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Características gerais dos gêneros <i>Bacteroides</i> e <i>Parabacteroides</i></b>	<b>15</b>
2.1.1	Histórico e características taxonômicas	15
2.1.2	Características morfológicas e fisiológicas	16
2.1.3	Microbiota do trato gastrointestinal em cães	20
2.1.4	Fatores de virulência	21
2.1.5	Patogenicidade para o homem e cães	24
<b>2.2</b>	<b>Biofilme</b>	<b>26</b>
2.2.1	Características gerais do biofilme	26
2.2.2	Biofilme, bactérias anaeróbias e Medicina Veterinária	30
<b>2.3</b>	<b>Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos</b>	<b>32</b>
2.3.1	Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos de bactérias anaeróbias	32
2.3.2	Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos de bactérias anaeróbias isoladas de cães	37
<b>2.4</b>	<b>Relevância do estudo</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESES</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>57</b>
<b>10.</b>	<b>APENDICE</b>	<b>67</b>

## INTRODUÇÃO

O grupo *Bacteroides fragilis* possui micro-organismos que são normalmente comensais da flora intestinal de cães e são descritos como anaeróbicos, resistentes a bile, não formadores de esporos e bacilos Gram-negativos (HIRSH et al., 2004). Esses micro-organismos podem ser responsáveis por infecções com significante morbidade e mortalidade em cães, como infecções de cavidade oral, abscessos e infecções de ferida (SILLEY et al., 2007; WAGNER et al., 2007; LEDBETTER e SCARLETT, 2008).

Numerosos fatores contribuem para a habilidade de *B. fragilis* persistir como comensal no intestino, como a capacidade de usar uma ampla variedade de polissacarídeos da dieta, alta tolerância a bile, formação de cápsula, a presença de diferentes antígenos em sua superfície que permite a evasão das respostas imunes do hospedeiro, adesão e formação de biofilme (WEXLER, 2007).

A habilidade de formar biofilme parece ser um atributo universal dos micro-organismos. O biofilme é um consórcio estruturado de bactérias embebidas em uma matriz polimérica autoproduzida composta por polissacarídeos, proteína e DNA (ácido desoxirribonucléico). O biofilme habilita a bactéria a sobreviver em ambientes hostis e aumenta a resistência a antimicrobianos devido à restrita penetração dos antimicrobianos, a atividade metabólica heterogênia contida no biofilme e diferentes expressões de genes comparados as células planctônicas (JACQUES et al., 2010).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Características gerais dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*

#### 2.1.1 Histórico e características taxonômicas

O trato gastrointestinal alberga o maior número e a maior diversidade de espécies de bactérias que colonizam o corpo humano. A população microbiana do cólon alcança  $10^{10}$  a  $10^{12}$  micro-organismos por grama de conteúdo luminal e supera em número o total das células eucarióticas presentes no corpo humano. Estudos moleculares mais recentes apontam para um número de cerca de 1000 espécies bacterianas habitando este ecossistema. Dois filos bacterianos, predominam neste sítio, Bacteroidetes e Firmicutes. Composto o filo Bacteroidetes, predominam bactérias pertencentes à ordem Bacteroidales, que são as bactérias Gram-negativas mais abundantes deste ecossistema. Espécies da ordem Bacteroidales comumente isoladas de fezes humanas são: *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. caccae*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *Parabacteroides merdae*, *P. distasonis*, *Prevotella tanaerae*, *Odoribacterium splanchnicus* e espécies do gênero *Alistipes*. As espécies mais estudadas são as pertencentes aos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* e pouco se sabe sobre a biologia e a importância, para o homem, das espécies dos outros gêneros (ZITOMERSKY; COYNE; COMSTOCK, 2011; KULAGINA *et al.*, 2012).

*Bacteroides fragilis* foi a primeira espécie descrita do gênero *Bacteroides*, descrita em 1898. Foi nomeada de *Bacillus fragilis*, tendo sua renomeação para *Bacteroides fragilis* ocorrida em 1919. Desde então, o gênero *Bacteroides* passou por muitas mudanças taxonômicas (CATO; JOHNSON, 1976).

O gênero *Bacteroides* compreende muitas espécies das quais *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides thetaiotaomicron* são os patógenos proeminentes. Em 1976, por meio de estudos morfológicos e fisiológicos, as espécies do gênero *Bacteroides* foram subclassificadas em *B. fragilis* subsp. *vulgatus*, *B. fragilis* subsp. *distasonis*, *B. fragilis* subsp. *ovatus*, *B. fragilis* subsp. *thetaitaomicron*, *B. fragilis* subsp. *eggerthii* e *B. fragilis* subsp. *uniformis*. Posteriormente, por meio de estudo de biologia molecular, verificou-se que essas subespécies eram geneticamente distintas, voltando a ser utilizada a classificação como espécies do gênero *Bacteroides* (CATO; JOHNSON, 1976; WEXLER, 2007).

Holdeman e Moore (1975) estudaram 326 espécies de bactérias com características que se encaixavam nas descrições iniciais de *B. fragilis* e agruparam as espécies que eram semelhantes em um grupo chamado *B. fragilis*. Essas espécies eram: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. ovatus* e *B. vulgatus*. As bactérias do grupo *B. fragilis* foram classificadas como: bacilos Gram-negativos, bile-resistentes, sacarolíticos e produtores de ácido acético e succínico como principais produtos do metabolismo de glicose. Mais espécies foram sendo adicionadas ao grupo ao longo dos anos. Em 1986, foi sugerida a adição de três novas espécies: *B. caccae*, *B. merdae* e *B. stercoris*. Em 2005 várias espécies foram incorporadas ao gênero *Bacteroides*, incluindo *B. goldsteinii*, *B. nordii*, *B. salyersai*, *B. plebeius*, *B. coprocola*, *B. massiliensis* (WEXLER, 2007).

Posteriormente, a análise da sequência do gene 16S RNAr (ácido ribonucléico ribossômico) de *B. distasonis* e *B. merdae* mostrou que essas espécies eram filogeneticamente distintas das espécies do gênero *Bacteroides*. Essas espécies foram relacionadas, primeiramente, como membros do gênero *Porphyromonas*, com similaridade de 84% na sequência do gene 16S RNAr. Em adição, essas espécies foram reclassificadas para o gênero *Tanerella*, em virtude da próxima associação filogenética (cerca de 90% de similaridade) (SAKAMOTO *et al.*, 2002). Em 2005, Song *et al.*, propuseram uma nova espécie do gênero *Bacteroides*, *B. goldsteinii*. Essa espécie foi relacionada com *B. distasonis* e *B. merdae*, com 93% de similaridade na sequência gene 16S RNAr, e *B. goldsteinii* foi também reclassificada para o gênero *Tanerella*, com cerca de 90% de similaridade (SONG *et al.*, 2005).

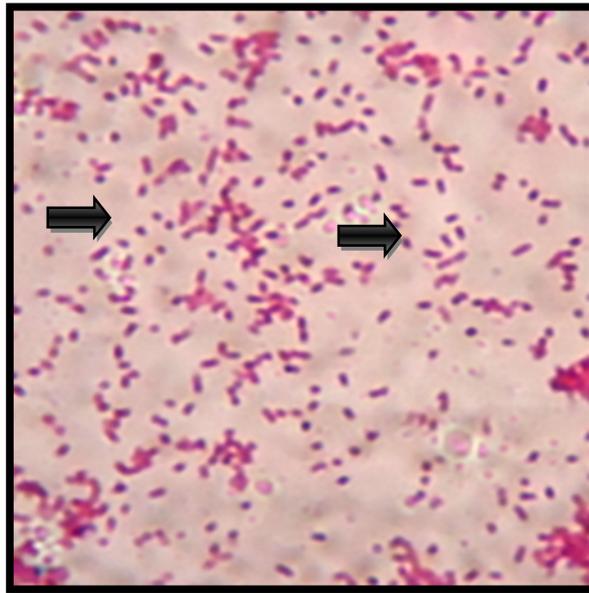
Em 2006, essas três espécies foram reclassificadas para o novo gênero *Parabacteroides* e foram renomeadas como *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides merdae* e *Parabacteroides goldsteinii* (SAKAMOTO; BENNO, 2006).

### 2.1.2 Características morfológicas e fisiológicas

Os gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* são compostos por bactérias anaeróbias obrigatórias moderadas, ou seja, vivem em ambientes com a concentração de oxigênio variando de 2 a 8% (LOESCHE, 1969). São bactérias resistentes à bile, não formadoras de esporos, na forma de bacilos pleomórficos Gram-negativas (Figura 1), possuem fimbrias

formadas por proteínas que são distribuídas por toda a bactéria e estão envolvidas com o processo de adesão e hemaglutinação (PUMBWE; SKILBECK; WEXLER, 2006).

Figura 1. Morfologia da espécie *B. fragilis* observada pela coloração de Gram (bacilos curtos pleomórficos Gram-negativos). Foto obtida por meio de microscopia óptica em um aumento de 100x

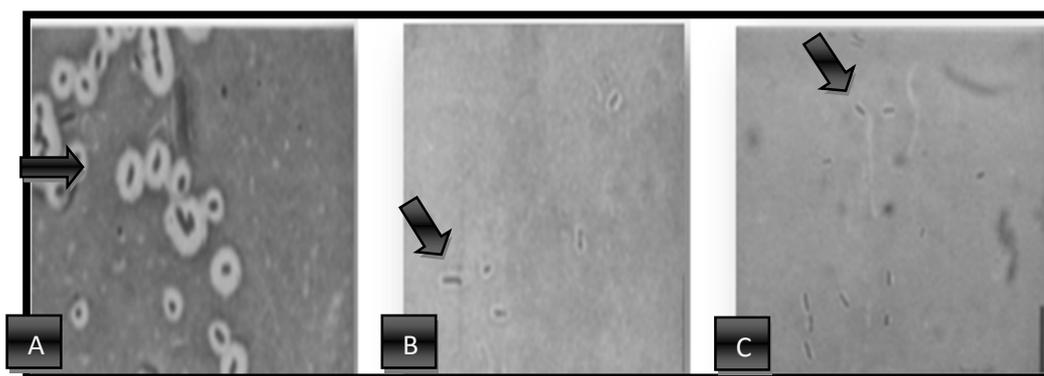


SILVA, J. O, 2012

Essas bactérias podem sobreviver à exposição ao oxigênio em um período de até quatro horas em razão de enzimas, como superóxido dismutase e catalase, que lhes conferem alta resistência à oxidação. Durante o estabelecimento da infecção, a habilidade de crescer na presença de pequenas concentrações de oxigênio permite a proliferação em tecidos do hospedeiro, antes mesmo do abscesso anaeróbio ser formado (ROCHA *et al.*, 1996; BAUGHN; MALAMY, 2004).

*B. fragilis* pode possuir três tipos de cápsulas: grande, pequena e eletrodensa (Figura 2) (PATRICK; GILPIN; STEVENSON, 1999). Estudos mostram que as cepas com cápsula eletrodensa são antigenicamente diferentes de cepas com cápsulas pequenas, mas apresentam epítomos compartilhados com bactérias de cápsula grande (PATRICK; LUTTON, 1990; PUMBWE; SKILBECK; WEXLER, 2006).

Figura 2. Cápsulas (A= grande, B= pequena e C= eletrodensa) estudadas na espécie *B. fragilis*



PATRICK; LUTTON, 1990

Espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* residem, principalmente, no cólon, são quimio-heterotróficas, sacarolíticas e são seus principais produtos de fermentação acetato, succinato, lactato e propionato (SALYERS, 1984). Essas bactérias podem fermentar carboidratos com a produção de ácidos graxos voláteis que são absorvidos através da parede intestinal e são utilizados pelo hospedeiro como fonte de energia. Essas bactérias podem usar desde açúcares simples a complexos e polissacarídeos como nutrientes para seu crescimento (HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 2002). A espécie *B. thetaiotaomicron* possui a capacidade de clivar a maioria das ligações glicosídicas encontradas na natureza, podendo utilizar diferentes fontes de nutrientes para seu crescimento (GILMORE; FERRETTI, 2003). Alguns autores descrevem uma relação de mutualismo entre o ser humano e *Bacteroides*, pois ambos são beneficiados como resultado desta relação (WEXLER, 2007).

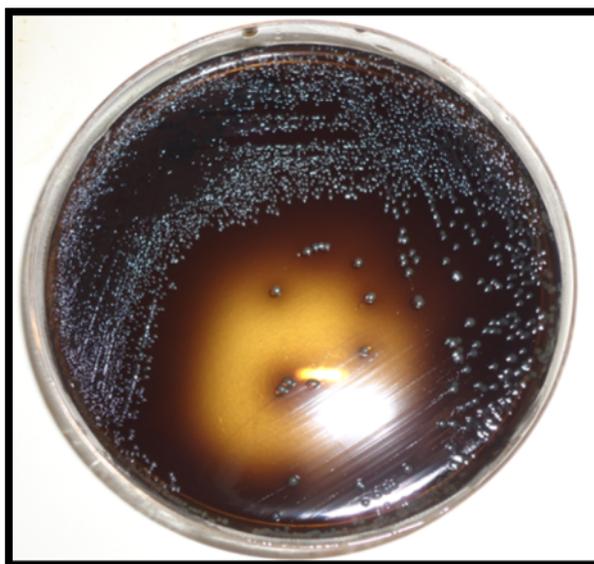
Os produtos de fermentação produzidos pelas bactérias com origem em compostos orgânicos, como ácido pirúvico, variam entre os diferentes gêneros e espécies de anaeróbias. Pela medição da acidificação do meio, ou pela detecção dos ácidos graxos

voláteis resultantes do processo fermentativo desses micro-organismos, pode ser realizada a identificação da bactéria mediante a utilização de provas bioquímicas ou por meio de cromatografia gasosa. A identificação por prova bioquímica envolve a utilização de um meio com glicose e outro carboidrato (que poderá ser ou não fermentado pela bactéria) e a medida da mudança de pH. A cromatografia gasosa é uma técnica mais sensível e utiliza os produtos metabólicos (ácidos graxos voláteis) liberados no meio de cultura em caldo durante o crescimento em condições anaeróbicas. Com essas técnicas, as bactérias anaeróbicas, como as dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, podem ser identificadas definitivamente até o nível de espécie (KONEMAN *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *Bacteroides* também contribuem para o hospedeiro, limitando a colonização de patógenos no trato gastrintestinal (GILMORE; FERRETTI, 2003). Esse fato sucede em decorrência da alta produção de proteína bacteriocina no intestino, que são substâncias antibacterianas cuja ação é reduzir por competição de bactérias que ocupam o mesmo nicho ecológico (WEXLER, 2007).

Quando cultivadas *in vitro*, em meio de cultura suplementado com sangue desfibrinado de carneiro, as espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* exibem colônias de 1 a 4 mm de diâmetro, não hemolíticas. Podem crescer em meios contendo bile, como o meio seletivo ágar *Bacteroides* Bile Esculina (Figura 3), que possui como indicador a esculina. Essas bactérias hidrolisam a esculina, formando esculetina, a qual reage com o ferro presente no meio, produzindo um halo enegrecido ao redor da colônia. A bile é uma secreção digestiva que desempenha um papel importante na emulsificação e solubilização de lipídios no intestino. A bile possui uma atividade detergente com a capacidade de afetar os fosfolipídios e as proteínas de membrana das bactérias, levando à ruptura da membrana. As bactérias Gram-positivas são sensíveis à bile e muitas vezes os meios seletivos utilizam a bile para impedir o crescimento dessas bactérias (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; KONEMAN *et al.*, 2008).

Figura 3. Morfologia colonial da espécie *B. fragilis* semeada em Agar *Bacteroides* Bile Esculina



SILVA, J. O. 2012

Para o cultivo dessas bactérias, é necessário um ambiente de anaerobiose, que pode ser obtido mediante a modificação da atmosfera interna ou por intermédio da retirada e reposição de atmosferas de um ambiente (jarra de anaerobiose, capela de anaerobiose). A modificação da atmosfera interna do ambiente é feita com a aplicação de um método químico que consiste na remoção do oxigênio usando geradores de gás ( $H_2$  e  $CO_2$ ) e um catalisador (remove o oxigênio do ambiente por acelerar a reação do oxigênio com o hidrogênio produzido). Dentro de aproximadamente 100 minutos, a quantidade de  $O_2$  chega a menos de 0,2%. O procedimento de retirada e reposição de atmosferas é um método físico em que o ar da jarra é removido e substituído por uma mistura de 85% de  $N_2$ , 10% de  $H_2$  e 5% de  $CO_2$ , permitindo o estabelecimento mais rápido das condições de anaerobiose. Para as duas técnicas, as condições anaeróbias devem sempre ser controladas

com a inclusão de um indicador de oxirredução, como tiras de azul de metileno (KONEMAN *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Microbiota do trato gastrointestinal em cães

A superfície bucal, a língua e os dentes desses animais são habitados por bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias obrigatórias, ao passo que a microbiota gengival é composta quase inteiramente por bactérias anaeróbias obrigatórias, tendo como destaque os gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* e *Prevotella*. A saliva contém uma mistura de bactérias anaeróbias facultativas e espécies de bactérias anaeróbias e aeróbias obrigatórias. O esôfago possui uma microbiota transitória composta por micro-organismos encontrados na saliva. A microbiota dos intestinos delgado e grosso varia significativamente entre os diferentes animais (HIRSH; MACLACHLAN; WALKER, 2004).

A microbiota do trato gastrintestinal de cães se assemelha ao do homem, com as bactérias anaeróbias obrigatórias predominando na região superior do intestino delgado, ceco e fezes (HIRSH; MACLACHLAN; WALKER, 2004).

Mentula *et al.* (2005) realizaram uma pesquisa que teve como objetivo identificar espécies bacterianas anaeróbias e aeróbias isoladas do jejuno e fezes coletadas de 22 cães. Nesse estudo, foi observado que os grupos isolados em maior quantidade foram *Bacteroides spp*, *Clostridium spp* e *Lactobacillus*. As espécies prevalentes do gênero *Bacteroides* foram *B. vulgatus* e *B. fragilis*.

Jia *et al.* (2009) realizaram um estudo com o objetivo de isolar bactérias aeróbias e anaeróbias da microbiota intestinal em cães com idade de quatro a 13 anos. Esses animais apresentavam diarreia crônica e na análise das amostras foi observada a prevalência de bactérias do gênero *Bacteroides*.

### 2.1.4 Fatores de virulência

Os fatores de virulência das espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* são estudados, entretanto, como a espécie *B. fragilis* é a mais frequentemente isolada de

infecções, se tornou a mais pesquisada e, em sua maioria, os ensaios sobre virulência em *Bacteroides* são realizados com esta espécie (WEXLER, 2007).

De maneira geral, os fatores de virulência podem ser divididos em três categorias: os envolvidos na adesão, os envolvidos na evasão à resposta imune do hospedeiro e os envolvidos na destruição dos tecidos. As cepas do gênero *Bacteroides* exibem fatores de virulência que se enquadram nas categorias há pouco mencionadas, como fimbrias, implicadas na adesão, cápsula, lipopolissacarídeos e catalase na evasão à resposta imune e enzimas histolíticas que atuam na destruição tecidual (WEXLER, 2007).

*B. fragilis* é uma bactéria capaz de induzir a formação de abscesso como único organismo infectante. A formação de abscessos é claramente ligada à cápsula de *B. fragilis*, como demonstrado em modelos animais. A administração de cápsulas (mesmo purificadas, administrando apenas polissacarídeos PS-A e PS-B) na região intra-abdominal provou ser suficiente para induzir a formação de abscesso. A cápsula coexpressa dois polissacarídeos antigenicamente distintos de alto peso molecular, PS-A composto por tetrassacarídeos repetidos e PS-B composto por hexassacarídeos repetidos, cada unidade repetida tem grupos aminos carregados positivamente e carboxilas carregadas negativamente ou grupos fosfatos. A análise destes polissacarídeos, antes e depois de modificações químicas, revelou que essas cargas opostas são necessárias para a indução de abscessos intra-abdominais em ratos (TZIANABOS *et al.*, 1993).

Além da função de proteger a bactéria contra a fagocitose, a cápsula também está envolvida no processo de hemaglutinação. Estudos determinam que a hemaglutinação parece ser causada por mais de uma adesina: cápsula e fimbria estariam assumindo o papel em cepas não encapsuladas (BEENA; SHIVANANDA, 1997).

As espécies do gênero *Bacteroides* se ligam às células epiteliais por meio de adesinas, tais como fimbrias. Essas estruturas de adesão podem estar envolvidas na hemaglutinação, comum em espécies do grupo *B. fragilis*, de tal forma que, a adesão é avaliada por meio de testes de aglutinação em eritrócitos e em células, verificando-se que as cepas mais virulentas são mais hemaglutinantes (NAMAVAR; VUGHT; MACLAREN, 1991).

As espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* podem produzir enzimas extracelulares, como proteases, hialuronidases, neuraminidases,  $\beta$ -lactamase e condroitina

sulfatase (RUDEK; HAQUE, 1976). Algumas espécies do gênero *Bacteroides* podem produzir hemolisinas, que são proteínas citotóxicas que causam danos na integridade da membrana de hemácias. Foram descritas duas hemolisinas em *B. fragilis* - HlyA e HlyB -, que atuam juntas na hemólise dos eritrócitos (ROBERTSON *et al.*, 2006). A  $\beta$ -lactamase produzida por essas bactérias é em sua maioria do tipo cefalosporinases, que hidrolisam cefalosporinas e penicilinas, sendo este o principal mecanismo de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (ROGERS; PARKER; SMITH, 1993; EDWARD, 1997).

A neuraminidase possui a capacidade de clivar o complexo de glicoproteínas e polissacarídeos presente na superfície das células do hospedeiro ou mucina ricas em ácido siálico presente no lúmen intestinal, aumentando o crescimento dessas bactérias mediante a geração de glicose (GODOY *et al.*, 1993) A neuraminidase também tem a função de remover a parte terminal do ácido siálico, expondo o sitio de adesão para as adesinas e, em alguns casos, as adesinas do tipo lectina só conseguem se ligar ao receptor (ácido siálico e outros açúcares) após esse tratamento (PUMBWE; SKILBECK; WEXLER, 2006). Essas bactérias contêm vesículas na membrana externa, que mostra função hemaglutinante e atividade sialidase podendo estar relacionada com a virulência (DOMINGUES *et al.*, 1997).

*B. fragilis* exerce um importante papel na circulação enterohepática da bile auxiliando no processo de biotransformação destes sais, que por sua vez, auxiliam a digestão de lipídeos no intestino do homem. Esta bactéria possui muitas enzimas que são ativas nesta reação, como a hidrolase. Por outro lado, este micro-organismo tolera grande concentração de sais biliares, o que permite que a bactéria permaneça no intestino, um dos mecanismos envolvidos na tolerância a bile é a presença de bomba de efluxo (WEXLER, 2007).

Estas bactérias possuem lipopolissacarídeos (LPS) cujos efeitos biológicos resultam na amplificação da resposta inflamatória. Sua liberação ocorre quando as células bacterianas são fagocitadas e degradadas pelas células de defesa. A endotoxicidade dos lipopolissacarídeos da parede do *B. fragilis* é menor do que a observada em enteropatógenos clássicos. Os lipopolissacarídeos de *B. fragilis* apresentam diferenças entre seus constituintes e os de outras bactérias Gram-negativas. Estes não apresentam o ácido 3-aceto-2-deoxioctanóico, e a composição e quantidade de seus ácidos graxos também se diferenciam dos de outras bactérias Gram-negativas (SALYERS, 1984;

SOUZA; SCARCELLI, 2000; WEXLER, 2007; KONEMAN *et al.*, 2008).

Algumas cepas de *B. fragilis* enterotoxigênica possuem a capacidade de produzir uma enterotoxina chamada de fragilisina, uma metaloprotease de zinco com a capacidade de destruir zonas de aderência na junção do epitélio intestinal por clivagem da E-caderina, resultando no rearranjo do citoesqueleto de actina das células epiteliais e perda da junção do epitélio. A perda de eletrólitos por intermédio do desequilíbrio ocasionado pela fragilisina finaliza em diarreia (WU *et al.*, 1998). A fragilisina também estimula células epiteliais intestinais (HT29, T84 e Caco-2) a secretarem interleucina-8 (IL-8), iniciando o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para a submucosa intestinal, resultando em resposta inflamatória que aumenta a secreção de fluido intestinal (SANFILIPPO *et al.*, 2000). *B. fragilis* enterotoxigênica tem possível papel carcinogênico em câncer colorretal (TOPRAK *et al.*, 2006).

#### 2.1.5 Patogenicidade para o homem e cães

Apesar do número de isolados de *B. fragilis* ser de dez a 100 vezes menor do que outras espécies de *Bacteroides* intestinais, *B. fragilis* é, ainda, o anaeróbio mais frequentemente isolado de espécimes clínicos de pacientes doentes, sendo considerado como a espécie do gênero *Bacteroides* mais virulenta. Esses organismos escapam do intestino geralmente em consequência da ruptura do trato gastrintestinal ou de cirurgia intestinal, podendo causar sérias patologias, incluindo formação de abscesso em vários locais no organismo (ex: cérebro, cavidade abdominal, fígado e pulmão) como também bacteremias (WEXLER, 2007).

Infecções provocadas por anaeróbios são normalmente polimicrobianas, sendo *B. fragilis* encontrado na maioria dessas infecções com taxa de mortalidade estimada em cerca de 19% e em infecções não tratadas, a taxa de mortalidade relatada é de cerca de 60% (GOLDSTEIN, 1996). As infecções mais comumente causadas por *Bacteroides* são infecções intra-abdominais. Nestas infecções, com a ruptura da parede intestinal, a microbiota intestinal invade a cavidade peritoneal, que é normalmente estéril, resultando em infecção. A fase aguda da infecção geralmente dura 20 horas e as bactérias anaeróbias facultativas, como *E. coli*, colonizam inicialmente o local e tornam o ambiente mais favorável para bactérias anaeróbias por via da redução do potencial de oxirredução

(WEXLER, 2007). Essas bactérias também podem causar infecções ginecológicas, que geralmente acompanham a formação de abscesso e podem causar infecções em tecidos moles, mas não é a bactéria anaeróbia mais frequente (WEXLER *et al.*, 1998; OSBORNE, 2006).

As bactérias anaeróbias são responsáveis por até 17% das culturas de sangue positivas. Aproximadamente 50% dessas culturas são causadas por espécies do grupo *B. fragilis* (BROOK, 2010). O aumento do número de idosos e de pacientes comprometidos (como pacientes que fazem quimioterapia) são as principais causas para a crescente frequência de bacteremias por anaeróbios. Pesquisadores assumiram que o tratamento quimioterápico do câncer causa danos à mucosa gastrintestinal, permitindo que as bactérias anaeróbias do intestino atinjam a corrente sanguínea, fenômeno conhecido por translocação bacteriana (LASSMANN *et al.*, 2007).

Na Medicina Veterinária, relativamente poucos artigos relatando o isolamento de *Bacteroides* e *Parabacteroides*, com origem nas infecções em cães, são publicados. Em uma busca ativa realizada por meio do PubMed® e periódicos Capes, no dia 28 de novembro de 2012, utilizando as palavras-chave anaeróbios e cão, existem 69 artigos publicados nos últimos dez anos. Destes trabalhos veiculados, a maioria é relacionada a infecções orais e apenas cinco versam sobre a prevalência de *Bacteroides* em microbiota intestinal de cães e infecções. Quando se compara com o que é descrito para o homem, vê-se que, para este grupo, o número de publicações é bem maior, como também a frequência de estudos multicêntricos.

Dentre os poucos relatos descritos na literatura, Soki *et al.* (2002) realizaram um estudo em que isolaram uma cepa de *B. fragilis* resistente a imipenem de um abscesso prostático em um cão.

Nos Estados Unidos, Wagner *et al.* (2007) estudaram a prevalência de bactérias isoladas de 190 cães e 58 gatos suspeitos de doença hepatobiliar. Foi realizada cultura de tecido do fígado, tecido de vesícula biliar e amostras de bile. Nos cães, 5% das culturas hepáticas e 28% das culturas biliares foram positivos para o crescimento bacteriano. Das bactérias anaeróbias isoladas de todas as amostras positivas, o gênero prevalente foi *Bacteroides* (12%).

Na Europa, Silley *et al.* (2007) isolaram 141 cepas de anaeróbios de infecções orais, abscessos, infecções de feridas, e também da flora fecal de cães e gatos, e, destas, 28 cepas foram identificadas como pertencentes ao grupo *B. fragilis*.

Ledbetter e Scarlett (2008) estudaram a frequência de bactérias anaeróbias obrigatórias isoladas de amostras da córnea de animais domésticos com ceratite ulcerativa. Bactérias anaeróbias foram isoladas em 14% dos cães e os isolados mais frequentes foram *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Fusobacterium* e espécies do gênero *Bacteroides*. Esse estudo ressalta a importância de bactérias anaeróbias obrigatórias como *Bacteroides* na microbiota de ceratite ulcerativa de animais domésticos.

Wang *et al.* (2009) determinaram a população bacteriana em cães e gatos com abscesso orbital. Como resultado, as bactérias isoladas mais frequentemente nos abscessos orbitais foram *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Pasteurella*.

Abrahamian e Goldstein (2011) publicaram um artigo de revisão sobre a microbiologia das infecções de feridas em humanos que se seguem à mordedura de cães, gatos e outros animais. Com suporte na infecção provocada pela mordedura de cães, é relatado o isolamento, em ordem decrescente de frequência, dos anaeróbios *Fusobacterium* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella* sp., *Propionibacterium* sp., *Bacteroides* sp. e *Peptostreptococcus* sp. Ainda segundo os autores, *B. fragilis* pode ser isolado nestes casos, mas numa frequência menor (< 4%), já que a cavidade oral não é o sítio onde esta espécie predomina.

Numerosos ensaios envolvendo anaeróbios e doenças relacionadas à cavidade oral de cães, especialmente doença periodontal, são realizados, mas, como dito anteriormente, espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* não são frequentemente descritas neste sítio como patógenos oportunistas (DOMINGUES *et al.*, 1999; SENHORINHO *et al.*, 2011; DAHLEN *et al.*, 2012).

## **2.2 Biofilme**

Historicamente, as bactérias são estudadas como organismos isolados. Com o advento de técnicas sofisticadas de microscopia, entretanto se tornou claro que a maioria de bactérias existe em comunidades complexas, conhecidas como biofilmes. Biofilmes têm

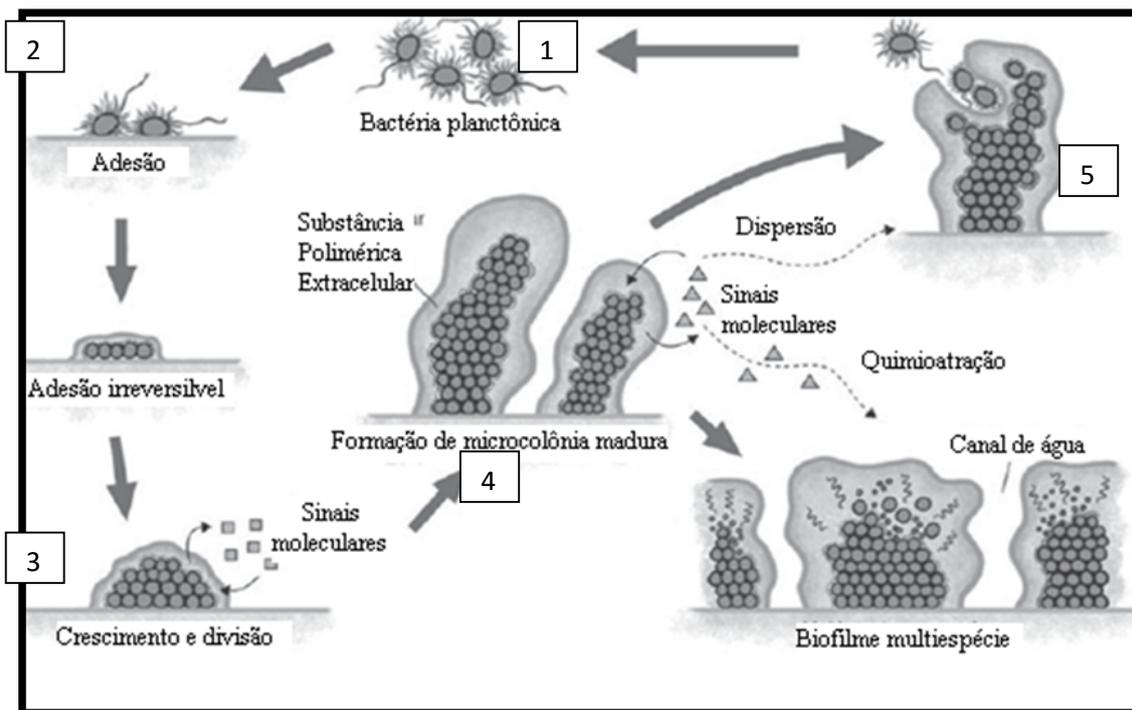
impacto sobre a humanidade de várias maneiras, à medida que podem formar em ambientes naturais, aparatos médicos e industriais e em tecidos vivos, participando de processos infecciosos no homem e animais (POST *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Características gerais do biofilme

Biofilme pode ser definido como uma comunidade multicelular altamente organizada de micro-organismos, entre eles as bactérias, envolvidos numa matriz de polímero extracelular, onde se concentram produtos de seu metabolismo juntamente com íons e nutrientes sequestrados do ambiente ecológico e em adesão a uma superfície biótica ou abiótica (COSTERTON *et al.*, 1995).

São descritas várias etapas na formação do biofilme (Figura 4) e esta se inicia com a adesão do micro-organismo em uma dada superfície que pode ser biótica ou abiótica. Uma vez que as bactérias se ligam a uma superfície, inicia uma autoagregação entre as bactérias, resultando na formação de microcolônias. Após a formação da microcolônia, o biofilme começa a se tornar maduro. Durante a maturação, a comunidade bacteriana produz substância polimérica extracelular (EPS), que a circunda e se liga à comunidade bacteriana. As bactérias no biofilme podem coordenar o seu comportamento, resultando na formação de complexos de estruturas tridimensionais. A estrutura tridimensional do biofilme pode ser plana ou em forma de cogumelo. Apesar da coordenação presente no biofilme, essa comunidade bacteriana exibe uma heterogeneidade funcional. O passo final da maturação do biofilme é a dispersão de bactérias do biofilme, as quais podem colonizar novas superfícies e formar outros biofilmes. A dispersão pode ser influenciada por vários fatores, incluindo degradação enzimática da matriz do biofilme (por exemplo, alginato liase), degradação enzimática do EPS do biofilme (por exemplo, hialuronidase) e lise celular (JACKES; ARAGON; TREMBLAY, 2010).

Figura 4. Etapas de formação do biofilme



Adaptado de JACKES; ARAGON; TREMBLAY. 2010

O alto nível de organização das bactérias no biofilme produz uma comunidade funcional coordenada, muito mais eficiente do que as populações mistas de organismos planctônicos. As células crescem, predominantemente, nesta matriz fechada, em que são protegidas das condições ambientais adversas e de agentes antibacterianos biológicos e químicos (COSTERTON *et al.*, 1995).

Os biofilmes são compostos, principalmente, por células microbianas e EPS. A EPS do biofilme não é geralmente uniforme. Leriche *et al.* (2000) utilizaram a especificidade de ligação de lectinas para açúcares simples para avaliar o biofilme bacteriano produzido por diferentes organismos. Como resultado, os pesquisadores mostraram que diferentes organismos produzem quantidades variadas de EPS e que a quantidade de EPS aumenta com a idade do biofilme.

Os biofilmes são heterogêneos, possuem em sua estrutura microcolônias compostas por células bacterianas revestidas por uma matriz de EPS e separadas das outras microcolônias por canais de água. O fluxo de líquido ocorre nestes canais de água, o que permite difusão de nutrientes, oxigênio e agentes antimicrobianos. Este conceito de heterogeneidade é descritivo, não só para biofilmes de cultura mista (como pode ser encontrado em biofilmes ambientais), mas também para biofilmes de culturas puras,

comuns em dispositivos médicos e associados com doenças infecciosas (LEWANDOWSKI, 2000).

A EPS pode associar-se com os íons metálicos, cátions divalentes e outras macromoléculas, tais como proteínas, polissacarídeos e DNA. A EPS também é altamente hidratada porque pode incorporar grandes quantidades de água em sua estrutura através de pontes de hidrogênio (DONLAN, 2002; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A formação do biofilme, como ocorre com eventos no seu interior, é orquestrada por comunicações químicas, essenciais para o adequado crescimento e para o desenvolvimento dos organismos que vivem em biofilme. Essa comunicação sucede dependente da densidade populacional (e da concentração de sinais) e o sistema é ativado em resposta a pequenos ferormônios produzidos pelas bactérias (moléculas bioquímicas) chamados de autoindutores. Este sistema é denominado de *quorum sensing*. É uma comunicação sofisticada usada para propagar várias atividades biológicas, incluindo a produção de fatores de virulência, iniciação e crescimento na comunidade do biofilme (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994; MILLER; BASSLER, 2001).

O sistema *quorum sensing* pode ser dividido em quatro etapas: produção de moléculas sinalizadoras pelas células bacterianas, liberação dessas moléculas, reconhecimento dessas moléculas sinalizadoras por receptores específicos e, ao ultrapassar o limiar de concentração, resulta na mudança do gene regulador. Uma consequência comum da indução do sistema *quorum sensing* na expressão do gene é o aumento da síntese de proteínas envolvidas na produção de moléculas sinalizadoras. Esse aumento da síntese de moléculas sinalizadoras cria um *feedback* positivo, razão por que os sinais moleculares são comumente chamados de autoindutores (SIFRI, 2008).

Pelo menos seis tipos de sistemas *quorum sensing* foram descritos em bactérias patogênicas. Nas bactérias Gram-negativas, o sistema de comunicação é feito por meio da N-acilhomoserina lactona (AHLs). Em razão do seu pequeno tamanho, e por serem lipofílicas, as AHLs difundem-se livremente através das membranas celulares e a concentração dentro da célula se aproxima da concentração presente extracelularmente. À medida que a densidade da população aumenta, a AHL intracelular se liga ao receptor *LuxR* em uma concentração suficiente dentro do citoplasma para induzir a expressão do gene. As bactérias Gram-positivas se comunicam mediante a produção e detecção de

oligopeptídeos modificados, chamados peptídeos autoindutores (FUQUA; PARSEK; GREENBERG, 2001; SIFRI, 2008).

Os biofilmes também proporcionam um ambiente ideal para a troca de DNA extracromossômico (plasmídeos). A conjugação (o mecanismo de transferência de plasmídeo entre bactérias) ocorre em maior quantidade entre as células em biofilmes do que entre as células na forma planctônicas (EHLERS; BOUWER, 1999). A razão provável para o aumento da conjugação é que o ambiente do biofilme proporciona o contato mais próximo entre as células. Uma vez que os plasmídeos podem codificar resistência para múltiplos agentes antimicrobianos, a associação de células do biofilme também fornece um mecanismo para promover e propagar a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos (HAUSNER; WUERTZ, 1999; GHIGO, 2001).

Bactérias crescendo em biofilme podem causar infecções crônicas, caracterizadas por inflamação persistente e dano tecidual. Infecções crônicas são infecções que persistem, a despeito de antibioticoterapia, sistema imune inato e adaptativo e resposta inflamatória do hospedeiro (HOIBYA *et al.*, 2010).

O estágio maduro do biofilme mostra o máximo de tolerância a antibióticos. Nessa fase existem diferentes concentrações de nutrientes e oxigênio da superfície para o interior do biofilme. No interior do biofilme, onde há menor quantidade destes elementos, ocorrem uma diminuição da atividade metabólica e o aumento do tempo de duplicação das bactérias. As células com baixa atividade metabólica são as responsáveis pela tolerância do biofilme aos antibióticos. Monoterapia com antibióticos, tais como  $\beta$ -lactâmicos, que são ativos apenas contra células se dividindo, não são, portanto, eficiente na erradicação de infecções causadas por biofilme. Mecanismos convencionais de resistência, tais como produção de enzimas que degradam antibióticos, bombas de efluxo e mutações em moléculas-alvo de antibióticos em bactérias no biofilme, também, contribuem para a sobrevivência do biofilme (HOIBYA *et al.*, 2010).

Alguns estudos revelam que a concentração subinibitória de alguns antibióticos pode agir como agonistas na formação de biofilme *in vitro*. A concentração de antibiótico que induz a formação máxima de biofilme difere para cada antibiótico. Para a maioria dos antibióticos, são testadas duas concentrações, 1/2CIM e 1/4 CIM, entretanto, as concentrações maiores do que 1/2 CIM induzem a máxima formação de biofilme na maioria dos antibióticos (KAPLAN, 2011). Subrt *et al.* (2011) testaram concentrações

subinibitórias de alguns antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em cepas de *S. aureus* e tiveram como resultado o aumento de formação de biofilme por essas cepas.

As concentrações subinibitória de tobramicina, um antibiótico da classe aminoglicosídeo, induz a formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Para a maioria das bactérias, o tratamento com a concentração subinibitória de alguns antibióticos pode estimular a produção de exopolissacarídeo. A concentração subinibitória de imipenem aumenta a produção do exopolissacarídeo alginato em *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, aumenta a produção de biofilme (HOFFMAN *et al.*, 2005).

Costa *et al.* (2012) estudaram a formação de biofilme sob a ação de concentrações subinibitórias de enrofloxacin em cepas de *E. coli* isoladas de mastite bovina. A densidade óptica do biofilme foi lida no espectrofotômetro e foi observado que houve o aumento da densidade óptica nas cepas tratadas com o antibiótico, quando comparada com as cepas não tratadas. Esse estudo sugere que a enrofloxacin pode agir induzindo a formação de biofilme e esse fenômeno aumenta a presença de mastite persistente, uma vez que a concentração subinibitória de enrofloxacin pode ocorrer em virtude da presença de edema na região úbere causada pela mastite clínica, que impede parcialmente a distribuição do agente antimicrobiano para os sítios de infecção.

### 2.2.2 Biofilme, bactérias anaeróbias e Medicina Veterinária

*B. fragilis* é a principal bactéria anaeróbia isolada do intestino em seres humanos que pode formar biofilme. Por meio da adesão à parede intestinal do hospedeiro como mecanismo de sobrevivência, a espécie *B. fragilis* se torna parte da microbiota normal. O mecanismo de aderência de *B. fragilis* nas células do epitélio ocorre por diferentes tipos de interação fimbria, adesinas e formação de biofilme (PUMBWE *et al.*, 2007).

Donelli *et al.* (2012) estudaram a formação de biofilme por bactérias anaeróbias do trato intestinal. Entre as bactérias anaeróbias Gram-negativas testadas para a formação de biofilme, as espécies *B. fragilis*, *F. necrophorum*, *P. intermedia*, bem como *Veillonella* spp., foram as que mais produziram biofilme. Na pesquisa da sequência do genoma de *B. fragilis*, foi identificado o gene regulador *LuxR* (envolvido na formação do biofilme). A presença desse gene está relacionada com o sistema de *quorum sensing* de bactérias Gram-negativas chamado sistema *LuxRI*. Esse sistema é utilizado para comunicação entre

bactérias Gram-negativas por meio da produção de sinais de AHLs, onde *LuxR* e *LuxI* são genes reguladores envolvidos com a produção e detecção desses sinais. Homólogos de *LuxR* controlam a ativação de vários genes em resposta a sinais de moléculas autoindutoras (PUMBWE; SKILBECK; WEXLER, 2008).

No que concerne à formação de biofilme por bactérias anaeróbias, o que mais tem sido estudado são os biofilmes da cavidade oral. Apesar de possuir grande quantidade de oxigênio na boca, este oxigênio é rapidamente consumido por bactérias aeróbias (por exemplo, *Neisseria* spp.) ou anaeróbias facultativas (por exemplo, *Streptococcus* e *Actinomyces* spp.) e outros gases (como: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) são libertados, resultando na redução do potencial redox. Especialmente os biofilmes, tais como placa dentária, criam as condições adequadas para desenvolvimento de bactérias anaeróbias obrigatórias na cavidade oral (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011). Bactérias orais em humanos, em sua maioria, são anaeróbias, vivem em comunidades de multiespécies no biofilme conhecido como placa dental. As comunidades microbianas que formam as superfícies dos dentes são constituídas por várias espécies, das quais os colonizadores iniciais são *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Veillonella* e o colonizador tardio é *Fusobacterium* (KOLENBRANDER *et al.*, 2006).

Existe uma diversidade de micro-organismos patogênicos Gram-negativos e positivos de importância veterinária que podem formar biofilme. Os biofilmes constituídos por esses patógenos são resistentes aos antibióticos comumente usados na Medicina Veterinária. Dentre os micro-organismos mais estudados que formam biofilme na Medicina Veterinária estão: *Actinobacillus*, grupo *Bacillus cereus*, *Burkholderia*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Yersinia* (JACKES; ARAGON; TREMBLAY, 2010). Moreira *et al.* (2012) estudaram espécies do gênero *Staphylococcus*, isoladas de 54 animais com otite e a sua capacidade de produzir biofilme. As espécies isoladas com maior frequência foram *S. intermedius* e *S. simulans* e em 30% as cepas foram produtoras de biofilme.

Embora exista poucos estudos sobre biofilmes de *Bacteroides* em animais, essas comunidades microbianas parecem estar envolvidas em muitas doenças como pneumonia, abscesso hepático, enterite, infecções de feridas e infecções de mastite. O impacto da formação de biofilme bacteriano na Medicina Veterinária é evidente em razão do aumento da resistência a antibióticos, desinfetantes e a resposta imune do hospedeiro (JACKES; ARAGON; TREMBLAY, 2010).

## 2.3 Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana entre micro-organismos comensais e patógenos representa uma grande ameaça para a saúde pública humana e animal. Atualmente a preocupação está muito relacionada ao rápido desenvolvimento de resistência bacteriana e à demora ocorrente a introdução de novos grupos de antibióticos na prática clínica. O desenvolvimento da resistência é acelerada e deve-se à capacidade das bactérias adquirirem genes de múltipla resistência, pelo uso excessivo de antibióticos na Medicina Humana e Veterinária, na agricultura e em alimentos, aumentando o risco de disseminação de genes de bactérias multirresistentes para os seres humanos. O contato do homem com animais domésticos pode servir como uma fonte de infecção para o humano, em especial no que diz respeito à resistência antimicrobiana (CLARKE, 2006).

### 2.3.1 Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos de bactérias anaeróbias

Quatro drogas ou grupos de drogas são ativas contra a maioria das bactérias anaeróbias de significância clínica: nitroimidazóis como metronidazol, carbapenênicos como o imipenem, cloranfenicol e combinações de drogas  $\beta$ -lactâmicas com inibidores de  $\beta$ -lactamase. Outras três drogas também são eficazes contra anaeróbios, mas são menos ativas do que os grupos mencionados há pouco. Esses agentes são cefoxitina, clindamicina e penicilinas de largo espectro, como ticarcilina ou piperacilina. Cepas do grupo *B. fragilis* apresentam de 15% a 25% de resistência a essas drogas na maioria dos hospitais dos Estados Unidos (FINEGOLD; WEXLER, 1996; SNYDMAN *et al.*, 2007).

Muitos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprim, a maioria das quinolonas, e monobâmicos, têm fraca atividade contra muitos ou a maioria dos anaeróbios (FINEGOLD; WEXLER, 1996).

Algumas cefalosporinas como ceftizoxime e cefotetan também são ativas contra bactérias anaeróbias. Essas drogas devem ser usadas em infecções como: infecção do trato genital feminino, úlcera nos pés ou abscessos em tecidos moles. O uso desses agentes também serve para guardar drogas mais potentes para infecções mais graves. Em sua

maioria, as infecções anaeróbias são mistas, envolvendo bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, e sendo geralmente necessário adicionar outros antimicrobianos na terapia antimicrobiana para que todos os micro-organismos da infecção sejam tratados (FINEGOLD; WEXLER, 1996).

As taxas de resistência podem variar entre as espécies do grupo *B. fragilis*. A resistência, mesmo para drogas mais ativas - como imipenem, piperacilina-subactam e metronidazol - tem aparecido em algumas cepas ocasionais (SCHARPIRO *et al.*, 2004; PUMBWE *et al.*, 2007).

As espécies do gênero *Bacteroides* contêm os mais diversos mecanismos de resistência e maiores taxas de resistências de todas as bactérias anaeróbias (SÓKI *et al.*, 2006). A resistência a alguns agentes antimicrobianos decorre, pelo menos, de um dos seguintes mecanismos: alteração de afinidade do alvo, redução da penetração do antibiótico em virtude de permeabilidade ou bomba de efluxo ou presença de enzimas inativadoras (SNYDMAN *et al.*, 2002).

O mecanismo comum de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é a produção da enzima  $\beta$ -lactamase, que quebra o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando o antimicrobiano. Quatro tipos de  $\beta$ -lactamases são encontrados no grupo *B. fragilis*, sendo a mais comum a do tipo cefalosporinase, que não tem ação sobre cefoxitina ou imipenem (ROGERS; PARKER; SMITH, 1993). Os carbapenêmicos são degradados por enzimas (classe B de metallo- $\beta$ -lactamase) produzidas por dois genes, *cfiA* e *ccrA*. Essas enzimas conferem resistência a carbapenêmicos,  $\beta$ -lactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamase. A resistência aos carbapenêmicos também pode ser mediada por bomba de efluxo (PUMBWE; CHANG, *et al.*, 2006; PUMBWE; WAREHAN *et al.*, 2007)

Além de poder inativar enzimaticamente antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, esses micro-organismos possuem a capacidade de modificar as proteínas ligadoras de penicilina, essas proteínas estão envolvidas na formação de parede celular são alvo de penicilinas e outros  $\beta$ -lactâmicos que atuam na parede celular, fazendo com que essas drogas percam sua ação (EDWARDS, 1997).

As espécies de *Bacteroides* são naturalmente resistentes aos aminoglicosídeos que atuam inibindo a síntese de proteínas se ligando a subunidade 30S do ribossomo. A penetração através da membrana citoplasmática nesta classe de antibiótico é um processo

aeróbio dependente de energia, de modo que as bactérias anaeróbias são resistentes aos aminoglicosídeos (BRYAN; KOWAND; ELZEN, 1979).

Os macrolídeos (como azitromicina) e a lincosamina (como clindamicina) inibem a síntese de proteína, por se ligar em à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, bloqueando a saída da cadeia peptídica em crescimento. A resistência à clindamicina, um antibiótico usado comumente durante as últimas décadas para infecções causadas por bactérias anaeróbias, tem aumentado consideravelmente. A resistência à clindamicina e à azitromicina ocorre por meio da metilação do alvo de ligação dessas drogas no ribossomo (ROBERTS, 2003).

O cloranfenicol se liga à peptidil-transferase do ribossomo na bactéria, prevenindo a biossíntese de proteína. A resistência ocorre em razão da enzima cloranfenicol acetiltransferase, que acetila o antimicrobiano, impedindo a sua ligação ao ribossomo e, conseqüentemente, o seu efeito (BRITZ; WILKINSON, 1978).

O grupo das tetraciclínas se liga à subunidade 30S do ribossomo inibindo a síntese de proteína. Esse agente foi a primeira linha de antibiótico usada para tratar infecções anaeróbias e permaneceu indicado até próximo à década de 1970. Atualmente, quase todos os isolados de *B. fragilis* são resistentes (80 a 90%) às tetraciclínas. O gene *tetQ* é um de vários que codificam um proteína citoplasmática que interage com o ribossomo, bloqueando o sítio de ligação da tetraciclina (SALYERS; SPEER; SHOEMAKER, 1990). A resistência em *Bacteroides* a tetraciclina também é descrita por bomba de efluxo (PUMBWE *et al.*, 2006).

Embora a resistência ao metronidazol permaneça baixa (< 1%), os microorganismos resistentes ao metronidazol estão começando a ser detectados. A redução de sensibilidade ao metronidazol é atribuída a mudanças nos genes *nim*. Cinco genes *nim* (*nimA – E*) podem estar presentes nas cepas de *Bacteroides*. Os genes *nim* podem estar associados com seqüências de inserção que codificam 5-nitroimidazol-redutase. Essa enzima converte 4- ou 5-nitroimidazol para 4- ou 5-aminoimidazol, evitando a formação de radical nitroso tóxico, essencial para atividade do antimicrobiano (HAGGOUD *et al.*, 1994; STUBBS *et al.*, 2000; LOFMARK *et al.*, 2005). A resistência às quinolonas aparece mais frequentemente. As quinolonas inibem duas enzimas, DNA-girase e DNA-topoisomerase IV, que ajudam na replicação do DNA, e a mutação nessas enzimas, na

maioria das vezes, é a causa mais comum de resistência às quinolonas (RICCI *et al.*, 2004). A resistência às quinolonas também pode ocorrer por meio do aumento da atividade de bombas de efluxo (PUMBWE; CHANG *et al.*, 2006; RICCI *et al.*, 2004).

A transferência horizontal de genes (plasmídeos e transposons) por meio da conjugação em procariontes lidera a variação genética e aquisição de genes de resistência. Espécies de *Bacteroides* intestinais apresentam três tipos de plasmídeos - pBF4, pBFTM10 e pBI136 - que codificam altos níveis de resistência a macrolídeo, lincosamida e estreptogramina por meio do gene *erm* conservado. Os transposons conjugativos (CTn) no gênero *Bacteroides* exercem papel central na disseminação de genes de resistência a antibióticos; o principal transposon conjugativo identificado em *Bacteroides* é CTnDOT. CTnDOT carrega resistência a tetraciclina, *tetQ*, e ao gene de resistência a eritromicina, *ermF*. O alto nível de resistência a antibióticos nas espécies do gênero *Bacteroides* é preocupante, pois este pode ser um reservatório de resistência para outras bactérias altamente patogênicas (QUESADA, 2011).

As bombas de efluxo contribuem para resistência a várias drogas em *Bacteroides*. Essas bombas exibem uma ampla especificidade e podem agir sinergicamente como barreira permeável e resultar em significativa resistência intrínseca a muitos antibióticos (NIKAIDO, 2001). São identificados 16 tipos de bombas de efluxo de resistência a multidrogas da família Resistance-Nodulation-Division (RND) em *B. fragilis*, nomeadas de *bmeABC1 – 16* (UEDA *et al.*, 2005). A bomba de efluxo da família Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) também foi descrita em *B. thetaiotaomicron* (nomeada de *BexA*) (MIYAMAE *et al.*, 2001).

Estudos multicêntricos de monitoração de sensibilidade a antimicrobianos em *Bacteroides* isolados de espécimes clínicos ou microbiota intestinal normal do homem são efetuados em vários países.

No período de 2000 e 2007, em alguns países da Europa, a resistência desses microorganismos aos antibióticos imipenem, cefoxitina, clindamicina, cloranfenicol e metronidazol foi de menos de 10% em 3140 isolados, exceto para clindamicina, que mostrou mais de 35% de resistência (SNYDMAN *et al.*, 2010). Estudos na Coreia, nos anos de 2007 e 2008, revelaram 5% de resistência dos isolados a cefoxitina, 2% a

imipenem, 11% a moxifloxacina, 33% a clindamicina e sensibilidade absoluta para cloranfenicol e metronidazol (LEE *et al.*, 2010).

Carvalho *et al.* (1996), em Fortaleza, realizaram um estudo com o objetivo de analisar a resistência de espécies do grupo *B. fragilis* de amostras clínicas e microbiota intestinal a antimicrobianos. A espécie *B. fragilis* representou 68% das espécies do grupo *B. fragilis* encontradas nas amostras clínicas e 51% nas amostras fecais. Todas as amostras estudadas foram sensíveis ao cloranfenicol e ao metronidazol. A resistência a penicilina, tetraciclina, clindamicina e cefoxitina em espécimes clínicos foi de: 93,5%, 80,5%, 21,7% e 10,9%, respectivamente, e, em amostras fecais, de 78,4%, 73%, 19% e 5,4% respectivamente.

No Brasil, em São Paulo, no ano de 2011, a resistência de espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* isolados de microbiota intestinal de crianças para cefoxitina foi de 23%, clindamicina 34,2%; amoxicilina+ ácido clavulânico foi de 47,3%, tetraciclina 53,5% e penicilina 99% (NAKANO *et al.*, 2011).

Wareham *et al.* (2005), pela primeira vez, reportaram cepas de *B. fragilis* multirresistentes. Os autores analisaram cepas de *B. fragilis* isoladas de um paciente com sepse por bactérias anaeróbias, simultaneamente resistentes a carbapenêmicos,  $\beta$ -lactâmicos associados a inibidores de  $\beta$ -lactamase e metronidazol. Estudos posteriores entre a variedade de mecanismos de resistência confirmaram a presença do gene carbapenemase (*cfiA*), resistência estreptogramina, lincosamina e macrolídeo associado ao gene *erm*, plasmídeo localizado no gene *tetQ* com resistência a tetraciclina e genes com o aumento da expressão para bomba de efluxo (PUMBWE; CHANG *et al.*, 2007).

Sherwood *et al.* (2011) estudaram cepas de *B. fragilis* isoladas de um homem que sofreu um acidente e fraturou a tíbia e fíbula em um ambiente de esgotos com águas contaminadas. O paciente iniciou a terapia com carbapenêmicos por longo prazo e as feridas continuavam com secreção purulenta. A falha clínica persistiu ao iniciar o tratamento com metronidazol. O resultado do teste de sensibilidade de *B. fragilis* mostrou resistência a penicilina, clindamicina, metronidazol, cefoxitina, meropenem, imipenem, piperacilina/tazobactam e tigeciclina. Os antibióticos para os quais *B. fragilis* mostrou sensibilidade foram somente linezolida e moxifloxacina.

As espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*, quando comparadas a outras bactérias anaeróbias, são caracterizadas pela alta resistência às drogas antimicrobianas utilizadas na clínica médica humana e veterinária (ÁVILA *et al.*, 1991). No Brasil, a análise microbiológica e de sensibilidade às drogas antimicrobianas de bactérias anaeróbias não constitui uma rotina nas clínicas laboratoriais, em decorrência de limitações, como o lento crescimento dos micro-organismos, a natureza polimicrobianas em infecções por anaeróbios, a complexidade, os custos dos métodos de cultivo e a carência de técnicos especializados. Esse fato dificulta o conhecimento dos padrões de sensibilidade desses micro-organismos.

### 2.3.2 Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos de bactérias anaeróbias isoladas de cães

Há poucos estudos sobre resistência a antimicrobianos em bactérias anaeróbias e menos ainda é conhecido sobre espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides*.

Silley *et al.* (2007) compararam a ação da pradofloxacina, uma nova fluoroquinolona desenvolvida para uso veterinário, com outras fluoroquinolonas contra bactérias anaeróbias isoladas de cães e gatos. Os autores isolaram 141 cepas de anaeróbios de infecções orais, abscessos, infecções de feridas e também da microbiota fecal de cães e gatos e, destas, 28 cepas pertenciam ao grupo *B. fragilis*. Como resultado do teste de sensibilidade, detectaram maior atividade da pradofloxacina, seguida da marbofloxacina, enrofloxacina e outras contra bactérias anaeróbias.

Stegemann *et al.* (2006) estudaram a ação de cefovecina, uma nova cefalosporina, em 2.641 isolados clínicos (por exemplo: ferida, pele, cavidade oral, abscesso, trato urinário, ouvido e olho) de cães e gatos nos Estados Unidos e em países da Europa. Foram isoladas 32 cepas do gênero *Bacteroides* em um total de 286 patógenos anaeróbios. Como resultado do teste de sensibilidade, todas as bactérias anaeróbias foram sensíveis a cefovecina.

Na Hungria, houve um isolado de *Bacteroides* em um cão de nove anos que estava com enfermidade clínica há quase quatro anos. Com quadro clínico de disúria desde cinco anos de idade, e posterior formação de abscesso na próstata, o animal foi tratado inicialmente com amoxicilina-ácido clavulânico. Depois de três anos, o cachorro foi

tratado com cotrimoxazol em virtude da nova formação do abscesso na próstata. *B. fragilis* foi isolado e foi feito o tratamento com metronidazol por sete semanas. Foram realizados testes de sensibilidade em *B. fragilis*, identificando resistência a penicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefoxitina, meropenem e imipenem. Esse achado prova que cepas de *B. fragilis* resistente a imipenem estão também presentes em animais domésticos, apesar de os carbapenêmicos serem raramente usados no tratamento de infecções em animais. Essas cepas podem causar infecções endógenas no próprio animal e também podem ser transmitidas para a população humana (SÓKI *et al.*, 2002).

Nos últimos dez anos, atenção é dirigida à possibilidade de transferência direta de micro-organismos resistentes entre animais de estimação e as pessoas, pois existe o contato físico em ambientes domésticos e uso dos mesmos agentes antibacterianos em seres humanos e animais. Na revisão sobre o papel dos animais de estimação como reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos, os veterinários usam frequentemente, como primeira linha de antibacterianos, amoxicilina+ clavulanato, cefalosporinas e fluoroquinolonas em animais de companhia. A resistência tanto em bactérias patogênicas como em bactérias comensais apresenta um significativo risco de transferência zoonótica entre animais e pessoas (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004). Cepas resistentes a antimicrobianos isoladas de animais de pequeno porte, muitas vezes, são indistinguíveis de cepas isoladas de pessoas que cuidam destes animais (CLARKE, 2006).

## **2.4 Relevância do estudo**

Cepas isoladas de amostras intestinais normais são importantes, pois a microbiota endógena pode desempenhar um papel protagonista na disseminação de resistência (*B. fragilis* é considerado reservatório de genes de resistência no intestino) e pode se tornar patógeno oportunista, causando infecção no próprio animal (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004).

Outra questão importante diz respeito ao fato de os cães servirem como reservatórios de micro-organismos e ser uma fonte de infecção para pessoas susceptíveis. A circulação de cepas resistentes a antimicrobianos de animais para o homem já é bem documentada (CLARKE, 2006). O conhecimento do perfil de sensibilidade desse grupo microbiano isolado de animais é importante porque, na Medicina Veterinária esta avaliação

não é feita na rotina laboratorial, tampouco é feita a monitorização periódica. Esse fato torna o número de infecções por Bacteroidales na Medicina Veterinária subestimado e, por isso, ainda existem poucos estudos (NGUYEN *et al.*, 2000).

### 3. HIPÓTESES

1. *B. fragilis* e *B. vulgatus* devem constituir as espécies mais frequentemente isoladas da microbiota intestinal de cães.
2. A sensibilidade das cepas a maioria dos antibióticos será baixa dado ao amplo uso de alguns destes antimicrobianos na clínica veterinária.
3. A concentração subinibitória de diferentes antimicrobianos terá ação na redução de formação de biofilme.

## 4. OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de isolamento e a sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas de cães

### 4.1 Objetivos Específicos

1. Identificar as espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* em de amostras fecais de cães;
2. Avaliar o perfil de sensibilidade dessas bactérias a diferentes classes de antibióticos;
3. Analisar a formação de biofilme de cepas da espécie *B. fragilis* na presença de concentrações subinibitórias de diferentes antimicrobianos;
4. Visualizar o biofilme de cepas de *B. fragilis* e a viabilidade celular decorrente da ação subinibitória dos antimicrobianos imipenem, clindamicina e enrofloxacina por meio de microscopia confocal.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Aspectos éticos

O presente trabalho faz parte de um projeto colaborativo UFC/UECE denominado “Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias anaeróbias e facultativas isoladas da microbiota normal e de infecção em animais” o qual foi submetido ao Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e aprovado (número do protocolo: 10610110-2/57, APÊNDICE I).

### 5.2 Animais utilizados

Foram analisadas amostras fecais de cães saudáveis, com idade limitada até um ano e sem distinção de sexo e raça, os animais que estavam fazendo o uso de antimicrobianos foram excluídos da pesquisa. Foi realizada a coleta no período de fevereiro a junho do ano de 2011, após a autorização dos proprietários dos animais (APÊNDICE II) e da Clínica Veterinária da UECE. Foi aplicado um questionário onde foram coletados os dados do animal como: raça, idade, uso de antimicrobianos e outras informações (APÊNDICE III).

### 5.3 Coleta dos espécimes clínicos

Foram analisadas 50 amostras da microbiota intestinal que foram coletadas através de swab retal e em seguida colocadas em meio para transporte (Cary & Blair modificado/DIFCO®). Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório dentro do período de até 4 horas e então foram processadas imediatamente (OPLUSTIL *et al.*, 2010).

### 5.4 Isolamento e identificação das espécies da ordem *Bacteroidales*

As amostras coletadas foram semeadas em meio seletivo Agar *Bacteroides* Bile Esculina (BBE/DIFCO®) e incubadas em condições de anaerobiose à 37 °C, por 48 horas. A anaerobiose foi obtida pela adição do envelope gerador de anaerobiose/Anaerobac (PROBAC®) em jarra de anaerobiose (PROBAC/DIFCO®). Após o tempo de incubação, as colônias foram observadas e as colônias escuras (devido à hidrólise de esculina) foram examinadas quanto às suas características morfo-tintoriais pela coloração de Gram. Elas foram também inoculadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI/DIFCO®) e incubadas em atmosfera convencional por 24/48 horas. Todos os meios de cultura foram suplementados com hemina (5 mg/ml), menadione (1 mg/ml) e cisteína (0,5 mg/ml) (OPLUSTIL *et al.*, 2010).

Primeiramente foi realizado o teste de aerotolerância para confirmar que o micro-organismo suspeito se tratava de uma bactéria anaeróbia. Esse teste consiste em repicar cada colônia isolada de placa em anaerobiose em uma placa de agar sangue e incubar em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. Se o micro-organismo crescer apenas na atmosfera anaeróbia, confirma a presença de uma bactéria anaeróbia. Em seguida a identificação presuntiva foi realizada determinando-se a produção de catalase, hidrólise da esculina, produção de indol e crescimento em meio com bile. A identificação definitiva da espécie foi realizada pelas reações de fermentação dos açúcares arabinose, ramnose, celobiose, trealose e xilose em meio enriquecido com peptona. Todos os isolados identificados em cultura pura foram estocados em BHI com glicerol (20 %) a -20 °C (KONEMAN *et al.*, 2008).

## 5.5 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa foi realizada na Universidade de Costa Rica, Laboratório de Investigação em Bacteriologia Anaeróbia. Para o envio das cepas foram utilizados criotubos com 1,5 mL de meio semi-sólido BHI contendo um swab embebido com cepa obtida a partir de um crescimento recente em agar BHI suplementado com sangue desfibrinado de carneiro (5%). Para a cromatografia gasosa as bactérias foram cultivadas em agar BBE suplementado com 5% de sangue de carneiro, vitamina K (1 mg/mL)/hemina (5 mg/mL). As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C em anaerobiose. As colônias crescidas nas placas foram inoculadas em caldo BHI suplementado com vitamina

K/hemina e incubadas nas mesmas condições por 6 a 8 horas. Após o crescimento, cada cepa foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. No sedimento foi adicionado hidróxido de sódio, água destilada, metanol e colocado em banho maria à 100 °C durante 30 minutos. Depois do aquecimento, ácido clorídrico, metanol, ácido sulfúrico e metanol foram adicionados, a amostra foi colocada novamente em banho maria à 80 °C durante 10 minutos e em seguida num banho de gelo. Foi adicionado éter e metil-terbutil-éter, a solução foi então homogeneizada durante 10 minutos e a fase inferior foi removida. Na parte superior foi adicionada água destilada e hidróxido de sódio e foi misturado durante 5 minutos. Em seguida, a parte superior (ácidos graxos) foi colocada num frasco especial para cromatografia. A cromatografia foi feita num cromatógrafo gasoso (Modelo 6850, Agilent Technologies®) e a análises dos padrões de ácidos graxos foi feito pelo software MIDI Sherlock (Agilent Technologies®) (KONEMAN *et al.*, 2008).

#### 5.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (técnica de microdiluição em caldo)

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes drogas das cepas de *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, padronizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Como controle foi empregado uma cepa padrão de *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) cuja sensibilidade é conhecida (CLSI, 2007, M11-S1, 2011).

##### 5.6.1 Antimicrobiano, meio de cultura e inóculo

Para realização da técnica de microdiluição foi utilizada uma microplaca de 96 poços com fundo “u” e os antimicrobianos foram amoxicilina-ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacina, imipenem, metronidazol, penicilina e tetraciclina (SIGMA®). O meio de cultura utilizado foi o caldo Brucella (100 µL/DIFCO®) suplementado com sangue lisado de cavalo e para a diluição seriada dos antimicrobianos foi utilizado 100 µL da solução contendo cada antibiótico, a concentrações testadas para todos os antimicrobianos foram de 0,125 µg/mL à 256 µg/mL. O solvente utilizado para cefoxitina, clindamicina, penicilina e tetraciclina foi água destilada, para amoxicilina-ácido clavulânico e imipenem foi tampão fosfato com pH 6 e 7,2 respectivamente, para ciprofloxacina e enrofloxacina foi hidróxido de sódio 0,1N, para

metronidazol foi dimetil sulfóxido e cloranfenicol foi utilizado etanol 95%. O diluente utilizado para cefoxitina, clindamicina, penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, enrofloxacina, cloranfenicol e metronidazol foi água destilada e para amoxicilina-ácido clavulânico e imipenem foi tampão fosfato com pH 6 e 7,2 respectivamente.

Para a padronização do inóculo, partimos do crescimento recente do micro-organismo em meio de cultura líquido (24 horas). Essa suspensão foi diluída em caldo Brucella, até atingir a turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland, em seguida essa suspensão foi diluída em 15 vezes em caldo Brucella para atingir a concentração de  $1 \times 10^7$  UFC/mL. O inóculo (10  $\mu$ L) foi adicionado nas microplacas para atingir a concentração final  $1 \times 10^6$  UFC/mL. As microplacas com as microdiluições dos antimicrobianos e o micro-organismo foram incubadas durante 48 horas à 37 °C em jarras de anaerobiose (CLSI, 2007).

#### 5.6.2 Leitura e interpretação dos resultados

Após a incubação, foi feita a leitura das microplacas, utilizando como padrão de crescimento os controles das cepas cultivadas em caldo Brucella sem adição de antibióticos. Foi considerada a CIM do antimicrobiano para cada cepa testada, a menor concentração de cada agente antimicrobiano capaz de inibir crescimento bacteriano visível (CLSI, 2007).

#### 5.7 Ação de concentrações subinibitórias de antibióticos sobre formação de biofilme de cepas *B. fragilis*

De todas as cepas isoladas, foram selecionadas quatro cepas da espécie *B. fragilis* com formação de biofilme variada. A identificação das cepas formadoras de biofilme foi feita pelo método de adesão em microplaca. As cepas cresceram em anaerobiose por 48 horas e por meio de microplacas de 96 poços com a adição de 20  $\mu$ L da bactéria padronizada na turvação de 0,5 MacFarland e 180  $\mu$ L de caldo BHI suplementado com 1% de glicose. Após esse período, a densidade óptica do cristal violeta retido pelo biofilme foi lida no espectrofotômetro a 540 nm. Após o crescimento das cepas selecionadas de *B. fragilis* em BHI suplementado com hemina e menadiona à 37 °C por 24 horas foi preparada uma turvação de 0,5 McFarland em caldo Brucella. Foi retirado 20  $\mu$ L dessa

suspensão e adicionada a 180µL de caldo Brucella com antibióticos (cefexotina, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacina, imipenem e metronidazol (SIGMA®) em concentrações de 1/2 CIM e 1/4 CIM de cada antibiótico referente às cepas testadas sendo acondicionada em uma microplaca de 96 poços de fundo chato. As microplacas foram incubadas à 37 °C por 24 horas e 48 horas. Depois desse período, as microplacas foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS) para remover células planctônicas e em seguida o biofilme foi fixado à 60 °C por 60 minutos. As bactérias remanescentes foram coradas com 200µL de solução de cristal violeta à 0,01% por 20 minutos à temperatura ambiente. Depois desse período, os poços foram lavados mais três vezes com PBS para remover o excesso da solução de cristal violeta que não corou as bactérias aderidas (figura 5). Foram adicionados 200 µL de etanol a 95 % para solubilizar o cristal violeta que corou o biofilme. As placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente, a densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro (Multiscan FC, Thermo Scientific®) a 540 nm de comprimento de onda e registrados de acordo com a formação do biofilme. Os testes foram feitos em triplicata e repetidos em quatro ocasiões diferentes. Como controle negativo foi utilizado apenas o caldo Brucella e controle positivo para o padrão de formação de biofilme, as cepas a serem testadas com o meio Brucella (PUMBWE; SKILBECK *et al.*, 2007; MAESTRE *et al.*, 2012).

Figura 5. Formação de biofilme por cepas de *B. fragilis* sobre a ação de concentração subinibitória de antibióticos

Droga 1 (A), Droga 2 (B), Droga 3 (C),  
Droga 4 (D), Droga 5 (E) e Droga 6 (F).  
As drogas estão em triplicata e na  
concentração decrescente de: CIM, 0,5x  
CIM e 0,25x CIM.

Fileira H: controle positivo (coluna 1 a  
6) e negativo (coluna 7 a 12)



SILVA. J. O.

## 5.8 Microscopia confocal

As mesmas quatro cepas usadas no estudo do biofilme sobre a ação de clindamicina, enrofloxacin e imipenem foram analisadas no microscópio confocal. A concentração padronizada foi de 1/2 CIM. As cepas de *B. fragilis* (200 µL padronizadas em uma turvação de 0,5 McFarland) cresceram em lamínulas embebidas em 1800 µL de caldo Brucella por um período de 48 horas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão fosfato e fixadas com paraformaldeído 3,7% à temperatura ambiente por 30 minutos. As lamínulas foram coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (3,35µM Syto-9, corante verde para células vivas e 20 µM iodido de propidium, corante vermelho para células mortas), adicionando 1 mL de água destilada com a mistura de 3µL de cada corante por 15 minutos no escuro. O corante foi então aspirado e a lamínula contendo o biofilme foi lavada com água destilada. A viabilidade do biofilme foi examinada imediatamente com microscópio de exploração a laser confocal (Olympus FV 1.000®) que pertence ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI) localizado no centro de Biomedicina. Para o controle positivo de formação biofilme foi utilizada a cepa de *B. fragilis* em caldo Brucella sem adição de antibiótico (DONELLI *et al.*, 2012).

## 5.9 Análise estatística

Para cada cepa testada foi calculada a média da triplicata dos valores obtidos do DO<sub>540</sub> na presença e na ausência dos antimicrobianos. Os valores do DO<sub>540</sub> das cepas na ausência e presença dos antibióticos foram comparados individualmente e depois foi feita a comparação em relação ao tempo de formação do biofilme (24 e 48 horas) aplicando o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni comparação múltipla, usando GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows. Um P valor <0,05 foi considerado como significativo (POMPILIO *et al.*, 2011).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Isolamento e identificação

Das cinquenta amostras coletadas, foram isoladas 30 cepas dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* e destas, as espécies mais isoladas (64%) foram *B. fragilis* e *P. distasonis*. As espécies *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *P. merdae* e *B. eggerthi* foram isoladas em menor frequência (36%).

### 6.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Todas as cepas foram sensíveis a cloranfenicol, imipenem e metronidazol. Amoxicilina-ácido clavulânico foram ativas contra 97% das bactérias estudadas e cefoxitina foi ativa contra 93% das cepas. Tetraciclina foi ativa contra 50% das cepas e clindamicina contra 33%. Todas as cepas foram resistentes a penicilina (tabela 1). Ciprofloxacina e enrofloxacina não possuem ponto de corte para bactérias anaeróbias.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* isoladas de microbiota normal de cães

Antibióticos	Concentração inibitória Mínima (µg/mL)			% Sensibilidade
	Intervalo	50	90	
Penicilina	1 – 128	32	64	0%
Amox/Ac. Clav	0,25/0,125 - 8/4	0,5/0,25	2/1	97%
Cefoxitina	1 – 64	8	16	93%
Imipenem	0,125 – 4	0,5	2	100%
Clindamicina	0,5 – 128	16	128	33%
Cloranfenicol	0,25 – 8	2	4	100%
Metronidazol	0,125 – 8	1	2	100%
Tetraciclina	0,064 – 32	8	32	50%

Cepa controle: *B.fragilis* ATCC 25285

Enrofloxacina: Intervalo CIM: 0,125 – 4; CIM 50: 1; CIM 90: 2.

Ciprofloxacina: Intervalo CIM: 8 – 32; CIM 50: 8; CIM 90: 32.

### 6.3 Biofilme

Imipenem e metronidazol foram os antibióticos que apresentaram maior atividade na redução de formação de biofilme, com ação nas quatro cepas testadas, porém, imipenem foi o que mais teve ação, com a redução máxima de 87,57%. Cefoxitina, clindamicina, cloranfenicol reduziram a formação de biofilme em três cepas, com a redução máxima de 66,15%, 83,48% e 86,49% respectivamente. Em relação à indução da formação de biofilme, cefoxitina induziu em uma cepa e enrofloxacina em duas cepas. A indução máxima de formação de biofilme em enrofloxacina foi de -46,49% (tabela 2).

Não houve diferença de ação dos antibióticos entre os períodos estudados (24 e 48 horas) e a concentração que obteve maior redução na formação de biofilme foi 1/2 CIM, e esta, foi a concentração que mais induziu a formação de biofilme em enrofloxacina.

Tabela 2. Formação de biofilme de cepas *B. fragilis* sobre a ação concentração subinibitória de diferentes antibióticos em 48 horas

DROGA	CEPAS	CIM	CONTROLE	½ CIM	%RD	¼ CIM	% RD
CEFOXITINA	29C2	4	0,77 <sup>bb</sup>	0,5727 <sup>b</sup>	25,62%	0,7303	5,15%
	33C2	4	0,373 <sup>aa</sup>	0,1567 <sup>b</sup>	57,98%	0,2488	33,29%
	42C3	8	0,4527 <sup>aa</sup>	0,269 <sup>b</sup>	40,57%	0,2932	35,23%
	44C7	8	0,872 <sup>aa</sup>	0,3067 <sup>b</sup>	64,80%	0,3486	60,00%
CLINDAMICINA	29C2	16	0,77 <sup>aa</sup>	0,1272 <sup>b</sup>	83,48%	0,3079	60,00%
	33C2	16	0,373 <sup>bb</sup>	0,3292 <sup>b</sup>	11,74%	0,3256	12,70%
	42C3	8	0,4527 <sup>ab</sup>	0,201 <sup>a</sup>	55,59%	0,3684	18,62%
	44C7	4	0,872 <sup>ab</sup>	0,4257 <sup>b</sup>	51,18%	0,4755	45,50%
CLORAMFENICOL	29C2	8	0,77 <sup>aa</sup>	0,104 <sup>b</sup>	86,49%	0,1098	85,74%
	33C2	2	0,373 <sup>ab</sup>	0,248 <sup>b</sup>	33,51%	0,3229	13,43%
	42C3	1	0,4527 <sup>aa</sup>	0,2632 <sup>b</sup>	41,90%	0,284	37,26%
	44C7	1	0,872 <sup>aa</sup>	0,2851 <sup>b</sup>	67,30%	0,4833	44,60%
ENROFLOXACINA	29C2	0,125	0,77 <sup>bb</sup>	0,5707 <sup>b</sup>	25,88%	0,5661	26,48%
	33C2	1	0,373 <sup>bb</sup>	0,5098 <sup>b</sup>	-36,67%	0,4552	-22,03%
	42C3	0,25	0,4527 <sup>bb</sup>	0,6632 <sup>b</sup>	-46,49%	0,4995	-13,34%
	44C7	0,25	0,872 <sup>ab</sup>	0,4059 <sup>b</sup>	53,45%	0,5536	36,50%
IMIPENEM	29C2	0,5	0,77 <sup>aa</sup>	0,09624 <sup>b</sup>	87,50%	0,09574	87,57%
	33C2	0,125	0,373 <sup>aa</sup>	0,1619 <sup>b</sup>	56,59%	0,1427	61,74%
	42C3	1	0,4527 <sup>aa</sup>	0,1373 <sup>b</sup>	69,67%	0,1538	63,61%
	44C7	0,5	0,872 <sup>aa</sup>	0,1654 <sup>b</sup>	81,00%	0,21	75,90%
METRONIDAZOL	29C2	1	0,77 <sup>aa</sup>	0,1794 <sup>b</sup>	76,70%	0,2159	71,96%
	33C2	1	0,373 <sup>ab</sup>	0,1713 <sup>b</sup>	54,07%	0,1933	48,17%
	42C3	0,5	0,4527 <sup>aa</sup>	0,2307 <sup>b</sup>	49,00%	0,2419	46,56%
	<b>44C7</b>	<b>2</b>	<b>0,872<sup>ab</sup></b>	<b>0,5763<sup>b</sup></b>	<b>33,90%</b>	<b>0,5744</b>	<b>34,10%</b>

<sup>a</sup> = Redução significativamente estatística

<sup>b</sup> = Redução não significativamente estatística

% Rd = redução em percentual

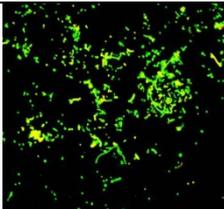
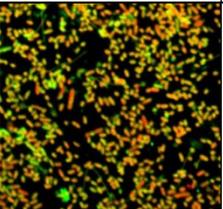
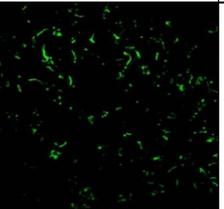
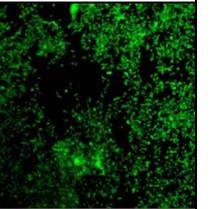
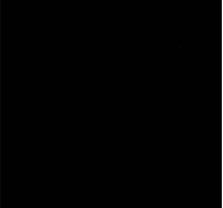
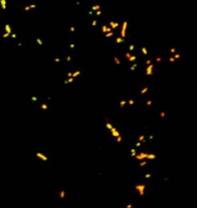
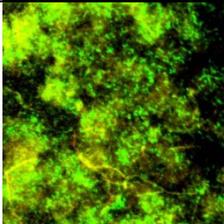
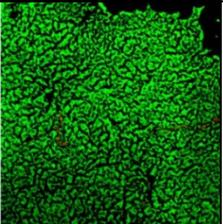
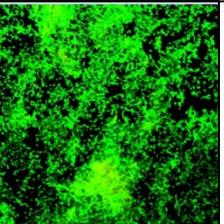
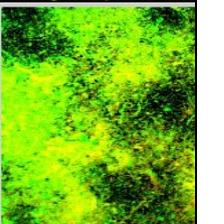
<sup>aa</sup> = significativamente estatística comparando o controle com 1/2CIM e 1/4CIM

#### 6.4 Microscopia confocal

Em relação aos controles, podemos perceber que as cepas 29C2 e 44C7 apresentam biofilmes mais espessos quando comparados com as cepas 33C2 e 42C3. A microscopia confocal confirmou que imipenem foi a droga que obteve maior capacidade na inibição de formação de biofilme, com significante redução de viabilidade celular por espécies de *B. fragilis* seguida da clindamicina com menor ação sobre essas cepas. A clindamicina reduziu significativamente as células viáveis nas cepas 29C2, 42C3 e 44C7, e na cepa

33C2 reduziu a viabilidade celular porém as células permaneceram fixadas à superfície da lamínula (figura 6).

Figura 6. Ação de 1/2 CIM de antibióticos sobre a formação de biofilme de quatro cepas da espécie *B. fragilis* no período de 48 horas

Antimicrobianos	Cepa 29C2	Cepa 33C2	Cepa 42C3	Cepa 44C7
<b>A</b> Clindamicina				
<b>B</b> Imipenem				
<b>C</b> Controle				

## 7. DISCUSSÃO

As cepas pertencentes ao grupo *B. fragilis*, especialmente a espécie *B. fragilis*, são micro-organismos anaeróbios comumente associados a uma grande variedade de infecções clínicas. Nesse estudo, *B. fragilis* foi a espécie mais frequentemente isolada do trato intestinal de cães, seguido por *B. vulgates*, *P. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *P. merdae*, *B. eggerthi*. Os dados são consistentes com a literatura, onde as espécies mais frequentemente isoladas da microbiota intestinal de cachorros são *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *P. distasonis* (WAGNER, K. A.; HARTMANN, F. A.; TREPANIER, L. A., 2007).

Os testes de sensibilidade antimicrobiana realizados nesse estudo revelaram que penicilina não teve eficácia contra as cepas testadas. A resistência de *Bacteroides* a penicilina foi inicialmente observada em 1966. A mais alta prevalência da taxa de resistência à penicilina entre todas as bactérias anaeróbias é do grupo *B. fragilis*, e as taxas de resistência alcançam quase 100% em muitos estudos. A produção de diferentes tipos de  $\beta$ -lactamases representa o mais importante mecanismo de resistência desses micro-organismos para essa droga (HAWSER *et al.*, 2010; SNYDMAN *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas um aumento na resistência para cefamicinas (cefotitina e cefotetan) tem sido reportado pelo grupo *B. fragilis* isolado de humanos, dados nos quais foram também encontrados em nosso estudo, com a taxa de resistência de 7%. Em contraste, as taxas de resistência à amoxicilina associada ao ácido clavulânico e imipenem encontradas foram baixas, como relatado na medicina humana (HAWSER *et al.*, 2010; SNYDMAN *et al.*, 2010).

Clindamicina é um derivado semi-sintético de lincomicina, no qual foi considerada a droga de escolha na terapia de infecções anaeróbias durante muitas décadas. Entretanto, a resistência tem aumentado significativamente ao longo das duas últimas décadas. Foi encontrado nesse estudo sensibilidade de 33% à clindamicina. Mecanismos de resistência à clindamicina em anaeróbios incluem mutação no sítio de ligação do alvo ribossomal, resistência mediada por bomba de efluxo e genes de eritromicina metilases (*erm*). Determinantes de resistência, incluindo os genes *erm*, são frequentemente carregados em

elementos transmissíveis como transposons conjulgativos e plasmídios contribuindo para a disseminação deles (SNYDMAN *et al.*, 2010).

Os resultados de altas taxas de sensibilidade para o metronidazol nesse estudo são similares aos descritos na literatura em cepas isoladas de humanos. Metronidazol, um 5-nitroimidazol, tem sido considerado, por muitas décadas, como um importante agente terapêutico no tratamento de infecções anaeróbias. A resistência é ainda incomum na Europa com as mais altas taxas (7%) em Reino Unido (NAKANO, *et al.*, 2007).

Ciprofloxacina e enrofloxacin são antimicrobianos comumente usados na medicina veterinária, mas critérios interpretativos para o ponto de corte de sensibilidade não foram estabelecidos para quinolonas. Consequentemente, a atividade *in vitro* contra bactérias anaeróbias pode somente ser estudada como concentrações inibitórias mínimas (SILLEY *et al.*, 2007; CLSI 2007). Estudos testando ciprofloxacina contra bactérias anaeróbias isoladas de infecções humanas mostram valores de CIM50 e CIM90 de 8 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente, esses dados são similares aos resultados obtidos em nosso estudo com cães. Por outro lado, CIM50 e CIM90 de enrofloxacin nesse estudo foram menores que os descritos (CIM50 e CIM90 de 2 µg/mL e 8 µg/mL) em estudos de cepas isoladas de cães e gatos (GOLDSTEIN, 1996).

A alta sensibilidade aos antimicrobianos observado nesse estudo pode ser devido ao baixo uso de antibióticos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Ceará. Os serviços clínicos fornecidos para pessoas de baixo poder aquisitivo que não podem pagar por cuidados médicos e não possuem recursos para comprar medicamentos caros. As taxas de resistência à clindamicina e tetraciclina foram altas e tetraciclina não pode ser prescrita para animais com idade até um ano, que foi a idade dos animais examinados nesse estudo. Em relação à alta taxa de resistência à clindamicina e tetraciclina encontrada nesse estudo, precisamos determinar se existe uma pressão seletiva no ambiente, que não seja uso de antimicrobianos, que contribui para espalhar e manter os genes de resistência e que explique o alto nível de resistência em áreas onde antibióticos parecem não estar presentes (SALYERS; SPEER; SHOEMAKER, 1990).

O resultado terapêutico efetivo dos antibióticos é melhor quando a concentração é acima do CIM. Entretanto, depois de certo período de tempo com determinada dose, as concentrações de antibióticos dentro de muitos tecidos se torna menor que o CIM (sub-

CIMs). Micro-organismos frequentemente crescem na presença de sub-CIMs, embora não seja capaz de inativar os micro-organismos, são potencialmente capazes de alterar química e fisicamente as características da superfície celular e conseqüentemente a funcionalidade e expressão de algumas propriedades de virulência como adesão, formação de biofilme, hidrofobicidade e motilidade (SPROULE-WILLOUGHBY *et al.*, 2010; GUAGLIANONE *et al.*, 2010; DONELLI *et al.*, 2012). A maioria dos estudos sobre os efeitos de concentrações sub-CIMs de antibióticos tem focado em *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*, não há estudos na literatura envolvendo *B. fragilis* (WOJNICZ, JANKOWSKI, 2007; MAJTÁN *et al.*, 2008).

Como esperado, imipenem mostrou ótimo efeito na redução de formação do biofilme e clindamicina mostrou aproximadamente 50% de redução. A literatura tem demonstrado que concentrações sub-CIMs de alguns antimicrobianos são capazes de induzir a formação de biofilme por certas espécies bacterianas. Recentemente foi reportada a produção de biofilme por *E. coli* isolada de mastite bovina sendo induzida por concentrações subinibitórias de enrofloxacin (WOJNICZ, JANKOWSKI, 2007). Em nosso estudo, 2 de 4 cepas de *B. fragilis* formadoras de biofilme, quando expostas a concentrações de sub-CIM de enrofloxacin (1/2CIM e 1/4CIM) mostrou maiores valores de densidade óptica quando comparados ao controle positivo ( $P < 0,05$ ) como mostrado na tabela 2 e figura 5. Esses dados poderiam ser usados como referência para escolha do antibiótico para o tratamento de infecções crônicas em cães.

## 8. CONCLUSÃO

Nesse estudo, as espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Parabacteroides* com mais alta frequência de isolamento foram iguais as descritas na literatura, em cães. As cepas mostraram altas porcentagens de sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados, como reportado na literatura. Uma baixa sensibilidade a clindamicina e tetraciclina foi observada. As concentrações de sub-CIM de cefoxitina, clindamicina, cloranfenicol, metronidazol e imipenem reduziram a formação de biofilme nas cepas estudadas e enrofloxacin induziu a formação de biofilme. Esses resultados corroboram com estudos, de concentrações de sub-CIM desses antimicrobianos com outras bactérias, encontradas na literatura.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento (FUNCAP) pelo suporte financeiro dado para a realização deste trabalho. Esta pesquisa não poderia ter sido feita sem a cooperação da Clínica Veterinária da UECE e o suporte técnico de José Olavo Moraes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMANIAN, F. M.; GOLDSTEIN, E. Microbiology of animal bite wound infections. *Clinical Microbiology reviews*, v. 24, p. 231-246, 2011.

AVILA, C. M. J.; CARVALHO, M. A.; DAMASCENO, C. A. V.; CHARTONE-SOUZA, E.; CISALPINO, E. O. Population stability in species of the *Bacteroides fragilis* group, under mercuric choride action. *Reviews Microbiology*, v. 22, p. 93-96, 1991.

BAUGHN, A. D.; MALAMY, M. H. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*, v. 427, p. 441-444, 2004.

BEENA, V. K.; SHIVANANDA, P. G. In vitro adjesiveness of *Bactaroides fragilis* in relation to encapsulation. *India Journal of Medical Research*, v. 105, p. 258-261, 1997.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p.625–651. 2005.

BRITZ, M. L.; WILKINSON, R. G. Chloramphenicol acetyl-transferase of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 14, p. 105–111. 1978.

BROOK, I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe*, v. 16, p. 183–189, 2010.

BRYAN, L. E.; KOWAND, S. K.; ELZEN, H. M. V. Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 15, p. 7-13, 1979.

CARVALHO, C. B. M.; MOREIRA, J. L. B.; FERREIRA, M. C. Epidemiology and antimicrobial resistance of *B. fragilis* group organisms isolated from clinical specimen and human intestinal microbiota. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, p. 329-335, 1996.

CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *B. vulgatus*: designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thataiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 26, p. 230-237, 1976.

CLARKE, C. R. Antimicrobial Resistance. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v. 36, p. 987-1001. 2006.

Clinical And Laboratory Standards Institute - CLSI. Approved Standard – M11-A7.

Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, 7 ed., 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. CLSI document M11-S1. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; informational supplement. 2011.

COSTA, J. M. C.; ESPESCHIT, I. F.; PIERI, F. A.; BENJAMIN, L. A.; MOREIRA, M. A. S. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin. *Veterinary Microbiology*, v. 160, p. 488-90, 2012.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; SCOTT, H. M. L. Microbial biofilms. *Annual Reviews Microbiology*, v. 49, p. 711-45. 1995.

DAHLEN, G.; CHARALAMPAKIS, G.; ABRAHAMSSON, I.; BENGTSSON, L.; FALSEN, E. Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *Journal Periodontal Research*, v. 47, p.354-64. 2012.

DOMINGUES, L. M.; ALESSI, A. C.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; DUTRA, L. S. Microbiota saprófita associada à doença periodontal em cães. *Arquivo Brasileiro de medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 51, p.1-6, 1999.

DOMINGUES, R. M.; SOUZA, W. G. S.; MORAES, S. R.; AVELAR, K. E.; HIRATA, J. R.; FONSECA, M. E.; FERREIRA, M. C. Surface vesicles: a possible function in commensal relations of *Bacteroides fragilis*. *Zentbl Bakteriologie*, v. 285, p. 509–517. 1997.

DONELLI, G.; VUOTTO, C.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 65 p. 318–325, 2012.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, p. 881-890, 2002.

EDWARDS, R. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Bacteroides* spp. *Journal Medical Microbiology*, v. 46, p. 979-986, 1997.

EHLERS, L. J.; BOUWER, E. J. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Science Technology*, v. 7, p.163–171, 1999.

FINEGOLD, S. M.; WEXLER, H. M. Present Status of Therapy for Anaerobic Infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 23, p. 9-14, 1996.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology*, v. 38, p. 623-633, 2010.

FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review Genetic*, v. 35 p. 439–68, 2001.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 269-275, 1994.

GHIGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, v. 412, p. 442-445, 2001.

GILMORE, M. S.; FERRETTI, J. J. The Thin Line Between Gut Commensal and Pathogen. *Science*, v. 299, p. 1999-2002, 2003.

GODOY, V. G.; DALLAS, M. M.; RUSSO, T. A.; MALAMY, M. H. A Role for *Bacteroides fragilis* Neuraminidase in Bacterial Growth in Two Model Systems. *Infection And Immunity*, v. 61, p. 4415-4426, 1993.

GOLDSTEIN, E. J. C. Anaerobic Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 23, p. 97-101, 1996.

GUAGLIANONE, E., CARDINES, R., VUOTTO, C., DI ROSA, R., BABINI, V., MASTRANTONIO, P., & DONELLI, G. Microbial biofilms associated with biliary stent clogging. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 59, p. 410-20, 2010.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 321-32, 2004.

HAGGOUD, A.; REYSSET, G.; AZEDDOUG, H.; SEBALD, M. Nucleotide Sequence Analysis of Two 5-Nitroimidazole Resistance Determinants from *Bacteroides* Strains and of a New Insertion Sequence Upstream of the Two Genes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 38, p. 1047-1051, 1994.

HAUSNER, M.; WUERTZ, S. High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3710-3713, 1999.

[HIRSH](#), D. C.; [MACLACHLAN](#), N. J.; [WALKER](#), R. L. *Veterinary Microbiology*. 2 ed., Iowa State University Press. 2004, 536 p.

HOFFMAN, L. R.; D'ARGENIO, D. A.; MACCOSS, M. J.; ZHANG, Z.; JONES, R. A.; MILLER, S.L. Aminoglycoside Antibiotics Induce Bacterial Biofilm Formation. *Nature*, v. 436, p. 1171-1175, 2005.

HOIBYA, N.; BJARNSHOLTA, T.; GIVSKOVB, M.; MOLINC, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, p.322-332, 2010.

HOLDEMAN, L. V.; MOORE, W. E. C. *Anaerobe laboratory manual*, 3rd ed., Virginia Polytechnic Institute and State University. 1975, 132p.

- HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. How host-microbial interactions shape The nutrient environment of the Mammalian intestine. *Annual Reviews of Nutrition*, v. 22, p. 283–307. 2002.
- JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y. D. N. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews*, p. 1-25, 2010.
- JIA, J.; FRANTZ, N.; KHOO, C.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A.; MCCARTNEY A. L. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. *FEMS Microbiol Ecol.* v. 71, p. 304–312, 2010.
- KAPLAN, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *The International Journal Artificial Organs*, v. 34, p. 737-751. 2011.
- KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; RICKARD, A. H.; JAKUBOVICS, N. S.; CHALMERS, N. I.; DIAZ, P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000, v. 42, p. 47–79, 2006.
- KONEMAN, E. W. *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica. 2008. 1527p.
- KULAGINA, E. V.; EFIMOV, B. A.; MAXIMOV, P. Y.; KAFARSKAIA, L. I.; CHAPLIN, A. V.; SHKOPOROV, A. N. Species composition of *Bacteroidales* order bacteria in the feces of healthy people of various age. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 76, p. 169-171, 2012.
- LASSMANN, B.; GUSTAFSON, D R.; WOOD, C M.; ROSENBLATT, J E. Reemergence of Anaerobic Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44. p. 895–900, 2007.
- LEDBETTER, E. C.; SCARLETT, J. M.; Isolation of obligate anaerobic bacteria from ulcerative keratitis in domestic animals. *Veterinary Ophthalmology*. v. 11, p. 114 –122, 2008.
- LEE, Y.; PARK, Y.; KIM, M. S.; YONG, D.; JEONG, S. H.; LEE, K.; YUNSOP, CHONG. Antimicrobial Susceptibility Patterns for Recent Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria in South Korea. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 54, p. 3993–3997, 2010.
- LERICHE, V.; SIBILLE, P.; CARPENTIER, B. Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1851–1856, 2000.
- LEWANDOWSKI, Z. Structure and function of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. *Amsterdam: Harwood Academic Publishers*. 2000. p. 1–17.
- LOESCHE, W. J. Oxygen Sensitivity of Various Anaerobic Bacteria. *Applied Microbiology*, v. 18, p. 723-727, 1969.

LOFMARK, S.; FANG, H.; HEDBERG, M.; EDLUND, C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 49, p. 1253–1256, 2005.

MAESTRE, J. R.; AGUILAR, L.; MATEO, M.; GIMENEZ, M. J.; MENDEZ, M. L.; ALOU, L.; GRANIZA, J. J.; PRIETO, J. In vitro interference of tigecycline at subinhibitory concentrations on biofilm development by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p. 1-4, 2012.

MARSH, P. D.; MOTER, A.; DEVINE, D. A. Dental Plaque Biofilms: Communities, Conflict And Control. *Periodontology* 2000, v. 55, p. 16–35, 2011.

MAJTÁN J, MAJTÁNOVÁ L, XU M, MAJTÁN V., *In vitro* effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* isolated in Slovakia, *Journal Applied Microbiology*, v. 104, p. 294-1301, 2008.

MENTULA, S.; HARMOINEN, J.; HEIKKILA, M.; WESTERMARCK, E.; RAUTIO, M.; HOUVINEN, P.; KONONEN, E. Comparison between Cultured Small-Intestinal and Fecal Microbiotas in Beagle Dogs. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, p. 4169-4175, 2005.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing In Bacteria. *Annual Review Microbiology*, v. 55, p. 165–99, 2001.

MIYAMAE, S.; UEDA, O.; YOSHIMURA, F.; HWANG, J.; TANAKA, Y.; NIKAIDO, H. A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 3341–3346, 2001.

MOREIRA, C. A.; OLIVEIRA, L. C.; MENDES, M. S.; SANTIAGO, T. M.; BARROS, E. B.; CARVALHO, C. B. M. Biofilm production by clinical staphylococci strains from canine otitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 371-374, 2012.

NAKANO, V.; SILVA, A. N.; MERINO, V. R. C.; WEXLER, H. M.; CAMPOS, M. J. A. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. *Clinics*, v. 66, p. 543-547, 2011.

NAMAVAR, F.; VUGHT, M. A. J. J. V-V.; MACLAREN, D. M. A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. *Journal of General Microbiology*, v. 137, p. 1431-1435, 1991.

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

NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Cell & Developmental Biology*, v. 12, p. 215–223, 2001.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010, 544p.

OSBORNE, N. G., The Role of *Bacteroides fragilis* in Pelvic Infections. *Journal Of Gynecologic Surgery*, v. 22, p.81-82, 2006.

PATRICK, S.; GILPIN, D.; STEVENSON, L. Detection of Intrastrain Antigenic Variation of *Bacteroides fragilis* Surface Polysaccharides by Monoclonal Antibody Labelling. *Infection And Immunity*, v. 67. p. 4346–4351, 1999.

PATRICK, S.; LUTTON, D. *Bacteroides fragilis* surface structure expression in relation to virulence. *Médecine et Maladies Infectieuses*, p. 19-25, 1990.

POMPILIO, A.; SCOCCHI, M.; POMPONIO, S.; GUIDA, F.; PRIMIO, A.; FISCARELLI, E.; GENNARO, R.; BONAVENTURA, G. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients. *Peptides*, v. 32, p. 1807-1814, 2011.

POST, J. C.; HILLER, N. L.; NISTICO, L.; STOODLEY, P.; EHRLICH, G. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*, v. 15, p. p 347-351, 2007.

PUMBWE, L.; WAREHAM, D. W.; ADUSE-OPOKU, J.; BRAZIER, J. S.; WEXLER, H. M. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clinical Microbiology Infectious*, v. 13, p. 183–189, 2007.

PUMBWE, L.; CHANG, A.; SMITH, R. L.; WEXLER, H. M. Clinical significance of overexpression of multiple RND-family efflux pumps in *Bacteroides fragilis* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 543–548, 2006.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A.; WEXLER, H. M. The *Bacteroides fragilis* cell envelope: quarterback, linebacker, coach—or all three? *Anaerobe*, v. 12, p. 211–220, 2006.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A.; NAKANO, V.; CAMPOS, M. J. A.; PIAZZA, R. M. F.; WEXLER, H. M. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microbial Pathogenesis*, v. 43, p. 78-87, 2007.

PUMBWE, L.; SKILBECK, C. A.; WEXLER, H. M. Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. *Microbiology Ecology*, v. 56, p. 412–419, 2008.

QUESADA, G. C. *Bacteroides* mobilizable and conjugative genetic elements: antibiotic resistance among clinical isolates. [Revista Espanola Quimioterapia](#), v. 24, p. 184-90, 2011.

RICCI, V.; PETERSON, M. L.; ROTSCHAFFER, J. C.; WEXLER, H.; PIDDOCK, L. J. Role of topoisomerase mutations and efflux in fluoroquinolone resistance of *Bacteroides fragilis* clinical isolates and laboratory mutants. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 48, p. 1344–1346, 2004.

ROBERTS, M. C. Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamide-streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe*, v. 9, p. 63–69, 2003.

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. *Infection And Immunity*, v. 74, p. 2304–2316, 2006.

ROCHA, E. R.; SELBY, T.; COLEMAN, J. P.; SMITH, J. Oxidative Stress Response in an Anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a Role for Catalase in Protection against Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 6895–6903, 1996.

ROGERS, M. B.; PARKER, A. C.; SMITH, C. J. Cloning and Characterization of the Endogenous Cephalosporinase Gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* Reveals a New Subgroup of Ambler Class A  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 37, p. 2391-2400, 1993.

RUDEK, W.; HAQUE, R. U. Extracellular enzymes of the genus *Bacteroides*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 4, p. 458–460. 1976.

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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1599-1605, 2006.

SAKAMOTO, M.; SUZUKI, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA I.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.* 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v 52, p. 841-849, 2002.

SALYERS, A. A. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annual Reviews Microbial*, v. 38, p. 293-313, 1984.

SALYERS, A. A.; SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B. New perspectives in tetracycline resistance. *Molecular Microbiology*, v. 4, p. 151–156, 1990.

SANFILIPPO, L.; LI, C. K. F.; SETH, R.; BALWIN, T. J.; MENOZZI, M. G.; MAHIDA, Y. R. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) by human colonic epithelial cells. *Clinical Experimental Immunology*, v. 119, p. 456-463, 2000.

SCHAPIRO, J. M.; GUPTA, R.; STEFANSSON, E.; FANG, F. C.; LIMAYE, A. P. Isolation of Metronidazole-Resistant *Bacteroides fragilis* Carrying the *nimA*

Nitroreductase Gene from a Patient in Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 4127–4129, 2004.

SENHORINHO, G. N. A.; NAKANO, V.; LIU, C.; SONG, Y.; FINEGOLD, S. M.; CAMPOS, M. J. A. Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe*, v. 17, p. 257-258, 2011.

SHERWOOD, J. E.; FRASER, S.; CITRON, D. M.; WEXLER, H.; BLAKELY, G.; JOBLING, K.; PATRICK, S. Multi-drug resistant *Bacteroides fragilis* recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan. *Anaerobe*, v. 17, p. 152-155, 2011.

SIFRI, C. D. Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense. *Healthcare Epidemiology*, V. 47, p. 1070-1076, 2008.

SILLEY, P.; STEPHAN, B.; GREIFE, H. A.; PRIDMORE, A. Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 999-1003, 2007.

SNYDMAN, D. R.; JACOBUS, N. V.; MCDERMOTT, L. A.; GOLAN, Y.; HECHT, D. W.; GOLDSTEIN, E. J. C.; HARRELL, L.; JENKINS, S.; NEWTON, D.; PIERSON, C.; RIHS, J. D.; YU, V. L.; VENEZIA, R.; FINEGOLD, S. M.; ROSENBLATT, J. E.; GORBACH, S. L. Lessons Learned from the Anaerobe Survey: Historical Perspective and Review of the Most Recent Data (2005–2007). *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, p. 26–33, 2010.

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

SNYDMAN, D. R.; JACOBUS, N. V.; MCDERMOTT, L. A.; RUTHAZER, R.; GOLDSTEIN, E. J.; FINEGOLD, S. M.; HARRELL, L. J.; HECHT, D. W.; JENKINS, S. G.; PIERSON, C.; VENEZIA, R.; RIHS, J.; GORBACH, S. L. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends for 1997-2000. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. 126–134, 2002.

SÓKI, J.; GAL, M.; BRAZIER, J. S.; ROTIMI, V. O.; URBÁN, E.; NAGY, E.; DUERDEN, B. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 212–220, 2006.

SÓKI, J.; FODOR, E.; URBÁN, E.; NAGY, E.; EDWARDS, R.; LAJOS, Z.; VRABELY, T. Isolation and characterization of an imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strain from a prostate abscess in a dog. *Veterinary Microbiology*, v. 84 p. 187–190, 2002.

- SONG, Y.; LIU, C.; LEE, J.; BOLANOS, M.; VAISANEN, M.-J.; FINEGOLD, S. M. “*Bacteroides goldsteinii* sp. nov.” Isolated from Clinical Specimens of Human Intestinal Origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 4522–4527, 2005.
- Sproule-Willoughby, K.M., Stanton, M.M., Rioux, K.P., McKay, D.M., Buret, A.G., & Ceri, H. In vitro anaerobic biofilms of human colonic microbiota, *Journal of Microbiological Methods*, v. 83, p. 296-301, 2010.
- SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. *Arquivos Do Instituto Biológico*, v.67, p. 275-281, 2000.
- STEGEMANN, M. R.; PASSMORE, C. A.; SHERINGTON, J.; LINDEMAN, C. J.; PAPP, G.; WEIGEL, D. J.; SKOGERBOE, T. L. Antimicrobial Activity and Spectrum of Cefovecin, a New Extended- Spectrum Cephalosporin, against Pathogens Collected from Dogs and Cats in Europe and North America. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 50, p. 2286–2292, 2006.
- STUBBS, S. L. J.; BRAZIER, J. S.; TALBOT, P. R.; DUERDEN, B. I. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of *Bacteroides* spp. and Characterization of Nitroimidazole Resistance Genes. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 3209–3213, 2000.
- SUBRT, N.; MESAİK, L. R.; DAVIES, J. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 979–984, 2011.
- TOPRAK, N. U.; YAGCII, A.; GULLUOĞLU, B. M.; AKIN, M. L.; DEMIRKALEM, P.; CELENK, T.; SOYLETIR, G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, p. 782–786, 2006.
- TZIANABOS, A.; ONDERDONK, A. B.; ROSNER, B.; CISNEROS, R. L.; KASPER, D. L. Structural Features of Polysaccharides That Induce Intra-Abdominal Abscesses. *Science*, v. 262, p. 416-419, 1993.
- UEDA, O.; WEXLER, H. M.; HIRAI, K.; SHIBATA, Y.; YOSHIMURA, F.; FUJIMURA, S. Sixteen homologs of the Mex-type multidrug resistance efflux pump in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 49, p. 2807–2815, 2005.
- WAGNER, K. A.; HARTMANN, F. A.; TREPANIER, L. A. Bacterial Culture Results from Liver, Gallbladder, or Bile in 248 Dogs and Cats Evaluated for Hepatobiliary Disease: 1998–2003. *Journal Veterinary Internal Medical*, v. 21, p. 417–424, 2007.
- WANG, A. L.; LEDBETTE, E. C.; KERN, T. J. Orbital abscess bacterial isolates and in vitro antimicrobial susceptibility patterns in dogs and cats. *Veterinary Ophthalmology*. v. 12, p. 91–96, 2009.
- WAREHAM, D. W.; WILKS, M.; AHMED, D.; BRAZIER, J. S.; MILLAR, M. Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure

and clinical response with linezolid therapy. *Clinical Infectious Disease*, v. 40, p.67–68, 2005.

WEXLER, H. M.; MOLITORIS, E.; MOLITORIS, D.; FINEGOLD, S. M. In vitro activity of levofloxacin against a selected group of anaerobic bacteria isolated from skin and soft tissue infections. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 42 p. 984–986. 1998.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p 593-621, 2007.

WOJNICZ, D. AND JANKOWSKI, S. Effects of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on the hydrophobicity and adherence to epithelial cells of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, p. 700–704, 2007.

WU, S.; LIM, K-C, HUANG, J.; SAIDI, R. F.; SEARS, C. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *The National Academy of Sciences*, v. 95, p. 14979–14984, 1998.

ZITOMERSKY, N. L.; COYNE, M. J.; COMSTOCK, L. E. Longitudinal Analysis of the Prevalence, Maintenance, and IgA Response to Species of the Order *Bacteroidales* in the Human Gut. *Infection And Immunity*, v. 79, p. 2012–2020, 2011.

 <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ</p>	<p><b>Comitê de Ética para o Uso de Animais</b> Av. Paranjana, 1700 - Itaperi CEP 60740-903 - fone 3101-9890 ceua_uece@yahoo.com.br - www.uece.br/ceua</p>	 <p>GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ Secretaria de Ciência, Tecnologia e Educação Superior</p>
---	--	---

## CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado “**Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias anaeróbias e facultativas isoladas da microbiota normal e de infecção em animais**” registrado sob o número **10610110-2/57**, tendo como pesquisador principal **Cibele Barreto Mano de Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA - UECE)**, tendo sido aprovado em 26 de novembro de 2010. Este certificado expira-se 26 de novembro de 2014.

Fortaleza, 26 de novembro de 2010

  
José Mário Girão Abreu  
Presidente CEUA-UECE

CEUA - UECE

## APÊNDICE II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) Senhor(a) está sendo convidado para participar da pesquisa: **AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE CEPAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Bacteroidales* ISOLADOS DE CÃES**

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, ou com o serviço no qual você está sendo atendido. Os objetivos deste estudo são o de isolar e identificar as bactérias envolvidas em infecções em seu animal e traçar seus perfis de sensibilidade aos antimicrobianos. Sua participação nesta pesquisa consistirá em ceder uma pequena quantidade de material fecal proveniente do seu animal. A coleta será feita com swab retal. Os riscos relacionados com a participação do seu animal são mínimos, visto não tratar-se de procedimento invasivo. Os benefícios resultantes desta permissão se relacionam a aquisição de maiores conhecimentos sobre as bactérias associadas às infecções em medicina veterinária e ao tratamento de processos infecciosos.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua permissão. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do seu animal. O(a) Senhor(a) receberá uma copia deste termo, onde constarão o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e a participação do seu animal, agora ou a qualquer momento.

---

Assinatura do Pesquisador

Endereço e Fone:

Declaro que entendi os objetivos e benefícios da participação do meu animal nesta pesquisa e concordo em participar

---

Responsável pela Autorização

---

Testemunha

APENDICE III

QUESTIONÁRIO

<p><b>Nome do entrevistador:</b> _____ <b>Data:</b> _____</p>
<p><b>Identificação:</b></p> <p>Local de Coleta do material: _____</p> <p>Animal: _____ Sexo: _____</p> <p>Raça: _____ Idade: _____</p>
<p><b>Dados Clínicos:</b></p> <p>O animal sentiu algum sintoma? Qual? _____</p> <p>O animal tomou antibiótico nos últimos 30 dias? Qual? _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p><b>Exame físico:</b></p> <p>Peso: _____ Altura: _____</p> <p>Estado clínico do animal: _____</p>
<p><b>Coleta do material:</b></p> <p>Data: _____ Local: _____</p> <p>Tipo de amostra: _____</p>
<p><b>Exames laboratoriais e resultados:</b></p> <p>_____</p> <p>_____</p>



## *In vitro* effect of antibiotics on biofilm formation by *Bacteroides fragilis* group strains isolated from intestinal microbiota of dogs and their antimicrobial susceptibility



Janice Oliveira Silva<sup>a,\*</sup>, Ana Catarina Martins Reis<sup>a</sup>, Carlos Quesada-Gómez<sup>b</sup>,  
Adriana Queiroz Pinheiro<sup>c</sup>, Rosemary Souza Freire<sup>d</sup>, Reinaldo Barreto Oriá<sup>d</sup>,  
Cibele Barreto Mano de Carvalho<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biomedicina, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia, Facultad de Microbiología and Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

<sup>c</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>d</sup> Núcleo De Estudos Em Microscopia E Processamento De Imagem (NEMPI), Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 October 2013

Received in revised form

17 April 2014

Accepted 18 April 2014

Available online 4 May 2014

#### Keywords:

*Bacteroides fragilis*

Biofilm

Antimicrobial resistance

Intestinal microbiota

### ABSTRACT

The *Bacteroides fragilis* group strains colonize the intestinal tract of dogs as commensal bacteria. Nevertheless, they can be opportunistic pathogens responsible for significant morbidity and mortality rates in dogs, like in oral infections, abscesses and wound infections. The purpose of this study was to evaluate antimicrobial susceptibility in *B. fragilis* strains isolated from dogs intestinal microbiota and to evaluate the effect of subinhibitory concentrations of some antimicrobials on biofilm formation. A total of 30 *B. fragilis* group strains were tested for susceptibility to ten antimicrobial agents by broth micro-dilution method. Thirteen *B. fragilis* strains were tested for biofilm formation and the biofilm producer strains were chosen to evaluate the effect of subinhibitory concentrations of six antimicrobials on biofilm formation. The isolates were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, metronidazole, imipenem and chloramphenicol. Tetracycline and clindamycin were active against 50% and 33% of the strains, respectively. When biofilm-forming strains were grown in the presence of sub-MICs of imipenem and metronidazole, the inhibition of biofilm formation was observed. In contrast, enrofloxacin at 1/2 MIC caused a significant increase in biofilm formation in two of four strains examined. In conclusion, the *B. fragilis* group strains isolated were susceptible to most of the antimicrobials tested and the sub-MIC concentrations of imipenem, metronidazole and clindamycin were able to inhibit the biofilm formation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Bacteroides fragilis* group and *Parabacteroides* microorganisms are anaerobic, bile-resistant, non-spore-forming, gram-negative rods [1]. They are normally commensal bacteria of the gut flora of dogs. Nevertheless, these microorganisms can also be responsible for infections with significant morbidity and mortality rates in dogs, like oral infections, abscesses and wound infections [2–4].

Numerous factors contribute to the ability of *B. fragilis* to persist as commensal in the gut, such as the capacity to use a

wide range of dietary polysaccharides, high bile tolerance, capsule formation and the presence of variable surface antigens that allow the bacteria to evade the host's immune responses. The capacity for adhesion and biofilm formation is also important factors [5].

The ability to form biofilm is an attribute of a majority of the microorganisms. A biofilm is a structured consortium of bacteria embedded in a self-produced polymer matrix consisting of polysaccharide, protein and DNA. The biofilm enables the bacteria to survive in hostile environments and increase antibiotic resistance due to restricted penetration of antimicrobials, the heterogeneous metabolic activity of microorganisms contained in biofilm and differences in gene expression patterns compared with planktonic cells [6].

\* Corresponding author. Centro de Biomedicina, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1315, Rodolfo Teófilo, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil.  
E-mail address: [janice.oasilva@gmail.com](mailto:janice.oasilva@gmail.com) (J.O. Silva).