



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**FATORES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *Bacteroides fragilis* ISOLADOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES**

**ANA CATARINA MARTINS REIS**

**FORTALEZA- CEARÁ  
2013**

**ANA CATARINA MARTINS REIS**

**FATORES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *Bacteroides fragilis* ISOLADOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

FORTALEZA- CEARÁ  
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R298f Reis, Ana Catarina Martins.  
FATORES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *Bacteroides fragilis* ISOLADOS DA  
MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES / Ana Catarina Martins Reis. – 2013.  
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2013.  
Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

1. *Bacteroides fragilis*. 2. Biofilme. 3. Fatores de virulência. 4. Cães. I. Título.

CDD 616.9

---

**ANA CATARINA MARTINS REIS**

**FATORES DE VIRULÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *Bacteroides fragilis* ISOLADOS DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES**

Aprovada em: 08/01/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará  
Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Cunha Frota  
Universidade Federal do Ceará  
Examinadora

---

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

## **DEDICATÓRIA**

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com este momento, em especial, meu marido, meu amor, amigo e confidente e ao meu maior presente, meu tesouro que foi concebido durante este momento tão especial da minha vida, minha filha Mirela.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, nosso eterno pai, que ilumina cada um dos meus dias, me dando força e perseverança em todos os momentos da minha vida.

A minha família, em especial meus pais, Mônica Martins e Givaldo Reis pela dedicação e formação que me deram, ensinando-me os mais importantes valores do ser humano.

Ao meu marido, Yulo Castelluccio, pela compreensão e amor verdadeiro.

A minha orientadora, Profa. Cibele Barreto M. de Carvalho, pela oportunidade, auxílio e constante aprendizado.

Aos amigos de Laboratório de Bacteriologia Nayara Oliveira, Cecília Costa, Camila Alencar, Jamila Ricarte, Thially Gonçalves, Bruno Jaegger e José Olavo Moraes pela amizade e ajuda em todos os momentos. Em especial, Janice Oliveira pela cumplicidade.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos e experiências que levarei comigo para sempre.

Aos amigos do Programa pela amizade e aprendizado.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará e da Clínica Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, que contribuíram e participaram deste trabalho, em particular Carolinda Oliveira pela imensa ajuda e conselhos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

**A todos, minha gratidão !**

## RESUMO

*Bacteroides fragilis* faz parte da microbiota fecal de animais, contudo é a espécie mais patogênica do gênero *Bacteroides*. A sua transformação de um microrganismo comensal para agente patogênico deve-se principalmente aos seus fatores de virulência. Este micro-organismo tem sido isolado de diversas infecções em cães. Considerando o potencial patogênico de *B. fragilis* e sua importância na medicina veterinária, o presente trabalho foi elaborado com o objetivo de avaliar os fatores de virulência e formação de biofilme de *Bacteroides fragilis* isolados de amostras fecais de cães. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas na Clínica Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e processadas no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram analisadas fenotipicamente os fatores de virulência (produção de hemolisinas e hemaglutininas, hidrofobicidade, presença da enzima  $\beta$ - lactamase e cápsula) e produção de biofilme de 13 cepas da espécie *B. fragilis*. Para determinação do perfil de sensibilidade a clindamicina, metronidazol, cloranfenicol e penicilina foi utilizada a técnica de diluição em Agar. Os ensaios *in vitro* para detecção de biofilme foram realizados pelos métodos Agar Vermelho Congo (AVC) e Adesão em microplacas. Todas as cepas de *B. fragilis* apresentaram cápsula e não produziram hemólise. Com relação à produção de hemaglutininas, 38% das cepas são capazes de aglutinar sangue canino e 15% em sangue humano (A<sup>+</sup>). Das cepas estudadas, 7% apresentaram uma superfície celular hidrofóbica. No total, 61% das cepas produziram teste da  $\beta$ - lactamase positivo. Quanto a produção de biofilme, foi observado pelo método do AVC que 12 (92,3%) dos isolados eram produtores de biofilme e por meio do método de Adesão em Microplacas, verificou-se que 8 (61,5%) cepas foram capazes de produzir biofilme. Todos os isolados foram sensíveis ao metronidazol e cloranfenicol e resistentes à penicilina. A taxa de resistência à clindamicina foi de 69,2%. Esse estudo mostrou que espécies de *B. fragilis* isolados da microbiota normal de cães apresentaram fatores de virulência importantes para sua patogenicidade, possuem a capacidade de formar biofilme e demonstram uma alta taxa de resistência a clindamicina.

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*. Biofilme. Fatores de virulência. Cães.

## ABSTRACT

*Bacteroides fragilis* is part of the fecal microbiota of animals, yet it is the most pathogenic species of the genus *Bacteroides*. The transformation these microorganisms commensals in pathogens agents is mainly due to its virulence factors. This microorganism has been isolated from several infections in dogs. Considering the pathogenic potential of *B. fragilis* and its importance in veterinary medicine, this study was designed to evaluate the virulence factors and biofilm formation of *Bacteroides fragilis* isolated from fecal samples from dogs. The samples used in this study were collected at the Veterinary Clinic of the State University of Ceará and processed at the Laboratory of Bacteriology of the Federal University of Ceará. Were phenotypically analyzed the virulence factors (production of hemolysins and hemagglutinins, hydrophobicity, the presence of the enzyme  $\beta$ -lactamase and capsule) and biofilm production of 13 strains of *B. fragilis*. To determine the pattern of sensitivity to clindamycin, metronidazole, chloramphenicol and penicillin was used in agar dilution technique. In vitro assays for detection of biofilms were performed by the methods Congo Red agar and Accession in microplates. All strains of *B. fragilis* showed capsule and produced no haemolysis. Regarding the production of hemagglutinin, 38% of the strains showed hemagglutination when used canine blood and 15% in human blood (A<sup>+</sup>). Of the strains studied, 7% had a cell surface hydrophobic. In total, 61% of the strains showed  $\beta$ -lactamase test positive. As regards the production of biofilm was observed by the method of strokes that 12 (92.3%) of the biofilm producers were isolated by the method and Adhesion microplates, it was found that eight (61.5%) strains were able to produce biofilm. All isolates were susceptible to metronidazole and resistant to penicillin and chloramphenicol. The rate of clindamycin resistance was 69.2%. This study showed that species *B. fragilis* isolated from normal canine microflora showed major virulence factors for pathogenicity, they possess the ability to form biofilms and show a high rate of resistance to clindamycin.

Key words: *Bacteroides fragilis*. Biofilm. Virulence factors. Dogs.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aspecto morfotintorial de <i>B. fragilis</i>	20
Figura 2.	Modelo da formação de biofilme	29
Figura 3.	Princípio de funcionamento do <i>quorum sensing</i>	31
Figura 4.	Mecanismo molecular da detecção de <i>quorum sensing</i>	32
Figura 5.	Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de 24 horas de <i>B. fragilis</i>	35
Figura 6.	Estrutura 3D de biofilme multi-especie	36
Figura 7.	Teste do indol	81
Figura 8. (a)	Replicador de Steer	84
Figura 8. (b)	Placa de Brucella ágar com as cepas de <i>B. fragilis</i>	84
• Capítulo I		
Figura 1.	Microscopia confocal de <i>B. fragilis</i>	53

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Chave de identificação de espécies do grupo <i>Bacteroides fragilis</i> indol negativo	82
Quadro 2.	Chave de identificação de espécies do grupo <i>Bacteroides fragilis</i> indol positivo	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Detecção de biofilme de <i>B. fragilis</i> avaliadas pelo AVC	51
Tabela 2.	Leitura da média da densidade óptica de <i>B. fragilis</i>	52
Tabela 3.	Comparação dos dois métodos de produção de biofilme	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AHL	Acil Homoserina Lactona
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Ágar Vermelho Congo
BBE	<i>Bacteroides</i> Bile Esculina ágar
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	BHI suplementado
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CFU	Colony-forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CRA	Congo Red Agar
HA	Hemaglutinação
Hp	Hidrofobicidade
IA	Índice de acidificação
LPS	Lipopolissacarídeo
McF	McFarland
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Minimum inhibitory concentration
MPT	Microtiter plate test

OD	Densidade óptica
ODC	Densidade óptica de corte
OMP	Proteína de membrana externa
PBS	Phosphate buffered saline
PUM	Fosfato Uréia Magnésio
PY	Peptona extrato de levedura
QS	<i>Quorum sensing</i>
TSA	Trypticase soy agar
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
<b>1.1 Microbiota Intestinal Residente</b>	16
<b>1.2 Aspectos taxonômicos do gênero <i>Bacteroides</i></b>	18
<b>1.3 Espécie <i>B. fragilis</i></b>	19
1.3.1 Aspectos morfológicos e fisiológicos	19
1.3.2 Fatores de virulência	21
1.3.3 Patogenicidade para o homem e cães	25
<b>1.4 Biofilme</b>	27
1.4.1 <i>Quorum sensing</i>	29
1.4.2 <i>Biofilme e B. fragilis</i>	32
1.4.3 Métodos de detecção de biofilme	35
<b>1.5 Justificativa</b>	38
<b>2 PERGUNTAS DE PARTIDA</b>	39
<b>3 HIPÓTESES</b>	39
<b>4. OBJETIVOS</b>	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos específicos	39
• <b>Capítulo I</b>	41
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	
<b>6 CONCLUSÕES</b>	63
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	64

<b>ANEXOS E APÊNDICES</b>	75
ANEXOS I- Certificado Comitê de Ética para o Uso de Animais	76
ANEXO II- Declaração UECE	77
ANEXO III- Coautoria artigo	78
APÊNDICE I- Termo de consentimento livre e esclarecido	79
APÊNDICE II- Questionário	80
APÊNDICE III- Metodologia complementar	81

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Microbiota Intestinal Residente

A microbiota residente é também chamada de indígena ou autóctone, e possui um papel importante na homeostase do hospedeiro quando em equilíbrio em um sítio específico. Estes micro-organismos oferecem barreira contra a colonização de patógenos, produzem substâncias utilizáveis pelo hospedeiro, degradam produtos tóxicos e participam da modulação do sistema imune do hospedeiro. A microbiota residente tem um caráter anfibiótico, podendo se comportar como patógenos oportunistas no desequilíbrio ou ao serem introduzidos em áreas não colonizadas do corpo (SUMMANEN et al., 1993).

A colonização do corpo de todos os animais por micro-organismos ocorre desde o momento do nascimento e muitos desses micro-organismos podem permanecer por toda a vida (WEXLER, 2007).

O feto de animais é microbiologicamente estéril antes de passar pelo canal vaginal. Os micro-organismos são adquiridos no canal vaginal e, após o nascimento, no meio ambiente. O ambiente imediato do recém nascido é habitado por micro-organismos excretados pela mãe e outros animais. Esses micro-organismos são ingeridos, competem por nichos e com o tempo tornam-se estabelecidos como parte da microbiota normal (HIRSH, 2009).

Poucas horas após o nascimento, bactérias começam a aparecer nas fezes. O trato gastrointestinal é colonizado primeiro por bactérias anaeróbias facultativas, e o consumo gradual de oxigênio por estas bactérias muda a composição da microbiota, permitindo a sobrevivência de bactérias anaeróbias. Espécies de *Bacteroides* aparecem no neonato em aproximadamente dez dias depois do nascimento (PENDERS et al., 2006; WEXLER, 2007).

Entre os anaeróbios obrigatórios encontrados na microbiota intestinal, as espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Clostridium* são consideradas como as mais importantes em razão do seu potencial patogênico. Dentre as espécies do gênero *Bacteroides*, as que compõem o grupo *B. fragilis* se destacam, tanto em relação à frequência de isolamento em infecções, quanto por sua resistência a muitos antimicrobianos (HENTGES, 1993).

A maior parte das bactérias que compõem a microbiota normal do homem está presente no cólon, onde se encontram aproximadamente  $10^{11}$  bactérias/mL. A maioria destes micro-organismos é de anaeróbios obrigatórios, superando as bactérias anaeróbias facultativas numa proporção de 1000:1 e, destes, 25% pertencem ao gênero *Bacteroides*, o anaeróbio mais predominantes no intestino (FINEGOLD, 1995; BROOK, 2008; QUESADA-GÓMEZ, 2010). É neste sítio onde o seu papel como microbiota normal adquire maior importância (WEXLER, 2007).

A microbiota intestinal de cães assemelha-se à do homem com predominância de bactérias anaeróbias e da espécie *B. fragilis* (BORNSIDE & COHN, 1965). O uso das ferramentas moleculares tem proporcionado a expansão do conhecimento sobre a diversidade filogenética do intestino de cães. Estudos revelaram centenas de filos bacterianos presentes no trato intestinal de cães (SUCHODOLSKI et al., 2010; SWANSON et al., 2010). Os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, e Actinobacteria constituem mais de 99% de toda a flora intestinal de cães (SUCHODOLSKI, 2011). Suchodolski et al. (2008), Xenoulis et al. (2008) e Garcia-Mazcorro et al. (2012) observaram que Bacteroidetes foi um dos principais filos identificados no intestino delgado e /ou cólon canino utilizando técnicas de clonagem e seqüenciamento.

Pesquisas realizadas com a finalidade de descrever a diversidade microbiana do intestino de cães saudáveis demonstraram que existe um aumento do número de bactérias da ordem *Bacteroidales* ao longo do trato intestinal destes animais, com uma acentuada elevação do seu número no íleo e cólon. Sendo *Bacteroides* spp. os principais componentes da microbiota do cólon e das fezes de cães. Estudos também revelaram que as espécies do gênero *Bacteroides* são predominantes na microbiota fecal de cães (SIMPSON et al., 2002.; MENTULA et al., 2005.; SUCHODOLSKI et al., 2008; BELL et al., 2008).

O metabolismo microbiano no intestino de humanos e animais pode resultar na produção de substâncias utilizáveis pelo hospedeiro. Várias espécies do gênero *Bacteroides* possuem grande quantidade de enzimas que permitem a degradação de uma variedade de polissacarídeos (QUESADA-GÓMEZ, 2010). Neste processo, são gerados e liberados carboidratos, vitaminas e aminoácidos que podem ser utilizados por outros micro-organismos, de tal maneira que os produtos do metabolismo das espécies de *Bacteroides* servem como fonte de nutrientes para outras bactérias

intestinais, contribuindo para o estabelecimento da microbiota deste sítio (FERREIRA, 2002; WEXLER, 2007).

Estudos mostram que animais isentos de germes necessitam de um acréscimo de 30% de calorias quando comparados com outros animais com microbiota associada ao intestino (GRONLUND et al., 2000; WEXLER, 2007).

## 1.2 Aspectos taxonômicos do gênero *Bacteroides*

A família Bacteroidaceae pertence ao filo Bacteroidetes, classe Bacteroidales e compreende 13 gêneros, sendo *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas* os mais importantes em razão da relativa facilidade com a qual desencadeiam infecções no organismo do hospedeiro (SONG et al., 2004).

A primeira espécie do gênero *Bacteroides* foi descrita, em 1898, como *Bacillus fragilis* e, em 1919, a espécie foi reclassificada como *Bacteroides fragilis* (FINEGOLD et al., 1992). Em 1923, na primeira edição do *Manual Bergey de Determinação Bacteriológica*, *B. fragilis* foi classificada como pertencente ao gênero *Bacteroides*, composto por bacilos anaeróbios obrigatórios, Gram-positivos e negativos e não formadores de esporos (HOLDEMAN et al., 1984; SONG et al., 2004). Posteriormente, em 1937, Weiss e Rettger excluíram os organismos Gram-positivos do gênero.

O gênero *Bacteroides* foi alvo de grandes revisões nas últimas décadas. A inclusão ou exclusão de espécies neste gênero ocasiona grandes mudanças na taxonomia desses micro-organismos (WEXLER, 2007). Na 9ª edição do *Manual Bergey de Determinação Bacteriológica*, de 1984, Holt et al. descreveram o gênero *Bacteroides* com 47 espécies. Atualmente o gênero *Bacteroides* é constituído por cerca de 20 espécies, incluindo as recentemente incorporadas *B. nordii*, *B. salyersae*, *B. massaliensis*, *B. plebius*, *B. coprola*, *B. finedoldii*, *B. dorei*, *B. intestinalis*, *B. barnesiae*, *B. salanitronis* e *B. gallinarum* (SONG et al., 2004; BROOK, 2010).

As espécies bacterianas que compreendem este gênero são bacilos anaeróbios obrigatórios, Gram-negativos, resistentes à bile, com conteúdo de guanina-citosina entre 40 e 48%, sacarolíticos, cujos metabólitos finais são, predominantemente, o succinato e o acetato (WEXLER, 2007; QUESADA-GÓMEZ, 2010).

Devido a semelhanças genéticas, dez espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* foram reunidas em um grupo denominado grupo *B. fragilis*. As espécies

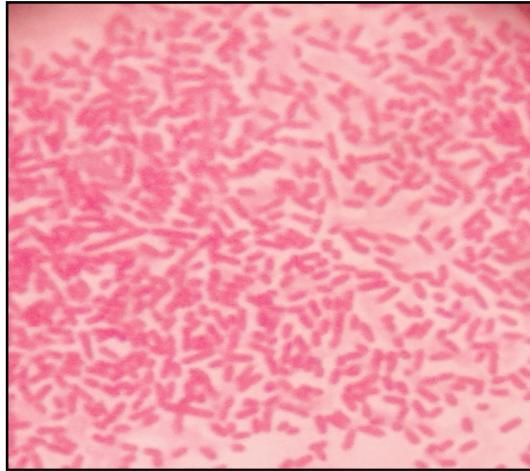
que compõem o grupo *B. fragilis* apresentam características bioquímicas, morfológicas e implicações clínicas similares. O grupo é composto pelas seguintes espécies: *B. fragilis*, *B. caccae*, *B. eggerthii*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* (WEXLER, 2007; QUESADA-GÓMEZ, 2010). Anteriormente, as espécies *B. merdae* e *B. distasonis* também constituíam o grupo *B. fragilis*, porém ambas passaram por uma reclassificação juntamente com *B. goldsteinii* e foram incorporadas a um novo gênero denominado *Parabacteroides* (WEXLER, 2007; SAKAMOTO & BENNO, 2006).

As espécies *P. distasonis*, *P. merdae* e *P. goldsteinii* são filogeneticamente distintas das espécies do gênero *Bacteroides* e estão relacionadas com a *Tannerella forsythia* (antiga *B. forsythus*) (SAKAMOTO et al., 2009). *Parabacteroides sp.* são isoladas principalmente de fezes humanas e amostras clínicas, tais como fluidos peritoneais e abscessos intra-abdominais (SAKAMOTO et al., 2009; AWADEL-KARIEM et al., 2010).

### **1.3 Espécie *B. fragilis***

#### **1.3.1 Aspectos morfológicos e fisiológicos**

*B. fragilis* são bactérias anaeróbias obrigatórias, capazes de sobreviver quando expostas a níveis de oxigênio que variam de 2% a 8% (3% a media), quimio-heterotróficas e sacarolíticas. São formadas por bacilos, pleomórficos, não formadoras de esporos, Gram-negativas, imóveis, com extremidades arredondadas, com diâmetro de 0,5-0,8 $\mu$ m e 1,5-4,5 $\mu$ m de comprimento, sendo a maioria das cepas encapsuladas. Crescem em meios de cultura contendo carboidratos, amônia, hemina, vitamina B12, sais orgânicos e agentes redutores e seus produtos de fermentação de carboidratos são o succinato e o acetato (SUMMANEN et al., 1993; KONEMAN et al., 2008) (Figura 1).



**Figura 1.** Aspecto morfofotintorial de esfregaço de cultura de *B. fragilis* corado pelo metodo de Gram, utilizando objetiva de imersão (aumento de 100x). Fonte Própria

Uma das características do *B. fragilis* consiste no estímulo de seu crescimento pela bile, que é a base para um meio de cultura seletivo utilizado para seu isolamento a partir de fezes ou material clínico. Além disso, *B. fragilis* possui algumas enzimas que estão diretamente relacionadas com a degradação de variados tipos de mucinas e polissacarídeos, como neuraminidases (ou sialidase) e glicosidases, entre outras (KONEMAN et al., 2008).

Vários fatores contribuem para a adaptação do *B. fragilis* no trato intestinal, como a tolerância à bile e a capacidade de utilizar vários carboidratos provenientes da dieta (GOLDSTEIN, 2002). Essa tolerância aos sais biliares é de enorme importância para a sobrevivência desses micro-organismos. Os sais biliares possuem uma atividade detergente, que permeabiliza as membranas bacterianas podendo eventualmente provocar colapso na membrana, causando danos celulares (PUMBWE et al., 2006).

A espécie *B. fragilis* tem como característica a aerotolerância e, apesar de não crescer na presença de oxigênio, pode sobreviver a sua exposição por algum tempo, em virtude da presença da catalase e superóxido dismutase, que lhe confere alta resistência a oxidação (MEEHAN & MALAMY, 2011). Esta característica explica, em parte, a maior frequência de isolamento desta espécie em infecções

extraintestinais, infecções de ferida cirúrgica, pé diabético, bacteremia, entre outras (BROOK, 2010).

As bactérias anaeróbias têm importante papel nos contextos clínico e ecológico e sua habilidade e versatilidade de sobreviver em diversas condições, beneficiando o hospedeiro ou atuando como fonte de infecções, proporcionam-lhes a categoria de organismos anfíbios (DINIZ et al., 2004).

### **1.3.2 Fatores de virulência**

Virulência refere-se ao grau de patogenicidade num grupo ou numa espécie de micro-organismo. A virulência geralmente não é atribuída a somente um fator, dependendo, isto sim, de vários parâmetros relacionados ao organismo, ao hospedeiro e à relação dinâmica entre eles (SALYERS & WHITT, 1994; KONEMAN et al., 2008).

Fator de virulência é a denominação de um componente, produto bacteriano ou estratégia que contribua para a expressão da agressão. Os fatores de virulência podem ser classificados em duas categorias não excludentes: os que promovem a colonização e invasão bacteriana e aqueles que causam destruição tecidual no hospedeiro. No primeiro caso, citam-se cápsula, fimbrias e adesinas; entre os fatores de virulência que causam danos ao hospedeiro, consideram-se o antígeno LPS (endotoxina), exotoxinas e enzimas (SALYERS & WHITT, 1994).

A transformação de um organismo comensal em um agente patogênico pode decorrer da aquisição de genes que codificam fatores de virulência. Os principais fatores de virulência presentes no *B. fragilis* são: capacidade de adesão e invasão de tecidos, a produção de toxinas, síntese de enzimas, a produção de superóxido dismutase e catalase, hemaglutininas, produção de biofilme, componentes da superfície bacteriana como a cápsula polissacarídica e lipopolissacarídeos, e resistência aos antimicrobianos (NAKANO & AVILA-CAMPOS, 2004; BROOK, 2008, KO et al., 2009; BOENTE et al., 2010 ).

A adesão das bactérias às células epiteliais é o primeiro passo para a colonização ou infecção. Nota-se que a adesão de *B. fragilis* às células intestinais é mediada por fimbrias e adesinas, como a lectina (WEXLER, 2007; PUMBWE et al., 2007).

A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o ácido succínico, produto final do metabolismo fermentativo do *B. fragilis*, pode inibir a atividade bactericida dos neutrófilos, e interagir com macrófagos peritoneais, induzindo a atividade pró-coagulante e a deposição de fibrina, dificultando a remoção dos micro-organismos infecciosos (BROOK, 2010).

Os polissacarídeos capsulares de *B. fragilis* são considerados o fator de virulência mais importante destes micro-organismos. Seu polissacarídeo capsular é complexo, composto por pelo menos oito diferentes polissacarídeos, que parecem ser antigenicamente diversos. Além disso, *B. fragilis* pode expressar três diferentes tipos de cápsula- grande, pequena e elétrion-densa (KALKA-MOLL et al., 2001; COYNE et al., 2001; NAKANO et al., 2008).

A cápsula polissacarídica está relacionada diretamente com a formação de abscessos intra-abdominais. Além disso, pode interferir no ataque do sistema imunológico do hospedeiro, protegendo as células bacterianas da ação fagocitária dos polimorfonucleares. Os principais componentes do material capsular purificado do *B. fragilis* são L-fucose, Dgalactose, DL-quinovasamine, D-glicosamina e ácido galacturônico (SALYERS, 1984; SOUZA & SCARCELLI, 2000; KALKA-MOLL et al., 2001; COYNE et al., 2001).

*Bacteroides* tem a capacidade de produzir grande variedade de enzimas, entre as quais se pode citar: a hialuronidase e a condroitina sulfatase, importantes na degradação da matriz extracelular do hospedeiro; e colagenase, fibrinolisinase, heparinase e neuronimidase, que cumprem a importante função de disseminação do micro-organismo no hospedeiro. A neuronimidase está relacionada com os processos de adesão, colonização e virulência do *B. fragilis* (LORBER, 2000).

As enzimas catalase e superóxido dismutase são agentes neutralizadores de oxigênio e seus metabólitos ajudam a criar ambientes anaeróbios ótimos para a proliferação do *B. fragilis*. A enzima superóxido dismutase é um significativo fator de virulência, pois neutraliza espécies reativas de oxigênio produzidas durante o contato com O<sub>2</sub> e, portanto, promove a existência destes patógenos oportunistas em tecidos vivos durante o período inicial de infecção, antes do desenvolvimento de condições anaeróbias ótimas para o crescimento destes micro-organismos (WEXLER, 2007; KONEMAN et al., 2008; MEEHAN & MALAMY, 2011).

A atividade de hemaglutinação está relacionada com a severidade dos processos infecciosos em que *B. fragilis* está envolvido, verificando-se que cepas

virulentas de *B. fragilis* são mais hemaglutinantes do que as não virulentas (OYSTON & HANDLEY, 1991; NAVAMAR et al., 1991). A presença de pili e/ou cápsula é relacionada com a hemaglutinação, porém esta propriedade parece ser provocada por diversos tipos de adesinas (WEXLER, 2007).

Micro-organismos da espécie *B. fragilis* possuem lipopolissacarídeo (LPS) também denominado de endotoxina. Esse fator de virulência provoca efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias. Sua liberação ocorre quando as células bacterianas se multiplicam ou quando são fagocitadas e degradadas por células de defesa. A endotoxicidade dos LPS da parede do *B. fragilis* é menor do que a observada nos LPS de enteropatógenos clássicos. Os LPS do *B. fragilis* registram 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 são diferentes de outras bactérias Gram-negativas (SALYERS, 1984; SOUZA & SCARCELLI, 2000; WEXLER, 2007; KONEMAN et al., 2008).

Além da endotoxina, *B. fragilis* pode exibir cepas enterotoxigênicas que produzem uma toxina termolábil dependente do zinco, a metaloproteinase, também conhecida como fragilisina. Esta exotoxina causa alterações morfológicas no epitélio intestinal por meio de rearranjo da F-actina, resultando na estimulação da secreção de cloretos e, conseqüentemente, perda de eletrólitos (PUMBWE et al., 2006; SEARS, 2009).

A maioria das cepas isoladas de *B. fragilis* não são enterotoxigênicas, mas tem sido demonstrado que algumas cepas isoladas de animais como ovinos, bovinos, suínos e potros com diarreia, elaboram uma enterotoxina, liberada no meio durante o crescimento *in vitro*, e cuja atividade foi detectada. Estudos também demonstraram que *B. fragilis* enterotoxigênico pôde ser isolado de humanos com quadros de diarreia e que estas cepas se mostraram igualmente virulentas em testes, empregando-se coelhos adultos como modelos (MYERS et al., 1987; SOUZA & SCARCELLI, 2000). Toprak et al. (2006), relataram que *B. fragilis* enterotoxigênico tem uma possível correlação carcinogênica em câncer colorretal.

Várias proteínas de membrana externas (OMPs) tem sido encontradas em *B. fragilis*. A OmpA é a principal OMP encontrada nesses micro-organismos. Foram identificados quatro genes distintos que codificam homólogos de OmpA e descobriu-se que os quatro genes são transcritos em OmpA de *B. fragilis*. Estudos sugerem que

essas OMPs estão relacionadas a aderência e manutenção da estrutura celular, participando do transporte ativo e passivo e parecem estar associadas com a virulência. OMPs de várias bactérias Gram-negativas contribuem para a invasão de células de mamíferos (PUMBWE et al. 2006; PUMBWE et al., 2007; NAKANO et al., 2008).

Além do seu envolvimento em infecções intra-abdominal e sistêmicas, *B. fragilis* é muito estudada em razão do aumento da resistência às drogas antimicrobianas utilizadas na Clínica Médica Humana e Veterinária (GALVÃO et al., 2011). *B. fragilis* possui grande capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, um fator essencial na sua virulência (PUMBWE et al., 2006).

A virulência do micro-organismo e a sua resistência a agentes antimicrobianos são mecanismos que desempenham um papel importante na determinação do resultado de uma infecção bacteriana. Virulência e resistência não são propriedades independentes elas estão intimamente relacionadas. A aquisição de resistência promove um aumento ou diminuição da virulência. Além disso, virulência e resistência podem estar presentes no mesmo elemento genético móvel (NAKANO & ÁVILA-CAMPOS 2004; SOTO, 2009).

O grupo *B. fragilis* possui genes de resistência a antibióticos que podem partilhar entre si e transferir entre espécies diferentes. Esse grupo produz enzimas (como a  $\beta$ -lactamase, que inativa antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas) que atuam na destruição e inativação de antibióticos (DUBREUIL & ODOU, 2010; QUESADA-GÓMEZ, 2011).

Os antibióticos frequentemente utilizados em infecções por *B. fragilis* são  $\beta$ -lactâmicos (com ou sem inibidor de  $\beta$ -lactamase), carbapenêmicos, clindamicina e metronidazol. Fluoroquinolonas são também utilizadas em combinação com clindamicina e metronidazol (CLSI, 2007; WEXLER, 2007).

Nas últimas décadas, *B. fragilis* se tornou resistente a diversos antibióticos. As taxas de resistência podem variar entre regiões geográficas e hospitais (QUESADA-GÓMEZ, 2011).

Altos níveis de resistência a penicilina G e ciprofloxacina tem sido observados (ALDRIDGE & O'BRIEN, 2002) e, além disso, estudos demonstram uma diminuição da sensibilidade das cepas a múltiplos antibióticos utilizados em infecções, como a clindamicina, cefoxitina e cefotetan (WYBO et al., 2007). Também foram

encontradas cepas resistentes ou com sensibilidade diminuída a antibióticos que apresentavam uma grande atividade contra bactérias anaeróbias, tais como metronidazol e imipenem (LIU et al., 2008).

A ocorrência de cepas resistentes pode resultar em falhas de tratamento e enfatiza a importância da vigilância da resistência antimicrobiana, inclusive nas cepas isoladas de microbiota, pois estas cepas podem surgir como patógenos oportunistas (ROH et al., 2009; BOENTE et al., 2010; BROOK, 2010; GALVÃO et al., 2011).

O isolamento de cepas resistentes em animais domésticos é de grande importância. Estudos revelam que genes de resistência a antimicrobianos, isolados inicialmente somente em animais, foram encontrados no ambiente e em humanos. O *B. fragilis* é implicado como reservatório de genes de resistência e a transmissão de animais para o homem tem sido documentada (GUARDABASSI et al., 2004; KATSANDRI et al., 2006).

*B. fragilis* apresenta uma grande variedade de fatores de virulência, dentre estes a formação de biofilme é de grande relevância, principalmente, nos processos infecciosos (PUMBWE et al., 2008; QUESADA-GÓMEZ, 2010).

### 1.3.3 Patogenicidade para o homem e cães

*B. fragilis* é a bactéria anaeróbia mais isolada de infecções e abscessos no homem e em animais, sendo a mais virulenta do gênero *Bacteroides* (WEXLER, 2007).

Apesar da sua importância clínica, *B. fragilis* não é classificado como patógeno entérico, sendo reconhecido como a causa mais comum (68%) dos abscessos intra-abdominais em humanos (E. RODRÍGUEZ et al., 2006).

Os anaeróbios, particularmente o *B. fragilis* estão presentes em feridas cirúrgicas abdominais infectadas e pé diabético. Em Fortaleza, Carvalho et al. (2004) realizaram um estudo microbiológico em pacientes com pé diabético e as bactérias mais isoladas foram Enterobacteriaceae (83,7%), *S. aureus* (43,3%) e bacilos Gram-negativos anaeróbios (17%).

Papaparaskevas et al. (2011) avaliaram as diferenças entre infecções causadas por bactérias Gram-negativas anaeróbias (*Bacteroides*, *Prevotella* e *Fusobacterium spp.*) em humanos e observaram que a espécie mais isoladas foi *B. fragilis*. Em sua

maioria, os casos foram de infecções intra-abdominais (49%), seguida de infecções de pele e tecidos moles (24,7%).

O isolamento de microrganismos da microbiota endógena, em sítios de infecções graves, alerta para o fato de que estes microrganismos não podem ser desprezados automaticamente como contaminantes (SOUZA & SCARCELLI, 2000; PAPAPARASKEVAS et al., 2011).

Na medicina veterinária, doenças causadas por bactérias anaeróbias obrigatórias do trato alimentar normalmente resultam da extensão da microbiota normal para um local comprometido, seja por contaminação de uma ferida com a microbiota próxima ou inoculação tecidual de um instrumento contaminado ou mordeduras (HIRSH, 2009).

Desde a década de 1970, tem sido ressaltada a importância de espécies bacterianas anaeróbias obrigatórias em infecções em seres humanos (MARTIN, 1974; FINEGOLD, 1977). Existem, no entanto, limitadas informações a respeito desses micro-organismos e suas implicações em animais.

Na década de 1980, Myers et al. (1987) verificaram a semelhança dos quadros patológicos ocasionados por *B. fragilis* em seres humanos e em animais domésticos, como ocorrência de abscessos, diarreia aquosa não hemorrágica, lesões intestinais primárias no intestino grosso, incluindo esfoliações das células epiteliais e hiperplasia das criptas intestinais.

Nos últimos dez anos, alguns estudos vem relatando o isolamento de *Bacteroides* como patógeno em infecções que acometem cães. Em 2002, Sóki et al. isolaram *Bacteroides fragilis* de abscesso prostático de cão.

Braga et al. (2005) pesquisaram a microbiota de sítios periodontais de cães saudáveis e com doença periodontal e observaram que o acúmulo de placa tinha uma correlação positiva com o isolamento de anaeróbios. Anaeróbios pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Bacteroides* foram prevalentes nos sítios com doença periodontal, onde *Pasteurella multocida* e *Escherichia coli* também foram isolados em número considerável. Em 2006, Radice et al. avaliaram a flora subgingival de 13 cães com doença periodontal e verificaram que das bactérias anaeróbias, *Bacteroides fragilis* foi mais frequentemente encontrada.

Carneiro et al. (2005) analisaram cadelas portadoras de piometra e as bactérias mais encontrados foram *Bacteroides*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, sendo predominantes na vagina. No ano de 2007, Wagner et al. observaram que

*Bacteroidales* foi a ordem de micro-organismo anaeróbio mais isolado em infecção hepatobiliar de cães e gatos.

Cães são acometidos por diversas infecções microbianas. O cuidado com a saúde de animais domésticos, na prevenção e terapias de doenças infecciosas, tem colaborado com o aumento da frequência do uso de antibióticos em especial o licenciado para uso humano. Segundo Guardabassi et al. (2004), o uso indiscriminado e sem critério de antibióticos no tratamento de infecções crônicas, em humanos e animais, constitui-se o principal responsável pelo aumento da resistência a antimicrobianos em bactérias.

#### **1.4 Biofilme**

O conceito de bactérias que vivem num contexto de comunidade, no lugar de simplesmente entidades autônomas, ganha rápida aceitação entre a comunidade científica. Na década 1970, começou-se a perceber que bactérias em biofilme (bactérias sésseis) são um componente importante da biomassa bacteriana em diversos ambientes; e apenas nos anos 1980 e 1990 percebeu-se que as bactérias, em biofilme, se organizam de forma tão elaborada (APARNA & YADAV, 2008).

O tipo de "ecologia" que se imaginava em relação aos procariotos- células individuais crescendo de maneira planctônica (bactérias livres) raramente é encontrado na natureza. Aproximadamente 80% da biomassa microbiana do mundo reside como populações de biofilme (RICHARDS & MELANDER, 2009).

Os biofilmes são comunidades microbianas sésseis, incorporadas a uma matriz polimérica extracelular chamada "slime", que se encontram irreversivelmente aderidas a uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Três elementos básicos se destacam: microrganismos, matriz e superfície. Se um desses elementos não está presente, um biofilme maduro não pode se desenvolver. As bactérias em biofilme exibem um fenótipo alterado no que diz respeito a taxa de crescimento e transcrição de genes. Os biofilmes são estruturas altamente hidratadas contendo canais que permitem a difusão interna de nutrientes e oxigênio (APARNA & YADAV, 2008).

O biofilme pode ser formado por uma única espécie bacteriana ou fúngica, embora também possa consistir de muitas espécies bacterianas, fúngicas, e ainda algas e protozoários. A matriz polimérica produzida pelo biofilme consiste numa estrutura

complexa, podendo ser composta por proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e heteropolímeros, tais como glicoproteínas, fosfolipídios, alginatos etc. A matriz é responsável pela estrutura do biofilme e sua composição determina algumas propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes. Uma das suas propriedades é tornar-se impermeável a certos agentes antimicrobianos, impedindo a sua difusão (ROHDE et al., 2009; HOIBY et al., 2010; BATONI et al., 2011).

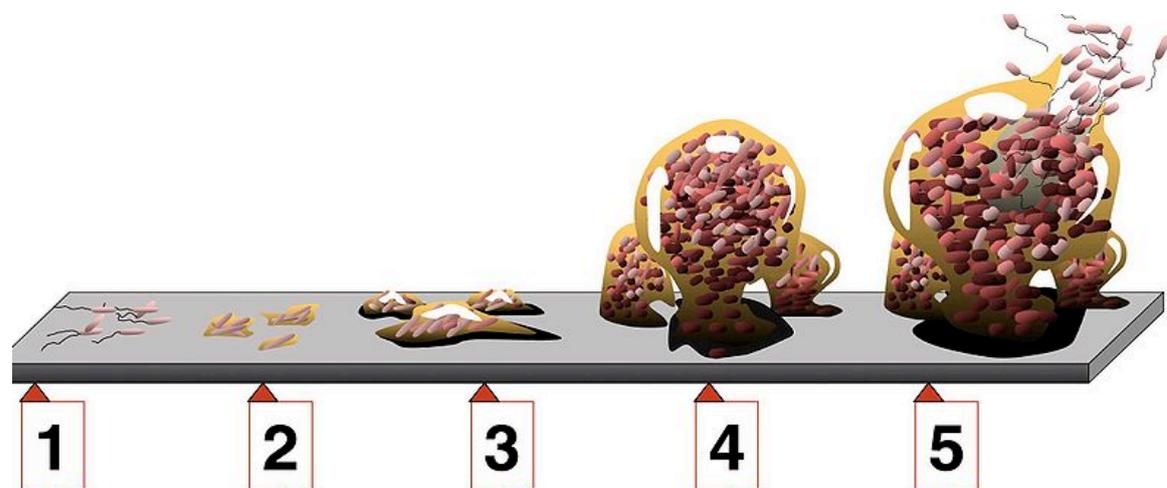
Micro-organismos crescendo sob a forma de biofilme apresentam propriedades singulares como a resistência intrínseca a antibióticos com tolerância a multidroga. Estudos demonstram a habilidade desses micro-organismos em persistir em concentrações de antibióticos superiores se comparadas às mesmas bactérias em estado planctônico. Essas comunidades microbianas também são resistentes à resposta imune do hospedeiro, permitindo-lhes sobreviver em ambientes hostis e resistir a pressões seletivas (DAVIS et al., 2008).

Bactérias crescendo em biofilme podem causar diversas infecções crônicas. Estas infecções incluem doença periodontal, endocardite, infecções do trato urinário, infecções de ouvido médio, feridas cirúrgicas, infecções de cateter, doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras (APARNA & YADAV, 2008).

O biofilme pode ser considerado um mecanismo de proteção para a comunidade bacteriana contra insultos externos. Assim parece razoável que sinais extracelulares específicos regulem a ativação de padrões metabólicos que desencadeiam o estabelecimento dos biofilmes. Essa sinalização externa pode advir de várias fontes: podem ser produzidas e secretadas pela própria comunidade bacteriana, onde as moléculas são designadas autoindutores, que se acumulam no meio extracelular, sendo sua concentração correlacionada com a densidade populacional (LÓPEZ et al., 2010), e que em altas concentrações podem desencadear cascatas de sinalização que levam a respostas multicelulares na população bacteriana. Esse mecanismo de comunicação célula-célula (designado *quorum sensing*) controla grande número de processos, incluindo aqueles relacionados à formação de biofilme (CAMILLI & BASSLER, 2006).

A formação de biofilme é um processo que envolve muitas etapas: uma ligação inicial reversível das células planctônicas a uma superfície, seguida de uma fase de maturação. A ligação inicial envolve forças de atração e repulsão entre as células e a superfície. Essas forças incluem interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de Van der Waals, forças hidrodinâmicas em temperatura adequadas. Após a

ligação com a superfície, as bactérias crescem e dividem-se com a produção de polissacarídeo pelas células bacterianas, que se tornam irreversivelmente aderidas ao substrato. Com o tempo, microcolônias se desenvolvem em um biofilme maduro, adquirindo uma arquitetura típica, com projeções do tipo cogumelo, separadas por canais preenchido de fluidos. O estagio final (fase de dispersão) envolve o desligamento de células unitárias ou grupos celulares do biofilme maduro, sendo considerada uma etapa essencial para a disseminação bacteriana (Figura 2) (LEMON et al., 2008; AGARWAL et al., 2010; BATONI et al., 2011).



**Figura. 2** Modelo da formação de biofilme. Desenvolvimento em quatro etapas: (1e 2) adesão inicial, (3) formação de microcolônias, (4) maturação e (5) dispersão.  
Fonte: Adaptada de Monroe, 2007.

### 1.4.1 *Quorum sensing*

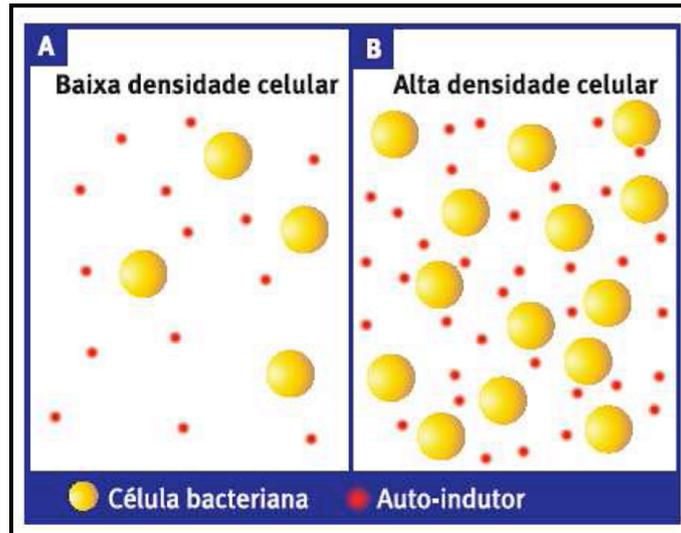
Para que um biofilme de uma ou várias espécies seja formado, é necessário o estabelecimento de um comportamento multicelular, que se reflete em atividades coordenadas de interação e comunicação dos vários organismos. Assim, os biofilmes não são simples camadas viscosas contendo organismos, mas sistemas biológicos altamente organizados, onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas (KARATAN & WATNICK, 2009).

Um dos mecanismos de comunicação interbacteriana que se mostra muito importante na formação e desenvolvimento de biofilmes corresponde ao *quorum sensing* (QS). *Quorum sensing* pode ser definido como um mecanismo de comunicação entre bactérias, através da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras, através de membranas bacterianas. Este sistema de

linguagem permite a coordenação do comportamento bacteriano em relação ao meio ambiente, regulando a expressão de genes especializados, em resposta à densidade populacional, além da intervenção em diversos processos fisiológicos como a diferenciação celular e fluxo de nutrientes, a bioluminescência, indução de fatores de virulência em patógenos de plantas e animais e a formação de biofilmes (SCHAUDER & BASSLER, 2001; RUMJANEK et al., 2004; AMMOR et al., 2008; BAI & RAI, 2011).

Muito do desenvolvimento e integridade estrutural do biofilme é dependente de QS, que é sobretudo uma maneira pela qual moléculas extracelulares autoindutoras melhoram a comunicação entre as bactérias com origem em uma certa densidade populacional. Estas moléculas de comunicação intercelular, produzidas por bactérias e fungos, são análogas às citocinas produzidas pelas células de mamíferos. A viabilidade do biofilme é dependente do equilíbrio entre a expressão de genes de resposta e da sinalização intercelular por meio de QS (APARNA & YADAV, 2008; DONGARI-BAGTZOGLU, 2008; KARATAN & WATNICK, 2009).

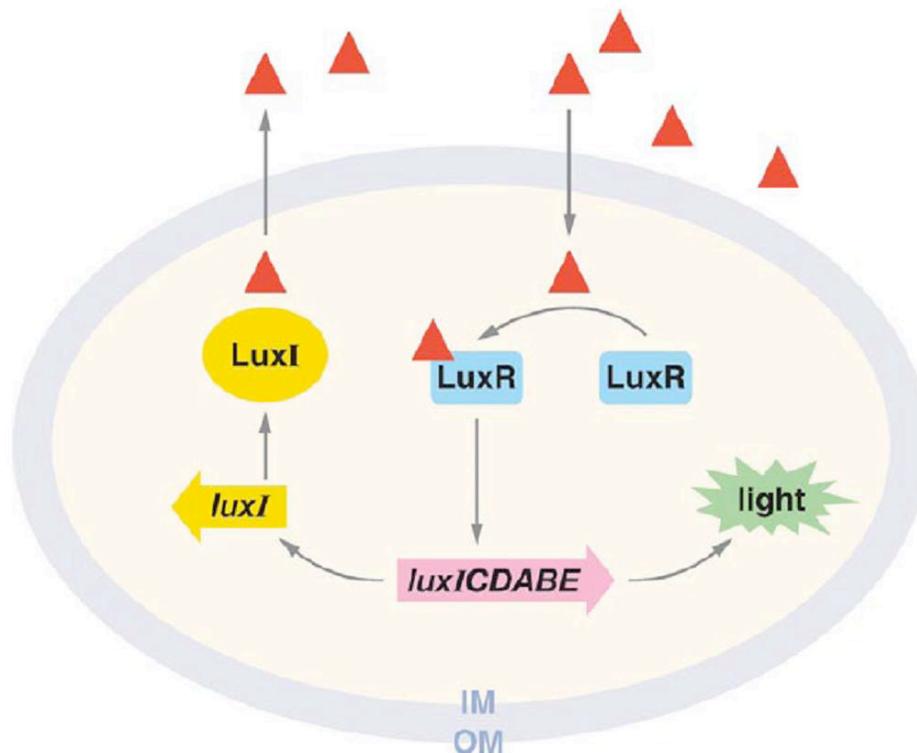
A sinalização dependente da densidade celular pode ser considerada um comportamento comum entre micro-organismos. Nestes sistemas, a regulação encontra-se mediada pelo acúmulo de uma ou mais moléculas sinalizadoras produzidas pelas células e excretadas para o meio externo, pelo simples processo de difusão. Estas pequenas moléculas químicas ou autoindutoras acumulam-se no ambiente em quantidades proporcionais ao crescimento celular e são detectadas pelos indivíduos por meio de receptores, somente quando, no ambiente externo, perpassa a concentração crítica (Figura 3). A partir deste limite atingido, ocorre a percepção da alta densidade celular pela população, iniciando ações conjuntas com a ativação ou repressão de genes determinados, como por exemplo, os envolvidos na virulência e regulação do crescimento de colônias (MILLER & BASSLER, 2001; WHITEHEAD et al., 2001; RUMJANEK et al., 2004; PINTO et al., 2007).



**Figura 3.** Princípio de funcionamento do *quorum sensing*: se há poucas bactérias (A), a concentração de auto-indutores é baixa e não detectável; mas se a densidade populacional aumenta (B), essa concentração atinge um limiar a partir do qual tais moléculas passam a ser detectáveis. Fonte: Adaptada de Hardman et al., 1998.

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam sistemas de comunicação diferenciados para regular as diversas funções fisiológicas. Em geral, as bactérias Gram-positivas usam oligopeptídeos para se comunicar e as bactérias Gram-negativas usam como autoindutores as acil-homoserina lactonas (AHLs – um anel de homoserina lactona que, através de uma ligação amida, liga-se a um grupamento acil, que varia conforme a espécie bacteriana considerada) (WINZER et al., 2002; SMITH et al., 2004; AMMOR et al., 2008).

O primeiro mecanismo molecular de detecção de QS a ser descrito foi o sistema LuxI-LuxR, que se encontra em bactérias da espécie *Vibrio fischeri* (Figura 4). Neste caso, a enzima LuxI sintetiza o autoindutor, uma AHL, que se difunde para o meio. Quando a concentração crítica é atingida, o sinal interage com a proteína LuxR, formando um complexo que ativa a transcrição de alguns genes (WATERS & BASSLER, 2005).



**Figura 4.** Mecanismo molecular da detecção de *quorum* em *Vibrio fischeri*. Este sistema é regulado por apenas duas proteínas: LuxI e LuxR. O autoindutor AHL (triângulos vermelhos) sintetizado por LuxI é detectado por LuxR, e é o próprio complexo LuxR-AHL que interage com o DNA da bactéria, ativando a expressão do *operon lux*. A transcrição do gene que codifica LuxI também é induzida, o que cria um efeito de *feedback* positivo que tem como consequência a rápida extensão desta resposta a toda a população. Fonte: Adaptada de Waters e Bassler, 2005.

Estudos em bactérias aeróbias revelam que o sistema LuxRI é usado principalmente por bactérias Gram-negativas que se comunicam com os sinais de lactona. Genes homólogos ao LuxR foram identificados no genoma de *B. fragilis* ATCC® 25285 (KASPER & SPERANDIO, 2005; WATERS & BASSLER, 2005; PUMBWE et al., 2008).

Pumbwe et al. (2008) avaliaram biofilmes com e sem autoindutores e observaram que biofilmes contendo autoindutores formavam um biofilme maior. Este estudo investigou a presença de QS em *B. fragilis* e seus resultados mostram que *B. fragilis* possui LuxR, que poderiam responder às AHL e modular a formação de biofilme (PUMBWE et al., 2008; WEXLER, 2012).

#### 1.4.2 Biofilmes e *B. fragilis*

O trato intestinal abriga uma comunidade complexa de micro-organismos que crescem como biofilmes na mucosa intestinal. Estas comunidades bacterianas não

estão bem caracterizadas, embora sejam conhecidas por desempenharem um papel importante na saúde. Sabe-se que nas mucosas intestinais as bactérias vivem sob a forma de biofilme, em vez de um estado planctônico não aderente. As bactérias que permanecem aderidas no trato intestinal comportam-se de forma diferente, com atividades metabólicas distintas das células planctônicas, maior resistência aos antibióticos e a outros fatores inibitórios que têm efeitos prejudiciais sobre bactérias planctônicas (MACFARLANE & MACFARLANE, 2006; SPROULE-WILLOUGHBY et al., 2010).

O crescimento de bactérias anaeróbias em forma de biofilme no trato intestinal é pouco estudado. A capacidade destas bactérias em formar biofilmes e / ou co-agregado é raramente relatada neste sitio, se comparado com o número de estudos sobre o desenvolvimento de biofilmes anaeróbios multiespécies na cavidade oral (MARSH et al., 2011; KOLENBRANDER, 2011).

Os micro-organismos que colonizam o cólon como o *B. fragilis*, são importantes na manutenção ecológica desse sítio. É provável que esses micro-organismos estejam envolvidos no processo de formação de biofilme. Ao passo em que há um crescente interesse em biofilmes da mucosa do cólon, particularmente no que diz respeito ao seu papel nos processos de doença, estudo da composição e significado ecológico do biofilme no intestino, geralmente, é negligenciado (HUIJSDENS, et al., 2002; MACFARLANE et al., 2004; MACFARLANE & MACFARLANE, 2006).

*B. fragilis* possui grande capacidade de persistir no intestino em virtude de algumas características que esses micro-organismos apresentam, como elevada tolerância aos sais biliares, alta resistência a antibióticos, e evitam a resposta imune do hospedeiro, entre outras (WEXLER, 2007; PUMBWE et al., 2007).

Vários estudos expressam que algumas bactérias formam biofilmes durante a infecção. *B. fragilis* é a principal bactéria anaeróbia isolada de infecções extra intestinais que podem formar biofilme (PUMBWE et al., 2007; PUMBWE et al., 2008).

Embora se tenha pouca informação disponível sobre a formação de biofilme por *B. fragilis*, sabe-se que algumas estruturas celulares estão envolvidas, como o envelope celular, polissacarídeos extracelulares, pili e a secreção de neuraminidase, que estaria envolvida na degradação da mucina (PUMBWE et al., 2006). Estudo

mostra que *B. fragilis* é capaz de colonizar géis de mucina e formar biofilme *in vitro* (MACFARLANE et al., 2005).

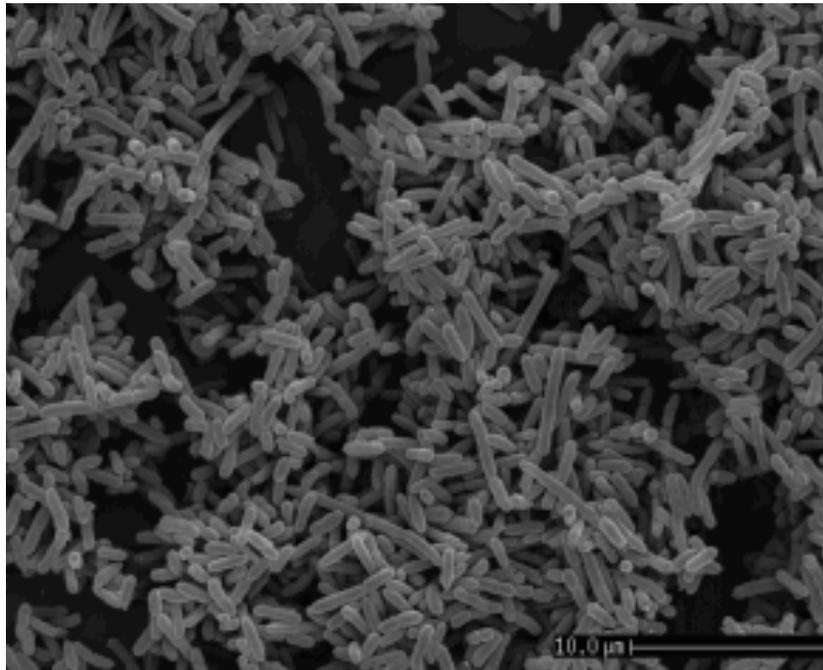
A espécie *B. fragilis* adere à parede intestinal do hospedeiro como mecanismo de sobrevivência, tornando-se parte da microbiota normal. O mecanismo de aderência do *B. fragilis* nas células do epitélio ocorre por diferentes tipos de interação pili/fimbria, adesinas e formando biofilme (PUMBWE et al., 2008).

Pumbwe et al. (2007) relataram que os sais biliares podem estimular a co-agregação bacteriana, a adesão bacteriana às células HT-29 humanas e a formação de biofilme de *B. fragilis*. Eles observaram que as células tratadas com sais biliares apresentavam um taxa de crescimento do biofilme muito maior, fato demonstrativo que *B. fragilis* pode crescer como biofilme durante a colonização no intestino humano.

Sproule-Willoughby et al. (2010) pesquisaram a microbiota do cólon humano de pacientes saudáveis submetidos a colonoscopia e observaram a presença de biofilme de *Bacteroides* em amostras de biópsia deste sítio.

Recentemente, Donelli et al. (2012) verificaram que as bactérias anaeróbias desenvolvem biofilmes polimicrobianos no trato intestinal. Nos seus ensaios *in vitro*, por meio de adesão em microplacas, observou-se que entre as bactérias Gram-negativas anaeróbias testadas, as espécies *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* e *Veillonella spp.* formavam um biofilme espesso e que cepas de *B. fragilis* exibiam uma matriz exopolissacarídica, crescendo de forma séssil e agregada.

Cateteres biliares oclusos por biofilmes tem sido alvo de estudos. Guaglianone et al. (2008) realizaram uma análise microbiologia do biofilme isolado destes dispositivos e observaram a presença de uma colonização microbiana mista. Entre as bactérias Gram-negativas anaeróbias mais isoladas estavam *Bacteroides spp.* e *Fusobacterium spp.* Em um estudo seguinte com estes mesmos dispositivo, resultados semelhantes foram observados. 57% das bactérias encontradas foram anaeróbias e destas *Bacteroides spp.* e *Clostridium spp.* foram as mais representativas. Todas as 19 cepas anaeróbias isoladas foram investigadas quanto a sua capacidade de produzir biofilme *in vitro*. Entre as 12 bactérias anaeróbias Gram-negativas testadas quanto a produção de biofilme, as espécies *Bacteroides fragilis* (Figura 5) *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* e *Veillonella spp.* foram produtoras de um espesso biofilme (GUAGLIANONE et al., 2010).



**Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de 24 horas de *B. fragilis* isolado de cateter biliar obstruído. Fonte: Guaglianone et al., 2010.

Estudos que relacionam *B. fragilis* e biofilmes em cães são escassos. Uma pesquisa realizada em novembro de 2012 no portal de busca de artigos científicos Pub Med usando o termo “*Biofilms in dogs*” resultou em 28 artigos. Destes, nenhum estava envolvidos com o *B. fragilis*. Concatenando a busca com bactérias anaeróbias obrigatórias foi encontrado apenas artigos associados a doenças periodontais. Na mesma pesquisa foi inserido um segundo termo “*B. fragilis in dogs*” e somente seis artigos foram localizados.

Pesquisas sobre biofilmes de *B. fragilis* devem ser cada vez mais expandidas, já que a caracterização do biofilme intestinal é de grande importância para a compreensão da patogênese de infecções causadas por esses micro-organismos (PUMBWE et al., 2007).

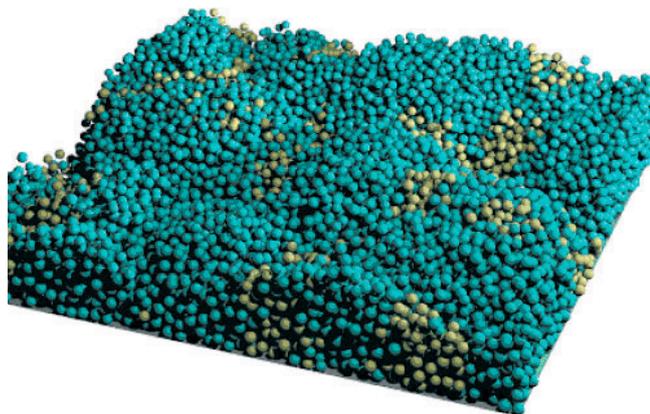
### 1.4.3 Métodos de detecção de biofilme

Atualmente a diversidade de técnicas permite avaliar inúmeros aspectos importantes no biofilme, desde o início da adesão até seu estabelecimento. De uma

maneira geral são, os métodos de detecção divididos em dois grupos: os métodos visuais e os métodos não visuais (ROSADO, 2008).

Os métodos visuais compreendem basicamente a microscopia de contraste, a de epifluorescência, óptica, de força atômica, confocal, eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (PARIZZI, 2004; SMIRNOVA et al., 2010).

A microscopia confocal permite a visualização em profundidade de células e tecidos, cria imagem em três dimensões (Figura 6) e possui a capacidade de produzir imagens com alta resolução e clareza, sendo um bom método para a observação estrutural do biofilme. O confocal tem como princípio um sistema de varredura que utiliza uma fonte de luz a laser, podendo ser utilizado em uma grande variedade de materiais, como a imagem de células vivas. Isto é frequentemente realizado por meio de uma proteína verde ou fluorocromos ligados a outros componentes celulares (HIBBS, 2000; XAVIER et al., 2003).



**Figura 6.** Estrutura 3D de biofilme multi-especie, representada por duas espécies (azul e amarelo).  
Fonte: Xavier et al., 2003.

Existem vários métodos não visuais utilizados na avaliação da aderência bacteriana, como o método de Adesão em Microplaca, método de Tubo, método do Ágar Vermelho Congo (AVC) e ensaios bioluminescentes de ATP (ROSADO, 2008; HASSAN et al., 2011).

O primeiro método de rotina utilizado para detectar a produção de biofilme em isolados bacterianos foi o "método do Tubo" que é também conhecido como método de Christensen, proposto por Christensen et al. (1982), mas este nem sempre foi bem-sucedido na detecção de cepas com produção fraca de biofilme, recebendo, também a influência de variações no preparo do meio. Em 1989, o método Ágar Vermelho Congo (AVC) foi proposto como alternativa para a detectar a produção de biofilme,

alegando ser mais confiável do que o método de Christensen. Os dois métodos são qualitativos, tendo boa função na triagem de bactérias produtoras de biofilme (FREEMAN et al., 1989; ARCIOLA et al., 2002; JAIN & AGARWAL, 2009; HASSAN et al., 2011).

Inicialmente, o método AVC foi idealizado para bactérias Gram-positivas (FREEMAN et al., 1989), porém diversos estudos comprovam a eficiência desse método para bactérias Gram-negativas (DADAWALA et al., 2010; MURUGAN et al., 2011; HASSAN et al., 2011).

O método do AVC avalia a capacidade do micro-organismo de produzir cápsula como fator potencial para o desenvolvimento de biofilme. Este método é prático e de fácil execução (JAIN & AGARWAL, 2009). A análise direta das colônias formadas no AVC permite o reconhecimento das cepas produtoras de biofilme, caracterizadas por colônias de coloração preta, e de cepas não produtoras de biofilme caracterizadas por colônias de cor vermelha (FREEMAN et al., 1989). Assim, o ensaio não é quantitativo, e sim baseado em uma avaliação cromática, por vezes subjetiva (ARCIOLA et al., 2002).

Christensen et al. (1995) fizeram algumas modificações no método do Tubo, criando o método de Placa, considerado o método padrão ouro para detecção de biofilme. Este método é quantitativo e avalia a adesão de micro-organismos em placas de cultura celular (HASSAN et al., 2011).

O cristal violeta é utilizado para corar a biomassa do biofilme aderido nos poços da microplaca. O cristal violeta é um corante básico que se liga a moléculas carregadas negativamente e a polissacarídeos na matriz. Como as células (vivas ou mortas), assim como a matriz, são coradas pelo cristal violeta, este método não é adequado para avaliar a ação de drogas sobre células do biofilme (avaliação da morte celular) (STEPANOVIC et al., 2000; PEETERS et al., 2008).

O método de adesão em microplaca passou por algumas adaptações, e nos últimos anos é utilizado para a detecção de biofilme de bactérias anaeróbias, incluindo *B. fragilis* (WEINACHT et al., 2004; PUMBWE et al., 2007; PUMBWE et al., 2008; DONELLI et al. 2012).

## 1.5 Justificativa

*Bacteroides fragilis* é um patógeno que coloniza o trato intestinal de cães, podendo atuar como oportunista e causar infecções em vários sítios anatômicos. Sua capacidade de causar doença está relacionada com os seus fatores de virulência. Existem poucas informações acerca de fatores de virulência e formação de biofilmes de *B. fragilis* isolados de cães. Neste estudo verificou-se que *B. fragilis* mesmo quando isolados da microbiota intestinal possuem fatores de virulência e tem a capacidade de formar biofilme. Os resultados obtidos contribuem para um aumento do conhecimento científico sobre *B. fragilis* na medicina veterinária.

## **2 PERGUNTAS DE PARTIDA**

**2.1** Cepas de *B. fragilis* isoladas da microbiota fecal de cães possuem fatores de virulência e tem a capacidade de produzir biofilme?

**2.2** Quando comparados, os métodos para detecção de biofilme Ágar Vermelho Congo e Adesão em Microplaca possuem resultados semelhantes?

## **3 HIPÓTESES**

**3.1** Mesmo quando isoladas da microbiota intestinal, as cepas de *B. fragilis* possuem fatores de virulência importantes para a sua patogenicidade e produzem biofilme.

**3.2** Os métodos mostram resultados diferentes, pois possuem princípio distintos.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

- Investigar a presença de fatores de virulência e produção de biofilme de *Bacteroides fragilis* isolados de amostras fecais de cães.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Isolar e identificar *B. fragilis* a partir de amostras fecais de cães.
- Verificar fenotipicamente a presença de fatores de virulência.
- Determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas da espécie *B. fragilis* isoladas.
- Avaliar e comparar a produção de biofilme *in vitro* pelo método do Ágar Vermelho Congo e Adesão em Microplaca.
- Visualizar biofilme de *B. fragilis* por meio da microscopia confocal.

*Capítulo I:*  
*Artigo*

---

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

Brazilian Journal of Microbiology 45, 2, 647-650 (2014)  
ISSN 1678-4405

Copyright © 2014, Sociedade Brasileira de Microbiologia  
www.sbmicrobiologia.org.br

Short Communication

### Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts

Ana Catarina M. Reis<sup>1</sup>, Janice O. Silva<sup>1</sup>, Bruno J. Laranjeira<sup>1</sup>, Adriana Q. Pinheiro<sup>2</sup>,  
Cibele B.M. Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bacteriologia, Centro de Biomedicina, Universidade Federal do Ceará,  
Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>2</sup>Campus do Itaperi, Universidade Estadual do Ceará, Itaperi, CE, Brazil.

Submitted: August 16, 2012; Approved: September 9, 2013.

---

### Virulence factors and biofilm production by isolates of *Bacteroides fragilis* recovered from dog intestinal tracts

### Fatores de virulência e produção de biofilme de *Bacteroides fragilis* isolados do trato intestinal de cão

Ana Catarina M. Reis<sup>1</sup> †, Janice O. Silva<sup>1</sup> †, Bruno J. Laranjeira<sup>1</sup> †, Adriana Q.  
Pinheiro<sup>2</sup> ‡, Cibele B. M. Carvalho<sup>1</sup> †.

<sup>1</sup> Centro de Biomedicina, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Medica,  
Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal do Ceara, Brazil.

<sup>2</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

† Present Address: Universidade Federal do Ceará. Centro de Biomedicina,  
Laboratório de Bacteriologia, Rua Cel. Nunes de Melo 1315. Rodolfo Teófilo.  
Fortaleza- Ceara. Cep: 60430-270. Brazil.

‡ Present Address: Universidade Estadual do Ceará. Campus do Itaperi, Av.  
Paranjana 1 700, CEP: 60740-903. Brazil.

Correspondence: Ana Catarina M. Reis, acmr\_bio@hotmail.com

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the virulence factors of *Bacteroides fragilis* strains isolated from dog intestinal tract. *In vitro* assays to determine the biofilm formation were also performed by the Congo red agar and the microtiter plate test as the gold standard. A total of 13 strains were evaluated in this study. The assays were performed in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines and other established methods. The virulence factors studied were the presence of capsules, hemolytic, B-lactamase and hemagglutination activity, hydrophobicity, antibiotic susceptibility and biofilm formation. All the *Bacteroides fragilis* strains showed negative hemolytic activity. By using the Hiss staining method to reveal capsules, we found that all strains tested were encapsulated. Hemagglutination activity was detected in 38.4% of the strains. The *B. fragilis* strains studied showed very low cell surface hydrophobicity values (7.7%). A total of 61.5% of the strains were B- lactamase positive. The isolates were uniformly susceptible to metronidazole and chloramphenicol and were penicillin resistant. The resistance rate to clindamycin was 69.2%. The Congo red agar test was easy to perform and consumed little time, but was very difficult to read and classify the results even when supported by a colorimetric scale. Five false positive strains were found by this method versus none for the MPT method. 61.5% of the strains were biofilm producers by the microtiter plate test. Prevalence of virulence factors in biofilm-producer isolates was observed.

Key words: *B. fragilis*; biofilm; virulence factors; dogs.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os fatores de virulência de cepas de *Bacteroides fragilis* isoladas do trato intestinal de cão. Os ensaios *in vitro* para determinar a formação de biofilme foram realizados pelo método Ágar vermelho Congo e teste da microplaca que consiste num método padrão ouro. Um total de 13 amostras foram avaliadas neste estudo. Os ensaios de resistência foram realizados de acordo com o CLSI e outros métodos estabelecidos. Os fatores de virulência estudados foram a presença de cápsula, produção de hemolisinas, B- lactamase e hemaglutininas, hidrofobicidade, sensibilidade a antibióticos e formação de biofilme. Nenhuma das cepas de *Bacteroides fragilis* produziram hemólise. Ao utilizar o método de coloração de Hiss para revelação das cápsulas, verificou-se que todas as cepas testadas eram encapsuladas. Atividade hemaglutinante foi detectada em 38,4% das cepas. Apenas 7,7 % das cepas de *B. fragilis* estudadas possuíam uma superfície celular hidrofobicidade. Um total de 61,5% das cepas eram B-lactamase positiva. Todas as cepas isoladas foram sensíveis ao metronidazol e cloranfenicol e resistentes a penicilina. A taxa de resistência a clindamicina foi de 69,2%. O teste de Ágar vermelho congo foi fácil e rápido na sua execução, mas com resultados muito difícil de ler e classificar, mesmo quando utilizado uma escala colorimétrica. Quando comparado os dois métodos, cinco cepas falsos positivas foram encontrados no método do Ágar vermelho congo. 61,5% das cepas foram produtoras de biofilme pelo teste da microplaca. Foi observada uma prevalência de fatores de virulência em cepas produtoras de biofilme.

Palavras-chave: *B. fragilis*; biofilme, fatores de virulência; cães.

## INTRODUCTION

The *Bacteroides fragilis* group is a significant component of the normal flora that inhabits the mucosal surfaces of the gastrointestinal tract, playing a key role in preventing the colonization of exogenous microbial populations. But some species are also consummate opportunistic pathogens. *Bacteroides fragilis* species, which account for only 0.5% of the normal colonic flora, are recognized as the single most important anaerobic pathogen (13).

*Bacteroides fragilis* bacilli have been isolated from intestinal flora and from infectious processes in humans and animals. Hirsh *et al.* (16) reported the results of a survey designed to determine the relative incidence and species of anaerobic bacteria found in clinical specimens obtained from animals. Of the 2,234 bacteriologically positive specimens, 26% were positive for anaerobic strains. The most common sites from which anaerobes were isolated were abscesses, peritoneal exsudates and pleural effusions. *Bacteroides fragilis* accounted for 1% of all isolates. Guardabassi *et al.* (15) isolated *B. fragilis* from patients with dog and cat bites. In a comparison study between cultured small-intestinal and fecal microbiotas from Beagles, Mentula *et al.* (19) found that *B. fragilis* strains were the most frequently isolated from the jejunum and the second most frequent Gram negative anaerobic strain in feces, followed by *B. vulgatus*.

Cats and dogs represent potential sources of antimicrobial resistance due to the extensive use of antimicrobial agents in these animals and their close contact with humans. Bacterial resistance to antimicrobial agents and virulence are mechanisms that play an important role in determining the outcome of a bacterial infection. Virulence and resistance are not independent properties, but rather are closely related. The relationship can be seen in two ways: as genetic elements carrying

genes associated with both virulence/resistance and when the acquisition of resistance affects the virulence of the bacteria (27).

The three major virulence factors in anaerobes are the ability to adhere to or invade epithelial surfaces, the production of toxins and enzymes and surface constituents of the organisms, such as capsula polysaccharide or lipopolysaccharide (11).

*B. fragilis* is the only bacterium that has been shown to induce abscess formation as the sole infecting organism. Abscess formation has been clearly linked to the *B. fragilis* capsule in animal models. There are various opinions concerning the prevalence of capsules among clinical isolates of *B. fragilis*. Electron micrographs reveal that even within an individual strain of *B. fragilis*, large-capsule, small-capsule and noncapsulated variants can be observed (34).

The ability to form biofilms is now seen as a universal attribute of microorganisms. The organisms within biofilms are notorious for their resistance to the host's immune response and antibacterial agents compared to their free-living planktonic counterparts, thus negatively influencing the outcome of bacterial infections. Although less research exists about biofilms in animals, they are believed to be involved in many diseases such as pneumonia and enteritis, as well as liver abscesses, wound infections and mastitis infections (18, 8). These infections can be caused by environmental organisms as well as by species of bacteria that constitute part of the normal microflora of animals. Through a combination of endogenous and exogenous factors, these generally harmless commensals may become pathogenic (4).

In the present study, *Bacteroides fragilis* strains isolated from dog intestinal tract were evaluated virulence factors *in vitro*, such as capsule formation, hemolytic and B-lactamase activity, hemagglutination activity, hydrophobicity and antibiotic

susceptibility. *In vitro* assays to determine the biofilm formation were also performed. The Congo red agar test for detection of biofilm in *B. fragilis* strains was evaluated and compared with the results of the microtiter plate test as the gold standard.

## **METHODS**

### **1. Bacterial isolates and identification**

The 13 *B. fragilis* strains were isolated from dog intestinal tract in the period from January to May 2011. The animals were from the Veterinary Hospital Unit of State University of Ceará. The study was approved by the hospital's research ethics committee (number 10610110-2/57). Animals that had undergone antimicrobial chemotherapy during the past 90 days were rejected. The feces were collected by a rectal swab and the swabs were inoculated on semi-solid pre-reduced Cary & Blair medium and sent to the Bacteriology Laboratory of Ceará Federal University. The samples were processed for isolation of *B. fragilis* group in *Bacteroides* Bile Esculin agar (BBE, HiMedia<sup>®</sup>) supplemented with 100 µg ml<sup>-1</sup> of gentamycin, under anaerobiosis (90% N<sub>2</sub> and 10% CO<sub>2</sub>). The bacterial strains isolated from BBE plates were biochemically and physiologically identified according to established methods (30). The identification chart included verification of anaerobic physiology by respiratory testing, bacterial morphology by Gram staining and determination of esculin hydrolysis, indole, catalase and carbohydrate fermentation (arabinose, celobiose, ramnose, sucrose, trealose, xilan, xylose, salicin). The tests, performed in duplicate, were repeated three times to validate the conventional biochemical/physiological identification.

### **2. Capsule detection**

Capsules were detected by using Hiss staining with modifications (21). Each isolate was anaerobically grown in peptone-yeast extract (PY) with 1% glucose. A drop of 24-h-bacterial-suspension was deposited on a microscope slide. Then it was covered with 1% crystal violet and heated until vapor emission. Each slide was washed with 20% (w/v) of copper sulfate and allowed to air-dry. The capsule was identified under light microscopy (100X) through visualization of a clear area around the bacteria. The strain *Klebsiella pneumoniae* ATCC®13883 was used as positive control.

### **3. Hemolytic activity**

The hemolysin production was ascertained by culture on trypticase soy agar (TSA, OXOID®) enriched with horse blood (5%) (2). Plates were inoculated in duplicate by using a Steer's replicator, with a given final inoculum of  $10^5$  CFU spot<sup>-1</sup>, and then incubated in anaerobiosis at 37 °C for 48 h. The hemolytic activity was identified through verification of a clear zone around the bacterial growth.

### **4. Hemagglutination assays (HA)**

Dog, sheep and human blood samples were used to investigate the haemagglutinating activity of the strains. Organisms were grown in BHI broth, in anaerobiosis, for 24 h at 37 °C, then harvested, pelletized and washed (10,000 g, 5 min) three times in PBS. The bacterial suspension was adjusted to  $1.5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> (32). Dog, human and sheep erythrocytes collected and stored at a concentration of 10% in Alsevier's solution were harvested and then washed three times (600 g, 4 °C, 5 min) and finally resuspended at 1% in PBS. HA was tested qualitatively by mixing 50µl of bacterial suspension with 50µl of erythrocyte suspension in a 96-well microtitre plate (V shaped). Hemagglutination activity titers

were expressed through the reciprocal of the highest bacterial dilution showing agglutination activity.

## **5. Hydrophobicity (Hp)**

The hydrophobicity of the bacterial surface was measured through the interaction with hexadecane (26). Strains grown in BHI broth for 24 h, at 37 °C were washed three times in phosphate-urea-magnesium buffer (PUM) and resuspended to *ca.*  $1.5 \times 10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ . Then, 3 ml of bacterial suspension was mixed with 400  $\mu\text{l}$  of n-hexadecane (Sigma<sup>®</sup> Chemical Co., US) and incubated at 30 °C, for 10 min. After vortexing and the separation of two phases, absorbance (A540nm) was determined. Hp values were expressed through the percentage of bacteria recovered in the aqueous phase. Percentage values >50% were considered as hydrophilic, and Hp <50% as hydrophobic. These tests were performed in triplicate.

## **6. Antibiotic susceptibility testing**

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the agar dilution method, according to the CLSI (3). The antimicrobial drugs tested were: penicillin, clindamycin, chloramphenicol and metronidazole. The reference strain *B. fragilis* ATCC<sup>®</sup> 25285 was included for quality control.

## **7. Beta-lactamase activity**

To perform the iodometric strip method, beta-lactamase strips (OXOID<sup>®</sup>) were used. The strips were moistened with iodine and 2-3 colonies of bacteria were smeared. If the color of the strip changed in 5 min, the bacteria were beta-lactamase positive.

## **8. Assay for adhesion:** Phenotypic characterization of biofilm production

### **8.1 Congo red agar (CRA) test**

The CRA method was performed according to the protocol of Freeman *et al.* (12). The constituents of the media were brain heart infusion broth (37 g l<sup>-1</sup>), sucrose (0.8 g l<sup>-1</sup>), agar-agar (10 g l<sup>-1</sup>) and Congo red stain (0.8 g l<sup>-1</sup>). All the chemicals were supplied by Himedia<sup>®</sup>. Plates of the medium were inoculated and incubated anaerobically for 48h at 37 °C. Black colored colonies were considered as biofilm-producing strains. A modified six-color reference scale was used for a classification of the colonies' colors according to Arciola *et al.* (1). The strain *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923 was used as positive control.

### **8.2 Microtiter plate test (MPT)**

The biofilm assay was performed essentially as described by Donelli *et al.* (8) and Weinacht *et al.* (33). Bacterial strains were grown anaerobically at 37 °C in BHI broth for 24 h. Each well of a 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate (3 wells for each strain) was filled with 20 µl of the broth culture (adjusted to 0.5 McF) and 180 µl of fresh BHI supplemented with 1% glucose. As control, a well with fresh BHI supplemented with 1% glucose without bacteria has been used. The plate was covered with a lid and incubated anaerobically for 48 h at 37 °C. The plates were washed 3x with PBS, and 200 µl of 0.01% w/v crystal violet was added. After 20 min, the stain was removed, and the plates were washed 4x with PBS. The adherent bacteria and stain were solubilized with 95% ethanol. The optical density (OD) of each well was measured at 540 nm by using a microplate photometer (Multiscan FC, Thermo Scientific). The cut-off OD (OD<sub>c</sub>) is defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. According to the defined OD<sub>c</sub>, all the strains were classified on the basis of their adherence ability

into the following categories: non-adherent ( $OD \leq OD_c$ ), weakly adherent ( $OD_c < OD \leq 2XOD_c$ ), moderately adherent ( $2OD_c < OD \leq 4XOD_c$ ), and strongly adherent ( $4xOD_c < OD$ ) (29). The tests, performed in triplicate, were repeated five times.

### **8.3 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

Two *B. fragilis* strains were chosen for this study: 25C1, a non-biofilm-producing strain, and 47C4, a biofilm-producing strain. In order to investigate by CLSM the ability of single bacterial strains to form biofilms, each well of a 12-well plastic tissue culture plate, with a 13-mm diameter glass coverslip placed on the bottom, was filled with 200  $\mu$ l of a broth culture (adjusted to 0.5 McF) of each strain and 1.8 ml of BHI broth supplemented with 1% glucose, and then were incubated for 48 h at 37 °C. After incubation, the content of each well was removed and the wells were washed carefully three times with PBS. Biofilms grown on coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde at room temperature for 30 min and stained with the LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits (Invitrogen, Molecular Probes<sup>®</sup>) by adding in each well of a 12-well plate 3  $\mu$ l of the dye mixture in 1 ml of distilled water for 15 min at room temperature in the dark (8). The stain was aspirated and the coverslips were gently washed twice with distilled water. Fluorescence from the stained biofilms was viewed using a CLSM (Olympus FV 1.000) and the mounted specimens were observed using a 60x lens.

## **RESULTS**

All the *B. fragilis* strains were catalase positive. The hemolysin test was negative for all the strains. By using the Hiss staining method for demonstration of capsules, it was found that all strains tested were encapsulated. Hemagglutination activity for

dog's blood was detected in 38.4% of the strains, showing HA titers of 1:1. 40% of them also showed hemagglutination activity utilizing human blood (A+). Hemagglutination activity for sheep's blood was negative for all the strains. The *B. fragilis* strains studied showed very low cell surface hydrophobicity values (7.7%). A total of 8 (61.5%) of the strains were beta-lactamase positive. The isolates were uniformly susceptible to metronidazole and chloramphenicol and were resistant to penicillin. The resistance rate to clindamycin was 69.2%. Of the eight strains forming biofilm, five showed strong resistance and three showed intermediate resistance to that drug.

By the CRA method, four (30.76%) isolates showed black colonies with dry crystalline consistency (high biofilm producers), four (30.76%) showed black colonies with intermediate consistency (moderate biofilm producers), four (30.76%) showed black colonies with mucoid appearance (weak biofilm producers), and one (7.7 %) showed pink/bordeaux colored colonies (non-biofilm producers) (Table 1).

Table 1. Colorimetric scale adopted for colony evaluation of 13 *B. fragilis* strains tested by the CRA method to detect slime production.

Detection of biofilms				
Total strains (13)				
	NON PRODUCERS (%)	HIGH (%)	MODERATE (%)	WEAK (%)
	01 (7,8%)	04 (30,76%)	04 (30,76%)	04 (30,76%)

The anaerobic strains also were investigated for their ability to adhere *in vitro* to plastic tissue culture plate. The results are shown in Table 2. Among 13 isolates, 8 (61.5%) strains were capable of producing biofilm by the standard method. Comparison of the tests (CRA and MPT) showed that in the CRA test, five isolates were found to be false positive (Table 3).

Table 2. Mean optical density (OD) values of *B. fragilis* strains measured by the quantitative biofilm production test (MPT).

Clinical strains	Mean OD
25C1	0.2280
29C2	0.4773
30C1	0.2420
32C4	0.2783
33C2	0.4353
34C2	0.3170
35C2	0.2590
38C2	0.3800
40C5	0.3307
44C7	0.4370
47C4	0.2060
49C3	0.1857
42C3	0.4637
BHIS	0.1390

■ (OD ≤ OD<sub>c</sub>) Non-adherent

■ (OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2XOD<sub>c</sub>) Weakly adherent

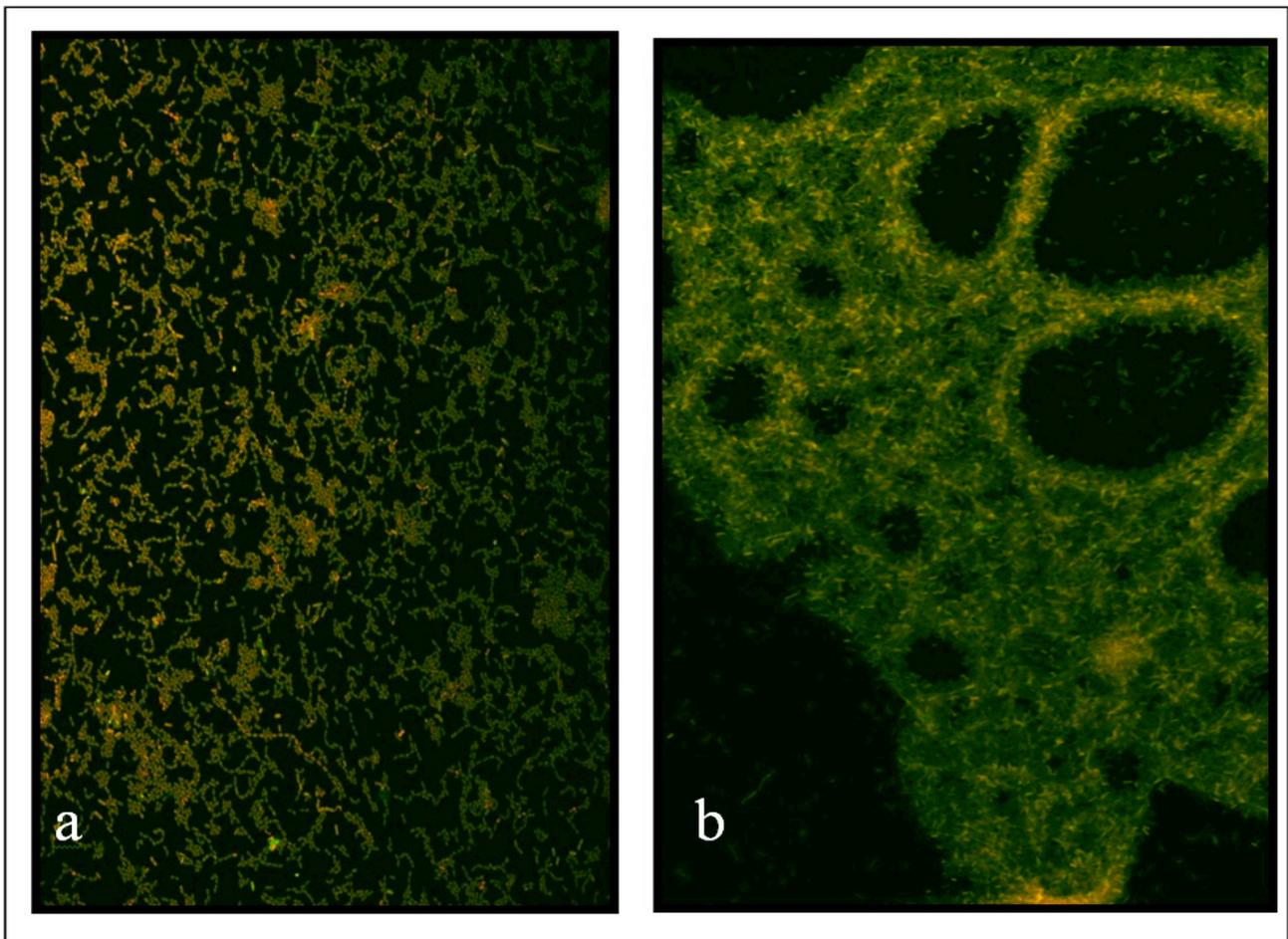
Table 3. Screening of biofilm production methods by Congo red agar (CRA) and microtiter plate test (MPT).

Number of strains (13)	BIOFILM PRODUCTION	CRA (%)	MPT (%)
	Weak	4 (30.7%)	8 (61.5%)
Moderate	4 (30.7%)	0	

High	4(30.7%)	0
Non producers	1 (7.8%)	5 (38.5%)
<b>Total producing strains</b>	<b>12</b>	<b>8</b>

Confocal microscopy showed isolated bacteria and small clusters in the 25C1 non-biofilm-producing strain's image Fig. 1(a). The biofilm-producing 44C7 strain was observed Fig. 1(b) as cell aggregates.

Fig. 1. CLSM micrographs of mono-species biofilm, of non-biofilm-producing *Bacteroides fragilis* 25C1 (a) and biofilm of *B. fragilis* 44C7 (b). Biofilms were stained with a live/dead stain.



## DISCUSSION

*B. fragilis* colonize the gut both as a commensal and as an infectious opportunistic pathogen. Numerous factors contribute to its ability to persist in that site, such as the

capacity to use a wide range of dietary polysaccharides, high bile tolerance, capsule formation and variable surface antigens that allow it to evade the host's immune responses and the capacity of adhesion and biofilm formation (34).

Adherence of bacteria to the surface layer cells of the host enables commensal bacteria and potential pathogens to overcome flushing mechanisms which cleanse mucous membranes (35). Although adhesion is essential for maintaining members of the normal microflora in their host, it is also the crucial first stage in any infectious disease (35). Encapsulated *Bacteroides* species are most often found in abdominal abscesses and the bloodstream, but have been reported in isolates from resident intestinal microbiota (10). The capsular polymer can first protect *B. fragilis* cells from phagocytosis and then, probably when produced in larger amounts, stabilize adhesion of cells to epithelia (23). In this study, all the examined *B. fragilis* strains were encapsulated. These results correspond to those reported by Kasper *et al.* (17), Domingues *et al.* (7), Nakano and Avila-Campos (22) and Nakano *et al.* (23).

The *B. fragilis* strains studied showed low hydrophobicity values. This may be due to the capsules, which are usually hydrophilic, and can contribute to the low hydrophobicity of the strains (22, 26)

Domingues *et al.* (6) analyzed 31 *B. fragilis* strains isolated from intestinal microbiota and other infections and observed that 84.2% of the clinical strains were HA-positive. On the other hand, Nakano and Avila-Campos (22) analyzed 64 *B. fragilis* strains from human intestinal microbiota and found variable data in the hemagglutination assay: four strains were able to hemagglutinate erythrocytes, showing HA titers of 8. In this study 38.4% of the strains were HA-positive to dog

blood and some strains also agglutinated human blood. This suggests that adhesion or outer membrane proteins could be responsible for hemagglutination (32).

The classic method most often used to phenotypically detect slime production in staphylococcal species is the Congo red agar (CRA) plate test, as described by Freeman *et al.* (12). Some authors have evaluated the effectiveness of this method for detecting Gram negative bacteria.

Dadawala *et al.* (5) studied 14 *E. coli* isolates and compared their ability to produce biofilm *in vitro* by slime production on Congo red agar medium and the microtitre plate test (MPT). Out of 14 isolates tested, 10 were positive for biofilm formation by the MPT. By the AVC method, two isolates were found to be false positive.

Murugan *et al.* (20) screened 96 *E. coli* clinical isolates for biofilm formation using the tube method and Congo red agar (CRA) method. Of the 96 isolates, 84.37% displayed a biofilm positive phenotype under the optimal conditions by the tube method. Screening in CRA did not correlate well with the tube method.

In the CRA method, the direct analysis of the colonies formed on the solid medium allows the recognition of biofilm-producing strains (characterized by black to almost black colonies) and of non-biofilm-producing strains (pink/red to Bordeaux colored colonies). Hence, the assay is not quantitative, but rather is based on a subjective chromatic evaluation. In this study, high producing biofilm strains displayed black colonies with a dry crystalline consistency but the other isolates showed almost black colonies without crystalline consistency, which were difficult to evaluate.

During commensal existence in the human digestive tract, *B. fragilis* maintains a low but sustainable bacterial population. In cases of gastroenteritis, bacterial doses

significantly increase, and gene expression patterns change. *B. fragilis* exists in biofilm so as to maintain an optimum population and uses membrane efflux pumps to extrude noxious agents, including antibiotics (25). From the human gastrointestinal microbiota, *B. fragilis* has been the main anaerobic bacteria studied that can form biofilms. Most recent studies have demonstrated that *Bacteroides* strains from human gastrointestinal microbiota can form biofilms *in vitro* (28, 14, 8). In this study, 61.5% of the *B. fragilis* strains isolated from dogs' intestinal microbiota were biofilm producers according to the MPT.

Clindamycin resistance has been reported since 1980. It has been observed, considered variation in the clindamycin resistance rates in different surveys, ranging from low to moderate and high resistance rates. The high resistance rate observed in this study (69.2%) was surprising and might be associated to the wide use of macrolides in veterinary clinics. In Brazil, antimicrobial resistance surveys of *Bacteroides* strains from human intestinal microbiota have shown lower resistance rates. Ferreira *et al.* (9) investigated antimicrobial resistance of *B. fragilis* group strains from children's intestinal microbiota and found the clindamycin resistance rates of 22.7% (resistance) and 38.6% (intermediary resistance). Nakano *et al.* (24), studying the antimicrobial resistance profile of *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated from children's intestinal microbiota, found 34.2% resistance to clindamycin.

It is important to isolate highly resistant strains in domestic animals because these strains can circulate from animals to humans. According to Van den Bogaard and Stobberingh (31), resistance genes against antibiotics that are or have only been used in animals were found soon after their introduction, not only in animal bacteria but also in the environment and in the commensal flora of humans. This makes it

clear that not only clonal spread of resistant strains occurs, but also transfer of resistance genes between human and animal bacteria.

On the basis of data obtained by CLSM investigation, the image of the biofilm-producing 44C7 strain appears quite different from the non-biofilm-producing 25C1 strain, with an aggregate of cells and a dense and thick appearance. In summary, the results of this study show that eight isolates of *B. fragilis* recovered from dogs' intestinal microbiota were biofilm producers *in vitro*. All of these strains were encapsulated, 50% showed HA activity and all showed high or intermediary clindamycin resistance. Our experience as well as that of other researchers confirms that the CRA test is easy to perform and consumes little time, but is very difficult to read and to classify strains, even when this is supported by a colorimetric scale. Our study indicates a prevalence of virulence factors in biofilm-producing isolates.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Research (CNPq) for financial support. This study could not have been done without the cooperation of the veterinarian of the Veterinary Clinic of UECE, Dra. Rosemeire Sousa Freire, and the technical support of José Olavo Moraes.

#### **REFERENCES**

1. Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Gamberini, S.; Cervellati, M.; Donati, E.; Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*. 23(21), 4233– 4239.

2. Avila-Campos, M.J. (1995). Haemolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains on different blood types. *Rev Inst Med Trop.* 37 (3), 215-217.
3. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. 7ed., Approved Standard M11- A7. CLSI, Wayne, P. A., U. S., v.24, n° 2.
4. Clutterbuck, A.L.; Woods, E.J.; Knottenbelt, D.C.; Clegg, P.D.; Cochrane, C.A.; Percival, S.L (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 121(1-2), 1-17.
5. Dadawala, A.I.; Chauhan H.C.; Chandel, B.S.; Ranaware, P.; Patel Sandip S.; Khushboo Singh, Rathod P.H.; Shah N.M.; Kher, H.N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for *In vitro* biofilm production. *Vet World.* 3 (8), 364-366.
6. Domingues, R.M.C.P.; Cavalcanti, S.M.B.; Fonseca, M.E.F.; Ferreira, M.C.S. (1991). Hemagglutination activity of *Bacteroides fragilis* as a virulence marker. *Rev Microbiol.* 22 (4), 277-281.
7. Domingues, R.M.C.P.; Oliveira, M., Hirata, R.J.; Andrade, A.F.B.; Ferreira, M.C.S. (1995). *Bacteroides fragilis*: an exogenous pathogen? *Zbl Bakt.* 282 (3), 296-302.
8. Donelli, G.; Vuotto, C.; Cardines, R.; Mastrantonio, P. (2012). Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65 (2), 318-325.

9. Ferreira, D.P.; Silva, V.L.; Guimaraes, D.A.; Coelho, C.M.; Zauli, D.A.G.; Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Diniz, C.G. (2010). Distribution, detection of enterotoxigenic strains and antimicrobial drug susceptibility patterns of *Bacteroides fragilis* group in diarrheic and non-diarrheic feces from Brazilian infants. *Braz. J. Microbiol.* 41 (3), 603-611.
10. Ferreira, E.O.; Falcão, L.S.; Vallim, D.C.; Santos, F.J.; Andrade, J.R.C.; Andrade, A.F.B.; Vommaro, R.C.; Ferreira, M.C.S.; Domingues, R.M.C.P (2002). *Bacteroides fragilis* adherence to Caco-2 cells. *Anaerobe.* 8 (6), 307–314.
11. Finegold, S.M.; Baron, E.J.; Wexler, H.M (1992). A clinical guide to anaerobic infections. Star Publishing Co, Belmont, United States of America.
12. Freeman, J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42 (8), 872-874.
13. Goldstein, E.J.C (2002). Intra-abdominal anaerobic infections: bacteriology and therapeutic potential of newer antimicrobial carbapenem, fluoroquinolone and desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis.* 35 (1), 106-111.
14. Guaglianone, E.; Cardines, R.; Vuotto, C.; Di Rosa, R.; Babini, V.; Mastrantonio, P.; Donelli, G. (2010). Microbial biofilms associated with biliary stent clogging. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 59 (3), 410- 420.
15. Guardabassi, L.; Schwarz, S.; Lloyd D.H (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 54 (2), 321-332.

16. Hirsh, D.C.; Biberstein, E.L.; Jang, S. (1979). Obligate anaerobes in clinical veterinary practice. *J. Clin Microbiol.* 10 (2), 188-191.
17. Kasper, D.L.; Hayes, M.E.; Reinap, B.G.; Craft, F.O.; Onderdonk, A.B.; Polk, B.F. (1977). Isolation and identification of encapsulated strains of *Bacteroides fragilis*. *J Infect Dis.* 136 (1), 75-81.
18. Melchior, M.B.; Vaarkamp, H.; Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 171 (3), 398-407.
19. Mentula, S.; Harmoinen, J.; Heikkilä, M.; Westermarck, E.; Rautio, M.; Huovinen, P.; Kononen, E. (2005). Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in Beagle dogs. *Appl Environ Microbiol.* 71 (8), 4169– 4175.
20. Murugan, S.; Devi, P.U.; John, P.N. (2011). Antimicrobial susceptibility pattern of biofilm producing *Escherichia coli* of urinary tract infections. *Curr Res Bacteriol.* 4, 73-80.
21. Namavar, F.; Marian, A.; Verweij-Van Vught, J.J.; Maclaren, D.M. (1991). A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol.* 137(6), 1431-1435.
22. Nakano, V.; Avila-Campos, M.J. (2004). Virulence markers and antimicrobial susceptibility of bacteria of *Bacteroides fragilis* group isolated from stool of children with diarrhea in SãoPaulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99 (3), 307–312.
23. Nakano, V.; Piazza, R.M.F.; Cianciarullo, A. M.; Bueris, V.; Santos, M.F.; Menezes, M.A.; Mendes-Ledesma, M.R.; Szulczewski, V.; Elias, W.P.;

- Pumbwe, L.; Wexler, H.; Avila-Campos, M.J. (2008). Adherence and invasion of Bacteroidales isolated from the human intestinal tract. *Clin Microbiol Infect.* 14 (10), 955–963
24. Nakano, V.; Silva, A.N.; Merino, V.F.C.; Wexler, H.M.; Avila-Campos, M.J. (2011). Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. *Clinics.* 66 (4), 543-547.
25. Pumbwe, L.; Skilbeck, C.A.; Wexler, H.M. (2008). Presence of Quorum-sensing Systems Associated with Multidrug Resistance and Biofilm Formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb Ecol.* 56 (3), 412–419.
26. Rosenberg, M.; Perry, A.; Bayer, E.; Gutnick, D.; Rosenberg, M.; Ofek, I. (1981). Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG- 1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect Immun.* 33 (1), 29-33.
27. Soto, S.M (2009). Relationship between virulence and antimicrobial resistance in bacteria. *Rev med microbial.* 20 (4), 84-90.
28. Sproule-Willoughby, K.M.; Stanton, M.M.; Rioux, K.P.; McKay, D.M.; Buret, A.G.; Ceri, H. (2010). In vitro anaerobic biofilms of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods.* 83 (3), 296-301.
29. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Dakic, I.; Savic, B.; Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 40 (2), 175-179.
30. Summanen, P.; Baron, E.; Citron, D.M.; Strong, C.; Wexler, H.M.; Finegold, S.M. (1993). *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. Star Publishing company, fifth edition.

31. Van den Bogaard A.E.; Stobberingh E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents*. 14 (4), 327-335.
32. Vel, W.A.C.; Navamar, F.; Marian, A.; Verweij-Van Vught, J.J.; Pubben, A.N.B.; Maclaren, D.M. (1986). Haemagglutination by *Bacteroides fragilis* group. *J Med Microbiol*. 21(2), 105-107.
33. Weinacht, K.G.; Roche, H.; Krinos, C.M.; Coyne, M.J.; Parkhill, J.; Comstock., L.E. (2004). Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affecting the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol*. 53 (5), 1319–1330.
34. Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. 20 (4), 593-621.
35. Wilson, M. (2002). Bacterial adhesion to host tissues: mechanisms and consequences. *Adv Mol Cell Microb*. 1:1, 39.

## 6. CONCLUSÕES

1. Neste estudo bactérias da espécie *B. fragilis* fazem parte da microbiota intestinal de cães;
2. Mesmo fazendo parte da microbiota, a maioria das cepas de *B. fragilis* isoladas de amostras fecais de cães apresentam os fatores de virulência estudados;
3. Algumas cepas apresentaram nos ensaios *in vitro* de produção de biofilme a capacidade de produzir biofilme;
4. Cepas de *B. fragilis* formadoras de biofilme possuíam uma tendência em alguns fatores de virulência e resistência a antibióticos;
5. Percentual de resistência a clindamicina foi maior do que os encontrados na literatura.
6. O método do Agar Vermelho Congo mostrou-se promissor como um método de triagem para cepas de *B. fragilis* produtoras de biofilme;

## 7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SINGH, K.P.; JAIN, A. (2010). Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 58,147-160.

ALDRIDGE, K.; O'BRIEN, M. (2002). In vitro susceptibilities of the *Bacteroides fragilis* group species: change in isolation rates significantly affects overall susceptibility data. *J Clin Microbiol.* 40, 4349-4352.

AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. (2008). Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. *J Food Prot.* 71, 1510-25.

APARNA, M. S.; YADAV, S. (2008). Biofilms: Microbes and Disease. *Braz J Infect Dis.* 12, 526-530.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials.* 23, 4233– 4239.

AWADEL-KARIEM, F.M; PATEL, P.; KAPOOR, J.; BRAZIER, J.S.; GOLDSTEIN, E.J. (2010). First report of *Parabacteroides goldsteinii* bacteraemia in a patient with complicated intra-abdominal infection. *Anaerobe.* 6, 223-225.

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. (2011). *Rev Food Sci F.* 10, 83-193.

BATONI, G; MAISETTA, G; BRANCATISANO, L.F.; ESIN, S.; CAMPA, M. (2011). Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: Advantages and Limits. *Current Medicinal Chemistry.* 18, 256-279.

BELL, J.A; KOPPER, J.J; TURNBULL, J.A; BARBU, N.I; MURPHY, A.J; MANSFIELD, L.S. (2008). Ecological characterization of the colonic microbiota of normal and diarrheic dogs. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* ID:149694.

BOENTE, R. F.; FERREIRA, L. Q.; FALCÃO, L. S.; MIRANDA, K.R.; GUIMARÃES, P. L. S.; FILHO, J. S.; VIEIRA, J. M. B. D.; BARROSO, D. E.; EMOND, J. P.; FERREIRA, E. O.; PAULA, G. R.; DOMINGUES, R. M. C. P. (2010). Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe.* 16, 190-194.

BORNSIDE, G.H.; COHN, I. (1965). The normal microbial flora. Comparative bacterial flora of animals and man. *Dig Dis Sci.* 10, 844-852.

BRAGA, C.A.S.B; RESENDE, C.M.F; PESTANA, A.C.N.R; CARMO, L.S; COSTA, J.E; SILVA, L.A.F; ASSIS, L.N; LIMA, L.A; FARIAS, L.M; CARVALHO,

M.A.R. (2005). Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. *Ciência Rural*. 35, 385-390.

BROOK, I. (2008). Anaerobic infections: Diagnosis and management. 1a ed. EUA: Informa Healthcare Inc.; p. 417.

BROOK, I. (2010). The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe*. 16, 183-189.

CAMILI, A.; BASSLER, B.L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*. 24, 1113-1116.

CARNEIRO, A.P.; TONIOLLO, G.H.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. (2005). Avaliação microbiológica da flora vaginal e do corpo uterino de cadelas (*Canis familiaris*) submetidas a ovariossalpingohisterectomia. *ARS Veterinaria*. 21, 361-367.

CARVALHO, C.B.M.; NETO, R.M.; ARAGÃO, L.P.; OLIVEIRA, M.M.; NOGUEIRA, M.B.; FORT, A.C. (2004). Pé diabético: análise bacteriológica de 141 casos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 48, 406-413.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L.; BEACHEY, E.H. (1982). Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*. 37,318-326.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.A. et al. (1995). Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol*. 22,996-1006.

CLSI CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2007). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 7ed., Approved Standard M11- A7. CLSI, Wayne, P. A., U. S., v.24, nº 2.

COYNE M.J.; TZIANABOS, A.O.; MALLORY, B.C; CAREY, V.J.; KASPER, D.L.; COMSTOCK, L.E. (2001). Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun*. 69, 4342–4350.

DADAWALA, A.I.; CHAUHAN H.C.; CHANDEL, B.S.; RANAWARE, P.; PATEL SANDIP S.; KHUSHBOO SINGH, RATHOD P.H.; SHAH N.M.; KHER, H.N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for *In vitro* biofilm production. *Vet World*. 3, 364-366.

DAVIS, S.C.; RICOTTI, C.; CAZZANIGA, A.,; WELSH, E.; EAGLSTEIN, W.H.; MERTZ, P.M. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen*. 16, 23-29.

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

DONELLI, G.; VUOTTO, C.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P. (2012). Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65, 318-325.

DONGARI-BAGTZOGLU A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6, 201-208

DUBREUIL, L.; ODOU, M.F. (2010). Anaerobic bacteria and antibiotics: What kind of unexpected resistance could I find in my laboratory tomorrow? *Anaerobe.* 16, 555-559.

E. RODRÍGUEZ, M.M.; GAMBOA, C.; RODRÍGUEZ Y P, VARGAS (2006). Grupo *Bacteroides fragilis* en heces humanas no diarreicas y su sensibilidad antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap.* 19, 357-362.

FERREIRA, E.O.; FALCAO, L.S.; VALLIM, D.C.; SANTOS, F.J.; ANDRADE, J.R.C.; ANDRADE, A.F.B.; ET AL. (2002). *Bacteroides fragilis* adherence to CACO-2 cells. *Anaerobe* 8, 307-314.

FINEGOLD, S. M. (1977). Anaerobic bacteria in human disease. Academic Press: London.

FINEGOLD, S.M. (1995). Overview of clinically important anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* 20, 205-207.

FINEGOLD, S.M.; BARON, E.J.; WEXLER, H.M (1992). A clinical guide to anaerobic infections. Star Publishing Co, Belmont, United States of America.

FREEMAN, J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42, 872-874.

GALVÃO, B.P.G.V.; MEGGERSEE, R.L.; ABRATT, V.R. (2011). Antibiotic resistance and adhesion potential of *Bacteroides fragilis* clinical isolates from Cape Town, South Africa. *Anaerobe.* 17, 142-146.

GOLDSTEIN, E.J.C (2002). Intra-abdominal anaerobic infections: bacteriology and therapeutic potential of newer antimicrobial carbapenem, fluoroquinolone and desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis.* 35, 106-111.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; SUCHODOLSKI, J.S.; JONES, K.R.; CLARK-PRICE, S.C.; DOWD, S.E.; MINAMOTO, Y.; MARKEL, M.; STEINER, J.M.; DOSSIN, O. (2012). Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol.* 80, 624–636.

- GRAY, T. J.; SHRYOCK, T. R. (2005). Antibiotic Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Animals. *Clin Microbiol Newsl.* 27, 131-135.
- GRONLUND, M.M.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; LEHTONEN, O.P.; ISOLAURI. (2000). Importance of intestinal colonisation in the prospective follow up study of healthy infants aged maturation of humoral immunity in early infancy: a 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 83, 186–192.
- GUAGLIANONE, E.; CARDINES, R.; MASTRANTONIO, P.; DI ROSA, R.; PENNI, A.; PUGGIONI, G.; BASOLI, A.; FIOCCA, F.; DONELLI, G. (2008). Role of multispecies microbial biofilms in the occlusion of biliary stents. *Microb Ecol Health.* 20, 207–209.
- GUAGLIANONE, E.; CARDINES, R.; VUOTTO, C.; DI ROSA, R.; BABINI, V.; MASTRANTONIO, P.; DONELLI, G. (2010). Microbial biofilms associated with biliary stent clogging. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 59, 410–420.
- GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD D.H (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 54, 321-332.
- HARDMAN, A.M.; STEWART, G.S.; WILLIAMS, P. (1998). Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 74, 199-210.
- HASSAN, A.; USMAN, J.; KALEEM, F.; OMAIR, M.; KHALID, A.; IQBAL, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 15, 305-311.
- HENTGES, D. J. (1993). Role of the intestinal flora in host defense against infection, p. 311–332. In D. J. Hentges (ed.), *Human intestinal microflora in health and disease.* Academic Press, London, United Kingdom.
- HIBBS A. 2000. Confocal microscopy for biologists: an intensive introductory Course. *BIOCON* ed. pp. 2-9
- HIRSH, D. C. (2009). Anaeróbios obrigatórios não- formadores de esporos do trato alimentar. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*, 2<sup>a</sup> ed, Guanabra Koogan. 77-79.
- HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.
- HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E. (1984). Taxonomy of anaerobes: present state of the art. *Rev Infect Dis.* 6, 3-10.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATHM, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (1984) *Berguey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> edn. Baltimore, MD: Willians and Williams.

HUIJSDENS, X. W.; LINSKENS, R.K.; MAK, M.; MEUWISSEN, S.G.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; SAVELKOUL, P.H. (2002). Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40,4423–4427.

JAIN, A.; AGARWAL, A. (2009) Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods.* 76, 88-92.

KALKA-MOLL, W.M.; WANG, Y.; COMSTOCK, L.E.; GONZALEZ, S.E.; TZIANABOS, A.O.; KASPER, D.L. (2001) Immunochemical and biological characterization of three capsular polysaccharides from a single *Bacteroides fragilis* strain. *Infect Immun.* 69, 2339–44.

KASPER, J.B.; SPERANDIO, V. (2005). Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 73, 3197–3209.

KARATAN, E.; WATNICK, P. (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73,310–347.

KATSANDRI, A; PAPAPARASKEVAS, J; PANTAZATOU, A; PETRIKKOS, G.L.; THOMOPOULOS, G; HOULOUA, D.P.; AVLAMIS, A. (2006). Two cases of infections due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group strains. *J Clin Microbiol.* 44, 3465-3467.

KO, K.S.; KUWAHARA, T.; LEE, K.; KOOK, Y. (2009). Population structure and distribution of virulence-related genes of *Bacteroides fragilis* isolates from Korea and Japan. *Diag Microbiol Infect Dis.* 64,340-343.

KOLENBRANDER, P.E. (2011). Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci.* 3, 49-54.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, E.; SCHRECKENBERGER, PC.; Jr. WINN, WC.; WOODS, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas Colorido*, 6<sup>a</sup> ed, Guanabara Koogan.

KORU, O.; OZYURT, M. (2008) Determination of antimicrobial susceptibilities of clinically isolated anaerobic bacteria by E-test, ATB-ANA and agar dilution. *Anaerobe.* 14, 161-165.

LEMON, K.P.; EARL, A.M.; VLAMAKIS, H.C.; AGUILAR, C.; KOLTER, R. (2008). Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*, *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 322, 1–16.

LIU, C.; HUANG, Y.; LIAO, C.; YEN, L.; LIN, H.; HSUEH, P. (2008). Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agent Chemother.* 52, 3161-3168.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2, 389.

LORBER, B. (2000). *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* Species (and other medically important anaerobic gram-negative bacilli). En: Principles and Practice of Infectious Diseases, 5a ed. USA: Churchill Livingstone; p. 2519-37.

MACFARLANE, S.; FURRIE, E.; CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. (2004). Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin. Infect. Dis.* 38,1690–1699.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T. (2006). Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 72, 6204–6211.

MACFARLANE, S.; WOODMANSEY, E.J.; MACFARLANE, G.T. (2005). Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 71, 7483–7492.

MARSH, P.D.; MOTER, A. DEVINE, D.A (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology.* 55,16–35.

MARTIN, W.J. (1974). Isolation and identification of anaerobic bacteria in the clinical laboratory. *Mayo Clin Proc.* 49, 300-308.

MEEHAN B.M.; MALAMY, M.H. (2011). Fumarate reductase is a major contributor to the generation of reactive oxygen species in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Microbiology.* 158, 539-546.

MENTULA, S.; HARMOINEN, J.; HEIKKILÄ, M.; WESTERMARCK, E.; RAUTIO, M.; HUOVINEN, P.; KONONEN, E. (2005). Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in Beagle dogs. *Appl Environ Microbiol.* 71, 4169– 4175.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 55, 165-199.

MONROE, D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *Plos Biol.* 5, e307.

MURUGAN, S.; DEVI, P.U.; JOHN, P.N. (2011). Antimicrobial susceptibility pattern of biofilm producing *Escherichia coli* of urinary tract infections. *Curr Res Bacteriol.* 4, 73-80.

MYERS, L.L.; SHOOP, D.S.; STACKHOUSE, L.L.; NEWMAN, F.S.; FLAHERTY, R.J.; LETSON, G.W.; SACK, R. B. (1987). Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2330-2333.

NAMAVAR, F.; MARIAN, A.; VERWEIJ-VAN VUGHT, J.J.; MACLAREN, D.M. (1991). A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol.* 137, 1431-1435.

NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J. (2004). Virulence markers and antimicrobial susceptibility of bacteria of *Bacteroides fragilis* group isolated from stool of children with diarrhea in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99, 307-312.

NAKANO, V.; PIAZZA, R.M.F.; CIANCIARULLO, A. M.; BUERIS, V.; SANTOS, M.F.; MENEZES, M.A.; MENDES-LEDESMA, M.R.; SZULCZEWSKI, V.; ELIAS, W.P.; PUMBWE, L.; WEXLER, H.; AVILA-CAMPOS, M.J. (2008). Adherence and invasion of Bacteroidales isolated from the human intestinal tract. *Clin Microbiol Infect.* 14, 955-963.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. (2010). Procedimentos básicos em microbiologia clinica, 3º ed, Sarvier.

OYSTON, P. C.; HANDLEY, P.S. (1991). Surface components of *Bacteroides fragilis* involved in adhesion and haemagglutination. *J Med Microbiol.* 34, 51-55.

PAPAPARASKEVAS, J.; KATSANDRI, A.; PANTAZATOU, A.; STEFANO, I.; AVLAMIS, A.; LEGAKIS, N.J.; TSAKRIS, A. (2011). Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: A prospective observational study. *Anaerobe.* 17, 113-117.

PARIZZI, S.Q.F.; ANDRADE, N.J.; SILVA, C.A.S; SOARES, N.F.F.; DA SILVA, E.A.M. (2004). Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz arch biol technol.* 47,1.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72: 157-165.

PENDERS, J.; THIS, C.; VINCK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P.A; STOBBERINGH, E.E. (2006). Factors influencing the composition of the microbiota in early infancy. *Rev. Pediatricas.* 118, 511-521.

PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. (2007). Detection of acylated homoserine lactones in Gram-negative proteolytic

- psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food control*. 18, 1322-1327.
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J.; PIAZZA, R.M.M.; WEXLER, H.M. (2007) Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microbial Pathogenesis*. 43, 78–87.
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; WEXLER, H.M. (2006) The *Bacteroides fragilis* cell envelope: Quarterback, linebacker, coach—or all three? *Anaerobe*. 12, 211–220.
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; WEXLER, H.M. (2008). Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb Ecol*. 56, 412–419.
- QUESADA-GÓMEZ, C. (2010). Infecciones em humanos por bactérias anaeróbias del género *Bacteroides*: actualización em aspectos taxonômicos, bioquímicos, inmunológicos, patogénicos e clínicos. *Rev Biomed*. 21, 9-96.
- QUESADA-GÓMEZ, C. (2011). Bacteroides mobilizable and conjugative genetic elements: antibiotic resistance among clinical isolates. *Rev Esp Quimioterap* 24, 184-190.
- RADICE, M.; MARTINO, P.A.; REITER, A.M. (2006). Evaluation of subgingival bacteria in the dog and susceptibility to commonly used antibiotics. *J Vet Dent*. 23, 219-224.
- RICHARDS, J.J.; MELANDER, C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *Chem Bio Chem*. 10, 2287-2294.
- ROH, K.H.; KIM, S.; KIM, C.K.; YUM, J.H.; KIM, M.S.; YONG, D. et al. (2009). Resistance trends of *Bacteroides fragilis* group over an 8-year period, 1997-2004, in Korea. *Korean J Lab Med*. 29,293-298.
- ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZÄHRINGER, U.; MACK, D (2009). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol*. 89, 103-111.
- ROSADO, M.S. (2008). Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes. Dissertação de mestrado na área de tecnologia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. XAVIER, G. R. (2004). *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. *Bio Ciência & Desenvolvimento*. 33.

SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. (2006). Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 56, 1599–1605.

SAKAMOTO, M.; SUZUKI, N.; MATSUNAGA, N.; KOSHIHARA, K.; SEKI, M.; KOMIYA, H.; BENNO Y. (2009). *Parabacteroides gordonii* sp. nov., isolated from human blood cultures. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59, 2843-2847.

SALYERS, A. A. (1984). *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 38, 293-313.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. (1994). *Bacterial Pathogenesis: A molecular Approach*. Washington D.C. ASM Press: 418.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15, 1468-1480.

SEARS, C.L. (2009). Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev.* 22, 349–369.

SIMPSON, J. M.; MARTINEAU, B.; JONES, W.E.; BALLAM, J.M.; MACKIE, R.I. (2002). Characterization of fecal bacterial populations in canines: Effects of age, breed and dietary fiber. *Microb. Ecol.* 44, 186–197.

SMIRNOVA, T.A.; DIDENKO, L.V.; R. R. AZIZBEKYAN, R. R.; ROMANOVA, YU. M. (2010). Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology.* 79, 413–423.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. (2004). Quorum sensing: A primer for food microbiologists. *J Food Prot.* 67, 1053-1070.

SÓKI, J.; FODOR, E.; URBÁN, E.; NAGY, E. (2002). Isolation and characterization of an imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strain from a prostate abscess in a dog. *Vet Microbiol.* 84, 187–190.

SONG, Y. L.; LIU, C. X.; McTEAGUE, M.; FINEGOLD, S.M. (2004). “*Bacteroides nordii*” sp. nov. and “*Bacteroides salyersae*” sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5565–5570.

SOTO, S.M (2009). Relationship between virulence and antimicrobial resistance in bacteria. *Rev Med Microbiol.* 20, 84–90

SOUZA, C.A.I.; SCARCELLI, E. (2000). Agressão por microrganismos da microbiota endógena. *Arq. Inst. Biol.* 67, 275-281.

SPROULE-WILLOUGHBY, K.M.; STANTON, M.M.; RIOUX, K.P.; MCKAY, D.M.; BURET, A.G.; CERI, H. (2010). In vitro anaerobic biofilms of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods*. 83, 296-301.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 40, 175-179.

SUCHODOLSKI, J.S. (2011). Companion animals symposium: Microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *J Anim Sci*. 89, 1520-1530.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO J.; STEINER, J.M. (2008) Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16s rRNA gene analysis. *FEMS Microbiol Ecol*. 66, 567–578.

SUCHODOLSKI, J. S.; XENOULIS, P.G.; PADDOCK, C.G.; STEINER, J.M.; JERGENS, A.E. (2010). Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Vet. Microbiol*. 142, 394–400.

SUMMANEN, P.; BARON, E.; CITRON, D.M.; STRONG, C.; WEXLER, H.M.; FINEGOLD, S.M. (1993). Wadsworth anaerobic bacteriology manual. Star Publishing company, fifth edition.

SWANSON, K. S.; DOWD, S.E.; SUCHODOLSKI, J.S.; MIDDELBOS, I.S.; VESTER, B.M.; BARRY, K.A.; NELSON, K.E.; CANN, I.K.; WHITE, B.A.; FAHEY, G.C. (2010). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME Journal*. 5, 639–649.

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

WAGNER, K.A.; HARTMANN, F.A.; TREPANIER, L.A. (2007). Bacterial Culture Results from Liver, Gallbladder, or Bile in 248 Dogs and Cats Evaluated for Hepatobiliary Disease: 1998–2003. *J Vet Intern Med*. 21, 417–424.

WATERS, C.M.; & BASSLER, B.L. (2005) Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21,319–346

WEINACHT, K.G.; ROCHE, H.; KRINOS, C.M.; COYNE, M.J.; PARKHILL, J.; COMSTOCK., L.E. (2004). Tyrosine site-specific recombinases mediate DNA inversions affecting the expression of outer surface proteins of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol*. 53, 1319–1330.

WEISS, J.E.; RETTGER, L.F. (1937). The Gran-negative *Bacteroides* of the intestine. *J Bacteriol*. 33, 423-434.

WEXLER, H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 20, 593-621.

WEXLER, H. M. (2012). Pump it up: occurrence and regulation of multi-drug efflux pumps in *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe*, 1-9.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 25, 365-404.

WINZER, K.; HARDIE, K. R.; WILLIAMS, P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now gone to lunch! (2002). *Curr Opin Microbiol.* 5, 216–222.

WYBO, I.; PIERARD, D.; VERSCHRAEGEN, I.; REYNDERS, M.; VANDOORSLAER, K.; CLAEY, G. et al. (2007). Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *JAC.* 59,132-139.

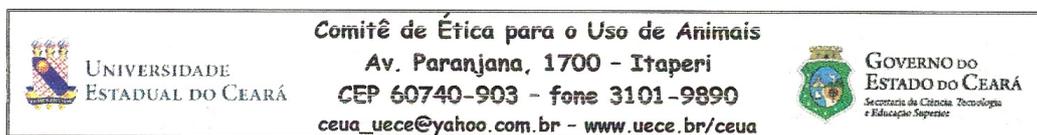
XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; J. S. ALMEIDA, J.S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. (2003). Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*.

XENOULIS, P.G.; PALCULICT, B.; ALLENSPACH, K.; STEINER, J.M.; VANHOUSE, A.M.; SUCHODOLSKI, J.S. (2008). Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol.* 66, 579–589.

## **ANEXOS E APÊNDICES**

## ANEXO I

### CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA



### 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

## ANEXO II

### DECLARAÇÃO UECE



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
*Faculdade de Veterinária – Gabinete do Diretor*  
Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE  
Fone: 085 3101 9855; 085 31019850 fax - E-mail: [favet@uece.br](mailto:favet@uece.br)



### DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que estamos cientes e de acordo com a realização da pesquisa intitulada “Perfil de Resistência a Antimicrobianos de Bactérias Anaeróbias e Facultativas Isoladas da Microbiota Normal e de Infecções em Animais”, sob coordenação da Profa. Cibele Barreto Mano de Carvalho (Pesquisadora principal; chefe do Laboratório de Bacteriologia/Unidade de Biomedicina/Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará) e do Prof. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Coordenador Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará), a realizar-se na Unidade Hospitalar desta Faculdade de Veterinária, sem nenhum ônus para a UECE.

Diretoria da Faculdade de Veterinária, em Fortaleza, 27 de Setembro de 2010.

  
Prof. Célio Pires Garcia  
Diretor da Favet/UECE



***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>

## APÊNDICE I

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O(a) Senhor(a) está sendo convidado para participar da pesquisa: **Fatores de virulência e produção de biofilme de *Bacteroides fragilis* isolados da microbiota intestinal 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 esta 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 resistência aos antimicrobianos. Sua participação nesta pesquisa consistirá em ceder uma pequena quantidade de material fecal proveniente do seu animal. A coleta será feita a partir de um swab retal, sem danos e sofrimento ao animal. 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 sua 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

## APÊNDICE II

### QUESTIONÁRIO

**Fatores de virulência e produção de biofilme de *Bacteroides fragilis* isolados da microbiota intestinal de cães**

**Nome do Pesquisador:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

#### **Identificação:**

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

#### **Dados Clínicos:**

Estado clínico do animal:

\_\_\_\_\_

O animal tomou antibiótico nos últimos 30 dias: ( )SIM ( )NÃO

Qual o antibiótico usado? \_\_\_\_\_

Fezes diarréicas: ( )SIM ( )NÃO

#### **Exames laboratoriais e resultados:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

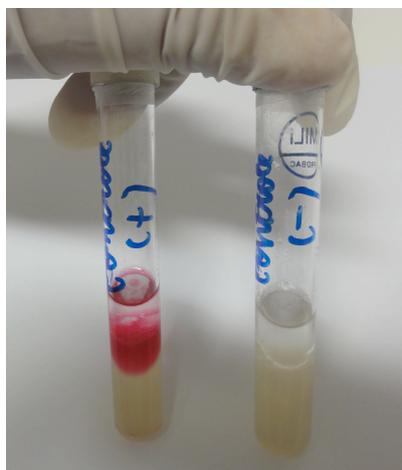
\_\_\_\_\_

## APÊNDICE III

### METODOLOGIA COMPLEMENTAR

#### 1. Identificação bioquímicas das cepas de *B. fragilis*

**1.1 Teste do indol:** Tem como finalidade determinar a habilidade da bactéria em metabolizar o triptofano, produzindo indol. Para pesquisar a produção de indol, colocou-se 1mL de cultura bacteriana crescida em caldo BHI por 24/h, em 5 mL de meio de cultura específico para teste do indol que foi incubado por 48/h, a 37°C, em anaerobiose. Após o período de incubação, retirou-se uma alíquota de 2mL da solução e adicionou-se 1mL de xilol e 0,5 mL do reativo de Ehrlich. O reativo Ehrlich tem como princípio ativo o grupo aldeído do *p*- dimetilaminobenzaldeído, que forma um complexo vermelho ao reagir com o indol indicando uma reação positiva (Figura 7). Para o controle positivo foi utilizado *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922) e no controle negativo *Klebsiella pneumoniae* (ATCC<sup>®</sup> 13883) (OPLUSTIL et al., 2010).



**Figura 7.** Formação de halo vermelho na superfície do meio (positivo), devido a reação do triptofano formando o indol (produção de enzima triptofanase). Fonte Própria.

**1.2 Teste da catalase:** Verifica a presença da enzima intracelular catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O teste foi realizado em lâminas de vidro, gotejando-se peróxido de hidrogênio a 10% diretamente sobre fragmentos das colônias características, observando a formação de bolhas (liberação de oxigênio). Os controles utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923) e

*Enterococcus faecalis* (ATCC<sup>®</sup> 25922), que correspondem respectivamente ao controle positivo e controle negativo (OPLUSTIL et al., 2010).

**1.3 Fermentação de carboidratos:** Foram diluídos 1mL de cultura crescida em BHI caldo por 24h, em anaerobiose, em 24 mL de caldo Py (Peptona- Extrato de levedura). O meio foi homogeneizado e em seguida 3,6 mL desta diluição foram adicionadas a tubos teste, em duplicata, contendo 0,4 mL de solução de açúcar (solução estoque a 10%) obtendo-se a concentração final do carboidrato de 1% (raminose, celobiose, xilano e sacarose) e também 0,4 mL de solução dos açucares arabinose e trealose (solução estoque a 5%), onde a concentração final do carboidrato era 0,5%. Para o controle da atividade fermentativa, foram inoculados, 4 mL da cultura diluída em tubos teste sem carboidrato, em duplicata. Os tubos foram incubados a 37°C em anaerobiose, por 48h. Após esse período, foi medido o pH em pHmetro digital PHS-3E (BIOSYSTEMS), e determinava-se o Índice de Acidificação (IA), pela diferença da média do pH entre as cultura inoculadas sem carboidrato e a média do pH das mesmas culturas inoculadas com os carboidratos. Se: IA < 0,3 – Reação negativa (sem fermentação do carboidrato); Se: IA > 0,3 – Reação positiva (fermentação do carboidrato (KONEMAN et al., 2008; SUMMANEN et al., 1993).

## 2. Chaves de identificação de espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, adaptada de Summanen et al. (1993) e Koneman et al. (2008).

### Quadro 1. INDOL NEGATIVO

INDOL (-)	CATALASE	ARABINOSE	RAMINOSE	SACAROSE	TREALOSE
<i>B. fragilis</i>	+	-	-	+	-
<i>B. vulgatus</i>	+ -	+	+	+	-
<i>B. distasonis</i>	+ -	-	+ -	+	+
<i>B. cacae</i> *	-	+	+ -	+	+
<i>B. merdae</i> *	- +	- +	+	+	+

\* Espécies diferenciadas através da fermentação dos açucares RIBOSE ou CELOBIOSE

## Quadro 2. INDOL POSITIVO

INDOL (+)	CATALASE	ARABINOSE	RAMINOSE	SACAROSE	TREALOSE
<i>B. uniformis</i>	-	+	+/-	+	-
<i>B. eggerthii</i>	-	+	+/-	-	-
<i>B. stercoris</i>	-	+/-	+	+	-
<i>B. splanchnicus</i>	-	+	-	-	-
<i>B. ovatus</i> * <sup>1</sup>	+	+	+	+	+
<i>B. thetaiotamicron</i> * <sup>1</sup>	+	+	+	+	+

\*<sup>1</sup>Espécies diferenciadas através da fermentação do açúcar XILANO

### 3. Teste de diluição em ágar (antibiograma)

Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC- minimal inhibitory concentration) foi utilizada a técnica de diluição em ágar, padrão ouro para avaliação da resistência a antimicrobianos em bactérias anaeróbias (GRAY, et al., 2005; CLSI, 2007; KORU & OZYURT, 2008).

#### 3.1 Antimicrobianos

As drogas testadas foram: clindamicina, metronidazol, cloranfenicol e penicilina. As concentrações dos antimicrobiano variaram de 2,5 µg/mL a 128 µg/mL. Após o preparo, as soluções foram distribuídas em alíquotas de 5 mL e estocadas a - 20° C.

#### 3.2 Inóculo

As amostras estocadas foram repicadas para caldo BHI suplementado e incubadas a 37°C, durante 48 horas. Após esse período, foi determinada a pureza dos caldos e as amostras foram novamente repicadas em caldo BHI suplementado e incubadas a 37°C, durante 24 horas. Para a padronização do inóculo, partiu-se do crescimento recente em meio de cultura líquido (caldo Brucella) até atingir a turvação

equivalente a 0,5 da escala McFarland, que corresponde aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL.

### 3.3 Meio de cultura e preparo das placas

Foi utilizado o meio Brucella ágar, suplementado e adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Com o objetivo de detectar possível contaminação com bactérias aeróbias e avaliar a viabilidade das amostras estudadas, foram utilizadas quatro placas-controle, sendo duas no início e duas no final de cada experimento. Duas placas-controle foram incubadas anaerobicamente e duas em atmosfera convencional.

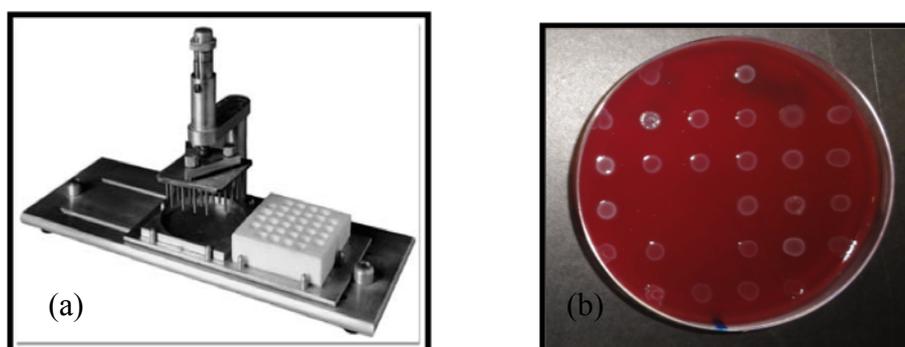
### 3.4 Cultura

Foi utilizado o replicador de Steer (Figura 8a) para a inoculação das cepas. Em cada experimento, foram inoculadas 25 cepas e as ATCCs<sup>®</sup> *Bacteroides fragilis* 25285 e *Bacteroides thetaiotaomicron* 29741. A concentração dos microorganismos nas placas foi cerca de  $10^5$  ufc/ Spot (Figura 8b). A sequência da inoculação foi a seguinte:

1<sup>a</sup> etapa: inoculação de duas placas- controle para incubação em atmosfera convencional e anaerobiose;

2<sup>a</sup> etapa: inoculação das placas contendo solução de antimicrobiano, seguindo a ordem crescente de concentração das soluções nas placas; e

3<sup>a</sup> etapa: inoculação de duas placas- controle para incubação em atmosfera convencional e anaerobiose.



**Figura 8.** (a) Replicador de Steer; (b) Placa de Brucella ágar com as cepas de *B. fragilis* inoculadas. Fonte Própria.

### **3.5 Incubação e leitura das placas**

As placas com a diluição dos antimicrobianos e os controles de anaerobiose foram incubados durante 48 horas a 37°C, em jarras de anaerobiose. As outras duas placas-controle serão incubadas em atmosfera convencional.

Após 48 horas de incubação, foi realizada a leitura das placas inoculadas. Utilizou-se como padrão de crescimento os controles de anaerobiose, ou seja, placas sem antimicrobianos, comparadas com o crescimento das culturas nas placas inoculadas e com agente antimicrobiano.

Foi considerada concentração inibitória mínima do antimicrobiano, para cada cepa testada, a menor concentração do antimicrobiano, que inibiu completamente o crescimento da cepa, ou quando se verificou a presença de crescimento, apenas discreto no local da inoculação, ou ainda uma fina película de crescimento visível a olho nu.

As placas controle de aerobiose foram examinadas antes da determinação da concentração inibitória mínima. Qualquer crescimento nessas placas foi indicativo de contaminação. Dessa forma, procedeu-se à purificação da cultura e à repetição do teste. O mesmo procedimento foi realizado quando a concentração inibitória mínima das cepas-padrão testadas, *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285 e *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC® 29741, estivessem fora da faixa de concentração estabelecida pelo CLSI.

## **4 Soluções e meios de cultura**

### **4.1 Cristal Violeta a 1% (Coloração de Hiss)**

- Formol (10mL)
- Ácido acético (4mL)
- Metanol (60mL)
- Água destilada (25mL)
- Cristal Violeta (1g)

### **4.2 Solução Alsever**

- Dextrose (20,5g)
- Citrato de sódio (8g)

- Cloreto de sódio (4,2g)
- Água destilada (1.000mL)

#### **4.3 Tampão PUM**

- Fosfato de potássio dibásico (22,2 g)
- Fosfato de potássio monobásico (7,26 g)
- Urea (1,8g)
- Sulfato de Magnésio (0,2g)
- Água destilada (1.000mL)

#### **4.4 BHI Suplementado**

- BHI (37g)
- Extrato de levedura (5g)
- Água destilada (1.000mL)
- Cisteína hidrocloreídrica (0,5g)
- Solução de hemina/menadione (10ml)

#### **4.5 PY (Peptona- Extrato de levedura)**

- Peptona (0,5g)
- Trypticase (0,5g)
- Extrato de levedura (1,0g)
- Solução de resazurina (0,4mL)
- Solução de sais (4mL)
- Água destilada (100mL)
- Solução hemina/menadione (1mL)
- Cisteína hidrocloreídrica (0,05g)

#### **4.6 Solução HEMINA/MENADIONE**

- Solução estoque Menadione: 100mg de menadione\_\_\_\_\_20mL de álcool etílico à 95%
- Solução estoque Hemina: 50mg\_\_\_\_\_1mL de NaOH e completar para 100mL de água destilada

#### **6.1 Solução uso**

Adicionou-se 1mL da solução estoque de menadione para 100mL da solução estoque de hemina.

#### **4.7 Solução de resazurina**

- Foi dissolvido 25mg de resazurina em 100mL de água destilada.

#### **4.8 Solução de sais**

- $\text{CaCl}_2$  (0,2g)
- $\text{MgSO}_4$  (0,2g)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0g)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0g)
- $\text{NaHCO}_3$  (10,0g)
- $\text{NaCl}$  (2,0g)

Misturou-se  $\text{CaCl}$  e  $\text{MgSO}_4$  em 300mL de água destilada até completar a dissolução.

Foi adicionado 700mL da água destilada sob agitação até que todos os sais fossem dissolvidos.

