

FERNANDA DOS SANTOS ALMEIDA

**ESPÉCIES DO GRUPO *Bacteroides fragilis* EM BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA
AGUDA: OCORRÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

FERNANDA DOS SANTOS ALMEIDA

**ESPÉCIES DO GRUPO *Bacteroides fragilis* EM BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA
AGUDA: OCORRÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2007

FERNANDA DOS SANTOS ALMEIDA

**ESPÉCIES DO GRUPO *Bacteroides fragilis* EM BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA
AGUDA: OCORRÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

À Deus, nosso eterno Pai, por toda a luz e por ter sido a minha força em todos os momentos da vida.

Aos meus queridos pais José e Maria Jurema pela formação que me deram, ensinando-me os mais importantes valores do ser humano: a firmeza do caráter, a honra e a honestidade. Aos meus avós (in memoriam) José Sebastião e Elisabeth, Carlos e Filina, pela força e dignidade com as quais superaram todos os desafios do caminho.

Ao meu marido Rodrigo, por toda a compreensão e pelo amor puro e verdadeiro que une nossos corações hoje e sempre.

À minha irmã Carla, meu cunhado Danilo e à minha sobrinha Maria Clara que veio iluminar ainda mais nossas vidas! Pela forte união que manteremos por toda a nossa jornada.

À todos os meus familiares pelo muito que me incentivaram a ultrapassar cada obstáculo sem jamais desistir da luta.

Obrigada! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, pelo inestimável auxílio, amizade e constante aprendizado.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, pela orientação em minha Iniciação Científica, por sua colaboração no desenvolvimento do meu amor pela Ciência e pela Microbiologia.

Aos amigos de sempre Fernanda Franklin, Amanda Prado, Patrícia Prado, Patrícia Santana, Patrícia Freitas, Daniela Panebianco, Anne Chen, Cláudia Passoni, Márcia Niyshizawa, Tais Fukuta, Melissa Junta, Juliana de Oliveira, Liliana Rocha e Lauro Hassegawa que tornaram mais leves os momentos de dificuldades durante a execução deste trabalho.

Às amigas do Laboratório de Anaeróbios Gerusa Neyla de Andrade Senhorinho e Taís Cristiane Wahasugui pelo apoio em todos os momentos e pelo muito que me ajudaram na superação dos obstáculos. Apesar da distância, vocês serão para sempre minhas grandes amigas.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios Amanda do Nascimento e Silva, Viviane Nakano, Sheila Alexandra Bellini Nishiyama, Alessandra da Mota Oliveira, Elessandra Maria Silvestro e Luiz Fernando Tomazinho pela experiência adquirida durante nossa convivência.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas pelos ensinamentos, empenho e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente à Zulmira Alves de Souza pela agilidade no apoio técnico e pelas palavras de carinho.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia, especialmente à Alice Shimabuku e Celso Pereira pelo atendimento e esclarecimentos prestados.

Às bibliotecárias e aos demais funcionários da Biblioteca do ICB pela eficiência e simpatia do trato conosco.

À Profa. Carla Prado pelas correções gramaticais da língua portuguesa e da língua inglesa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Processo N° 01/14139-3).

A todos, muito obrigada!

“...E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria...”

Primeira Epístola de São Paulo aos Coríntios

(13:2)

RESUMO

ALMEIDA, F. S. Espécies do grupo *Bacteroides fragilis* em bezerros com e sem diarreia aguda: ocorrência, fatores de virulência e caracterização molecular. 2007. 94 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007**

O grupo *Bacteroides fragilis* é atualmente constituído por oito espécies de bactérias gram-negativas, anaeróbias obrigatórias e não esporuladas, sendo a de maior destaque *B. fragilis*. Os fatores de virulência estão relacionados à capacidade de aderência, colonização, invasão tecidual e proteção bacteriana contra a resposta imunológica do hospedeiro. Foram analisadas 108 amostras fecais (54 de bezerros diarreicos e 54 de não diarreicos). Das 54 amostras diarreicas, 37 (68,5%) foram positivas para o grupo *B. fragilis*, isolando-se 124 bactérias. Das 54 não diarreicas, 21 (38,9%) foram positivas para este grupo, isolando-se 92 bactérias. Foi avaliada a produção de hemolisinas e hemaglutininas, resistência à temperatura, susceptibilidade ao soro, a antibióticos e a metais pesados. Analisamos também a presença de plasmídios e de genes mediadores da β -lactamase (*cepA* e *cfiA*), da produção da neuraminidase (*nanH*) e enterotoxina (*bft*) e, finalmente, foi determinada a similaridade genética entre as cepas de *B. fragilis*. A produção de hemolisina foi observada em 45 (36,3%) e em 77 (83,7%), respectivamente, das bactérias isoladas de bezerros diarreicos e não diarreicos. Apenas 16 (7,4%) isolados aglutinaram eritrócitos de carneiro, bezerro ou humano. A inibição da hemaglutinação foi observada quando a maltose foi usada (93,7%). Dentre os 124 isolados de diarreia, 96 (77,4%) resistiram a 60°C por 30 minutos e 69 (55,6%) por 60 minutos. Os isolados foram resistentes à ação do soro humano, de carneiro e de bovino. Todos os isolados foram sensíveis ao imipenem e metronidazol. Dos 216 isolados, 127 (58,8%) produziram β -lactamase e destes, 73 (57,5%) eram de bezerros diarreicos e 54 (42,5%) de não-diarreicos. A maioria dos isolados apresentou elevada resistência aos oito metais pesados utilizados, principalmente ao cloreto de chumbo e sulfato de níquel. Plasmídios foram detectados em 16 (7,4%) isolados com pesos moleculares de 5 a 11 kb. Após a cura, os isolados perderam pelo menos um elemento e foi observada a diminuição da resistência para amoxicilina, ampicilina, cefoxitina e sulfato de zinco. Dentre os 127 isolados resistentes aos agentes β -lactâmicos, em 25 (19,7%) isolados de bezerros diarreicos e em 33 (26,0%) de bezerros não diarreicos foi detectado o gene *cepA*. Este gene foi observado também nos plasmídios de 5,5 kb dos isolados Bc5j e Bd26e. O gene *cfiA* foi observado em 21 (16,5%) isolados de bezerros diarreicos e 16 (12,6%) de bezerros não diarreicos, mas não foi detectado em plasmídios. O gene *nanH* foi detectado em 47 (21,8%) isolados e o gene *bft* somente em dois isolados de duas amostras fecais diarreicas, e a produção da toxina confirmada por sua toxicidade característica em cultivo celular. A avaliação genética entre os *B. fragilis* mostrou a heterogeneidade dessas bactérias.

Palavras-chave: Diarreia; bezerros; grupo *B. fragilis*; bactérias anaeróbias; susceptibilidade a antimicrobianos.

**Normas ABNT:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABSTRACT

ALMEIDA, F. S. Species of the *Bacteroides fragilis* group in calves with and without diarrhea: occurrence, virulence factors and molecular characterization. 2007. 94 f. Doctor thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007**

Bacteroides fragilis group is constituted by eight gram-negative, strictly anaerobic and non-spore-forming bacteria, being *B. fragilis* the main species. The virulence factors are related to the capacity of adherence, colonization, tissue invasion and bacterial protection against the host immune factors. One hundred eight fecal samples were analyzed (54 from diarrhea and 54 from non-diarrhea calves). Of the 54 diarrhea samples, 37 (68.5%) were positive to the *B. fragilis* group, being isolated 124 bacteria. Of the 54 non-diarrhea samples, 21 (38.9%) were also positive for the *B. fragilis* group, being isolated 92 bacteria. Hemolysin and hemagglutinin production, resistance to the temperature, susceptibility to the sera, antibiotics and heavy metals were evaluated. Also, the presence of plasmids genes of β -lactamase (*cfiA* e *cepA*), neuraminidase (*nanH*) and enterotoxin (*bft*) was analyzed, as well as the genetic similarity among the *B. fragilis* strains. The hemolysin production was observed in 45 (36.3%) and in 77 (83.7%) bacteria isolated from, respectively, diarrhea and non-diarrheic calves. Only 16 (7.4%) isolates agglutinated sheep, calf or human erythrocytes, and the hemagglutination inhibition was observed when maltose was used (93.7%). Among 124 diarrhea isolates, 96 (77.4%) were resistant to 60°C for 30 minutes and 69 (55.6%) for 60 minutes. The most of isolates was resistant to the human, sheep or bovine serum action. All the isolates were sensitive to the imipenem and metronidazole. Of the 216 isolates, 127 (58.8%) produced β -lactamase. From these, 73 (57.5%) belong to diarrhea and 54 (42.5%) non-diarrhea calves. Most of the isolates showed high resistance to the eight heavy metals used, mainly to the lead chloride and nickel sulfate. Plasmids were detected in 16 (7.4%) isolates with molecular weights from 5 to 11 kb. After the cure, the isolates lost at least an element and the resistance to amoxicillin, ampicillin, cefoxitin and zinc sulfate was decreased. Of the 127 isolates resistant to the β -lactams 25 (19.7%) diarrhea and 33 (26.0%) non-diarrhea isolates harbored the *cepA* gene. This gene was observed in 5.5 kb plasmids of the Bc5j and Bd26e strains. The *cfiA* gene was observed in 21 (16.5%) isolates from diarrhea and 16 (12.6%) isolates from non-diarrhea calves, but this gene was not detected in plasmids. The *nanH* gene was detected in 47 (21.8%) isolates and the *bft* gene only in two isolates from two fecal diarrhea samples, and the toxin production was confirmed by cytotoxic alterations. The genetic profile showed the heterogeneity among the *B. fragilis* tested.

Key Words: Diarrhea; calves; *B. fragilis* group; anaerobic bacteria; antimicrobial susceptibility.

**Normas ABNT:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Nomenclatura e seqüência dos iniciadores utilizados na detecção de genes e suas respectivas temperaturas de anelamento. **42**
- TABELA 2. Distribuição das espécies do grupo *B. fragilis* isoladas de 37 bezerros com diarréia e de 21 bezerros sem diarréia, segundo a idade. **44**
- TABELA 3. Perfil de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (IHA) de 16 isolados pertencentes ao grupo *B. fragilis* de bezerros com e sem diarréia, em eritrócitos de carneiro, bezerro e humano.**45**
- TABELA 4. Susceptibilidade a 12 antibióticos de 216 bactérias do grupo *B. fragilis* isoladas de bezerros com e sem diarréia. **47**
- TABELA 5. Avaliação da produção de β -lactamase de 127 bactérias do grupo *B. fragilis* de bezerros com diarréia (73) e sem diarréia (54). **48**
- TABELA 6. Susceptibilidade a oito metais pesados de 216 bactérias do grupo *B. fragilis* isoladas de bezerros com e sem diarréia.**49**
- TABELA 7. Perfil plasmidial e sua relação com a resistência aos β -lactâmicos analisados de 16 isolados de bezerros diarréicos e não diarréicos.**51**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Detecção do gene <i>bft</i> do DNA bacteriano de amostra fecal e de bactérias isoladas	46
FIGURA 2. Perfil plasmidial de <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos	50
FIGURA 3(A). Detecção do gene <i>cepA</i> no DNA cromossômico dos isolados do grupo <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos	52
(B). Detecção do gene <i>cepA</i> em plasmídios de 5,5 kb dos isolados do grupo <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos	52
(C). Detecção do gene <i>cfiA</i> no DNA cromossômico dos isolados do grupo <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos e não diarréicos	50
FIGURA 4. Detecção do gene <i>nanH</i> nos <i>B. fragilis</i> isolados de bezerros diarréicos e não diarréicos	54
FIGURA 5. Perfil de amplificação dos DNA de <i>B. fragilis</i> isolados de bezerros diarréicos por AP-PCR.	54
FIGURA 6. Perfil de amplificação dos DNA de <i>B. fragilis</i> isolados de bezerros sadios por AP-PCR	55
FIGURA 7. Análise genotípica por AP-PCR de 28 isolados de <i>B. fragilis</i> de bezerros diarréicos.	57
FIGURA 8. Análise genotípica por AP-PCR de 41 isolados de <i>B. fragilis</i> de bezerros não diarréicos.....	58

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

