

Artículo original

Bacteroides fragilis enterotoxigénico aislado de pacientes con vaginitis

Nina Polanco^{a*}, Thamayra López^a, Gidalía Urbina^a, Oswaldo Carmona^b

^aLaboratorio de Patogenicidad, Bacteriana, Escuela de Bioanálisis

^bCátedra de Microbiología, Escuela de Medicina José María Vargas
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela
Caracas - Venezuela

Recibido 25 de junio de 2007; aceptado 14 de diciembre de 2007

Resumen: La vaginitis es un diagnóstico común en ginecología. Su presencia obedece a diversas causas, algunas aún desconocidas. *Bacteroides fragilis* es el anaerobio más importante desde el punto de vista clínico. Entre otros factores de virulencia, algunas cepas producen una enterotoxina asociada con diarrea. Estas cepas han sido aisladas tanto de muestras intestinales como extra intestinales. Por la existencia de procesos inflamatorios en la mucosa cérvico-vaginal de etiología desconocida se investiga a *B. fragilis* enterotoxigénico en pacientes con vaginitis. Se procesaron 140 muestras de pacientes y 40 de controles sanos. De las pacientes sintomáticas se aislaron 15 cepas de *B. fragilis* y ninguna en los controles ($P < 0,05$). Posteriormente, fueron cultivadas en anaerobiosis, usando caldo cerebro-corazón suplementado con vitamina K₁ y hemina durante 48 horas a 36°C. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación y su actividad se ensayó en células HT-29. Doce (80%) cepas produjeron alteraciones en la monocapa celular, manifestada por desprendimiento, disolución de los acúmulos, expansión y disgregación de las células, superando en algunos casos la toxicidad observada en el control positivo. En siete pacientes, *B. fragilis* enterotoxigénico no estuvo asociado a patógenos específicos. La presencia de *B. fragilis* enterotoxigénico en pacientes con vaginitis plantea la necesidad de definir su papel en la etiología de esta entidad clínica.

Palabras claves: *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico, vaginitis, leucorrea, células HT-29

Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* isolated from patients with vaginitis

Abstract: Vaginitis is a common diagnosis in the centers of gynecological attention. It is due to several causes, some even unknown. *Bacteroides fragilis* is the most important anaerobe in clinical practice; some strains produce an enterotoxin associated with diarrhea. Enterotoxigenic *B. fragilis* has been isolated from intestinal as well as extra intestinal samples. Because inflammatory processes unknown etiology it was investigated *B. fragilis* in the cervical-vaginal mucous in the patients with vaginitis.

140 samples were processed from symptomatic patients and 40 from healthy controls. 15 strains of *B. fragilis* were isolated from symptomatic patients while none were found in controls ($P < 0,05$). These strains were cultivated in anaerobic chambers, cultured in brain heart infusion supplemented with vitamin K₁ and hemine during 48 hours at 36°C. Supernatant were obtained by centrifugation and its activity assayed in HT-29 cells. Twelve (80%) of the isolated induced alterations in target cell morphology characterized by cell detachment, breakup of cell clumps, expansion and degradation of cells, some cases revealed a higher cytotoxic activity than the positive control. In seven patients enterotoxigenic *B. fragilis* was not associated to specific pathogens. The presence of enterotoxigenic *B. fragilis* in patients with vaginitis raises the necessity to define its role in the etiology of this clinical entity.

Keywords: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, vaginitis, leukorrhea, HT-29 cells

* Correspondencia:
E-mail: polancon@rect.ucv.ve

Introducción

La vaginitis es un diagnóstico común en los centros de atención ginecológica [1,2]. Se estima que más del 90% de los casos de vaginitis son secundarios a la vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal y tricomoniasis [3]. La pre-

valencia y causas de la vaginitis son inciertas, en parte, por que algunas pacientes se autodiagnostican y como consecuencia se automedican y por que frecuentemente suele ser asintomática o tener más de una causa, incluyendo la atrofia vaginal, alergias e irritación química.

Quizás, debido a que *Bacteroides fragilis* forma parte de

la flora normal en diversas cavidades del cuerpo humano, es el anaerobio más importante desde el punto de vista clínico [4], no solo por su alta frecuencia sino también por la resistencia a los agentes antimicrobianos usados tradicionalmente para combatirlo [5]. En el colon representa el 0.5% de la microflora mientras que, en el tracto genital femenino se encuentra en una frecuencia relativamente baja. Forma parte del complejo etiológico asociado a la vaginosis bacteriana [6]. *B. fragilis* es agente etiológico de abscesos intraabdominales, retroperitoneales, enfermedad inflamatoria pélvica y de la peritonitis que se presenta después de una lesión en la mucosa intestinal, ya sea por cirugía, un apéndice roto o un cáncer perforante de colon [7,8].

La frecuencia de aislamientos en hemocultivos ha aumentado en los últimos 10 años ya que se han reportado porcentajes que alcanzan el 70% de los anaerobios recuperados [5].

Hasta ahora, las investigaciones han revelado que los posibles factores de virulencia de *B. fragilis* incluyen: cápsula, fimbrias, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos, enzimas y algunos metabolitos [9].

Varios estudios demuestran que la enterotoxina de *B. fragilis* es otro factor de virulencia. Hace aproximadamente dos décadas se reportó que algunas cepas de este bacilo producen una enterotoxina que ocasiona diarrea de tipo secretor en animales [10]. Posteriormente, se demostró que cepas aisladas de niños con diarrea inducen en animales de experimentación una significativa respuesta de acumulación de líquido con daño al tejido del intestino delgado y grueso [11,12]. Aunque los primeros aislados de *B. fragilis* enterotoxigénico fueron de heces de animales o niños con diarrea, también ha sido aislado de una variedad de muestras extraintestinales. La mayor frecuencia de aislados es en muestras de sangre, este hecho es favorecido por la acción de la enterotoxina que por ser una metaloproteasa [13], actúa para acelerar el paso del microorganismo al torrente sanguíneo por activación de la cascada de bradiquinina, por lo cual se sugiere que la enterotoxina puede jugar un papel patogénico importante en la septicemia causada por este microorganismo [14]. También se ha aislado de abscesos perirectales e intraabdominales, de heridas quirúrgicas [15] y en uno (0,83 %), de ocho casos estudiados en la vagina de mujeres sanas embarazadas [16].

Desde que Weikel y col en 1992 [17], señalaron que los cultivos de tejido celular HT-29/C1 serían útiles en los estudios epidemiológicos de *B. fragilis* y en la identificación de su o sus toxinas, así como su mecanismo de acción, diferentes investigadores [18,20,15] han utilizado este ensayo para diferenciar a *B. fragilis* enterotoxigénico de los no enterotoxigénicos. La línea celular HT-29 es extremadamente sensible a la toxina, incluso a dosis tan bajas como 12,5 pM [21]. La toxina actúa sobre cultivos polarizados que forman uniones estrechas, tal como ocurre en esta línea celular [22, 23].

Aun cuando *B. fragilis* puede ocasionalmente formar parte de la flora habitual del tracto genital femenino su papel como patógeno es desconocido. En consideración de

la existencia de procesos inflamatorios en la mucosa cérvico-vaginal de etiología desconocida, se planteó investigar la presencia de *B. fragilis* enterotoxigénico en pacientes con vaginitis.

Materiales y Métodos

Muestras

El material de estudio estuvo constituido por 140 muestras de exudado de fondo de saco posterior de la vagina, provenientes de pacientes sexualmente activas, entre 15 y 55 años. Estas pacientes fueron referidas por especialistas del área metropolitana de Caracas para la investigación de agentes específicos de infección genital. Las mismas presentaban leucorrea, ardor, prurito y eritema vulvo-vaginal entre otras manifestaciones clínicas. Las muestras fueron obtenidas de la población en estudio siguiendo las normas del Código de Bioética y Bioseguridad del Fonacit [24]. Se tomaron como criterios de exclusión la administración de tratamiento antimicrobiano en los siete días previos a la toma de la muestra, edades por fuera del rango mencionado, así como aquellas pacientes con serología positiva para VIH. EL período de estudio fue desde febrero hasta junio del año 2003.

Los controles sanos estuvieron representados por 40 pacientes en el mismo rango de edades quienes no presentaban manifestaciones clínicas de molestia urogenital y acudían solamente para su evaluación ginecológica. Las pacientes fueron atendidas en la Unidad de Diagnóstico Microbiológico del Centro Aloa de la ciudad de Caracas. La toma de la muestra se realizó del fondo de saco posterior de la vagina y fueron transportadas en condiciones de anaerobiosis [25] para su procesamiento inmediato al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Cátedra de Bacteriología, en la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela. El aislamiento e identificación del grupo *B. fragilis* resistente a bilis, se realizó según métodos convencionales para la investigación de anaerobios [26,27].

Las cepas controles de *B. fragilis* (cepa 086 productora de la toxina BFT-2 y cepa TM 400, no toxigénica) fueron suministradas amablemente por el Dr. Augusto Franco, de la Escuela de Medicina de la Universidad John Hopkins, Maryland Estados Unidos.

Obtención de sobrenadantes de cultivo de *Bacteroides fragilis*

Las cepas de *B. fragilis* se sembraron en placas de Agar base triptosa con 5% de sangre de conejo desfibrinada suplementado con vitamina K₁ (1 µg/ml) + hemina (5 µg/ml) y se incubaron en atmósfera de anaerobiosis (Gas-PacK Anaerobe Systems) a 35°C durante 48 horas. De estas placas se tomaron varias colonias y se inocularon por duplicado hasta alcanzar la turbidez del patrón de McFarland N° 1 [28], en 5 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (Difco) suplementado con 0,05% de extracto de levaduras (BBL), Vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml), se

incubaron en atmósfera de anaerobiosis a 35° C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo cada cultivo se centrifugó a 12.000 g rotor A-841 (Sorvall Ultra centrifuge, Dupont, OTD 55B) a 4° C por 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de un filtro Millipore (0,22 µm, Millipore, Cor., Bedford, Mars) para posteriormente ser ensayado en los cultivos celulares.

Cultivo Celular

El clon de células HT-29 fueron obtenidas de la Unidad de Cultivos celulares del Centro de Bioquímica y Biofísica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Las monocapas semiconfluentes se obtuvieron en placas de 24 pozos [29].

Ensayos de citotoxicidad en células HT-2

Los 24 pozos se lavaron con PBS (pH) 7,2 posteriormente, se les agregó a cada uno 0,5 ml de medio de Dulbecco Modificado MDM (Gibco-HQ) suplementado con 0,1% de suero fetal de bovino (Sigma), más 0,5 ml de cada sobrenadante cuya actividad se deseaba ensayar, cada ensayo se hizo por triplicado. Se diluyeron con MDM en forma seriada hasta la dilución de un 1:32. Los controles utilizados fueron las células tratadas con: **i-** Sobrenadante de cultivo de *B. fragilis* 086 productora de la toxina BFT-2. **ii-** Sobrenadante de cultivo de *B. fragilis* TM 400 (no toxigénica). **iii-** Medio de cultivo MDM con caldo infusión cerebro corazón suplementado con vitamina K₁ (1 µg/ml) y hemina (5 µg/ml) y **iv-** MDM solamente. Seguidamente las placas fueron incubadas a 37°C en estufa de CO₂ (NAPCO Model 4100; 2 LPM de CO₂; 1 LPM de oxígeno y 100% de humedad) y observadas a través de un microscopio invertido a las 3, 24 y 48 horas. Los cambios en la monocapa fueron registrados con una cámara digital (Nikon). A continuación las placas se lavaron con PBS (pH 7,2), se fijaron con metanol de 90% durante 5 minutos, se colorearon con Giemsa diluido 1:10 con PBS (pH 7,2) y se registraron las impresiones fotográficas [30].

La actividad de la toxina, definida por las alteraciones en la morfología en las células HT-29, fue registrada en un modelo cualitativo usando una escala modificada [17]. Una puntuación de 4+ indica desprendimiento total de la monocapa, redondeamiento del 100% de la células, expansión y separación de las mismas, 3+ indica desprendimiento de un 75% de la monocapa, disolución de los acúmulos celulares, redondeamiento del 100% de las células, expansión y separación de las mismas, 2+ indica desprendimiento del 30%-40% de la monocapa, redondeamiento, expansión y separación de las células y 1+ expansión y separación leve de las células con escaso desprendimiento de la monocapa.

Resultados

En quince de las 140 muestras de exudado vaginal que conformaron este estudio se aislaron 22 especies anaerobias, de las cuales 15 de ellas se identificaron como *Bacte-*

roides fragilis. Fueron denominadas como: Bf-v (011; 021; 030; 040; 047; 048; 054; 055; 061; 063; 108; 109; 110; 116 y 122) donde Bf-v significa *Bacteroides fragilis* aisladas de exudado vaginal y el número es el asignado para el estudio. En ninguna de las 40 pacientes controles se aisló *B. fragilis*, lo cual es estadísticamente significativo (P<0,05). En los ensayos siguientes se obtuvieron los sobrenadantes de estas cepas de *B. fragilis* y fueron identificados con las siglas Bf-S con un subíndice numérico que corresponde el número de la cepa.

Ensayos de citotoxicidad en células HT-29

Tanto las células controles, como aquellas tratadas con el sobrenadante del control negativo (*B. fragilis*, TM-400) permanecieron inalteradas, con un patrón de una monocapa confluyente con uniones intracelulares estrechas durante todo el período de incubación de las placas.

El sobrenadante del control positivo, cepa de *B. fragilis* O86 productora de toxina BFT 2, presentó a las tres horas de incubación alteraciones en la morfología de la monocapa celular la cual se hizo más pronunciada a las 48 horas cuando produjo con un título de 1/4, desprendimiento total de la monocapa, redondeamiento, expansión y separación de las células (4+).

De las 15 cepas de *B. fragilis* aisladas, 12 (Bf-S-011; 021; 030; 040; 047; 048; 054; 055; 108; 109; 110; 116) presentaron entre 3 y 48 horas, alteraciones en la monocapa celular, con patrones que variaron entre 1+ y 4+, a diluciones desde 1/4 a 1/32 (Tabla 1). Cinco de las doce cepas estaban asociadas conjuntamente con *Candida albicans*.

La Figura 1, muestra los cambios morfológicos celulares inducidos por algunas cepas de *B. fragilis*.

Discusión

Bacteroides fragilis forma parte de la flora habitual de la vagina con una frecuencia relativamente baja [31], es un importante agente etiológico de infecciones extraintestinales, pero su papel patógeno en la vagina es desconocido. Algunas cepas de *B. fragilis* enterotoxigénico se han asociado a diferentes cuadros intestinales y extraintestinales. Por tal motivo, ante casos de inflamación vaginal de etiología desconocida, se planteó la investigación de *B. fragilis* enterotoxigénico en pacientes con vaginitis.

De las 140 muestras de pacientes sintomáticas, se aislaron 15 cepas de *B. fragilis*, de las cuales 12 (80%) mostraron efecto citotóxico en la línea celular HT-29. La intensidad del efecto varió en algunas cepas (Tabla 1) ya que unas indujeron el desprendimiento total de la monocapa, disolución de los acúmulos celulares con expansión y disgregación de las células, llegando, en algunos casos a superar el efecto citotóxico del control positivo (Figura 1E). Otras cepas solamente indujeron un efecto citotóxico leve, manifestado por la expansión de las células con ligera separación entre las mismas (Figura 1D).

Tabla 1. Alteraciones morfológicas en células HT-29 inducidas por sobrenadantes de cultivo de *Bacteroides fragilis* aislados de pacientes con vaginitis.

Bf-S	Cambios morfológicos	Dilución
011	3+	1/4
021	4+	1/32
030	2+	1/4
040	1+	1/4
047	1+	1/4
048	4+	1/32
054	1+	1/4
055	4+	1/32
108	1+	1/4
109	4+	1/32
110	4+	1/16
116	4+	1/16

4+: Desprendimiento total de la monocapa, disolución de los acúmulos celulares, redondeamiento, expansión y separación de las células.

3+: Desprendimiento del 75% de la monocapa, disolución de los acúmulos celulares, redondeamiento, expansión y separación de las células.

2+: Desprendimiento del 30%-40% de la monocapa, disolución de los acúmulos celulares, redondeamiento, expansión y separación de las células.

1+: Expansión y separación leve de las células con escaso desprendimiento de la monocapa.

La separación de los acúmulos celulares de la monocapa bien sea en pequeños grupos o en células separadas podría deberse a la degradación proteolítica de las uniones fuertes de la Zónula Ocludens-1, tal como ocurre en la línea celu-

lar MDCK [32]. La expansión celular, hecho ocurrido en todas las células tratadas con los sobrenadantes, se debe a un aumento en el volumen intracitoplasmático a consecuencia de la redistribución de la proteína F-actina. Este efecto es tiempo y concentración dependiente [33].

Las diferencias en toxicidad vistas en las células tratadas con los distintos sobrenadantes, ya sea en el tiempo en que aparecieron y/o con el patrón evidenciado, podrían interpretarse por que la producción de la toxina ocurre a diferentes tiempos. Para explicar esto, se han planteado varias hipótesis, las cuales incluyen diferencias en la expresión o tiempo de secreción de la toxina así como la presencia de otros factores de virulencia. Los datos más recientes utilizando cepas con baja producción de enterotoxinas derivadas de cepas altamente toxigénicas indican que la regulación de la transcripción de los genes es el mecanismo probablemente responsable de este comportamiento [34].

La presencia de *B. fragilis* enterotoxigénico en pacientes con vaginitis, aunado al alto porcentaje (58,3%) de su aislamiento sin asociación con patógenos específicos y a su ausencia en el grupo control, sugiere que la enterotoxina puede jugar un papel importante en la inflamación de la mucosa cérvico-vaginal, ya que, se ha demostrado que la enterotoxina de *B. fragilis* induce una respuesta inflamatoria en células de colon humano T-84 y HT-29 [34]. La determinación de la importancia clínica de este microorganismo en la vaginitis requiere de estudios adicionales para definir su papel en esta entidad clínica.

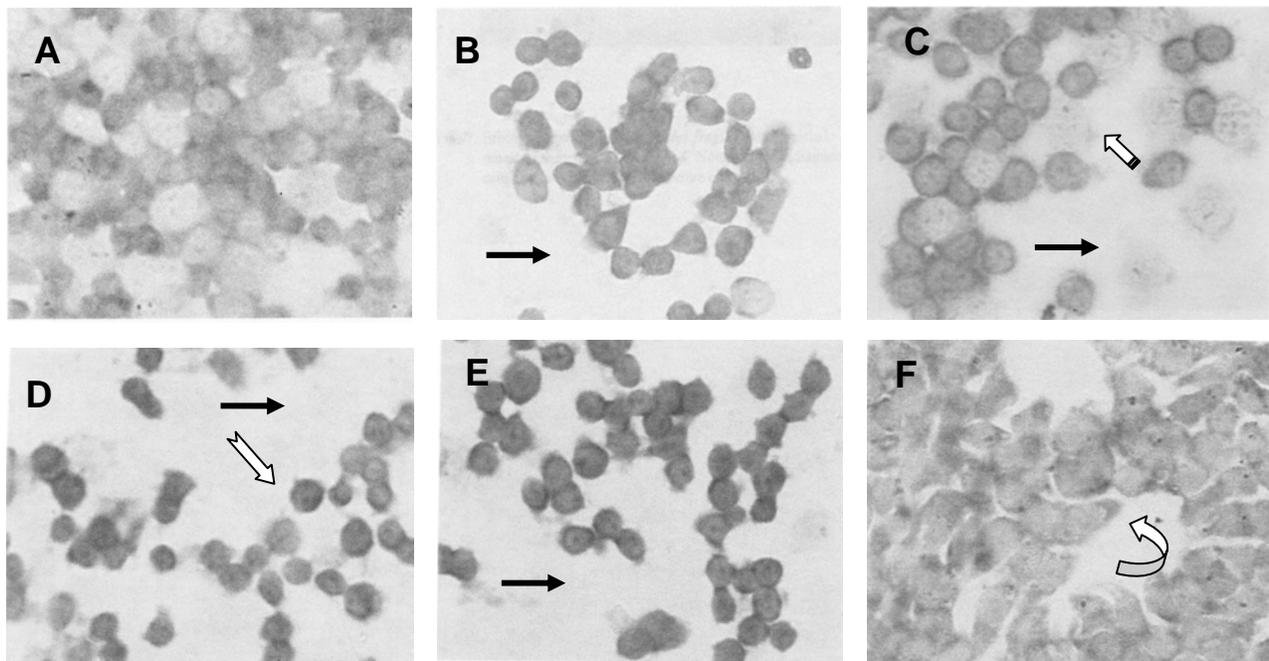


Figura 1. Alteraciones morfológicas inducidas por sobrenadantes de cultivo de *Bacteroides fragilis* aislados de pacientes con vaginitis. Magnificación. 400X. A: *B. fragilis* cepa TM400, no toxigénica. B: *B. fragilis* 086 productora de la toxina BFT2. C: Bf.-v110. D: Bf.-v116. E: Bf.-v109. F: Bf.-v147. Desprendimiento de la monocapa (flecha negra). Expansión celular (Flecha discontinua). Disolución de los acúmulos celulares (Flecha con bifurcación). Expansión y ligera separación de las células (Flecha curva).

Referencias

- Carr PL, Felsenstein D, Friedman RH. Evaluation and management of vaginitis. *J Gen Intern Med* 1998; 13:335-46.
- Haefner HK. Current evaluation and management of vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42:184-95.
- Sobel JD. Vulvovaginitis in healthy women. *Compr Ther* 1999; 25:335-46.
- Finegold, SM. Overview of clinically important anaerobes. *Clin Infect Dis* 1995; 20:205-7.
- Aldridge KE, Ashcraft D, O'Brien M, Sanders CV. Bacteremia due to *Bacteroides fragilis* group: Distribution of species, B-lactamase production, and antimicrobial susceptibility patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:148-53.
- Lyudmila Boyanova, Rossen Kolarov, Ivan Mitov. Antimicrobial resistance and management of anaerobic infections. *Expert Review of anti-infective Therapy* 2007; 4: 685-701.
- Gnocchi CA. Infección intraabdominal y nuevas quinolonas. *Medicina* 1999; 59 (Supl trov).
- Cheryl K. Walker and Harold C Wiesenfeld. Antibiotic therapy for acute pelvic inflammatory and prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Clin Infect Dis* 2007; 44: S111-S122.
- Jotwani R, Gupta U. Virulence factors in *Bacteroides fragilis* group. *Indian J Med Res* 1991; 93:232-5.
- Myers LL, Shoop DS, Firehammer BD, Border MM. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. *Infect. Immun* 1984; 44: 241-4.
- Polanco N, García A, Candela E, Seijas U. Aislamiento de *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico en pacientes del Hospital de Niños J M de los Ríos con síndrome gastrointestinal. *Acta Científica Venezolana. XLIV Convención Anual* 1994; 45:236.
- Obiso RJ, Lyerly DM, Van Tassell RL, Wilkins TD. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage *in vivo*. *Infect Immun* 1995; 63: 3820-6.
- Moncrief JS, Obiso R, Barroso LA, Kling JJ, Wright L, Van Tassell RL, Lyerly DM, Wilkins TD. The Enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infect Immun* 1995;66: 175-81.
- Kato N, Kato H, Watanabe K, Ueno K. Association of *Bacteroides fragilis* with bacteremia. *Clin Infect Dis* 1996;23: 83-6.
- Mundy ML, Sears CL. Detection of toxin production by *Bacteroides fragilis*: Assay development and screening of extraintestinal clinical isolates. *Clin Infect Dis* 1996; 23:269-76.
- Leszczynski P, Van Belkum A, Pituch H, Verbrugh H, Meisel-Mikolajczyk F. Vaginal carriage of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2899- 903.
- Weikel CS, Griego FD, Reuben J, Myers LL, Sack RB. Human colonic epithelial cells, HT-29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxigenic dramatically alter their morphology. *Infect Immun* 1992; 60: 321-7.
- Sack BR, Albert JM, Alam K, Neogi KP, Akbar MS. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. *J Clin Microbiol* 1994; 32:960-3.
- Donelli G, Fabbi A, Fiorentini C. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cytoskeletal changes and surface blebbing in HT-29 cells. *Infect Immun* 1996; 64: 113-9.
- Saidi S F, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin rapidly intoxicates human intestinal epithelial cells (HT-29/C1) *in vitro*. *Infect Immun* 1996;64: 5029-34.
- Wells CL, Van de Weaterlo EM, Jechoreck RP, Feltis BA, Wilkins TD, Erlandsen SL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin modulates epithelial permeability and bacterial internalization by HT-29 enterocytes. *Gastroenterology* 1996; 110:1429-37.
- Chambers FG, Koshy SS, Saidi RF, Clark DP, Moore RD, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin exhibits polar activity in monolayers of human intestinal epithelial cells (T84 cells) *in vitro*. *Infect Immun* 1997; 65:3561-70.
- Wu S, Lim KC, Huang J, Saidi RF, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens proteins E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14979-84.
- Briceño E, Suárez E, Michelangi C, Feliciangeli D, Ptaiza E, Mendible J y col. Código de Bioética y Bioseguridad 2002 capítulo 2 y 3. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2DA. Edición. Venezuela.
- Thomson RB, Miller JM. Specimen collection, transport and processing: Bacteriology. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edit. ASM Press Washington DC. 2003. pp. 286-315.
- Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Wexler H, Finegold SM, Gharbia SE, Shah HN. *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium* and other anaerobic Gram-negative bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edit. ASM Press Washington DC. 2003. pp. 880-98.
- Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold. *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*, 6th ed. Star Publishing Company, Belmont, Calif. 2002.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa, 2000.
- Van Tassell R L, Lyerly D M, Wilkins T D. Purification and characterization of an enterotoxin from *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* 1992; 60:1343-50.
- Obiso RJ, Azghani A, Wilkins T. The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infect Immun* 1997; 65:1431-39.
- Koshy SS, Montrose MH, Sears CL. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrate actin rearrangement in response to the metalloprotease toxin of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* 1996; 64: 5022-50.
- Saidi RF, Jaeger K, Montrose MH, Wu S, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin rearranges the actin cytoskeleton of HT-29/C1 cells without direct proteolysis of actin or decreases in F-actin content. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; 37:159-65.
- Wu S, Dreyfuss LA, Tzianabos AO, Hayashi CH, Sears C. Diversity of the metalloprotease toxin produced by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* 2002;70:2464-71.
- Sanfillippo L, Li CK, Seth R, Balwin TG, Menozzi MG, Mahida YR. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) by human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 456-63.