

SBM SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA

#05

MICROBIOLOGIA

in foco

julho/agosto/setembro - 2008

**A revista do
Microbiologista.**

informativo sbm • ano 2 • www.sbmicrobiologia.org.br



ISSN 1982-1301

**100 anos de
Paracoccidioidomicose**

Prezado Microbiologista,

Prezado leitor

Com este exemplar de número 5, iniciamos o segundo ano da “Microbiologia in foco”. Agradecemos a nossos colegas colaboradores que, sugerindo temas e elaborando artigos, possibilitaram que a revista completasse o primeiro ano. A foto ilustrativa da capa desta edição traz o agente etiológico *Paracoccidiodioides brasiliensis* que, somada ao artigo *Paracoccidiodomycose-Enigma da Micologia* escrito pelo Professor Zoilo Pires de Camargo, da UNIFESP, pretendem assinalar os 100 anos das primeiras observações de Adolpho Lutz e ainda homenagear todos os eminentes pesquisadores brasileiros que contribuíram e contribuem para o conhecimento dessa micose. Incluímos, ainda, importantes artigos da área de Microbiologia: Nisina, um antibiótico obtido por processo microbiano; floculação de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de bioetanol; monitoração microbiológica de água para hemodiálise por sistema Petrofilm; na área de virologia, gastroenterites virais e vacinas e erradicação da linfadenite caseosa, desenvolvidos por eminentes pesquisadores da Microbiologia. Como em todos os outros editoriais, enfatizamos a necessidade de sua colaboração, mandando notícias sobre sua área, sugerindo temas, pesquisadores, enfim, qualquer assunto que envolva a microbiologia e que achar interessante para publicação e divulgação. Somente com sua participação atuante, a Revista “Microbiologia in foco” terá a possibilidade de ser aprimorada e continuar no seu objetivo de atingir os mais variados setores e divulgar a Microbiologia.

Escrevam para taborda@usp.br ou vgambale@usp.br.



Marina B. Martinez
Presidente

Walderez Gambale
Carlos Taborda
Editores

Expediente

SBM in Foco

Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Ano 2, nº 5 (Julho, Agosto, Setembro)
São Paulo: SBM, 2008

Periodicidade Trimestral

Editores:

Carlos Taborda e Walderez Gambale

Marketing e Publicidade:

Prix Eventos: Silvia Neglia - Diretora
Fone/fax: 51.32496164
microbiologia@prixeventos.com.br

Editoração e Impressão:

Dolika Afa Artes Gráfica: (51) 3343.5533
Diagramação: André Saboia

Tiragem:

2000 exemplares - Circulação Nacional
Distribuição gratuita para sócios SBM

Responsabilidade editorial:

Todos os artigos assinados
são de responsabilidade dos
respectivos autores.

Foto da capa:

Carlos Taborda

Ciência in Foco

**NISINA: UM ANTIBIÓTICO
OBTIDO POR PROCESSO
MICROBIANO** 04

**FLOCULAÇÃO DE
SACCHAROMYCES
CEREVISIAE
NA PRODUÇÃO DE
BIOETANOL** 08

**MONITORAÇÃO
MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA
PARA HEMODIÁLISE
POR SISTEMA PETRIFILM®** . . . 13

GASTROENTERITES VIRAIS . 16

**VACINAS E A ERRADICAÇÃO
DA LINFADENITE CASEOSA** . 26

**PARACOCCIDIOIDOMICOSE:
ENIGMA DA MICOLOGIA** 32

Resenha in Foco 40

Agenda in Foco 41

NISINA: UM LANTIBIÓTICO OBTIDO POR PROCESSO MICROBIANO



1



2



3



4



5

1. Angela Faustino Jozala

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 16. 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil.

2. Priscila Gava Mazzola

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 16. 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil.

3. Pérola de Oliveira Magalhães

2Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900, Brasília, DF, Brasil.

4. Adalberto Pessoa Jr.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 16. 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil.

5. Thereza Christina Vessoni Penna

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 16. 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos na geração de produtos de interesse industrial reflete o conceito geral de microbiologia industrial. Dentre as razões para tal está a relativa simplicidade em realizar experimentos com microrganismos, com adequada velocidade de crescimento e grande diversidade de atividades bioquímicas, tornando-os um modelo experimental ideal para o estudo da genética e produção de biomoléculas aplicadas a diversas áreas da indústria.

Dando ênfase à obtenção de biomoléculas com vasto espectro de ação e aplicação e caráter inovador, a nisina surge como um bioproduto de relevante interesse industrial.

NISINA

A nisina é uma bacteriocina com característica bio-preservante, reconhecida em diversos países. As bacteriocinas são proteínas ou complexos protéicos excretados por bactérias e que se apresentam ativas contra espécies de microrganismos Gram-positivos, incluindo as bactérias ácido lácticas e os esporos do gênero *Bacillus*. Representam um grupo de substâncias antimicrobianas bastante heterogêneas, que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro bacteriano, ao modo de ação, à massa molar e às propriedades bioquímicas (Cleveland et al., 2001; Thomas et al, 2000).

Bactérias Gram-positivas, em sua maioria, produzem bacteriocinas menores do

que 6 kDa e aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas são divididas em 3 classes (Nes et al, 1996): (i) Lantibióticos; (ii) Lantibióticos pequenos não estáveis; e (iii) Grandes proteínas termolábeis.

Os lantibióticos são peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas, produzidos por uma extensa gama de bactérias Gram-positivas, e são caracterizadas pela presença única de aminoácidos modificados, particularmente os desidroaminoácidos e os tioéter aminoácidos lantionina (Lan) e 3-metilantionina (MeLan), produzidos por complexos multienzimáticos. Nisina pertence ao subgrupo dos lantibióticos lineares, sendo termoestável e está incluída na classe dos lantibióticos (Thomas, Clarkson e Delves-Broughton, 2000).



Figura 2: Coloração de Gram: Células de *Lactococcus lactis* ATCC 11454, cultivado em leite (em microscópio modelo: BX60F5, Olympus optical co., ltd. made in japan, com aumento de 1000 vezes).

nação com agentes quelantes (EDTA, monohidrato cítrico e ortofosfato trisódico) torna bactérias Gram-negativas sensíveis à nisina (Ganzle et al, 1999; Ukuku e Fett, 2004). Um sistema combinando diferentes soluções de antimicrobianos, como nisina/EDTA ou nisina/sorbato de potássio a 10 °C, mostrou significante decréscimo da população de *E. coli* O157: H7 comparado às amostras tratadas somente com a nisina (Fang e Hung-Chi, 2004). Portanto, a atividade inibitória da nisina em microrganismos Gram-negativos pode ser melhorada com a combinação da nisina com EDTA no meio de cultivo (Figura 3) (Vessoni Penna et al, 2006).

PRODUÇÃO DE NISINA: ESTUDOS DE MEIOS DE CULTIVO ALTERNATIVOS.

A importância do meio de cultivo é fundamental em trabalhos em que estão envolvidos microrganismos e produtos gerados por eles. No caso da produção de nisina o balanço nutricional do meio de cultivo é indispensável para as células produtoras.

As bactérias lácticas são fastidiosas e requerem meios de cultivo de alto valor nutricional, dos quais melhoram o crescimento e a produção de bacteriocinas. Muitos artigos descrevem os caldos MRS e M17 como ótimos meios de cultivo utilizados para o crescimento celular e produção de bacteriocina pelo *Lactococcus lactis* (Cheig et al., 2002). Apesar de estes meios promoverem crescimento exuberante e relativamente altos níveis de concentração de bacteriocinas, seus custos elevados os tornam inadequados para produção em larga escala (Guerra & Pastrana, 2003). Por outro lado, algumas matérias primas baratas como soro de leite ou melaço de cana, que são resíduos industriais, têm sido utilizadas como meio de cultura para produção de bacteriocinas (Guerra & Pastrana, 2003). As diferentes concentrações dos suplementos nu-

tricionais tais como a sacarose, a lactose e a glicose podem estar ligadas à nisina excretada nos meios de cultivos pelo *L. lactis* (Kim, Hall e Dunn, 1997). Altas concentrações de sacarose podem estar relacionadas ao aumento da produção de nisina no fim da fase estacionária de crescimento microbiano (Vessoni Penna & Moraes, 2002).

Vessoni Penna e Moraes, 2002, verificaram a influência positiva da utilização de suplementos como sacarose e asparagina em caldo MRS e M17, mostrando que a produção de nisina e massa celular de *L. lactis* dependiam do balanço desses nutrientes. Em outro estudo Vessoni Penna e colaboradores (2005) utilizaram o leite desnatado como suplementação dos meios de cultivo e verificaram melhores condições no crescimento do *L. lactis* e sua concomitante produção de nisina. Jozala e colaboradores (2006) estudaram a incorporação do leite desnatado (9,09% sólidos totais), na proporção 1:1, aos meios de cultivo MRS e

M17 e observaram o favorecimento do crescimento e simultânea produção de nisina por *L. lactis*. Portanto, afirma-se que a produção de nisina está relacionada à concentração nutricional dos meios de cultivo utilizados para o crescimento do microrganismo.

Os resultados favoráveis à utilização de leite desnatado continuaram a ser explorados por Jozala e colaboradores (2007). Estes autores estudaram diferentes concentrações do leite desnatado e observaram que ao ser diluído em 40% (contendo 2,27g^{sólidos totais}) houve melhor expressão de nisina. A figura 4 representa os ensaios de verificação da atividade nisina, através da metodologia de difusão em ágar, aplicados nos trabalhos realizados por este grupo de pesquisa.

Neste trabalho, Jozala e colaboradores (2007), sugeriu-se a utilização do soro de leite como meio de cultivo, pois aumentaria a produção de nisina e reduziria o custo de produção desta biomolécula.

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios e contém nutrientes como lactose, proteínas e sais minerais (Liu et al., 2006). No Brasil, a produção de queijo cresceu nas últimas décadas e a maioria do soro gerado é indevidamente descartado. Estima-se que no Brasil 50% do soro de leite são descartados sem tratamento em rios e carrega uma alta quantidade de matéria orgânica, sendo considerado um importante poluente. Neste caso a produção de um antimicrobiano poderia ser associada com a reciclagem ou a reutilização de material de descarte industrial, contribuindo com melhorias do meio ambiente, diminuindo ris-

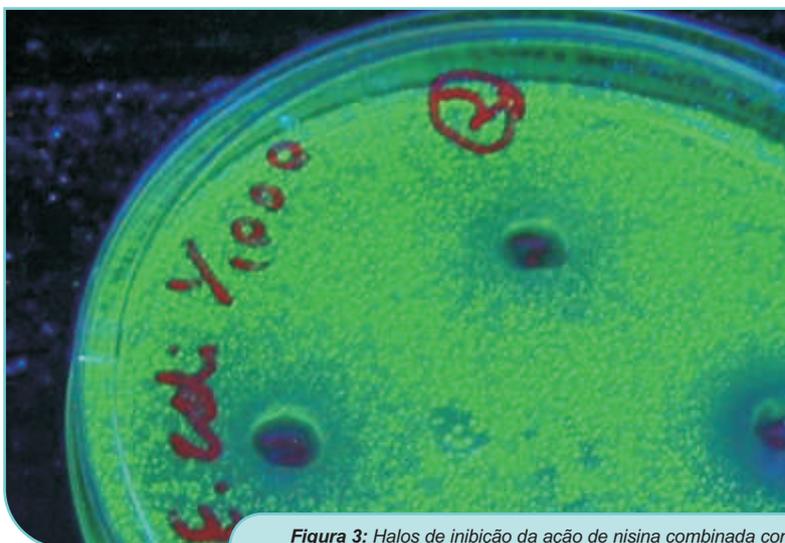


Figura 3: Halos de inibição da ação de nisina combinada com EDTA em *E. coli* produtora de proteína verde fluorescente (GFPuv).

cos de impacto ambiental. Flores & Alegre (2001) utilizaram soro de leite como suplemento durante fermentação por batelada e obtiveram atividade de nisina máxima de 5280 IU.ml⁻¹ após 9h de processo (pH 4,9). Mondragón-Prada et al. (2006) verificaram que a suplementação de soro de leite filtrado aumentou a produção de biomassa de bactérias lácteas. Pesquisadores testando uma cultura mista de *L. lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* observaram que o meio à base de soro de leite estimula a produção de nisina (Liu, C et al., 2006). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstram a utilização do soro de leite não suplementado para promover o crescimento e produção de nisina pelo *L. lactis*. (Jozala et al., 2007; Arauz et al., 2008).

Este meio de baixo custo, usado em culturas microbianas, promove vantagens econômicas, reduzindo a poluição do meio ambiente e estimulando os pesquisadores para a utilização deste subproduto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNO, M.E.C. e MONTVILLE, T.J. **Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59 (9), p. 3003-3010, 1993.

CHANDRAPATTI, S., O'SULLIVAN, D. J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Journal of Biotechnology*, v. 63, p. 229-233, 1998.

CHEIG, C. -I., CHOI, H. -J., PARK, H., KIM, S.-B., KOOK, M.-C., KIM, T.-S., HWANG, J.-K. e PYUN, Y.-R. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, v. 95, p. 225-235, 2002.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F. e CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural, and antimicrobials for food preservations. *International Journal of Food Microbiology*, v.71, p.1-20, 2001.

DELVES-BROUGHTON, J., BLACKBURN, P., EVANS, R. J. e HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 69(2), 193-202, 1996.

FANG, T.J. e HUNG-CHI TSAI. Growth patterns of *E. coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelator, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. *Food Microbiology*, v. 20(2), p. 243-253, 2004.

FLORES, S.H. e ALEGRE, R. M. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 34(2), 103-107, 2001.

GUERRA, N. P. e PASTRANA, L. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37(1), p. 51-55, 2003.

HOOVER, G. D., L. R. STEENSON. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1993.

JACK, R.W; JUNG, G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.4, p. 310-317, 2000.

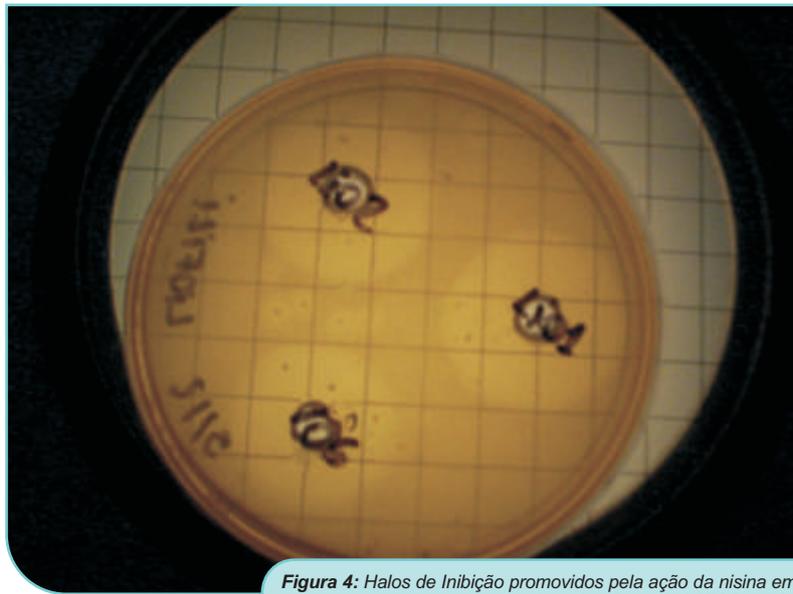


Figura 4: Halos de Inibição promovidos pela ação da nisina em *Lactobacillus sakei* ATCC 15521

JOZALA, A.F., NOVAES, L.C.L., CHOLEWA, O. e VESSONI PENNA, T.C. **Increased Of Nisin Produced By *Lactococcus Lactis* In Different Media.** *African Journal of Biotechnology*, v. 4(3), p. 262-265, 2005.

JOZALA, A. F., ANDRADE, M. S., ARAUZ L. J., PESSOA JR, A. e VESSONI PENNA, T. C. **Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 515-528, 2007.

KALETTA e ENTIAN. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisaA gene and posttranslational processing of its peptide product. *Journal of Bacteriology*, v. 171(3), p. 1597-1601, 1989.

KIM, W.S., HALL, R.J. e DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, p. 449-453, 1997.

LIU, C., LIU, Y., LIAO, W., WEN, Z. e CHEN, S. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113-116, p. 627-638, 2004

LIU, C., HU, B., LIU, Y. e CHEN, S. Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 751-761, 2006.

MONDRAGÓN-PARADA, M. E., NájERA-MARTÍNEZ, M., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., GALINDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N. e CRISTIANI-URBINA, E. Lactic acid bacteria production from whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 134(3), p. 223-232, 2006.

NES, I.F. DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B. EIJSK, V. E HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. [Review]. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 70, p. 113-128, 1996.

REDDY, K V R, ARANHA, C, GUPTA, S M, e YEDERY, R D Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. *Reproduction*, v. 128, p. 117-126, 2004.

SAHL, H.G e BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Reviews Microbiology*, vol. 52, p. 41-79, 1998.

SAKAMOTO, I.; IGARASHI, M.; KIMURA, K. Suppressive effect of *Lactobacillus gasserii* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 47, p. 709-710, 2001.

THOMAS, L.V., CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: Naidu, A.S., Editor. *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 463524, 2000.

TURNER, S.R., LOVE, R.M.; LYONS, K.M. An in vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *International Endodontic Journal*, v. 37, p. 664-671, 2004.

UKUKU D.O. e FETT W. Behaviour Of *Listeria Monocytogenes* Inoculated On Cantaloupe Surfaces And Efficacy Of Washing Treatments To Reduce Transfer From Rind To Fresh-Cut Pieces. *Journal of Food Protection*, p. 2143-2150, 2004.

VESSONI PENNA, T.C; MORAES, D.A. Optimization Of Nisin Production By *Lactococcus lactis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 775-789, 2002.

VESSONI PENNA, T.C, MORAES, D.A., and FAJARDO, D.N. Outgrowth kinetic parameters of activated *Bacillus cereus* spores in cooked rice and in milk with nisin added. *Journal Food Protection*, v. 65, p. 419-422, 2002.

VESSONI PENNA, T. C., JOZALA, A.F., NOVAES, L.C.L., PESSOA-JR., A. E CHOLEWA, O. **Production Of Nisin By *Lactococcus Lactis* In Media With Skimmed Milk.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 1-20, 2005.

VESSONI PENNA, T.C., JOZALA, A.F., GENTILE, T.R., PESSOA JUNIOR, A. e CHOLEWA, O. **Detection Of Nisin Expression By *Lactococcus Lactis* Using Two Susceptible Bacteria To Associate The Effects Of Nisin With Edta.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 334-346, 2006.

http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm
ANVS RDC nº 12 de 02/01/2001

FLOCULAÇÃO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL



Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

UNESP - Campus de Assis - SP - poliva@assis.unesp.br

INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica industrial para produção de álcool carburante pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) se baseia em duas bases tecnológicas que permitiram o grande avanço na eficiência alcoólica:

- a elevada concentração de células
- o reciclo de células de levedura.

Isto por que com esses dois fatores foi possível:

- diminuir muito o tempo de fermentação alcoólica, mesmo trabalhando com altas concentrações de açúcar. (**aumento de produtividade**)



Figura 1: Fotografia eletrônica de *S. cerevisiae* em fase de brotamento

- Operar um processo não asséptico sem que os contaminantes o dificultassem ou inviabilizassem (**estabilidade microbiológica e bioquímica**)
- Aumento da **eficiência alcoólica** desde que o açúcar não era mais tanto desviado para a produção da biomassa celular, mas apenas a reposição da mesma ao longo da safra.

Com o reciclo de células são também reciclados vários agentes bióticos e abióticos que podem produzir um fenômeno muito prejudicial à fermentação alcoólica para produção de etanol carburante - a **Floculação celular** (Figura 2).



Figura 2: Fotografia eletrônica da floculação entre leveduras *S. cerevisiae*. Fonte: Fermentec - agradecimento ao prof. Luis Basso

FLOCULAÇÃO CELULAR

Ocorre quando numa suspensão, células individuais são agregadas formando flocos ou agregados que logo em seguida sofrem sedimentação ou flotação (fig. 2).

Autofloculação - quando envolve as células de uma única linhagem que se agregam.

Co-floculação - determinada por **agregações ocorrendo entre diferentes** linhagens de diferentes espécies (STEWART et al, 1975; ESSER & KUES, 1983).

Denominações - Este processo pode estar associado também com as palavras **aderência, aglomeração, aglutinação, coagulação, flotação**, etc., sendo que quando em uma suspensão as células individuais são unidas, agregadas formam estruturas que recebem diversos nomes como: **aglomerados, agregados, aglutinados, cachos, coágulos, flocos ou pellet**, que sedimentam no meio no qual são cultivados, ou flotam para a superfície do meio (CALLEJA, 1987).

FATORES QUE PROVOCAM A FLOCULAÇÃO

Este padrão de floculação depende das **propriedades da parede celular**, ten-

do em vista que estas últimas isoladas apresentam o mesmo comportamento de agregação em relação às células intactas, determinada por um gene específico - o **gene FLO**. (MIKI et al, 1982a).

Este fenômeno é de caráter específico **dependendo da linhagem** de levedura utilizada e o seu comportamento frente a **tratamentos com maltose ou manose, presença ou ausência de Ca²⁺**. Além disso, a **floculação pode ocorrer** entre células preparadas em solução tampão, através de **interações envolvendo a parede celular** de células adjacentes (EDDY & PHIL, 1955a e STEWART et al, 1975).

Existem fatores intimamente relacionados ao fenômeno da agregação celular, que podem ser classificados de acordo com ESSER & KUES (1983) em:

Fatores genéticos, onde a agregação das células de levedura é efetuada por múltiplos genes alélicos (FLO1, FLO2 e FLO4) conhecidos pelo Locus FLO, que na presença de no mínimo um gene ativo é suficiente para o fenótipo ser expresso e ter início a flocculação (LEWIS et al, 1976; RUSSELL et al, 1980; MIKI et al, 1982a).

Fatores fisiológicos, onde a flocculação depende da **idade fisiológica** das células.

Fatores ambientais tais como **temperatura e pH**, são importantes na flocculação por leveduras, já que o tratamento térmico **entre 50 e 60°C provoca a separação das células** e o resfriamento aumenta a flocculação enquanto que **em pH por volta de 2,0 a flocculação é mínima e em pH entre 4,5 - 5,5 é máxima**. A **concentração de cálcio** que se caracteriza como elemento determinante na flocculação também deve ser destacado como um fator ambiental importante. (AMRI et al, 1982; CALLEJA, 1974; GILLILAND, 1957; MILL, 1964b).

Fatores biológicos tais como a **concentração de células** em suspensão é fundamental em linhagens flocculantes de *Saccharomyces cerevisiae* com uma ótima taxa de agregação em **concentrações superiores a 3-5x10⁸ células/ml** (PARKER et al, 1971 apud ESSER & KUES, 1983; YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991).

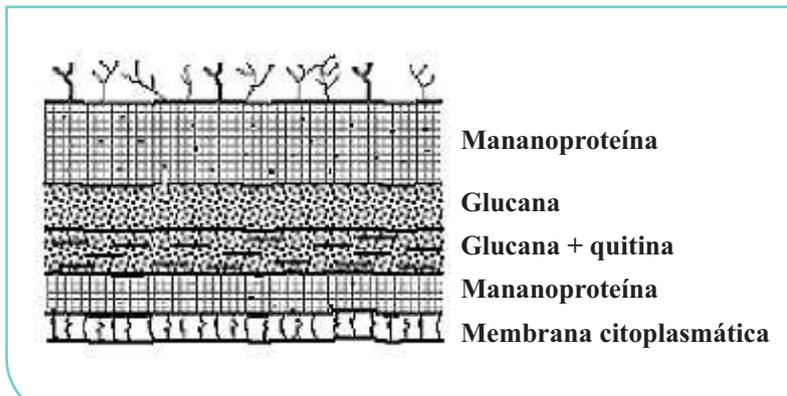


Figura 3: Parede celular de uma levedura. Fonte: Kí Canadá.

MECANISMO DE FORMAÇÃO DOS FLOCOS

A ORIGEM DA FLOCULAÇÃO pode ser devida a diferentes fatores, tais como:

1. **aglutinação imunoquímica (ligação antígeno anticorpo),**
2. **por aditivos químicos (ex. cálcio, ferro, gomas),**
3. **morfologia da parede celular e estruturas específicas (fímbrias, lectinas, polissacarídeos da parede celular) de células indutoras da flocculação.**
4. **Fatores genéticos podem estar envolvidos. Ex. gene Flo na flocculação de leveduras de cervejaria**
5. **aglutinação sexual (conjugação entre bactérias) Na fermentação alcoólica** para produção de etanol combustível os agentes mais comuns são:
 - 1°. **Bactérias indutoras da flocculação com participação de íons Cálcio.**
 - 2°. **Leveduras flocculantes**
 - 3°. **Polissacarídeos (dextrana)**

AUTO-FLOCULAÇÃO EM LEVEDURAS

A parede celular das leveduras está intimamente ligada às propriedades de flocculação e é composta de duas camadas: uma interior de glucanas e uma mais externa de mananas que estão associadas às proteínas (Figura 3).

Acredita-se que o **complexo exterior de fosfomananas e proteínas** sejam

essenciais para a flocculação, já que o tratamento com enzimas como, por exemplo, tripsina e papaína e outras enzimas proteolíticas e carboidrases reduzem a agregação (Ludwig, 1998).

Processo esse, também observado com leveduras do tipo *Candida albicans*, que se aderem aos tecidos humanos, e que tem uma parede celular muito semelhante à de *Saccharomyces cerevisiae*. Enzimas como glucanases e quitina sintases, manosil transferases e proteases podem atuar no desligamento da levedura ao epitélio (KRUPPA et al, 2003). Também a adição de manose numa suspensão de leveduras promove a completa desfloculação das células (Oliva-Neto, 1990).

FATORES ENVOLVIDOS NA FLOCULAÇÃO ENTRE LEVEDURAS

- **Fatores genéticos**, onde a agregação das células de levedura é efetuada por múltiplos genes alélicos (FLO1, FLO2 e FLO4) conhecidos pelo Locus FLO, que na presença de no mínimo um gene ativo é suficiente para o fenótipo ser expresso e ter início a flocculação (LEWIS et al, 1976; RUSSELL et al, 1980; MIKI et al, 1982a)
- **Fatores fisiológicos**, onde a flocculação depende da **idade fisiológica** das células.
- **Fatores ambientais** tais como **temperatura e pH**, são importantes na flocculação por leveduras, já que o tratamento térmico **entre 50 e 60°C provoca a separação das**

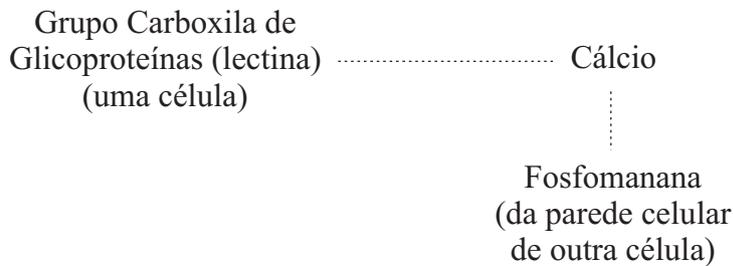


Figura 4: Representação esquemática da ligação entre as células para formação do floco

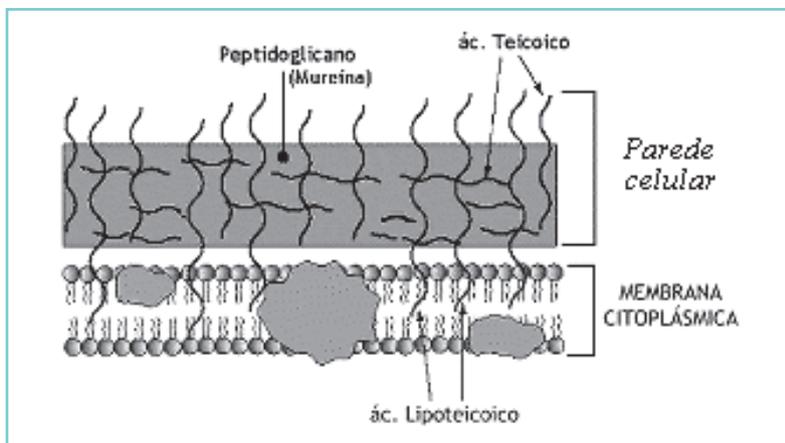


Figura 5: Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram positivas. Fonte: Daniel Val.



Figura 6: Efeito do aumento da concentração de *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 indutor da flocação de *S. cerevisiae*. A partir da concentração de 1,38 g/L de bactérias já ocorre separação de fases entre na suspensão celular. (Fonte: Ludwig et al, 1996)

células e o resfriamento aumenta a flocação enquanto que **em pH por volta de 2,0** a flocação é mínima e **em pH entre 4,5 - 5,5 é máxima**. A rigor acima de pH 2,8 já ocorre o reagrupamento das células (Ludwig et al 2001).

- A **concentração de cálcio** que se caracteriza como elemento determinante na flocação também deve ser destacado como um fator ambiental importante. (AMRI et al, 1982; CALLEJA, 1974; GILLILAND, 1957; MILL, 1964b).
- Fatores biológicos tais como a **concentração de células** em suspensão é fundamental em linhagens floclantes de *Saccharomyces cerevisiae* com uma ótima taxa de agregação em **concentrações superiores a 3.5×10^8 células/ml** (ESSER & KUES, 1983); há necessidade de pelo menos 30% de leveduras floclantes para que essas induzam as não floclantes.

ENVOLVIMENTO DE GLICOPROTEÍNAS NA FLOCAÇÃO

A parede celular de uma linhagem floclante e outra não floclante de *Kluyveromyces marxianus*, mostram **diferenças no conteúdo proteico**, com uma **concentração mais elevada de proteínas nas células floclantes**. Eletroforese das proteínas mostraram um **peptídeo extra** (peso molecular - 37 KDa) que **é ausente em células não floclantes** (TEIXEIRA et al, 1989).

Resultados semelhantes foram obtidos por PEREIRA JR & BU'LOCK (1993) que estudaram as proteínas da parede celular de duas linhagens (floclantes e não floclantes) de *Pichia stipitis*. As linhagens floclantes apresentaram um **conteúdo mais elevado de proteínas na parede celular** do que as correspondentes não floclantes, um **polipeptídeo de peso molecular 65 KDa foi detectado nas proteínas das linhagens floclantes e estava ausente nos extratos das não floclantes**.

STEWART et al (1995) isolaram e caracterizaram as proteínas da **parede celular de leveduras floclantes** em fase

estacionária de crescimento, e observaram **proteínas de PM de 20 a 85 KDa** e **glicoproteínas de 40 a 80 KDa**, sendo as proteínas dependentes de cálcio para flocular. Observaram também que provavelmente as proteínas do gene FLO1 (93 a 150 KDa) tem papel regulatório na floculação, agindo diretamente na interação lectina-carboidrato.

MECANISMO QUÍMICO DA FLOCULAÇÃO

Acredita-se que **os grupos carboxila da porção proteica das glicoproteínas (lectinas) tenham papel importante neste processo, ligando-se as mananas ou fosfato que formam o complexo de fosfomanas das células adjacentes**. Grupos aniônicos componentes da parede celular de células adjacentes tornem-se ligados pelo cálcio, através de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxílicos das proteínas da parede celular e os grupos fosfato do esqueleto de fosfomananas (LYONS & HOUGH, 1971).

Esta ligação entre leveduras via pontes de hidrogênio (formadas entre os grupos carboxila das células adjacentes, por meio de cálcio) **induzem a uma “ligação” conformacional determinando assim a adesão celular**. (MILL, 1964b; STEWART et al, 1975).

A **ligação entre glicoproteínas** (lectinas) da superfície celular, unindo-se as mananas dos **carboidratos complementares** de células adjacentes, é **ativada pelos íons cálcio** atuam como **cofatores**, (Figura 4) ativando a capacidade de ligação de certos componentes de lectinas com os carboidratos, mantendo a configuração correta destas lectinas essa é a **teoria “lectin-like”**. Sendo isto sustentado pelo fato da parede celular de leveduras floculantes conter uma quantidade mais alta de prolina, lisina e aspartato do que as leveduras não floculantes (AMRI et al, 1982; MIKI et al, 1982a; TAYLOR & ORTON, 1978).

FLOCULAÇÃO PELO CONTATO ENTRE BACTÉRIAS INDUTORAS DA FLOCULAÇÃO E OUTRAS CÉLULAS

A parede celular bacteriana (Figura 5) pode também estar associada à flo-

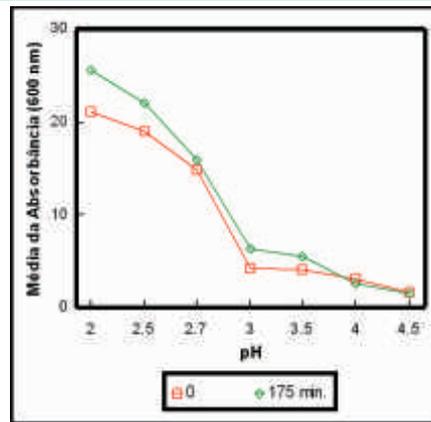


Figura 7: Efeito do pH sobre a capacidade de *Lactobacillus fermentum* flocular as células de *Saccharomyces cerevisiae* no tempo inicial e com 175 min.

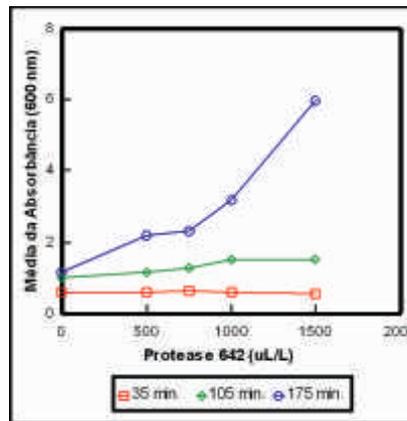


Figura 8: Quantificação (absorbância =600 nm), da floculação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por *Lactobacillus fermentum* CCT 1396, após o tratamento com a enzima proteolítica Novozyme 642, nas concentrações de 0 a 1500 U/L.

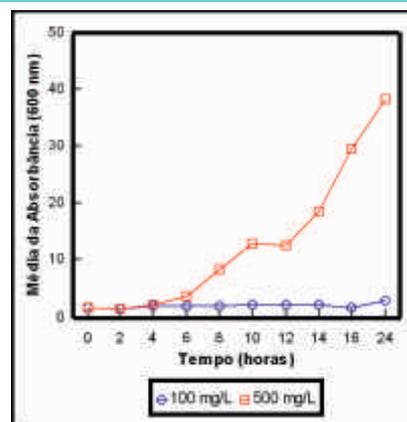


Figura 9: Ação da enzima Carbohidrase (Novo Nordisk SP 299) na floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 em diferentes intervalos de tempo.

culação celular e é formada de peptidoglicano (mureína), que é um heteropolímero formado por dois aminoaçúcares (N-acetil-glicosamina e ácido N-acetil-murâmico). A este último encontra-se ligadas, covalentemente, cadeias laterais de tetrapeptídeos, normalmente composto de L-alanina, D-glutamato, mesodiaminopimélico (ou outro aminoácido diamínico) e D-alanina. Nas bactérias gram (+), responsáveis pela floculação, aproximadamente 90% da parede são compostos de peptidoglicano, além de ácido teicóico e ácido lipoteicóico (PELCZAR et al, 1996; TRABULSI & ALTERTHUM, 2004).

MECANISMO DA FLOCULAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS E LEVEDURAS

O mecanismo de floculação que ocorre entre as células de **bactérias contaminantes da fermentação alcoólica e as leveduras**, está associado ao **contato físico entre a parede celular dos dois microrganismos**, existindo uma **relação ótima entre a quantidade de células de bactéria e levedura para causar a floculação**, que segundo YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) por contagem microscópica está em **4,8 (bactéria/levedura)**, o que explica a aparição repentina de floculação em indústrias de produção de etanol, quando ocorre um aumento da contaminação bacteriana principalmente por *Lactobacillus fermentum*. A Figura 6 mostra que a partir de 1,38 g/L de biomassa seca de *L. fermentum* CCT 1398 sobre uma suspensão de *S. cerevisiae*, ocorre separação de fases devido a intensa floculação celular. (LUDWIG et al. 1996) Segundo BROMBERG & YOKOYA (1995) **resíduos de aminoácidos** da superfície de *Lactobacillus fermentum* e **resíduos de carboidratos das leveduras** são responsáveis pelo desenvolvimento do fenômeno da floculação. As reações com vários reagentes de modificação proteica indicaram que o **grupo indol do triptofano e o grupo hidroxil fenólico da tirosina devem estar presentes na superfície celular bacteriana para a floculação ocorrer**. O resíduo do carboidrato na superfície celular de leveduras, que é responsável pela ligação, é provavelmente

manana que tem sido **demonstrado por experimentos de inibição por açúcares** (SANTOS & YOKOYA, 1993).

MÉTODOS DE DESFLOCULAÇÃO CELULAR

As destilarias de produção de bioetanol utilizam como método de controle da floculação indesejável, o tratamento ácido do fermento. Tal procedimento consiste na acidificação com ácido sulfúrico, depositado diretamente sobre a suspensão de levedura, e o conseqüente abaixamento do pH para a faixa de 2,0 a 2,5. Isso produz uma rápida desfloculação celular devido a competição dos íons Hidrogênio pelos sítios ligação onde os íons cálcio estavam ligados. Como o hidrogênio não possui a capacidade de induzir a formação de flocos, as células se separam, e este procedimento auxilia diminuindo a formação de flocos durante a fermentação. Porém tal reversão é temporária, pois com a introdução da suspensão de leveduras acidificadas no mosto, ocorre aumento do pH (pH entre 3,8 e 4,5) o que novamente induz a formação de flocos.

Na Figura 7 é demonstrado o efeito do pH na desfloculação celular, esta ocorrendo com a diminuição do pH, nota-se que acima de pH 3,0 já não há mais desfloculação, pois diminui a turbidez da suspensão celular provocada pelo reaparecimento da floculação.

As figuras 8 e 9 mostram que há alterações à desfloculação celular via ácido. Tanto enzimas carbohidrases como proteases podem desflocular o fermento de forma irreversível, ou seja, mesmo alterando-se o pH do mosto durante a fermentação alcoólica, não há reversão da desfloculação quando se utiliza um método enzimático. Porém neste caso, a limitação é econômica, uma vez que o tratamento enzimático é incompatível com o custo do tratamento ácido, razão pela qual ainda continua sendo usado ácido na fermentação alcoólica.

REFERÊNCIAS PRINCIPAIS

LUDWIG, K.M., OLIVA-NETO, P. De ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação al-

coólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 63-68. 2001.

LUDWIG, K.M. Floculação de *S. cerevisiae* caracterização e ação de enzimas desfloculantes. Rio Claro Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências de Rio Claro UNESP. 1998. 134 p.

LUDWIG, K.M. Produção e aplicação de enzimas visando a desfloculação de células de *S. cerevisiae* floculada por *L. fermentum*. Rio Claro/SP. Tese de Doutorado. UNESP. 2005.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Rev. Microb.*, v.22, n.1, p.12-16, 1991.

OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas/SP: UNICAMP. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1990. 207p

ST STRATFORD, M. Yeast flocculation: Calcium specificity. *Yeast*, v.5, p.487-496, 1989. _____ Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.5, p.441-445, 1989.

_____. Yeast flocculation: n of physiological and genetic viewpoints. *Yeast*, v.8, p.25-38, 1992a.

_____. Yeast flocculation: Receptor definition by mm mutants and concanavalin A. *Yeast*, v.8, p.635-645, 1992a. ST STRATFORD, M.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: kinetics and collision theory. *Yeast*, v.3, p.201-206, 1987.

Yeast flocculation: quantification. *Yeast*, v.4, p.107-115, 1988. STRATFORD, M.; BRUNDISH, H.M. Yeast flocculation: cationic inhibition. *Yeast*, v.6, p.77-86, 1990.

SANTOS, M.T. Caracterização da floculação de leveduras causada por *Lactobacillus fermentum*. Campinas/SP: UNICAMP, 1991, 93p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1991.

SANTOS, M.T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.75, n.2, p.151-154, 1993.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, v.XCIII, n.6, p.336-341, 1979.

MONITORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE POR SISTEMA PETRIFILM®



1. Fábio Nunes Dias

Analista de Pesquisa e Desenvolvimento da Nipro Medical Ltda. Doutorando do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. fabio_dias@nipro.com.br

2. José Luiz Bevilacqua

Médico nefrologista. Diretor administrativo do Instituto de Hemodiálise Sorocaba

3. Carlos Eduardo Guimarães

Tecnólogo em saúde especializado em Engenharia Clínica. Responsável pela manutenção e controle de qualidade do Instituto de Hemodiálise Sorocaba

4. Thereza Christina Vessoni Penna

Profa. Dra. Titular do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

A água é um dos recursos naturais fundamentais para a vida e para as diferentes atividades humanas, proporcionando saúde e conforto por meio de seus incontáveis usos.

A qualidade da água, por si só (em particular a qualidade microbiológica da água), tem uma grande influência sobre a nossa saúde. Se não for adequada, pode ocasionar surtos de doenças e causar sérias epidemias.

Os riscos à saúde, associados à água, resultam da poluição da água causada por elementos microbiológicos (bactérias e vírus) ou químicos (metais e pesticidas). E ainda vai mais além, se observarmos que a

água parada é o berço de vetores como o *Aedes aegypti*, transmissor da dengue.

Quando falamos em água para utilização na área da saúde (hospitais, clínicas, indústrias médicas e farmacêuticas), nos referimos a um tipo de água com elevado grau de pureza necessário para não contaminar os processos e produtos, evitando assim, riscos aos pacientes.

Portanto, na área da saúde, a água potável é especialmente tratada, por modernos sistemas de purificação de água, como a osmose reversa, capazes de remover partículas, bactérias e endotoxinas (substâncias presentes na célula de bactérias e que quando entram em contato com a corrente sanguínea, causam terríveis febres).



Figura 1: Sistema Petrifilm® (3M, St. Paul, MN, USA)

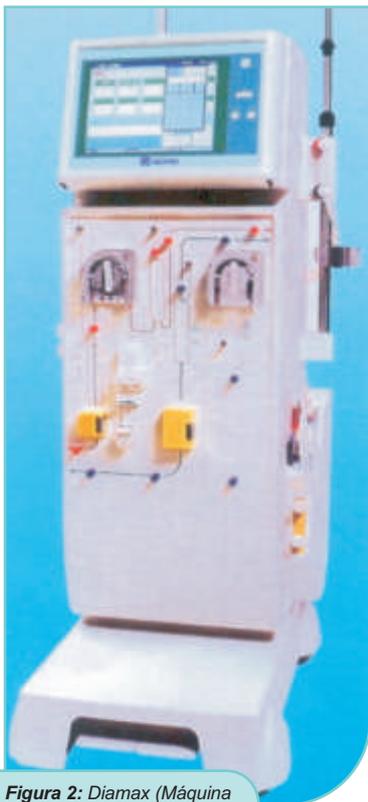


Figura 2: Diamax (Máquina para hemodiálise - Nipro)



Figura 3: PES-150DL (Dialisador Nipro)

TABELA 1. PARÂMETROS PARA QUALIDADE DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

PARÂMETRO	VALOR MÁXIMO PERMITIDO
Coliforme total	Ausência em 100 mL
Contagem de bactérias heterotróficas	200 UFC/mL
Endotoxinas	2 UE/mL

Este tratamento especial confere à água níveis de segurança, exigidos para aqueles tipos de água utilizados, por exemplo, na preparação de medicamentos administrados por via venosa e em seções de hemodiálise.

Por meio de pesquisa de bactérias heterotróficas (que decompõem matéria orgânica) uma indústria que fabrica e comercializa produtos para a saúde (agulhas, cateteres, oxigenadores de sangue e dialisadores), realizou um estudo abordando as etapas de tratamento para purificação da água utilizada na fabricação de seus produtos, demonstrando a importância da qualidade da água nas indústrias e estabelecimentos de saúde.

Neste estudo, a espécie *Flavimonas oryzihabitans* (também conhecida como *Pseudomonas oryzihabitans*) foi a bactéria identificada com maior frequência, em diferentes etapas do sistema de purificação de água.

Este estudo foi apresentado à uma conceituada clínica de hemodiálise, igualmente consciente da importância da qualidade da água nos seus processos, despertando interesse em realizar esta pesquisa na água para hemodiálise, assunto este que quando concluído, será publicado.

Esta clínica, além de cumprir com todas as exigências legais de controle de qualidade da água para hemodiálise (monitoração mensal realizada por laboratórios credenciados junto à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde - REBLAS), segue uma sistemática alternativa realizada pela própria clínica, utilizando o sistema Petrifilm® (Figura 1), que fornece dados importantes para assegurar a qualidade da água utilizada na clínica.

Diversos métodos microbiológicos, como a filtração da água em filtro especial (membrana filtrante) e semeadura em profundidade (mistura de uma amostra de água com um ágar), têm sido largamente empregados no monitoramento da qualidade da água para verificação da presença de microrganismos.

A patogenicidade (capacidade de causar doença) destes microrganismos não depende apenas de suas habilidades de produzir toxinas, mas também depende da resistência do hospedeiro. Qualquer microrganismo é patogênico em potencial, caso encontre um hospedeiro debilitado.

Os principais gêneros patogênicos são: *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*[1].

Doentes renais crônicos (com perda irreversível da função dos rins) necessitam geralmente de 3 seções semanais de hemodiálise, onde a filtração ou “limpeza” do sangue é realizada por um rim artificial, o dialisador (Figura 2), ajudado por uma máquina de hemodiálise (Figura 3), que através de uma solução aquosa contendo ingredientes eletrolíticos específicos.

Em cada uma das seções de hemodiálise são utilizados em média 120 litros de água especialmente tratada para esta finalidade e muitas das inflamações e reações adversas sentidas pelo doente renal são causadas por contaminação bacteriana das soluções de diálise [2, 3, 4].

A água para hemodiálise é aquela que atende aos requisitos da água potável e que foi submetida a um tratamento adicional, por processo apropriado, para reduzir componentes químicos e microbiológicos [5]. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a RDC nº 154, os parâmetros de qualidade da água para hemodiálise (Tabela 1) devem ser rigorosamente obedecidos e monitorados mensalmente por um laboratório credenciado, utilizando métodos oficiais de análises da qualidade da água [6].

Mas, devido à periodicidade mensal destas análises, o intervalo de um resultado ao outro chega a levar 45 dias e este é um período muito longo para assegurar a segurança dos pacientes em hemodiálise.

Então, para garantir a qualidade da água, durante este intervalo, o Instituto de Hemodiálise Sorocaba (IHS) tem realizado desde janeiro de 2007, o controle interno de qualidade da água, utilizando o sistema Petrifilm® para análise microbiológica, além de realizar também análises físico-químicas e de endotoxinas.

O SISTEMA DE TRATAMENTO DE ÁGUA E O PETRIFILM®

O sistema de tratamento de água do IHS (Figura 4) é composto por três etapas distintas:

- Pré-tratamento da água (oriunda de poço artiano e abastecimento público) através de filtração em leito de areia, abrandamento e filtração em carvão ativado.
- Osmose reversa (dois módulos em paralelo).
- Reservatório de água tratada composto de três "loops" de distribuição que abastecem às máquinas de hemodiálise e às salas de reprocessamento de materiais.

Enquanto foram realizadas análises microbiológicas pelo laboratório credenciado junto à REBLAS, nos 4 pontos específicos do sistema de tratamento de água da clínica (Pré-tratamento, "loop" 1, "loop" 2 e "loop" 3), totalizando 40 análises por métodos convencionais, o controle de qualidade interno da clínica realizou 200 análises no mesmo período. Isto incluiu, além dos pontos citados, também a análise de amostras de água do filtro de carvão, apontado como um dos grandes vilões dos sistemas de purificação de água [7].

O sistema Petrifilm® consiste de uma placa de papel quadriculado recoberto com nutrientes desidratados e um gel hidrossolúvel a frio com corante indicador, protegido por um filme plástico superior transparente [8].

Para seu funcionamento, basta adicionar asepticamente, 1 mL de amostra de água sobre o Petrifilm®. Seus nutrientes se hidratam, o gel solidifica a mistura e então ele é deixado em uma incubadora a 37°C por 48 horas.

O corante presente no gel produz coloração avermelhada nos microrganismos, tornando mais fácil sua visualização e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) desenvolvidas sobre a superfície do Petrifilm®.

O número limite de microrganismos que se desenvolvem e formam as colônias visíveis de bactérias sobre a superfície do Petrifilm® é de 50 UFC/mL. Valores acima deste limite funcionam como alertas às clínicas, indicando que ações quanto à qualidade da água devem ser tomadas, para preservar o paciente renal.

Análises para detectar a presença de endotoxinas também foram realizadas tanto pelo laboratório credenciado quanto pelo controle de qualidade da clínica.

RESULTADOS

As monitorações mensais realizadas pelo laboratório credenciado apresentaram os seguintes valores máximos (expressos em log₁₀ UFC/mL) de carga microbiana:

- 1,1 log₁₀ UFC/mL no pré-tratamento;
- 1,5 log₁₀ UFC/mL no "loop" 1;
- 1,6 log₁₀ UFC/mL no "loop" 2;
- 1,4 log₁₀ UFC/mL no "loop" 3.

Já as monitorações realizadas pelo controle de qualidade da clínica, apresentaram os seguintes valores máximos (expressos em log₁₀ UFC/mL) de carga microbiana:

- 0,5 log₁₀ UFC/mL no pré-tratamento;
- 1,7 log₁₀ UFC/mL no filtro de carvão ativado;
- 1,4 log₁₀ UFC/mL no "loop" 1;
- 1,0 log₁₀ UFC/mL no "loop" 2;
- 1,3 log₁₀ UFC/mL no "loop" 3.

As análises de presença de endotoxinas realizadas pelo laboratório credenciado apresentaram resultados inferiores à 2 UE/mL em todas as amostras de água analisadas durante o período avaliado. Enquanto os resultados encontrados pelo controle de qualidade da clínica foram inferiores à 0,25 UE/mL em todas as amostras analisadas durante o mesmo período.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do sistema alternativo Petrifilm®, mesmo que ainda não tenha sido reconhecido pelos órgãos oficiais como método aprovado para monitoração microbiológica, é uma importante ferramenta auxiliar no controle da qualidade da água para hemodiálise.

Os resultados obtidos com este sistema foram muito semelhantes aos resultados obtidos através dos métodos convencionais, fornecidos pelos laboratórios credenciados junto aos órgãos oficiais.

O método alternativo de monitoração mi-

crobiológica apresenta fácil manuseio e produz rápidos resultados em relação ao monitoramento exigido pela legislação vigente.

Como vimos aqui, a terapia de hemodiálise constitui um importante suporte para a vida de pacientes renais crônicos. E a água é o principal ingrediente desta prática.

Portanto, o monitoramento freqüente desta água, com rápidos resultados, torna-se imprescindível para as decisões que visam a saúde do paciente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] MACÊDO, J. A. B. Águas & Águas. *Conselho Regional de Química*, MG, 2004.
- [2] PÉREZ-GARCÍA, R.; RODRIGUEZ-BENÍTEZ, P. C. Why and how to monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15, 760-764, 2000.
- [3] HOENICH, N.A.; RONCO, C.; LEVIN, R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purification*, 24:1118, 2006.
- [4] VORBECK-MEISTER, I.; SOMMER, R.; VORBECK, F.; HÖRL, W. H. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14: 666-675, 1999.
- [5] THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (USP 30), NF25 The National Formulary. Rockville, MD, USA, 2007.
- [6] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) RDC nº 154 de 31 de Maio de 2006.
- [7] DIAS, F. N. Avaliação de eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicador de controle do processo. [Dissertação de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2007].
- [8] SANTANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate® TPC-Cl e Petrifilm® AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol. 22 nº 1 Campinas Jan./Apr. 2002.

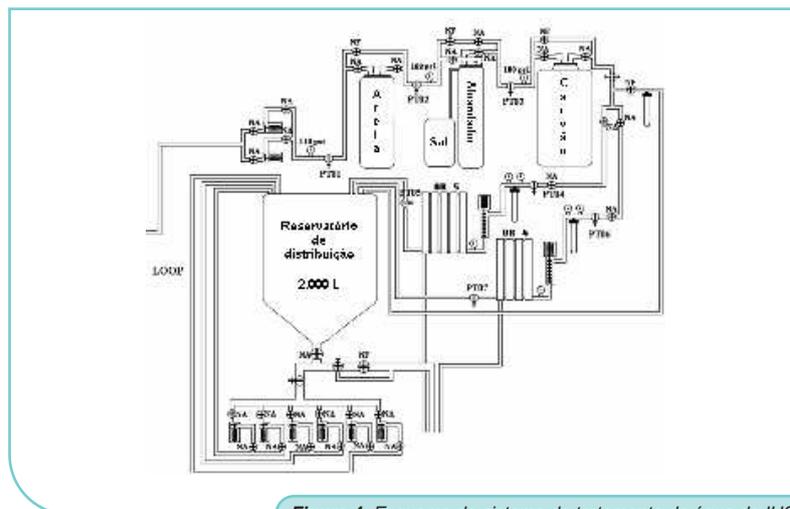


Figura 4: Esquema do sistema de tratamento de água do IHS.

GASTROENTERITES VIRAIS



1



2



3



4



5

1. Veridiana Munford

Departamento de Microbiologia, ICB/USP

2. Hugo Reis Resque

Food Animal Health Research Program/OARDC, The Ohio State University, Wooster, OH, USA

3. Juliana Galera Castilho

Instituto Pasteur, São Paulo

4. Thabata Alessandra Ramos Caruzo

Diagnostic Systems, BD Diagnostics

5. Maria Lucia Rácz

Departamento de Microbiologia, ICB/USP

A gastroenterite aguda é uma das doenças mais frequentes em humanos (30). Em países industrializados, a diarreia infecciosa aguda é uma das maiores causas de morbidade em crianças e jovens, o que representa uma grande perda econômica, em custos indiretos e médicos (10). Estima-se que a incidência de diarreia em crianças menores de 11 meses seja de 3,8 episódios por ano por criança e de 2,1 episódios por ano para cada criança de um a quatro anos de idade (35). Embora há muito tempo se suspeitasse de que muitas gastroenterites infantis agudas poderiam ter etiologia viral, as tentativas para se caracterizar o vírus, ou grupo de vírus responsável por estes quadros foram sempre mal sucedidas. Tal situação só pôde ser modificada após 1970 quando foram empregadas técnicas de microscopia eletrônica para exame direto das fezes, o que tornou possível a visualização de partículas virais em fragmentos de mucosa duodenal ou em amostras fecais (10). Dentre a multiplicidade de partículas virais, visualizadas por microscopia eletrônica, as que podem ser relacionadas etiológicamente com quadros agudos de diarreia são os rotavírus, adenovírus, caliciví-

rus e astrovírus (10, 18). A participação de cada um destes agentes em casos de gastroenterites pode ser observada na Figura 1 (23).

ROTAVÍRUS

Os rotavírus são considerados como o principal agente etiológico causador de diarreias. A cada ano os rotavírus infectam 111 milhões de crianças com menos de cinco anos, que apresentam quadros clínicos de diarreia e são tratadas em casa; 25 milhões de crianças a cada ano procuram tratamento médico e 2 milhões de crianças nesta faixa etária são hospitalizados; são observadas 440 mil mortes entre os casos mais graves, ou seja, 1.205 mortes por dia em todo o mundo. Em países extremamente pobres, os rotavírus são responsáveis por 82% das mortes em crianças com menos de cinco anos (35).

No Brasil, a frequência de diarreias associadas a rotavírus varia de 12% a 42% e o Ministério da Saúde estima que hoje cerca de 2.500 crianças de menos de cinco anos morrem desse mal por ano (26).

Os rotavírus são membros da família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Atualmente, encontram-se descritas cinco espéci-

es, *Rotavirus A, B, C, D e E*, bem como duas espécies tentativas, *Rotavirus E e F* (12).

A partícula viral tem morfologia esférica, simetria icosaédrica, com 100 nm de diâmetro e não apresenta envelope lipoprotéico. O cápside viral é constituído por três camadas protéicas concêntricas (Figura 2) (48). A camada interna do cápside, ou *core* viral, é constituída por quatro proteínas: a proteína VP1 (125 Kd), que é a polimerase viral; a proteína VP3 (88 Kd), que tem atividade de guanilil transferase; e mais externamente, a proteína VP2 (94 Kd), responsável pela ligação do RNA ao interior do *core* e necessária para a atividade de replicase da VP1. Circundando o *core*, tem-se o cápside interno, constituído pela proteína VP6 (46 Kd), que possui propriedades imunogênicas. Na terceira camada, o cápside externo contém duas proteínas estruturais: a proteína VP4 (88 Kd), que representa as espículas da partícula viral, e a glicoproteína VP7 (38 Kd) (10).

O genoma dos rotavírus é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA), com pesos moleculares que variam de 0,6 a 3,3 Kbp, o que permite sua se-

paração por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Cada segmento codifica para pelo menos uma proteína, e a correspondência entre os segmentos do dsRNA e as proteínas do rotavírus é bem conhecida conforme mostra a Figura 2 (10,13,48).

As espécies de rotavírus correspondem à classificação antigênica de grupos sorológicos (A, B, C, D, E, F e G). Os rotavírus mais frequentemente encontrados em todas as espécies animais pertencem ao grupo A (12).

Os demais grupos, anteriormente chamados de rotavírus atípicos ou pararotavírus, são mais raramente encontrados. As demais classificações sorológicas, subgrupo e sorotipo, estão estabelecidos apenas para os rotavírus do grupo A. O antígeno de subgrupo está situado no polipeptídeo VP6 do cápside interno. Atualmente, são reconhecidos quatro subgrupos distintos, I, II, I e II e não I não II, sendo detectados por ensaio imunoenzimático ou por hemaglutinação por imunoadesrência (10, 30).

Os antígenos que determinam o sorotipo estão localizados nas duas proteínas do cápside externo dos rotavírus: a glicoproteína VP7, codificada, dependendo da cepa, pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9; e a proteína VP4, codificada pelo quarto segmento genômico. Inicialmente, acreditava-se que a glicoproteína VP7 constituísse o determinante primário da especificidade de sorotipo, enquanto que a proteína VP4 teria um papel secundário. Entretanto, sabe-se atualmente que as duas proteínas possuem papéis igualmente importantes na imunogenicidade dos rotavírus. De acordo com a proposta de nomenclatura binária para os sorotipos de rotavírus, a especificidade antigênica da glicoproteína VP7 dos sorotipos estabelecidos de rotavírus é designada utilizando-se a letra G, de glicoproteína. A nomenclatura proposta para a especificidade antigênica da proteína VP4 é a utilização da letra P, pelo fato de esta proteína ser sensível a proteases (10, 30).

São atualmente bem estabelecidos 15 sorotipos/genótipos G de rotavírus do grupo A, designados G1 a G15. Em amostras de rotavírus de humanos, são mais frequentemente encontrados os sorotipos G1 a G4, G8, G9 e G12. Entretanto, os sorotipos G5, G6, G10 e G11, frequentemente isolados em animais, também foram descritos em amostras de rotavírus de humanos. Em amostras de rotavírus de animais são identificados principalmente os

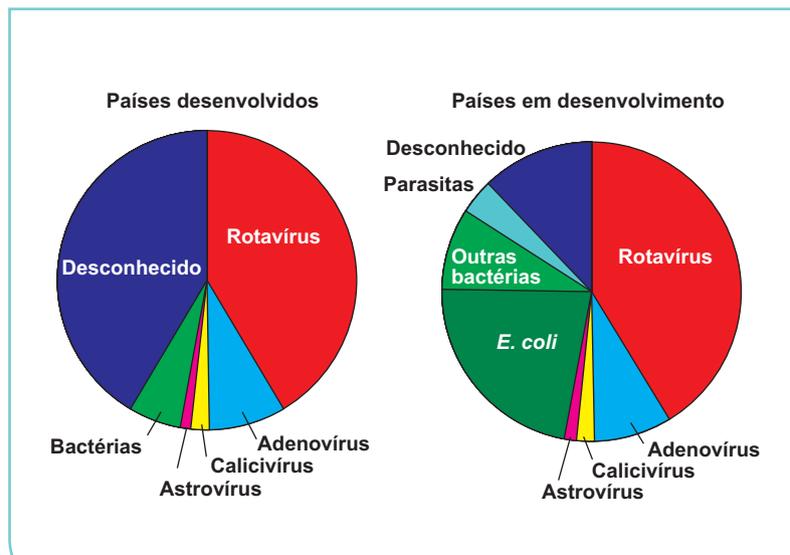


Figura 1: Participação dos principais agentes etiológicos de gastroenterites nos casos de diarreia em crianças, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (24).

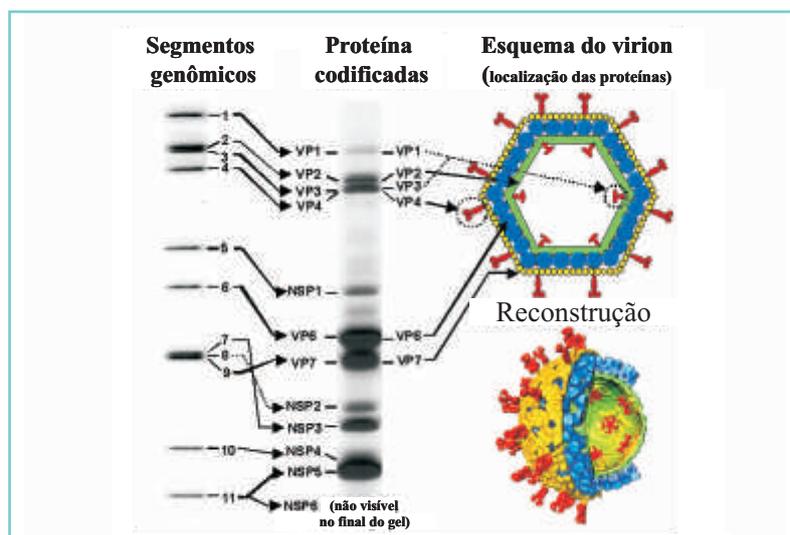


Figura 2: Genoma e proteínas correspondentes a cada segmento de dsRNA, localização das proteínas no capsídeo viral e na estrutura tridimensional da partícula de rotavírus. VP: proteína viral; NSP: proteína não estrutural (48). http://www.reoviridae.org/dsma_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm.

sorotipos G5 e G11 em suínos e G6, G8, G10 e G15 em bovinos. Os genótipos G13 e G14 foram identificados exclusivamente em amostras de rotavírus de eqüinos e o G7, somente em amostras de rotavírus de aves (10, 30).

Com relação à proteína VP4, existem descritos 15 sorotipos P de rotavírus. Esta proteína dos rotavírus tem sido também caracterizada pela seqüência de nucleotídeos ou por hibridização com sondas de

ácido nucléico, sendo estabelecidos 27 genótipos P, designados P[1] a P[27] (10, 27). Em amostras de rotavírus de humanos, são mais frequentemente encontrados os genótipos P[4], P[6] e P[8]; este último corresponde a aproximadamente 74% dos casos relatados em humanos em todo o mundo (43). Além disso, os genótipos P[3], P[9], P[10] e P[14] foram descritos em amostras de rotavírus de humanos (10, 30).

Estudos de epidemiologia molecular têm evidenciado que os tipos G1P1A[8], G2P1B[4], G3P1A[8] e G4P1A[8] são os mais comumente encontrados em diversos países (43). No Brasil, além desses tipos, tem sido relatado o sorotipo G5, característico de suínos, infectando crianças (7). O sorotipo G9 é considerado emergente, tendo sido descrito em muitos países, inclusive no Brasil. Além disso, ainda no Brasil, existem vários relatos de diferentes associações entre os genótipos P e G, como por exemplo, G1P1B[4], G2P1A[8] ou G2P2A[6], em amostras de rotavírus de humanos (1, 3, 31).

Os rotavírus replicam-se nas células do topo das vilosidades intestinais, não sendo atingidas as células que formam as criptas de Lieberkuhn. O exame de cortes finos, à microscopia eletrônica, mostra enterócitos vacuolizados contendo rotavírus. O processo infeccioso instala-se rapidamente, em aproximadamente 48 horas, entrando em regressão ao fim de três a cinco dias, apesar de os vírus poderem ser eliminados, ainda, por oito dias e, em alguns casos, até cerca de 40 dias. A reconstituição dos enterócitos faz-se lentamente, o que pode ser considerado uma das causas da longa duração dos quadros diarreicos por rotavírus; a outra causa seria que, eventualmente, ocorre um acentuado aumento do peristaltismo no íleo inflamado. No caso das gastroenterites ocasionadas por rotavírus, o fluxo da água e eletrólitos no intestino torna-se alterado não só por lesão do enterócito, mas também por perturbações do processo de reabsorção de fluidos intestinais. Recentemente, foi relatado que a proteína não estrutural NSP4, produzida durante a infecção viral, tem atividade de enterotoxina, sendo a primeira enterotoxina viral descrita (30, 38).

A infecção por rotavírus é seguida do aparecimento de anticorpos das classes IgM e IgG. Ao nascer, 73 a 80% das crianças possuem anticorpos do tipo IgG contra rotavírus, de origem materna, havendo depois um declínio acentuado dos mesmos, seguido de elevação a partir do sexto mês; aos 18 meses, 50% a 90% das crianças possuem anticorpos contra rotavírus (10).

Os estudos sobre a infecção de bezerros e suínos por rotavírus evidenciam que a imunidade local, no intestino, está relacionada com a presença de anticorpos secretores de tipo IgA no lúmen intestinal, não importando se estes foram elaborados localmente, ou ingeridos com o colos-

tro ou com o leite, situação esta idêntica à que ocorre nas infecções humanas. Além da amamentação natural, que explicaria a baixa incidência dos quadros de gastroenterite por rotavírus e sua benignidade em recém-nascidos, outros elementos parecem interferir, como a ocorrência no leite de fatores inespecíficos de ação antiviral (10, 30).

A grande maioria das crianças é infectada durante o período compreendido entre os seis meses e os seis anos de idade. Em crianças menores de um ano com quadros de gastroenterite, aproximadamente 25% dos casos são positivos para rotavírus. Esta percentagem atinge valores de até 90% entre um e três anos, para decrescer a cerca de 30% em crianças de quatro a seis anos (10).

O período de incubação do vírus é de 24 a 48 horas, seguido de vômitos por três dias e diarreia por cinco a oito dias (33). As manifestações clínicas mais comumente observadas são diarreia, vômito, febre, desidratação e dor abdominal. A maioria dos relatos clínicos sobre quadros com implicação etiológica por rotavírus faz referência a casos autolimitados com graus leves de desidratação (10).

A excreção máxima de vírus ocorre entre o terceiro e o quarto dia da doença, sendo possível encontrar cerca de 10^{11} partículas por grama de fezes. Com a idade de quatro anos, a maioria das pessoas já foi infectada e é imune à síndrome grave, mas inóculos altos ou imunidade diminuída podem produzir doença leve em crianças maiores e em adultos. Têm sido descritos casos de reinfeção, provavelmente ocasionados por sorotipos diferentes dos responsáveis pela infecção inicial. Em adultos, as infecções estão normalmente associadas a indivíduos que possuem um estreito relacionamento com crianças infectadas, além terem sido relatados surtos em adultos causados por rotavírus das espécies B e C, mais raros (10).

Os rotavírus são de fácil transmissão nos ambientes familiar e hospitalar. Particularmente em berçários, onde podem ocorrer condições para uma longa permanência de rotavírus viáveis, diante da frequência com que os recém-nascidos, pouco depois da admissão, apresentam sintomas de infecção. Esta pode surgir sob a forma de diarreia muito discreta, ou mesmo sem sintomas manifestos. Não está definido se esta diferença resulta de uma defesa mais eficiente pela ação de anticorpos maternos, ou se advém da presença de fatores fisiológicos ainda não identificados.

Embora se saiba que no colostro e no leite materno podem encontrar-se anticorpos específicos da classe IgA, cujo título, no entanto, cai rapidamente, não está ainda esclarecido em que medida o leite exerce seu papel protetor nos países em desenvolvimento, onde a amamentação natural muitas vezes se prolonga bem depois dos seis meses, período em que a doença por rotavírus também é mais freqüente (30).

Em crianças imunodeficientes, há certa tendência para a evolução crônica dos quadros de gastroenterite (10).

Não existem evidências que permitam concluir sobre a existência de portadores adultos de rotavírus, muito embora no homem, como em outras espécies animais, possa ocorrer o estado de infecção sem quaisquer sintomas aparentes. Para isto, deve contribuir, além de certo grau de imunidade por infecções anteriores, a ocorrência de cepas avirulentas de rotavírus, cuja existência, no entanto, não foi comprovada (10).

A distribuição estacional das infecções por rotavírus evidencia uma marcada preferência pelos meses de temperaturas médias e com baixa umidade relativa do ar (30).

Inicialmente, foi encontrada grande dificuldade no cultivo dos rotavírus em culturas celulares, o que levou ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico através da identificação direta dos vírus nas fezes, onde estão presentes em número elevado, ao redor de 10^{11} partículas virais/grama de fezes (10, 25).

Para o exame direto do material fecal, é possível recorrer a uma série de técnicas não imunológicas, das quais as mais utilizadas são a microscopia eletrônica e a eletroforese do genoma dsRNA em gel de poli-acrilamida. As técnicas imunológicas mais utilizadas são o ensaio imunoenzimático e a aglutinação de partículas de látex e identificam apenas os *Rotavirus A*. Podem ainda ser utilizadas as técnicas de imunoeletromicroscopia, imunoeletromicroscopia, imunofluorescência, radioensaio e fixação do complemento (10, 30).

A eletroforese em gel de poli-acrilamida, que separa o RNA segmentado dos rotavírus em 11 bandas, cuja localização no gel depende de seu peso molecular, permite o estudo dos rotavírus de acordo com os tipos eletroforéticos. Algumas características eletroforéticas podem permitir a distinção dos rotavírus dos grupos A e de grupos não-A. Lançando mão desta técnica, pode-se realizar o diagnóstico laboratorial das infecções intestinais por rotaví-

rus, uma vez que em material fecal só estes vírus possuem um genoma com semelhantes características (Figura 2) (20, 37, 48).

Para a sorotipagem de rotavírus, importantes em estudos epidemiológicos, têm sido utilizadas as reações imunoenzimáticas com anticorpos monoclonais específicos para grupo, subgrupo e sorotipo (30).

Com o avanço da biologia molecular, surgiram as técnicas que atualmente fornecem dados mais específicos e completos sobre os rotavírus circulantes em uma população: a reação de transcrição reversa (RT) seguida pela reação em cadeia pela polimerase (PCR *polymerase chain reaction*) e o sequenciamento genômico. Estas duas técnicas, disponíveis para os genótipos G e P, permitem a caracterização de amostras que não podem ser classificadas pelos métodos sorológicos, além de detectar possíveis misturas de genótipos em uma mesma amostra (10, 30).

Estima-se que a vacinação de crianças contra o rotavírus seria capaz de prevenir a morte de 352.000 a 592.000 de crianças a cada ano. Há mais de duas décadas a Organização Mundial da Saúde OMS (World Health Organization WHO) e Aliança Global para Vacinação e Imunização (Global Alliance for Vaccination and Immunization GAVI) identificaram a vacina de rotavírus como uma das prioridades a serem desenvolvidas, especialmente visando a vacinação em regiões da África, Ásia, Índia e China, onde ocorrem 90% das mortes (10).

A primeira vacina que completou os testes clínicos e foi liberada para uso foi a vacina tetravalente Rotashield-RRT™, Wyeth Lederle Vaccines, Philadelphia. A vacina era composta por quatro vírus vivos, sendo um atenuado (MMU18006 de macaco Rhesus, com especificidade para o sorotipo G3 humano), e três vírus recombinantes, contendo este mesmo vírus com um único gene (VP7) substituído, correspondendo aos sorotipos G1, G2 e G4 humanos. Esta vacina demonstrou, durante os testes clínicos, alta eficiência (90%) contra casos graves de diarreia por rotavírus e 60% contra todos os casos de infecções por rotavírus. Foi licenciada em outubro de 1998, nos Estados Unidos, e recomendada para uso oral, em três doses, aos 2, 4 e 6 meses de idade. Nove meses após sua liberação, aproximadamente 600 mil crianças haviam sido vacinadas com três doses de vacina. Em junho de 1999 foram diagnosticados 15 casos de intussuscepção (obstrução aguda do intesti-

no) em crianças, em até duas semanas após a vacinação com a Rotashield™. Em julho deste mesmo ano, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC *Center for Diseases Control and Prevention*) nos Estados Unidos, suspendeu temporariamente o uso desta vacina em território americano. Em outubro de 1999, 98 casos de intussuscepção foram reportados, sendo que 60 ocorreram sete dias após a aplicação da primeira, segunda ou terceira dose da vacina. O Comitê Assessor para a Prática de Imunizações (ACIP *Advisory Committee on Immunization Practices*) cancelou a recomendação de uso da RRV-TV (15, 21).

Atualmente algumas vacinas estão licenciadas ou em testes finais. A vacina pentavalente bovino-humana, RotaTeq®, produzida pelo laboratório Merck Sharp & Dohme, EUA contém cinco vírus obtidos por recombinação genética. Quatro vírus recombinantes expressam uma das proteínas do capsídeo externo da amostra humana de rotavírus (G1, G2, G3 e G4) e as demais proteínas do rotavírus de bovino original WC3, (P7[5]G6). O quinto recombinante, expressa a proteína VP4 do rotavírus humano (P1A[8]) e as demais proteínas do vírus bovino original. O resultado final é uma vacina pentavalente que oferece proteção contra os genótipos G1, G2, G3, G4 e P1A[8], que representam 75% dos casos de rotavírus identificados em todo o mundo. No total, os estudos da RotaTeq® envolveram mais de 72 000 crianças, para verificar a ocorrência de intussuscepção. Os resultados demonstraram eficácia de 74% para proteção contra qualquer gastroenterite por rotavírus e 98% contra formas graves de infecção. Além disso, durante a fase de testes a vacina demonstrou não aumentar o risco de intussuscepção nos lactentes que foram vacinados. A vacina é administrada por via oral em 3 doses: aos dois, quatro e seis meses de idade. A primeira dose deve ser administrada somente a crianças entre 6 e 12 semanas de idade, e a série deve estar completa antes de 32 semanas de idade. Esta vacina encontra-se licenciada nos EUA desde fevereiro de 2006 e também no México e aguarda o licenciamento na Europa. No Brasil, a vacina foi licenciada em abril de 2008. Até 15 de fevereiro de 2007, foram distribuídas 3,6 milhões de doses de vacinas nos Estados Unidos e os dados da vigilância do CDC, do FDA e do fabricante da vacina não sugerem nenhuma associação da administração desta vacina com intussuscepção (15, 21).

Outra vacina comercializada atualmente, denominada Rotarix®, do laboratório GlaxoSmithKline, é monovalente e preparada com uma amostra rotavírus humano atenuado P1A[8]G1. Os resultados do estudo pré-clínicos com mais de 60.000 crianças demonstraram uma eficácia de cerca de 70% em prevenir qualquer forma de gastroenterite por rotavírus e de 85% em prevenir formas grave. Esta vacina também não foi associada a um aumento no risco de intussuscepção e foi demonstrado que ocorre proteção eficiente contra sorotipos diferentes do sorotipo vacinal. A Rotarix® encontra-se licenciada em aproximadamente 65 países da América Latina, África, Ásia e em países da União Européia e já foi introduzida nos programas nacionais de vacinação no Brasil, Panamá e Venezuela (15, 21).

No Brasil, primeiro país a incluir a vacina contra o rotavírus em seu sistema público de saúde, a Rotarix® foi incorporada ao Programa Nacional de Imunizações e a sua aplicação rotineira iniciou-se em março de 2006 (6). A partir desta data, o Ministério da Saúde oferece, através do Sistema Único de Saúde (SUS), a vacina contra rotavírus ministrada em duas doses gratuitas: uma aos dois meses de idade e outra aos quatro meses (30).

Na China, uma vacina monovalente encontra-se licenciada desde o ano 2000, e é composta pela amostra de rotavírus de cordeiro Lanzhou (LLR), genótipo P[12]G10. Durante os testes clínicos, crianças de seis a 24 meses, após receberem uma única dose da vacina, apresentaram uma boa resposta imune e sem evento adverso associado. Esta vacina está disponível em algumas partes do país, mas não está incluída em programas nacionais de imunização (15).

Como tratamento, a amamentação ao peito ainda é uma das ações protetoras de melhor eficácia, pela imunidade que confere e pelo poder protetor de fatores inespecíficos do leite. O tratamento indicado é o restabelecimento do equilíbrio através de terapia de reidratação oral ou, em casos graves, parenteral (30).

NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS

Em 1972 a primeira amostra viral identificada como causa de gastroenterite aguda foi a cepa Norwalk, classificada atualmente como norovírus (22). Esta identificação consagrou os vírus como agentes etiológicos de gastroenterites. Os norovírus humanos são os únicos agentes virais causadores de gastroenterites que não po-

dem ser cultivado em células, até o momento, e isto têm dificultado seu estudo (10, 36). Atualmente, os norovírus são reconhecidos como uma importante causa da gastroenterite aguda em adultos e crianças (18, 34), sendo considerados como a segunda maior causa de gastroenterite viral no mundo inteiro (Figura 1) (23).

Estes agentes são associados a gastroenterites esporádicas na comunidade e grandes surtos epidêmicos em hospitais e outros locais institucionais (19). Recentemente, o CDC estimou que 96% dos relatos de surtos epidêmicos de gastroenterites não bacteriana nos Estados Unidos são causados por calicivírus (44). A presença deste vírus em surtos epidêmicos de gastroenterites agudas têm sido bem documentadas, mas sua participação em casos esporádicos de gastroenterites ainda não está bem determinada (14, 17).

Os calicivírus pertencem à família *Caliciviridae*, que compreende quatro gêneros: *Lagovirus* e *Vesivirus*, contendo vírus de animais, e *Norovirus* e *Sapovirus* que contêm os calicivírus humanos (11). O nome calicivírus é derivado do latim *calix*, que significa cálice e refere-se a depressões em forma de cálice, visíveis na superfície do vírus, ao microscópio eletrônico (12, 17).

A partícula viral é composta por um capsídeo protéico, não envelopado, com simetria icosaédrica, e diâmetro de 27 a 40 nm. (5). O cápside viral é formado por 90 dímeros da proteína estrutural. O genoma viral consiste de uma molécula linear de RNA de fita simples de polaridade positiva (+ssRNA) de 7,4 a 8,3 kb, contendo três janelas abertas de leitura (ORF *Open Reading frame*). Para o vírus Norwalk (NV), a primeira ORF da extremidade 5' codifica uma poliproteína com seqüências semelhantes às proteínas não-estruturais dos picornavírus, incluindo a RNA polimerase dependente de RNA. A ORF2 codifica a proteína VP1, presente em maior quantidade no capsídeo. A ORF3, na extremidade 3' do genoma, codifica uma proteína pequena VP2, associada ao virion. Uma proteína encontra-se ligada covalentemente à extremidade 5' do RNA genômico e a extremidade 3' é poliadenilada. Acredita-se que essa proteína seja necessária para infectividade do RNA viral e também para iniciação da síntese do RNA viral (8, 16).

No gênero *Norovirus* (NLV), existe uma espécie definida, *Norwalk virus*, e cinco espécies tentativas, uma de humanos, o vírus Alphantron, duas de bovinos, uma de suínos e uma de murinos. O vírus tipo Norwalk deve seu nome ao fato de ter sido iso-

lado de um surto de gastroenterite em alunos e professores de uma escola primária de Norwalk, Ohio, surto este em que 50% dos professores e alunos e 35% dos contatos familiares adoeceram. A identificação do agente etiológico foi feita por microscopia eletrônica, e foi observado tratar-se de um vírus esférico com diâmetro entre 23 e 30 nm. O vírus Norwalk é o agente representativo de um grupo heterogêneo de vírus, anteriormente chamados vírus pequenos esféricos estruturados (*SRSV small round structured viruses*) ou vírus semelhantes ao Norwalk (*Norwalk-like*). A relação antigênica entre os muitos membros desta espécie de vírus são complexas e os agentes são normalmente identificados pelo local onde os surtos ocorreram. Os NLV, espécie *Norwalk virus*, são classificados em cinco genogrupos. Os genogrupos GI e GII contêm a maioria dos norovírus humanos. O genogrupo GI inclui oito genótipos; o GII engloba 19 genótipos, humanos e de suínos. No GIII estão dois genótipos de norovírus bovinos, o GIV inclui o vírus Alphantron e o GV contém um genótipo de norovírus de camundongo (5, 12).

Os vírus do gênero *Sapovirus* (SV) têm, à microscopia eletrônica, a morfologia mais característica do calicivírus, com estrutura mais definida que os norovírus. Os SV, espécie *Sapporo virus*, são também classificados em cinco genogrupos. Os genogrupos GI e GII apresentam, cada um, três genótipos de vírus de humanos. O genogrupo GIII inclui dois genótipos de sapovírus de suínos. O GIV e o GV contêm, cada um, um genótipo de sapovírus de humanos (12, 17).

Ao contrário da gastroenterite ocasionada por rotavírus, o quadro diarreico causado pelos norovírus tem uma curta duração, de 24 a 48 horas, com duração média de 24 horas; ocorre com frequência em ambiente familiar e escolas, atingindo, indistintamente, crianças e adultos. A diarreia é mais freqüente em adultos, enquanto uma alta proporção de crianças apresenta vômitos. O período médio de incubação é de dez a 51 horas, com média de 24 horas, e os sintomas são idênticos aos da gastroenterite por rotavírus (náuseas e vômitos, dores abdominais, diarreia e febre). Embora os sintomas normalmente desapareçam dentro de 12 a 72 horas, a excreção viral pode exceder 22 dias. Comparações de características clínicas da gastroenterite causada pelos norovírus ou sapovírus em crianças concluíram que os norovírus induzem vômitos como principal sintoma

enquanto os sapovírus normalmente causam diarreia (17, 24).

A transmissão dos norovírus ocorre através da via fecal-oral, e o vírus consegue atravessar o estômago por ser resistente à acidez. A infecção primária ocorre na porção proximal do intestino delgado com expansão das criptas, encurtamento das microvilosidades, infiltração de células mononucleares e vacuolização citoplasmática. Ocorrem lesões na mucosa intestinal, o lúmen torna-se inflamado e células epiteliais de absorção desenvolvem uma aparência anormal. Entretanto, em duas semanas, o intestino delgado retorna a aparência histológica normal (17).

O vírus infeccioso pode ser transmitido não somente durante o período da doença, mas também durante o período de incubação e após recuperação do indivíduo, com 30% dos casos excretando vírus por até três semanas após infecção. Assim, pessoas infectadas continuam sendo fontes de infecção, mesmo após recuperação da doença (5, 17).

Relativamente à imunidade, estudos em voluntários estabeleceram que existem duas formas de resistência aos norovírus, uma de curta duração (seis a 14 semanas) e outra de longa duração (nove a 15 meses). A imunidade de curta duração é sorotipo específica e pode ser correlacionada com o desenvolvimento de resposta imune sérica e mucosa. A de longa duração aparentemente não segue o padrão dos demais vírus, pois a presença de anticorpos séricos contra os norovírus não apresenta correlação com a resistência à doença. Os níveis de anticorpos locais no jejuno também não podem ser correlacionados com a resistência à doença. Os sapovírus não foram estudados em voluntários e a imunidade a esse grupo de vírus é menos conhecida, mas acredita-se que haja uma correlação da presença de anticorpos com a resistência à infecção em crianças (5, 17).

Os norovírus são a causa mais freqüente de surtos de gastroenterite não bacteriana que ocorrem em comunidades, escolas, hospitais, instituições, acampamentos, navios de cruzeiro, casas de repouso, universidades e famílias. Vários alimentos têm sido implicados em surtos de norovírus, como saladas, melão, salada de fruta, sanduíches, gelo e água. Também são a causa mais freqüente de surtos de gastroenterite aguda após ingestão de ostras e mariscos crus. Em casos esporádicos de gastroenterite, são responsáveis por 10-20% de todos os casos de gastroenterite endêmica em al-

guns países. Os sapovírus são mais frequentemente associados a gastroenterites pediátricas e não são associados a surtos em adultos e crianças maiores (5, 17).

A infecção por norovírus tem sido observada durante todos os meses do ano, porém com maior circulação dos vírus no inverno. Em virtude da rapidez com que são disseminados na população e da predominância de sua transmissão nos meses frios, acredita-se que esses vírus possam também ser transmitidos pelo ar, caracterizando esta como uma suposta rota secundária de transmissão (5, 17).

Os estudos da epidemiologia molecular mostram uma grande diversidade genética dos norovírus. Os vírus do genótipo GII têm sido encontrados com maior frequência do que os vírus do genótipo GI, na maioria dos países onde norovírus foram estudados. A genotipagem de amostras circulantes é uma ferramenta importante para elucidar a origem e disseminação dos vírus em surtos. Sistemas de tipagem de norovírus foram propostos, baseados ou na sequência de nucleotídeos completa da VP1, que supostamente é correlacionada à especificidade antigênica, ou na sequência parcial de nucleotídeos desta mesma proteína. Esses sistemas mostram a divisão dos gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* em genótipos e genótipos. No Brasil, estudos realizados sobre a detecção de calicivírus em amostras provenientes de humanos confirmam que o genótipo GII é o mais frequente também em nosso meio (4, 5).

Podem ocorrer mudanças no genótipo circulante, em diferentes épocas, em uma mesma localidade, mas os fatores do hospedeiro ou viral responsável pela emergência de um norovírus epidêmico não são conhecidos. Evidências de infecções mistas, com diferentes genótipos de norovírus foram descritas, inclusive no Brasil. Estas infecções podem permitir a recombinação entre os genomas RNA, uma possibilidade sugerida recentemente pela análise de sequências de nucleotídeos de diversas amostras de norovírus (5, 17).

Ueda et al. (1996) analisaram 75 amostras de fezes de humanos com diarreia, provenientes de um surto de gastroenterite não bacteriana ocorrido na Baixada Santista (SP), no início de 1995. Através da técnica de microscopia eletrônica direta (DEM) identificaram 25 (33,3%) amostras positivas para SRSV. Destas, 20 amostras foram analisadas por RT-PCR, usando primers para os genótipos GI e GII do vírus Norwalk-like e foram obtidas 11 (55,0%)

amostras positivas para genótipo GII do vírus Norwalk-like (47).

Mais recentemente, Castilho et al., 2007, analisaram 234 amostras de fezes de crianças, com ou sem gastroenterite, e, através de RT-PCR e análise de sequência do cDNA, identificaram em São Paulo, um total de 78 (33,3%) das amostras positivas para norovírus: quatro (6,1%) foram GI, 52 (78,7%) classificadas como GII, e cinco amostras (7,6%) continham uma mistura dos genótipos GI e GII (4).

O significado biológico e epidemiológico da diversidade genética de norovírus e sapovírus ainda não é bem definido. Os relacionamentos antigênicos não podem ser definidos pela reação de neutralização, pois estes vírus ainda não foram cultivados, e assim, ainda é desconhecido o impacto da diversidade genética em estudos de prevenção da doença através da vacinação (5, 17).

Uma análise de surtos indica que pode ser feito um diagnóstico provisório de norovírus se os seguintes critérios forem cumpridos: (a) patógenos bacterianos ou parasitas não forem detectados; (b) vômitos ocorrendo em mais de 50% dos casos; (c) a duração média ou mediana da doença de 12 a 60 horas e (d) período de incubação de 24 a 48 horas (17).

A identificação do norovírus por microscopia eletrônica é dificultada em razão da curta duração da excreção do vírus e porque este vírus não possui uma morfologia bem definida e está presente, na maioria das vezes, em baixas concentrações nas fezes. Pode ser utilizada a imunomicroscopia eletrônica, mas soros específicos, de convalescentes humanos ou anticorpos específicos produzidos por proteínas recombinantes, são de difícil obtenção (5, 17).

O desenvolvimento de partículas semelhantes a vírus (VLP *virus-like particles*) através de técnicas de expressão de proteínas virais, principalmente em sistemas que usam baculovírus, possibilitou o desenvolvimento de testes de diagnóstico baseados em anticorpos. O ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando soros hiperimunes preparados contra as VLPs tem sido descrito para detecção de vários norovírus e sapovírus. Estes testes apresentam boa sensibilidade mas são altamente específicos para a VLP utilizada na produção do anticorpo. Foram também desenvolvidos alguns testes baseados em anticorpos monoclonais, já disponíveis de forma comercial. Os ensaios imunoenzimáticos utilizando VLPs como antígeno são específicos, sensíveis e eficientes para detecção de an-

ticorpos e têm sido utilizados em inquéritos soro epidemiológicos (17).

No início da década de 90, o genoma do vírus Norwalk foi clonado e sequenciado (5), possibilitando a utilização de técnicas moleculares para detecção e caracterização destes vírus. Técnicas como a RT-PCR possibilitam a identificação dos vírus, mesmo que as amostras apresentem um número pequeno de partículas virais. Com este método, o RNA viral pode ser detectado em amostras clínicas, como fezes ou vômito, e em água e alimentos contaminados. A RT-PCR quantitativa em tempo real (*real-time RT-PCR*) também tem sido utilizada, pois possibilita a detecção rápida e a comparação da quantidade de RNA viral nas amostras. A região mais utilizada nesta amplificação corresponde ao gene da RNA polimerase, altamente conservado. Essa técnica é considerada mais sensível do que a microscopia eletrônica para a detecção dos norovírus, pois possibilita a identificação do vírus, mesmo que as amostras apresentem um número pequeno de partículas virais, e é capaz de detectar o vírus duas semanas após o desaparecimento dos sintomas (5, 17).

Até o momento não há tratamento específico, nem se dispõe de qualquer tipo de vacina. Em surtos, em geral as medidas de contenção e prevenção da disseminação dos vírus incluem lavagem frequente das mãos e a descontaminação ambiental. Os norovírus são resistentes a produtos de limpeza contendo detergentes e etanol e a desinfecção de superfícies requer a utilização de produtos contendo hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio ou compostos fenólicos (5, 17).

As infecções são autolimitantes e muitos pacientes recuperam-se sem sequelas. A hidratação é normalmente mantida usando fluido oral com líquidos isotônicos. Se os sintomas como diarreia e vômitos foram severos, pode ser necessária a administração de fluidos de forma parenteral. As pessoas incapazes de manter a hidratação, especialmente indivíduos debilitados, como idosos e crianças imunocomprometidas, podem necessitar hospitalização. A morte, embora muito rara, pode ocorrer como resultado de um distúrbio eletrolítico (17).

Um dos maiores obstáculos para a formulação de uma estratégia de imunização contra os norovírus e sapovírus é a falta de compreensão sobre a imunidade para estes vírus. Como ainda não existe possibilidade de cultivo, estão sendo estudadas as VLPs como potenciais vacinas de subuni-

dades. Estas VLPs são imunogênicas, seguras, estáveis em pH ácido, e, portanto, podem ser administrada por via oral (5,17).

ASTROVÍRUS

Os primeiros relatos da associação de astrovírus com casos de gastroenterite aguda ocorreram em 1975 quando Appleton e Higgins, bem como Madeley e Cosgrove, visualizaram partículas virais que apresentavam projeções em suas superfícies semelhantes a uma estrela de cinco a seis pontas através de microscopia eletrônica (ME). Atualmente, os astrovírus são considerados uma causa importante de gastroenterite viral aguda em crianças, sendo associados a 2-8% das infecções não-bacterianas, embora alguns estudos cheguem a relatar prevalência superior a 20% (Figura 1) (18, 23).

Os astrovírus pertencem à família *Astroviridae*, gêneros *Mamastrovirus* que contém os astrovírus que infectam mamíferos e *Avastrovirus*, que infectam aves. O gênero *Mamastrovirus* apresenta seis espécies, entre as quais, a espécie *Human astrovirus* (HAstV) (12). A partícula viral possui simetria icosaédrica, sem envelope. A morfologia, característica à microscopia eletrônica, é esférica, com diâmetro de 28-30 nm. Um capsídeo em forma de estrela de cinco a seis pontas (*astron* = estrela, em grego), ornamentado com pequenas espículas, pode ser visualizado em apenas 10% dos virions, o que dificulta sua identificação morfológica em amostras de fezes (39).

O genoma dos astrovírus é constituído por um RNA poliadenilado de fita simples, de polaridade positiva (+ssRNA), com 6,4 a 7,4 kilobases. Durante a infecção de células susceptíveis, duas espécies de RNA podem ser observadas: um RNA genômico (gRNA) e um RNA subgenômico (sgRNA, de aproximadamente 2,8 kb). O genoma viral possui três janelas abertas de leitura (ORF - *open reading frame*): ORF1a, ORF1b e ORF2. As ORFs 1a e 1b estão localizadas na extremidade 5' do genoma e codificam proteínas não-estruturais, presumidamente envolvidas na transcrição e replicação do RNA. A ORF1a codifica para quatro proteínas transmembrânicas hidrofóbicas, para uma protease e para uma proteína que contém um sinal de localização nuclear. A ORF1b codifica para a RNA polimerase-RNA dependente. A ORF2 está localizada na extremidade 3', é comum aos RNAs genômico e subgenômico e codifica uma proteína

estrutural, de aproximadamente 87 kDa, que é precursora das proteínas que formam o capsídeo dos virions maduros (39).

Os astrovírus são, aparentemente, espécie-específicos e já foram identificados em amostras de fezes de bovinos (BAstV-1 e 2), felinos (FAstV-1), humanos (HAstV-1 a 8), ovinos (OAstV-1), suínos (PAstV-1), e martas (MAstV), além de veados, cães e camundongos. As aves em que astrovírus foram identificados incluem patos (DAstV-1), perus (TAstV-1) e galinhas (CAstV, vírus da nefrite das aves - *Avian nephritis virus* ANV-1 e 2) (12).

As partículas de astrovírus mostram-se estáveis em pH 3, além de serem resistentes ao clorofórmio, a uma variedade de detergentes e a solventes lipídicos. O HAstV perde a atividade em temperatura de 60°C por 10 minutos, mas a temperaturas extremamente baixas (-70C a -85C) as partículas ficam estáveis por vários anos. No entanto, se houver uma seqüência contínua de congelamentos e descongelamentos, a partícula viral tende a se romper (28, 39).

Os astrovírus são detectados em amostras fecais por microscopia eletrônica direta (ME), pois são eliminados nas fezes em grandes quantidades (10^{10} - 10^{11} partículas/g). Em pacientes excretando menor quantidade de partículas virais ou em situações em que se deseja medir a resposta imune aos astrovírus, as técnicas de imunomicroscopia eletrônica podem ser úteis. No entanto, apenas 10% das partículas virais apresentarem a morfologia característica em forma de estrela, contribuindo para um falso resultado de detecção desse vírus. Além desse problema, o congelamento e descongelamento das amostras fecais, degradação de partículas virais por enzimas, presença de anticorpos nas fezes e escolha incorreta de coloração podem modificar a morfologia das partículas e levar a uma classificação errônea de astrovírus. O grande número de amostras a serem testadas também é um problema já que o uso deste equipamento requer tempo e treinamento para a análise das amostras (28, 39).

Em geral, os astrovírus de humanos são capazes de se replicar em três tipos de linhagens celulares: linhagens de adenocarcinoma (CaCo-2, HT-29, T-84 e SK-CO1), linhagens de hepatoma de fígado humano (PLC/PRF/5) e linhagens derivadas de rim de macaco (MA-104, Cos-1 e Vero), sendo essas duas últimas susceptíveis a apenas algumas cepas de HAstV. De todas as linhagens celulares citadas an-

teriormente, CaCo-2, T-84 e PLC/PRF/5 são as mais eficientes para o cultivo de astrovírus diretamente de amostras de fezes, o que possibilitou o desenvolvimento de outras técnicas de detecção deste vírus (39).

Foram desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos (EIE) com anticorpos monoclonais grupo específicos, utilizados como anticorpo de captura, e soro detector policlonal ou monoclonal biotinizado. Estes testes apresentam boa sensibilidade e especificidade. O EIE é um dos principais métodos atuais de detecção de astrovírus por ser rápido e adequado para estudos com um grande número de amostras. Além disso, o EIE também pode ser utilizado como método de sorotipagem de amostras clínicas, onde se utilizam anticorpos específicos para cada sorotipo de astrovírus, na captura do antígeno viral (28, 39).

Atualmente, tem sido utilizada a reação RT-PCR para detecção do ácido nucleico viral. As regiões mais utilizadas para esta amplificação correspondem às ORFs 1a e 2, que codificam a protease viral e a proteína precursora das proteínas do capsídeo, respectivamente. Recentemente, novas técnicas baseadas na RT-PCR foram desenvolvidas para se detectar astrovírus: o RT-PCR multiplex em fase única (41) e o RT-PCR em tempo real (*one step real time RT-PCR*). Além disso, assim como acontece com o EIE, a técnica de RT-PCR também pode ser utilizada como método de genotipagem, utilizando *primers* específicos para cada um dos oito tipos de astrovírus de humanos (28).

O sequenciamento de nucleotídeos não é a primeira escolha para a detecção de astrovírus, mas pode ser utilizada em conjunto com outras, visando a confirmação de resultados e/ou genotipagem de amostras previamente testadas, reforçando e ampliando dados epidemiológicos sobre os astrovírus (28, 39).

A patogênese do astrovírus ainda não está muito bem esclarecida. No entanto, estudos sugerem que a replicação viral ocorra nos tecidos intestinais. Partículas desse vírus têm sido detectadas em biópsias duodenais e em células epiteliais localizadas na porção inferior das vilosidades, em humanos. Já em caprinos infectados experimentalmente, as partículas de astrovírus foram encontradas na região apical das vilosidades do intestino delgado. No entanto, em um estudo que utilizava aves como modelo animal, partículas virais foram detectadas em outros tecidos (além dos tecidos intestinais) e na

corrente sangüínea, sugerindo um estágio de viremia durante a infecção. Apesar da diarreia severa, também foram observadas alterações histopatológicas consideradas moderadas e não foi verificado quadro de inflamação. Essa ausência de inflamação, e a capacidade de o HAsTV induzir a apoptose em células cultivadas, sugerem que esta forma de morte celular, onde a inflamação não é freqüentemente observada, pode contribuir para o desenvolvimento da doença em algumas espécies. Além disso, surtos de diarreia causada por astrovírus em idosos e indivíduos submetidos a transplante de órgãos e quimioterapia, sugere fortemente que o sistema imune desenvolve um papel importante na patogênese desse vírus (28, 39).

O período de incubação do vírus varia de 24 a 36 horas, sendo sua transmissão por via fecal-oral, de modo direto ou pelo contato com objetos e/ou pessoas contaminadas. Alguns estudos também sugerem que o astrovírus seja transmitido pela água. O período de excreção do vírus é de três a cinco dias, mas existem relatos de excreção prolongada. Os astrovírus também podem ser excretados por indivíduos assintomáticos, favorecendo a transmissão do patógeno (28).

A diarreia causada por astrovírus é geralmente moderada, dura em média de 2 a 3 dias e vem associada a quadros de vômito, dores abdominais e febre, que duram alguns dias. Quadros de desidratação são menos comuns, mas já foram relatados (28, 39).

O astrovírus é um agente infeccioso cosmopolita que acomete principalmente crianças jovens. No entanto, casos de diarreia envolvendo idosos, adultos saudáveis e pessoas imunocomprometidas já foram descritos. Alguns estudos sugerem que a infecção em crianças ocorra nos dois primeiros anos de vida, principalmente nos 6 primeiros meses. A infecção pode ser identificada em casos de gastroenterites esporádicas, bem como durante surtos nosocomiais, em escolas, lares para idosos e creches (28, 39).

Estudos de soroprevalência indicam que a maioria das crianças adquire anticorpos contra astrovírus nos primeiros anos de vida e que esses anticorpos protegem a pessoa durante a maior parte da vida adulta. Entretanto, essa imunidade contra astrovírus tende a diminuir quando o indivíduo passa a ser idoso. Ainda de acordo com esses estudos, a prevalência de anticorpos aumenta rapidamente de 7% em

crianças de 6 a 12 meses, para 70% em crianças em idade escolar e adultos. Um outro trabalho demonstrou que entre 5 meses e 1 ano de vida, 50% das crianças desenvolvem anticorpos anti-astrovírus, e que aos 5 anos de idade esse número passa dos 90%. Além disso, o papel dos anticorpos anti-astrovírus na proteção do organismo foi observado em estudos com voluntários, onde indivíduos normais apresentaram sintomas leves da doença, enquanto voluntários sem anticorpos anti-astrovírus pré-existentes desenvolveram um quadro mais severo de sintomas da doença e liberaram maior quantidade de partículas virais. Esse trabalho sugere que anticorpos anti-astrovírus foram capazes de proteger adultos de infecções recorrentes (28, 39).

Os astrovírus apresentam até o momento, oito sorotipos/genótipos de vírus de humanos (HAsTV-1 a HAsTV-8). O sorotipo/genótipo 1 tem sido considerado o mais freqüente. Os HAsTV-2, 3, 5 e 8 são menos comuns e os HAsTVs-6 e 7 são raramente detectados inclusive no Brasil (2, 40). Quanto aos genogrupos, os astrovírus são classificados em: genogrupo A (HAsTV-1 a 5 e o HAsTV-8) e genogrupo B (HAsTV-6 e 7). Estes genogrupos foram estabelecidos através da análise filogenética de uma seqüência de nucleotídeos de c-DNA de 289 pb, proveniente de uma região altamente conservada na ORF1a (12, 28).

Alguns trabalhos já descreveram diarreias causadas por misturas entre astrovírus e outros vírus causadores de gastroenterite (rotavírus, norovírus ou adenovírus) e até mesmo misturas envolvendo vírus e bactérias causadoras de gastroenterite. Essas co-infecções podem levar a um quadro mais prolongado da doença, com febre mais intensa e episódios de vômito mais freqüentes, se comparadas às infecções causadas apenas por astrovírus (28, 40).

A associação de casos de gastroenterite aguda com astrovírus vem sendo evidenciada, em crianças, em todo mundo, incluindo países asiático, na Europa, África e nos Estados Unidos com índices de detecção que variam de 4% a 11% (28, 39).

Na América Latina, estudos realizados em crianças que receberam atendimento em hospitais, ambulatórios e creches estudos relatam a ocorrência de astrovírus em 4% a 17% dos casos (9, 28).

A pesquisa de astrovírus no Brasil foi inicialmente restrita, considerando que o único método disponível para sua identificação era a microscopia eletrônica

(ME). Com a implantação de novas técnicas, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a RT-PCR, estas pesquisas vem sendo realizadas. Um dos primeiros estudos realizado por Tanaka et al., em 1994 ainda utilizando a técnica de ME, mostrou a ocorrência de um surto de gastroenterite intra-familiar causado por astrovírus a partir de sua identificação em amostras fecais de cinco crianças de uma mesma família (46). Em 1998, um estudo realizado no Rio de Janeiro, utilizando RT-PCR, no período de um ano e meio, em três hospitais e uma creche, estabeleceu uma positividade de 15% para astrovírus (42). Este mesmo grupo, em 2001, constatou a ocorrência de surto de gastroenterite aguda relacionado com astrovírus em uma creche no Rio de Janeiro, onde 33% das amostras foram positivas (45). Em Goiânia, Cardoso e colaboradores observaram a presença de astrovírus em 2,8% das amostras analisadas (2). Em um estudo mais recente Resque et al., 2007, em um estudo com dois grupos distintos de amostras relatou um índice de positividade para astrovírus de 20,7% a 31,1% em crianças com diarreia aguda e/ou persistente, e um índice de 7,6% a 16,3% entre os indivíduos controle (40).

Embora a infecção por astrovírus em crianças ocorra ao longo do ano, um padrão sazonal tem sido relatado em alguns trabalhos. A sazonalidade das infecções atribuídas a astrovírus parece variar de acordo com a região geográfica. Em regiões de clima temperado, o pico de infecção ocorre nos meses mais frios (fim do outono e durante o inverno), padrão esse que se assemelha às infecções por rotavírus, enquanto que em lugares de clima tropical, esse pico acontece nos meses de chuva. Estudos realizados na Europa, Austrália e Argentina mostraram que há um aumento na incidência da infecção viral durante os meses mais frios do ano (28), enquanto em alguns países como Egito e México, a maioria das infecções pelo agente viral ocorre durante a época mais quente do ano (28). No Brasil, mais especificamente na cidade de Goiânia, as infecções relacionadas com este agente ocorrem, predominantemente, durante os meses de setembro a março, período no qual se observam os maiores índices pluviométricos nesta localidade (2). Por outro lado, os astrovírus foram detectados durante quase todos os meses do ano em São Paulo (40).

A gastroenterite causada por astrovírus é considerada moderada e não há necessidade de um tratamento terapêutico mais específico. Nas crianças, ou mais raramente nos adultos que ficam desidratados, a reposição oral ou intravenosa de água ou outro fluido nutriente pode resolver o problema. No caso de pessoas imunocomprometidas que não respondem à reposição de líquidos, a injeção de imunoglobulinas pode ser um importante aliado no combate à doença. Estudos relatam que após a administração de imunoglobulinas em pacientes imunocomprometidos com quadro de infecção persistente causada por astrovírus, foram observadas a extinção de partículas virais e a eliminação do quadro de diarreia (28, 32).

A interrupção da transmissão é o fator chave para que a infecção pelo vírus não ocorra, especialmente em hospitais e outras instituições, como postos de saúde e creches, onde a transmissão de pessoa para pessoa é comum. Essa interrupção pode ser feita através de hábitos higiênicos comuns, como lavar as mãos e manter o ambiente o mais limpo possível, além da adoção de medidas de saneamento básico (28, 39).

Outro modo de prevenção da infecção por astrovírus seria a administração de vacinas. No entanto, é necessário um melhor entendimento sobre a biologia desse vírus e suas características, para que alguma vacina seja desenvolvida com sucesso (28, 39).

REFERENCIAS

- Cardoso, D. D. P.; Soares, C. M. A.; Azevedo, M. S. P.; Leite, J. P. G.; Munford, V.; Rácz, M. L. Serotypes and subgroups of rotavirus in central Brazil. *J. Health Popul. Nutr.* 18:39-43, 2000.
- Cardoso, D. D. P.; Fiaccadori, F. S.; Souza, M. B. L. D.; Martins, R. M. B.; Leite, J. P. G. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med. Sci. Monit.* 8 (9):CR624-CR628, 2002.
- Carmona, R. C. C.; Timenetsky, M. C. S. T.; Morillo, S. G.; Richtzenhain, L. J. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerging Infect. Dis.* 12 (6):963-968, 2006.
- Castilho, J. G.; Munford, V.; Resque, H. R.; Fagundes-Neto, U.; Vinjé, J.; Rácz, M. L. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 44 (11):3947-3953, 2006.
- Castilho, J. G.; Munford, V.; Rácz, M. L. Gastroenterites Virais: Norovírus e Sapovírus. In: *Microbiologia*, edited by L. R. Trabulsi, F. Alterthum, M. B. Martinez, L. C. Campos, V. Gambale, and M. L. Rácz, São Paulo: Editora Atheneu, 2008, p. 625-628.
- Cheek, J. E.; Young, P.; Branch, L.; Dupnick, K. M.; Kelly, S. T.; Sharp, J. M. Norwalk-like virus-associated gastroenteritis in a large, high-density encampment - Virginia, July 2001. *MMWR* 51:661-663, 2002.
- Chen, D.; Ramig, R. Determinants of rotavirus stability and density during CsCl purification. *Virology* 186:228-237, 1992.
- Daughenbaugh, K. F.; Fraser, C. S.; Hershey, J. W. B.; Hardy, M. E. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO Journal* 22 (11):2852-2859, 2003.
- Espul, A.; Martinez, N.; Noel, J. S.; Cuello, H.; Abrile, C.; Grucci, S.; Glass, R.; Berke, T.; Matson, D. O. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 72:75-82, 2004.
- Estes, M. K.; Kapikian, A. Z. Rotaviruses. In: *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007, p. 1917-1974.
- Farkas, T.; Jiang, X.; Guerrero, M. L.; Zhong, W.; Wilton, N.; Berk, T.; Matson, D. O.; Pickering, L. K.; Ruiz-Palacios, G. Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. *J. Med. Virol.* 62:217-223, 2000.
- Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L. A. *Virus Taxonomy*, San Diego, CA: Academic Press, 2005. 1162 pages.
- Gentsch, J. R.; Laird, A. R.; Bielfelt, B.; Griffin, D. D.; Banyai, K.; Ramachandran, M.; Vinje, J.; Cunliffe, N. A.; Nakagomi, O.; Kirkwood, C. D.; Fischer, T. K.; Parashar, U. D.; Bresee, J. S.; Jiang, B.; Glass, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implication for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192 (suppl 1):s146-s159, 2005.
- Gilpatrick, S. G.; Schwab, K. J.; Estes, M. K.; Atmar, R. L. Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of norwalk virus. *J. Virol. Meth.* 90:69-78, 2000.
- Glass, R. I.; Bresee, J. S.; Turcios, R.; Fischer, T. K.; Parashar, U. D.; Steele, A. D. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. *J. Infect. Dis.* 192 Suppl 1:S160-S166, 2005.
- Glass, P. J.; White, L. J.; Ball, J. M.; Leparco-Goffart, I.; Hardy, M. E.; Estes, M. K. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* 74:6581-6591, 2000.
- Green, K. *Caliciviridae, The Noroviruses*. In: *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 949-979.
- Greenberg, H. B.; Matsui, S. M. Astroviruses and caliciviruses: emerging enteric pathogens. *Infectious Agents and Diseases* 1:71-91, 1992.
- Hale, A.; Mattick, K.; Estes, M.; Jiang, X.; Green, J.; Eglin, R.; Brown, D. Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J. Med. Virol.* 62:99-103, 2000.
- Houly, C. A. P.; Uchoa, M. M. M.; Zaidan, A. M. E.; Gomes-Neto, A.; De-Oliveira, F. M.; Athayde, M. A. G.; Almeida, M. F. L. M.; Pereira, H. G. Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Maceio, Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 19:33-37, 1986.
- Kang, G. Rotavirus vaccines, Indian. *J. Med. Microbiol.* 24:252-257, 2006.
- Kapikian, A. Z.; Wyatt, R. G.; Dolin, R.; Thornhill, T. S.; Kalica, A. R.; Chanock, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10:1075-1081, 1972.
- Kapikian, A. Z.; Hoshino, Y.; Chanock, R. M. Rotaviruses. In: *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 1787-1833.
- Kaplan, J. E.; Gary, G. W.; Baron, R. C.; Singh, N.; Schonberger, L. B.; Feldman, R.; Greenberg, H. B. Epidemiology of norwalk gastroenteritis and the role of norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann. Intern. Med.* 96:756-761, 1982.
- Landaeta, M. E.; Dove, W.; Vinh, H.; Cunliffe, N. A.; Campbell, J.; Parry, C. M.; Farraa, J. J.; Hart, C. A. Characterization of rotavirus causing diarrhoea in vietnamese children. *Ann. Trop. Parasitol.* 97 (1):53-59, 2003.
- Linhares, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad. Saúde Pública* 16 (3):629-646, 2000.

27. Martella, V.; Ciarlet, M.; Banyai, K.; Lorusso, E.; Arista, S.; Lavazza, A.; Pezzotti, G.; Decaro, N.; Cavalli, A.; Lucente, M. S.; Corrente, M.; Elia, G.; Camero, M.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 45 (2):577-580, 2007.

28. Méndez, E.; Arias, C. F. Astroviruses. In: *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 981-1000.

29. Mertens, P. P. C.; Attoui, H.; Bamford, D. H. eds. **The RNAs and Proteins of dsRNA Viruses.** Disponível em www.reoviridae.org/dsma_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm. Acesso em 17 julho de 2008.

30. Munford, V.; Caruzo, T. A. R.; Rácz, M. L. Gastroenterites Virais: Rotavírus. In: *Microbiologia*, edited by L. R. Trabulsi, F. Alterthum, R. M. Martins, L. C. Campos, V. Gambale, and M. L. Rácz, São Paulo: Editora Atheneus, 2008, p. 619-623.

31. Munford, V.; Souza, E. C.; Caruzo, T. A. R.; Martinez, M. B.; Rácz, M. L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:459-466, 2007.

32. Nadan, S.; Walter, J. E.; Grabow, W. O. K.; Mitchell, D. B.; Taylor, M. B. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: Comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2):747-753, 2003.

33. Offit, P. A. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J. Infect. Dis.* 174 (suppl 1):S59-S64, 1996.

34. Pang, X.; Honma, S.; Nakata, S.; Vesikari, T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J. Infect. Dis.* 181 (S2):S288-S294, 2000.

35. Parashar, U. D.; Hummelman, E. G.; Breesee, J. S.; Miller, M. A.; Glass, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565-572, 2003.

36. Parks, C. G. Moe, C. L.; Rhodes, D.; Lima, A.; Barrett, L.; Tseng, F.; Baric, R.; Talal, A.; Guerrant, R. Genomic diversity of "Norwalk Like Viruses" (NLVs): pediatric infections in Brazilian shantytown. *J. Med. Virol.* 58:426-434, 1999.

37. Pereira, H. G.; Azeredo, R. S.; Leite, J. P. G.; Candeias, J. A. N.; Rácz, M. L.; Linhares, A. C.; Gabbay, Y. B.; Trabulsi, L. R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg., Camb.* 90:117-125, 1983.

38. Ramig, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.* 78 (19):10213-10220, 2004.

39. Resque, H. R.; Munford, V.; Rácz, M. L. Gastroenterites Virais: Astrovírus. In: *Microbiologia*, edited by L. R. Trabulsi, F. Alterthum, R. M. Martins, L. C. Campos, V. Gambale, and M. L. Rácz, São Paulo: Editora Atheneus, 2008, p. 629-631.

40. Resque, H. R.; Munford, V.; Castilho, J. G.; Schimch, H.; Caruzo, T. A. R.; Rácz, M. L. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 102 (8):969-974, 2007.

41. Rohayem, J.; Berger, S.; Juretzek, T.; Herchenröder, O.; Mogel, M.; Poppe, M.; Henker,

J.; Rethwilm, A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to norovirus, astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. *J. Med. Virol.* 118:49-59, 2004.

42. Rosa e Silva M. L.; Pires de Carvalho, I.; Gouveia, V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. *J. Clin. Microbiol.* 40 (8):2837-2842, 2002.

43. Santos, N.; Hoshino, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15:29-56, 2005.

44. Schwab, K. J.; Neill, F. H.; Fankhauser, R.; Daniels, N. A.; Monroe, S. S.; Bergmire-Sweat, D. A.; Estes, M. K.; Atmar, R. L. Development of methods to detect "norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1):213-218, 2000.

45. Silva, A. M.; Leite, E. G.; Assis, R. M.; Majerowicz, S.; Leite J. P. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96 (8):1069-1073, 2001.

46. Tanaka, H.; Kisieliu, J. J.; Ueda, M.; Glass, R. I.; Joazeiro P. P. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. *J. Diar. Dis. Res.* 12 (3):219-221, 1994.

47. Ueda, M.; Kisieliu, J. J.; Rocha, M.; Timenetsky, M. C.; Tanaka H. Small round structured virus-SRSV, genogroup G2 in Baixada Santista (SP)-virus identification by IEM. VII Encontro Nacional de Virologia 147-147, 1996.

LANÇAMENTO OXOID LINHA IMAGEN™ VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Através de recente aquisição da divisão de microbiologia da marca Dako Cytomation, a Oxoid Limited expande seus negócios com produtos de relevância para a microbiologia clínica. Com essa aquisição a Oxoid Ltd. inaugura mais uma moderna unidade fabril localizada em Ely, Cambridgeshire – Reino Unido, com a finalidade de produzir kits e reagentes de detecção de vírus gastrintestinais, entre eles Astrovírus e Norovírus, agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis (IDEA™ amplified), vírus respiratórios (IMAGEN™), doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), detecção de *Helicobacter pylori*, além de kits para o diagnóstico de doenças de interesse veterinário.

No Brasil, como um trabalho simultâneo aos lançamentos da Matriz, a filial Oxoid Brasil já disponibiliza a linha IMAGEN™ (Immunofluorescent antigen detection). A linha IMAGEN™ é composta por kits contendo anticorpos monoclonais revestidos por reagentes fluorescentes para detecção dos principais vírus respiratórios **INCLUINDO o mais recente vírus respiratório isolado – hMPV (metapneumovírus humano).**

Com a utilização da técnica de imunofluorescência direta (indireta para Screen Respiratory – Painel Respiratório), a Linha IMAGEN™ confere alta qualidade de seus reagentes, excelente sensibilidade e especificidade no diagnóstico dos principais antígenos virais em amostras clínicas de aspirados/ secreções nasofaríngeas, bem como em culturas celulares.



PRODUTO	CÓDIGO	APRES.	REG. ANVISA
IMAGEN™ Adenovirus	K6100	50 testes	10349280264
IMAGEN™ Respiratory Syncytial Virus (RSV)	K6102	50 testes	10349280268
IMAGEN™ Parainfluenza Virus Group	K6103	50 testes	10349280265
IMAGEN™ Parainfluenza Virus Typing	K6104	50 testes	10349280266
IMAGEN™ Influenza Virus A / B	K6105	50 testes	10349280267
IMAGEN™ Respiratory Screen	K6120	100 testes	10349280269
IMAGEN™ hMPV (human pneumovirus)	K6125	50 testes	10349280263

Oxoid Brasil Ltda

Fone: 11 5505.0014 Fax: 11 5505-6010
 oxoid@oxoid.com.br www.oxoid.com



VACINAS E A ERRADICAÇÃO DA LINFADENITE CASEOSA



1



2



3



4

1. Fernanda Alves Dorella

Depto de Biologia Geral, ICB/UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brazil
CP 486 - CEP 31270-901 - Tel/Fax: 00 55 31 3409 2610 - dorella@icb.ufmg.br

2. Roberto Meyer

Possui graduação em Medicina pela Universidade Federal da Bahia (1977), especialização em Imunologia no Centro de Pesquisa e Treinamento em Imunologia da OMS, São Paulo (1978) e no Departamento de Imunobiologia da Universidade de Colônia, Alemanha (1986), mestrado em Imunologia pela Escola Paulista de Medicina (1983) e doutorado em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia (2003). Atualmente é Professor Associado da Universidade Federal da Bahia. Tem experiência na área de Imunologia, com ênfase em Imunoquímica e Imunologia Aplicada, atuando principalmente nos seguintes temas: Imunidade na Linfadenite Caseosa, Imunidade nas Doenças Periodontais e Imunidade em Câncer.

3. Anderson Miyoshi

Depto de Biologia Geral, ICB/UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brazil.
CP 486 - CEP 31270-901 - Tel/Fax: 00 55 31 3409 2610 - miyoshi@icb.ufmg.br

4. Vasco Azevedo

Depto de Biologia Geral, ICB/UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brazil
CP 486 - CEP 31270-901 - Tel/Fax: 00 55 31 3409 2610 - vasco@icb.ufmg.br

“Segundo a Organização Mundial da Saúde “as vacinas são, depois da água potável, a principal ferramenta no combate à mortalidade no mundo.”

A vacinação é o processo mais efetivo e menos dispendioso na profilaxia das doenças infecciosas. O objetivo de uma vacina é imunizar previamente o indivíduo de modo que ele responda de maneira rápida e eficiente quando em contato com o agente infeccioso, evitando assim, o desenvolvimento da doença. No presente artigo faremos uma abordagem a respeito das vacinas, sua história e os tipos existentes, com suas vantagens e desvantagens. Como modelo de discussão sobre a busca por uma vacina ideal, discutiremos todos os es-

forços que vêm sendo empregados no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a linfadenite caseosa, doença que acomete caprinos e ovinos no mundo todo, acarretando enormes perdas econômicas, visto que as vacinas disponíveis até o momento não são efetivas na erradicação desta enfermidade.

A HISTÓRIA DAS VACINAS

Há mais de duzentos anos deu-se início à era das vacinas com a descoberta, por Edward Jenner (1749-1823), em 1796, da propriedade de vacinação. Ele observou que existiam, nas tetas das vacas, as mesmas lesões causadas pela varíola em humanos. Após este fato, Jenner percebeu que as mulheres responsáveis pela ordenha das vacas, quando expos-

tas ao vírus da varíola, desenvolviam uma versão mais branda da doença.

Para testar sua teoria, Jenner recolheu o exsudato que saía de tais feridas e passou em arranhões que ele provocou em um menino saudável. O garoto teve febre e algumas lesões, mas se recuperou rapidamente. Semanas depois, o cientista expôs novamente o menino ao material da ferida de outro paciente e desta vez o menino passou incólume à doença (Figura 1). Estava descoberta a primeira vacina de que se tem notícia (Morgan e Parker, 2007).

Cem anos depois, Louis Pasteur (1822-1895), entre pesquisas sobre fermentação alcoólica, anaerobiose e doenças infecciosas, descobriu que existiam formas “fracas” e virulentas de micróbios



Figura 1: A primeira vacinação feita por Jenner. (Imagem: © Bettmann/Corbis)

e que as primeiras poderiam ser usadas como agentes imunizantes contra a infecção pelas últimas (Figura 2). Iniciou-se assim a utilização da vacinação como forma de prevenção de doenças. Entre os diversos campos da ciência em que atuava, coube a Pasteur a descoberta do agente transmissor da raiva bem como da vacina anti-rábica. Esta e outras descobertas científicas levaram à fundação do renomado Instituto Pasteur (Arroio, 2006).

As descobertas de Jenner e Pasteur fizeram parte do início de uma era muito importante para a medicina: a era da vacinação. Até então, ao longo da história, grandes epidemias de doenças infecto-contagiosas atingiram inúmeros países, cada uma com suas particularidades. E hoje em dia, doenças consideradas controladas, ou até mesmo extintas, estão reemergindo no cenário mundial. E no combate a essas doenças, a vacinação ainda é a melhor alternativa (Mahmouda e Levin, 2007).

OS TIPOS DE VACINAS

Basicamente existem três tipos de vacinas, levando-se em consideração o modo como são formuladas.

As **vacinas de primeira geração** consistem na utilização de patógenos vivos atenuados ou mortos, capazes de induzir uma resposta imune protetora contra estes mesmos agentes em sua forma selvagem. A vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) amplamente utilizada no combate à tuberculose faz parte da categoria de vacinas de primeira geração viva e atenuada (Silva et al., 2004). Além dela, vacinas contra varíola, raiva, peste bubônica, difteria, coqueluche, tétano, febre

amarela, poliomielite, sarampo e rubéola são todas vacinas de primeira geração. Embora este tipo de vacina seja predominante no mercado, atualmente sua eficácia e segurança são bastante contestadas bem como a questão ética na utilização de organismos vivos, mesmo que atenuados, em seres humanos (Schatzmayr, 2003; Movahedi e Hampson, 2008). Essas questões de biossegurança constituem uma importante plataforma de trabalho para o desenvolvimento de vacinas mais seguras (Dougan, 1994; Foss e Murtaugh, 2000). Para contornar estes problemas, hoje em dia são empregadas técnicas moleculares que permitem torná-las seguras, diminuindo a virulência do patógeno e evitando que haja reversão. Entre essas técnicas, a deleção de múltiplos genes, relacionados à virulência, ou mesmo inserções de fragmentos que interrompam tais genes no patógeno, quase que eliminam por completo o risco de que o patógeno reverta à sua forma virulenta (Jiskoot et al., 2002; Schatzmayr, 2003).

Algum tempo depois surgiram vacinas mais seguras e com espectro de atuação maior. As **vacinas de segunda geração** substituíram o microrganismo como um todo por subunidades protéicas do mesmo, ou seja, antígenos purificados ou recombinantes, isolados de cultura do próprio patógeno, responsáveis por estimular mais fortemente o sistema imune do hospedeiro. A tecnologia deste tipo de vacina baseia-se no isolamento, clonagem e expressão de genes que codificam proteínas que possuem epítopos reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro. As vantagens deste tipo de vacina são a de que uma única proteína pode ter vários epítopos imunodominantes capazes de induzir uma imunidade protetora sem riscos e as adversidades de se administrar um patógeno vivo; vacinas de subunidades não se replicam no hospedeiro, portanto não há risco de patogenicidade, além da possibilidade de produção em larga escala (Silva et al., 2004; Movahedi e Hampson, 2008). A vacina contra a pneumonia pneumocócica, que contém 23 polissacarídeos diferentes da cápsula de linhagens de *Streptococcus pneumoniae*; e a vacina contra a hepatite B, que contém fragmentos antigênicos da superfície do vírus da hepatite, isolados do sangue de portadores de hepatite, são exemplos bem sucedidos de vacinas de segunda geração (Paton e Briles, 2003). No entanto, existem dificuldades

na produção deste tipo de vacina como a purificação dos antígenos e a expressão de proteínas eucarióticas em procaríotos. Além disso, a escolha de antígenos deve ser cuidadosa visto que é necessário que o epítopo eleito induza imunidade humoral e/ou celular no hospedeiro de acordo com o tipo de organismo a ser combatido (Movahedi e Hampson, 2008).

No início da década de 1990 observou-se que DNA plasmidiano poderia ser transfetado em células animais *in vivo*. Em 1993, uma molécula de DNA nu codificando genes virais conferiu imunidade protetora e trouxe surpresa aos vacinologistas (Donnelly et al., 1997; Manickan et al., 1997). A partir desta observação surgiu o questionamento: Genes poderiam virar vacinas? Desde então surgiram as **vacinas de terceira geração**, compostas de genes ou fragmentos gênicos que codificam antígenos potencialmente imunogênicos carregados por DNA plasmidiano visando induzir resposta imune protetora através da injeção direta do DNA no tecido animal (Figura 3; Donnelly, 2003).

As vantagens oferecidas pelas vacinas de terceira geração são bastante atrativas: não apresentam risco de causar infecção, uma vez que os genes utilizados são específicos para uma dada proteína antigênica; pode-se empregar um mesmo plasmídeo carregando vários genes, o que é vantajoso quando o orga-

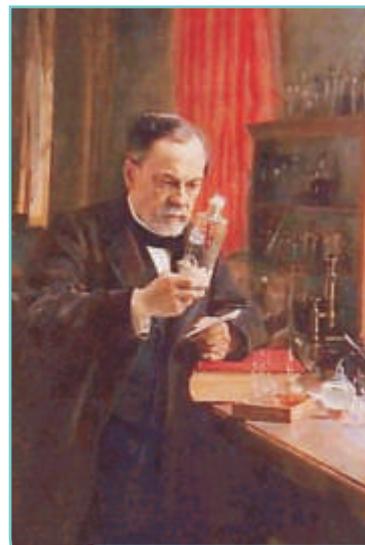


Figura 2: Pasteur em seu laboratório. (Imagem: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000j-0fn/institut-pasteur/musees>)

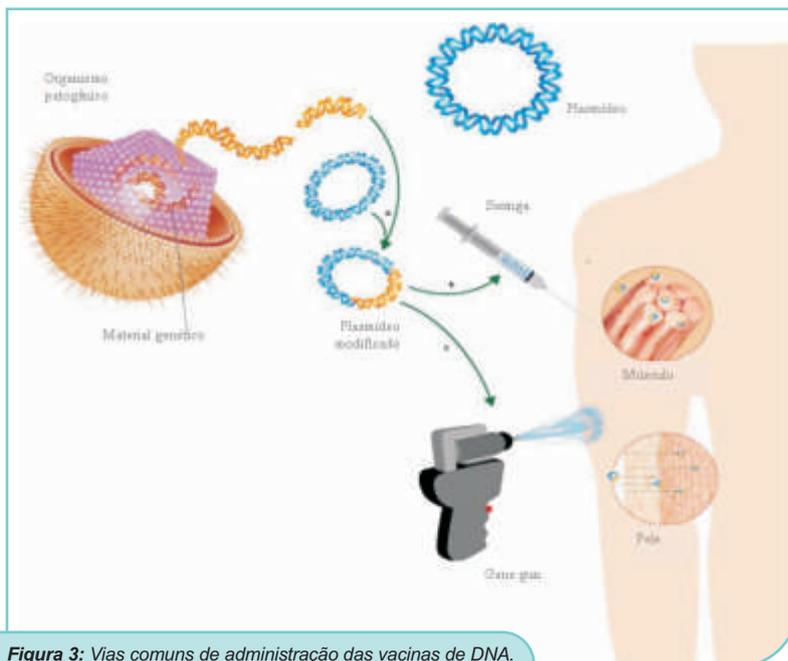


Figura 3: Vias comuns de administração das vacinas de DNA. (Adaptado de Weiner e Kennedy, 1999).

nismo é altamente variável como um vírus; a imunidade adquirida persiste por longo tempo devido à constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira. Além de boa estabilidade em baixas ou altas temperaturas, o que facilita enormemente a estocagem e distribuição (Oliveira, 2004). E finalmente, as vacinas são de fácil preparação e baixo custo de produção, o que traz grandes esperanças no campo da vacinologia (Biláková et al., 2007). Uma das principais desvantagens deste tipo de vacina é o fato de não apresentar resultados tão promissores no hospedeiro final quanto em modelos laboratoriais. Por exemplo, em estudos realizados com vacinas de DNA no combate à malária, os excelentes resultados obtidos em modelo murino não se reproduziram em humanos (Dunachie e Hill, 2003).

Os benefícios resultantes do desenvolvimento de vacinas gênicas são inúmeros, como mencionado anteriormente. E o impacto gerado sobre o controle das doenças infecciosas que podem ser prevenidas por imunização gênica será, provavelmente, uma das aquisições mais importantes advindas da utilização desta tecnologia.

A imunização baseada em DNA deu início a uma nova era no ramo da vacinologia. E com isso a busca pelo desenvolvimento de novas alternativas vacinais

capazes de controlar essas doenças infecciosas de modo profilático.

Em 2000 surgiu uma nova tecnologia de desenvolvimento de vacinas: a **vacinologia reversa ou vacinologia genômica** (Rappuoli, 2000). Esta nova abordagem se baseia na utilização de seqüências genômicas e de análises *in silico* para prever antígenos potenciais que serão então isolados, clonados expressos, purificados e, finalmente, utilizados na imunização para serem avaliados quanto ao seu potencial vacinal (Figura 4).

Estes antígenos podem ser tanto proteínas completas quanto seus epítopos imunodominantes (Schatzmayer, 2003; Movahedi e Hampson, 2008). Mas nem tudo são vantagens, boas correlações de proteção são raras, sendo assim, conseguir imunidade protetora é o ponto limitante da vacinologia reversa. Outro fator limitante é a necessidade da seqüência genômica do organismo de interesse ter sido completamente elucidada.

LINFADENITE CASEOSA COMO MODELO NA BUSCA POR UMA VACINA EFICIENTE

Linfadenite caseosa (LC)

ALC é uma doença crônica causada pela bactéria da espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete pequenos ruminantes e é responsável por

perdas econômicas significativas relacionadas à redução da produtividade e eficiência reprodutiva dos animais infectados, principalmente devido à redução da produção de lã, carne e leite, redução na eficiência de reprodução dos animais infectados e condenação de carcaças e couro em abatedouros (Dorella et al., 2006a). A manifestação da LC em pequenos ruminantes é caracterizada principalmente por necrose das glândulas linfáticas. A forma mais freqüente da doença, a LC externa, é caracterizada pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos (Figura 5). Esses abscessos podem também se desenvolver em órgãos internos, tais como pulmões, rins, fígado e baço, caracterizando a LC visceral (Piontkowski e Shivvers, 1998). Em alguns casos, a infecção produz poucos sinais clínicos no animal, o que leva à impossibilidade de identificá-los até sua morte, tornando difícil a obtenção de dados sobre a prevalência dessa doença (Arsenault et al., 2003).

Essa enfermidade é prevalente em países como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos e Brasil, onde apresenta intensa atividade de ovinos e caprinocultura (Arsenault et al., 2003). No Brasil, estimativas demonstram que a maior parte dos animais esteja infectada e a prevalência clínica seja de 30% (Ribeiro et al., 2001). Os estados da Região Nordeste são considerados

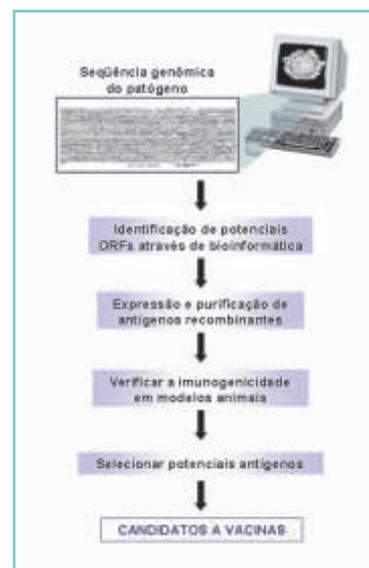


Figura 4: Esquema da abordagem utilizada na vacinologia reversa na busca por novos candidatos vacinais.

os mais afetados, porém, o estado de Minas Gerais (Região Sudeste), mesmo possuindo um rebanho ainda reduzido, 84,3% dos produtores relatou ter problemas como consequência da patologia (Faria et al., 2004). Estudos recentes realizados em aproximadamente 200 propriedades do estado de Minas Gerais demonstraram uma soroprevalência da LC de 70% em ovinos e 80% em caprinos.

A transmissão da LC entre caprinos e ovinos ocorre principalmente através de ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados tanto por procedimentos de manejo como tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e agulhas contaminadas quanto por fatores naturais como arbustos pontiagudos (Alves e Pinheiro, 1997). O tratamento da enfermidade não é eficiente através do uso de antibióticos, pois estes não penetram na cápsula dos abscessos. Portanto, o controle da LC deve ser realizado primariamente por medidas profiláticas. Considerando que as vacinas existentes não são eficientes, a identificação dos animais infectados e a privação destes animais do convívio com os saudáveis permanecem como as principais medidas de manejo para o controle desta enfermidade (Williamson, 2001; Dorella et al., 2006a).

PROCURA-SE UMA VACINA

A melhor medida de custo-benefício contra a introdução ou a erradicação da LC no plantel se baseia na imunização. Além do tratamento por antibióticos não ser eficaz e ser de alto custo, a necessidade de se obter uma vacina eficiente e protetora contra a LC pode ser evidenciada pelos relatos de anos de pesquisa com esse objetivo. Entretanto, as vacinas disponíveis apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Nem todas as vacinas licenciadas para ovinos têm, por exemplo, a mesma eficiência para caprinos. Por não se adequarem a todos os casos, normalmente é necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (Williamson, 2001). A ineficácia do processo de imunização pode ainda ser associada ao uso incorreto das vacinas pelos criadores. Além disso, o estudo da disseminação da bactéria pelo plantel demonstrou que animais aparentemente sem abscedação são transmissores (Paton et al., 2003).

Vários relatos na literatura mostram diferentes estratégias que vêm sendo



Figura 5: Lesões características de animais com LC. A) abscesso em linfonodo parotídeo, B) abscesso em linfonodo pré-escapular esquerdo, C) abscesso em linfonodo poplíteo esquerdo, e D) lesão característica de LC, abscesso com aspecto caseoso, exibindo camadas de material necrosado.

testadas, como o uso de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana, do sobrenadante de cultura bacteriana e uma mistura de componentes celulares e sobrenadante (Holstad, 1989, LeaMaster et al., 1987, Brogden et al., 1990, Ellis et al., 1991, Eggleton et al., 1991). Todas as preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis. Em nosso laboratório também estamos testando várias estratégias, com o intuito de obter uma vacina protetora e mais segura contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*, como o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas (vacinas de primeira geração), proteínas recombinantes (vacinas de segunda geração), vacinas de DNA (vacinas de terceira geração) e a busca por antígenos imunodominantes (vacinologia reversa).

1. Vacinas de primeira geração contra a LC

As vacinas com microorganismo vivo são produzidas a partir da atenuação da virulência, isto é, do potencial causador de doença do microorganismo. Neste tipo de estratégia vacinal o microorganismo mantém sua capacidade de replicação, mimetizando a infecção natural e produzindo uma resposta humoral e celu-

lar. Além disso, é o tipo de vacina que confere melhor e mais prolongada resposta imunológica devido a sua similaridade à infecção natural. Uma vez que as proteínas exportadas por bactérias constituem sua principal categoria de fatores de virulência, e, conseqüentemente, alvos para a atenuação; nosso grupo de pesquisa, entre os anos de 2003 e 2005, produziu 21 diferentes mutantes de *C. pseudotuberculosis* através de mutagênese aleatória utilizando um sistema de transposição repórter baseado na fosfatase alcalina de *Enterococcus faecalis* (Dorella et al., 2006b). Este sistema de descoberta de produtos exportados em bactérias Gram-positivas foi utilizado produzindo fusões aleatórias entre genes de *C. pseudotuberculosis* e o gene repórter empregado no sistema. Como a fosfatase alcalina está ativa somente quando exportada, pudemos selecionar os mutantes que exibiam atividade de fosfatase alcalina pela visualização do produto da degradação de um substrato revelador. As seqüências de DNA que flanqueiam os sítios de inserção do transposon em cada mutante foram identificadas através de seqüenciamento. Foi possível identificar loci que codificam subunidades fimbriais, proteínas de transporte e também proteínas de função hipotética e/ou desconhecida, as quais podem, ou não, estar relacionadas à virulência e à patogenicidade deste microorganismo (Dorella et

al., 2006b).

Atualmente, estas linhagens mutantes vêm sendo testadas em ensaios de imunização em camundongos com o objetivo de caracterizar *in vivo* e investigar se houve atenuação e, conseqüentemente, seu potencial vacinal durante a infecção. **Os resultados obtidos até o momento nos permitiram selecionar uma linhagem mutante que confere proteção acima de 80% em modelo murino e que vem apresentando-se como o candidato mais promissor no desenvolvimento de uma vacina no combate à LC.** Ensaios imunológicos utilizando os hospedeiros naturais, caprinos, estão sendo realizados com o intuito de reproduzir os bons resultados obtidos em camundongos. Todos estes testes servirão como base para o desenvolvimento de uma possível nova vacina viva atenuada contra a linfadenite caseosa.

2. Vacinas de segunda e terceira gerações contra a LC

Na produção de vacinas de segunda geração, o antígeno crítico responsável pelo desencadeamento da resposta imunológica de interesse, humoral ou celular, é obtido através da purificação de proteínas específicas do microorganismo que estimulem o sistema imune do hospedeiro ou da produção destes antígenos de forma heteróloga. *Heat-shock proteins* (HSPs) são proteínas presentes em organismos eucariotos e procaríotos, codificadas por genes induzidos sob condições de estresse. Sua função é basicamente o enovelamento correto de proteínas ou seu transporte através de membranas intracelulares. Diversos estudos vêm demonstrando que, devido à sua abundância, as HSPs são os principais antígenos de muitos patógenos. As duas principais famílias de HSPs são HSP70 e HS60, que também representam os maiores alvos para anticorpos em muitos processos infecciosos (Silva, 1999; van Eden et al., 2005). Devido a estas características, HSPs de diferentes microrganismos vêm sido testadas como antígenos vacinais.

Estudos de **isolamento, clonagem e caracterização molecular do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foram realizados por nosso grupo com o objetivo de avaliar o potencial desta proteína como antígeno vacinal ao ser utilizado no desenvolvimento de vacinas de subunidade protéica e de DNA.** Soros de caprinos imunizados com a pro-

teína recombinante Hsp60 e com a vacina de DNA baseada no mesmo gene foram utilizados para caracterizar a produção do isótipo IgG por meio de ensaios de ELISA indireto. Uma marcante resposta humoral foi obtida após a imunização com rHsp60, no entanto essa resposta não foi capaz de gerar uma resposta protetora contra o desafio com a linhagem selvagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Em relação à vacina de DNA, a produção de IgG e seus subtipos foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. *A partir deste resultado, pode-se afirmar que a imunização com a proteína recombinante induziu a produção de anticorpos específicos anti-Hsp60 de C. pseudotuberculosis.* Contudo, novamente não se verificou proteção, mesmo com a resposta humoral (Colho et al., manuscrito em preparação).

3. Vacinologia reversa aplicada ao combate da LC

A busca por antígenos imunodominantes de *C. pseudotuberculosis* vem sendo amplamente realizada. Com este propósito, o uso de soro de animais infectados e análises *in silico* de seqüências genômicas são estratégias promissoras na busca por tais antígenos.

Com o genoma de *C. pseudotuberculosis* quase que completamente elucidado torna-se viável a predição gênica e, por conseguinte, a seleção de peptídeos indutores de respostas imunes. Nosso grupo iniciou neste ano uma abordagem combinada de vacinologia reversa e mapeamento de epítomos para identificação de candidatos a vacinas, o que permitirá a identificação de proteínas que possam estar expostas ao sistema imune sob infecção. A disponibilidade do genoma de *C. pseudotuberculosis* recém seqüenciado, a existência de outros genomas de diferentes espécies de *Corynebacterium* e de outras actinobactérias, aliadas a diversas ferramentas computacionais disponíveis para a análise de dados biológicos possibilitarão a identificação de proteínas e peptídeos potencialmente imunoprotetores para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a LC, utilizando técnicas computacionais conhecidas no processamento de dados oriundos do genoma, transcriptoma e proteoma da *C. pseudotuberculosis*, bem como organismos ortólogos (Sali et al. 2006; Bateman e Birney, 2000; Falquet et al. 2002, Servant et al. 2002; Neuweger et al. 2007).

CONCLUSÕES

Avacinação tornou-se a medida mais eficiente e menos dispendiosa de evitar doenças infecciosas. Contudo, recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), começou a alertar os governos para a reincidência de doenças antes consideradas controladas e para os problemas de saúde provenientes deste retorno indesejável, principalmente para os países mais pobres. Sendo assim, a busca pela vacina ideal continua. Ela deve ser biologicamente estável, não apresentar risco de reversão da virulência *in vivo* e *in vitro*, deve induzir imunidade humoral e celular e ser facilmente produzida em grande escala (Babiuk, 1999; Ellis, 2001). Diversas estratégias vêm sendo empregadas, das mais simples como as vacinas de primeira geração, onde o microorganismo é utilizado vivo e atenuado ou morto e inativado, às mais complexas e elaboradas como as provenientes das técnicas de DNA recombinante e atualmente através da vacinologia reversa.

No caso do combate à LC, o modelo apresentado no presente artigo, o fato de o tratamento dos animais ser de alto custo e ineficaz, faz com que a medida de melhor custo-benefício contra a introdução da doença no plantel seja a imunização. Entretanto, não existe uma vacina eficiente e protetora contra a *C. pseudotuberculosis*. Os resultados até então obtidos com as vacinas disponíveis demonstram a necessidade de se desenvolver uma vacina que ofereça proteção eficiente, com a diminuição acentuada dos efeitos colaterais.

A guerra contra as doenças infecciosas começou há muitos séculos atrás, mais muitas batalhas terão que ser ainda vencidas.

REFERÊNCIAS

- Alves, FSF e Pinheiro, R. Linfadenite caseosa. *Recomendações e Medidas Profiláticas. Sociedade Nacional de Agricultura, ano 100, 1997.*
- Arroio, A. *Louis Pasteur: um cientista humanista. Revista Eletrônica de Ciências, 2006.* (http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_31/EraUmaVez.html)
- Arsenault, J, Girard, C, Dubreuil, P, Daignault, D, Galameau, JR, Boisclair, J, Simard, C, Bélanger, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec Canada. *Preventive Veterinary Medicine, 2003, 59:67-81.*

- Babiuk, LA. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine*, 1999, 17:1587-1595.
- Bateman, A e Birney, E. Searching databases to find protein domain organization. *Advances in Protein Chemistry*, 2000, 54:137-157.
- Biláková, J, Horynová, M, Koupka, M, Weigl, E e Raška, M.** DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2007, **55**, 387398.
- Brogden KA, Chedid L, Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Sacks J.** Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *American Journal of Veterinary Research*, 1990, 51:200-202.
- Dorella, FA, Pacheco, LG, Oliveira, SC, Miyoshi, A, Azevedo, V. a.** *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary Research*, 2006, 37:201-18.
- Dorella, FA, Estevam, EM, Pacheco, LG, Guimarães, T, Lana, UG, Gomes, EA, Barsante, MM, Oliveira, SC, Meyer, R, Miyoshi, A, Azevedo, V. b. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:7368-7372.
- Donnelly, JJ, Ulmer, JB, Shiver, JW, Liu, MA. DNA vaccines. *Annual Reviews in Immunology*, 1997, 15:617-648.
- Donnelly, JJ. DNA vaccines. In: *New bacterial vaccines*, Ellis, RW e Brodeur, BR (Eds.), Texas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, cap. 3, pp. 30-44.
- Dougan, G.** The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. 1993 Colworth Prize Lecture. *Microbiology*, 1994, 140:215-24.
- Dunachie, SJ e Hill, AVS. **Prime-boost strategies for malaria vaccine development.** *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206:3771-3779.
- Eggleton, D. G., C. V. Doidge, H. D. Middleton, D. W. Minty. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of the monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 1991, 68:320-321.
- Ellis, JA, Hawk, DA, Mills, KW, Pratt, DL.** Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1991, 28:303-316.
- Ellis, RW. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*, 2001, 19:2681-2687.
- Falquet, L, Pagni, M, Bucher, P, Hulo, N, Sigrist, CJ, Hofmann, K, Bairoch, A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30:235-238.
- Faria, GA, Morais, OR, Guimarães, PHS.** Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [on-line]. 2004. Disponível em: [HTTP://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coo pere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino caprinocultura.pdf](http://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coo pere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino caprinocultura.pdf).
- Foss, DL e Murtaugh, MP.** Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces. *Animal Health Research Reviews*, 2000, 1:3-24.
- Holstad, G.** *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1989, 30:285-293.
- Jiskoot, W, Kersten, GFA, Beuvery EC. Vaccine. In: *Pharmaceutical Biotechnology An introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists*. Crommelin, DJA e Sindelar, RD (Eds.), Londres, Taylor & Francis Group, 2002, 2a. Edição, Cap 12. pp. 259-282.
- LeaMaster, BR, Shen, DT, Gorham, JR, Leathers, CW, Wells, HD.** Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. *American Journal of Veterinary Research*, 1987, 48:869-872.
- Mahmouda, A e Levin, M.** Vaccines at the turn of the 21st century: a new era for immunization in public health. *International Journal of Infectious Diseases*, 2007, **11** (Supplement 2), S1-S2.
- Manickan E, Karem KL, Rouse BT.** DNA vaccines - a modern gimmick or a boon to vaccinology? *Critical Reviews in Immunology*, 1997, 17:139-154.
- Morgan, AJ e Parker, S. **Translational Mini-Review Series on Vaccines: The Edward Jenner Museum and the history of vaccination.** *Clinical and Experimental Immunology*, 2007, **147**: 389394.
- Movahedi, AR e Hampson, DJ. New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 2008. doi:10.1016/j.vetmic.2008.02.011
- Neuweger H, Baumbach J, Albaum S, Bekel T, Dondrup M, Hüser AT, Kalinowski J, Oehm S, Pühler A, Rahmann S, Weile J, Goesmann A. CoryneCenter - an online resource for the integrated analysis of corynebacterial genome and transcriptome data. *BMC Systems Biology*, 2007, 1:55.
- Oliveira, SC. Vacinas de DNA. In: Livro Genômica, Luis Mir (Ed.), EditoraAtheneu, São Paulo, 2004, cap. 24, PP. 495 511.
- Paton, JC e Briles, DE.** *Streptococcus pneumoniae*. In: *New bacterial vaccines*, Ellis, RW e Brodeur, BR (Eds.), Texas, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, cap. 19, pp. 294-310.
- Paton, MW, Walker, SB, Rose, IR, Watt, GF. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Veterinary Journal*, 2003; **81**:91-95
- Piontkowski, MD e Shivvers, DW.** Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1998, 212:1765-1768.
- Rappuoli, R. Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3:445-450.
- Ribeiro, MG, Junior, JGD, Paes, AC, Barbosa, PG, Júnior, GN, Listoni, FJP.** Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, 2001, 68:23-28.
- Sali, A, Potterton, L, Yuan, F, van Vlijmen, H, Karplus, M. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins*, 1995, 23:318-326.
- Schatzmayr, HG. Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências, Saúde. Mangueiras*, 2003, vol. 10 (suplemento 2): 655-669.
- Servant, F, Bru, C, Carrère, S, Courcelle, E, Gouzy, J, Peyruc, D, Kahn, D. ProDom: automated clustering of homologous domains. *Briefings in Bioinformatics*, 2002, 3:246-251.
- Silva, CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes & Infections*, 1999, 1:429-35.
- Silva, CL, Bonato, VLD, Castelo, AAMC, Lima, KM, Rodrigues Júnior, JM. Vacinas Gênicas. In: Livro Genômica, Luis Mir (Ed.), EditoraAtheneu, São Paulo, 2004, Cap 23, páginas 463-493.
- van Eden, W, Hauet-Broere, F, Berlo, S, Paul, L, van der Zee, R, de Kleer, I, Prakken, B, Tams, L. Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. *International Reviews in Immunology*, 2005, 24:181-97.
- Weiner, DB, Kennedy, RC.** Genetic vaccines. *Scientific American*, 1999, 281:50-57.
- Williamson, LH. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2001; **17**: 359-371.

PARACOCCIDIOIDOMICOSE: ENIGMA DA MICOLOGIA



Zoilo Pires de Camargo

Prof. Livre Docente

Disciplina de Biologia Celular, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.
04023-062Rua Botucatu 862, São Paulo, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis, fungo termo dimórfico, causa a paracoccidioidomicose (PCM), doença sistêmica que é limitada à América Latina, com áreas de endemicidade estendida da Argentina até a América Central e constitui uma das mais prevalentes micoses profundas nesta região (1). Acredita-se que a doença é adquirida quando propágulos da fase micelial do fungo (2) são inalados pela via respiratória (3) e a infecção atinge primeiramente o pulmão, podendo, então, se disseminar para qualquer parte do corpo (4). Muitos dos indivíduos infectados desenvolvem infecção pulmonar assintomática; entretanto, alguns pacientes apresentam manifestações originando as formas clínicas aguda, subaguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulto) (5).

Após penetração no hospedeiro o fungo se transforma em levedura e este processo é visto como um passo fundamental para o estabelecimento da infecção e fase inicial da relação parasita-hospedeiro (4). Embora as interações precisas entre o hospedeiro e *P. brasiliensis* não sejam conhecidas, o assunto tem atraído muito a atenção dos pesquisadores.

O fungo

Cepas de *P. brasiliensis* variam em suas curvas de crescimento, características ultraestruturais, composição antigênica e molecular. Estes achados indicam que a

paracoccidioidomicose pode ser causada por diferentes cepas do fungo. Muito pouco é conhecido sobre os fatores de virulência em *P. brasiliensis*. Cepa virulenta influencia na relação parasita-hospedeiro como demonstrado pelas diferenças no modelo de formação de granulomas e órgãos envolvidos na infecção experimental induzida por cada cepa (6,7). A prevalência das formas clínicas e a frequência dos órgãos envolvidos pela doença variam em diferentes áreas endêmicas (4,8). É de se pensar que estes achados podem estar relacionados com a presença de diferentes variedades de cepas de *P. brasiliensis*.

Quando propágulos infecciosos atingem o hospedeiro, as primeiras defesas do hospedeiro visam o impedimento da transformação do propágulo em levedura e sua multiplicação. As primeiras interações ocorrem nos alvéolos pulmonares, onde a capacidade invasiva do fungo depende de seu mecanismo adaptativo e resistência à temperatura do corpo humano e ataque de fagócitos.

Há outros mecanismos em que componentes do fungo podem influenciar a virulência do *P. brasiliensis*. Proteinases produzidas por certos fungos patogênicos são reconhecidos como importantes fatores de virulência. *P. brasiliensis* sintetiza várias proteinases capazes de hidrolisar a caseína, colágeno e pode ter um papel facilitador na invasão do fungo nos tecidos (9).

A aderência às células do hospedeiro é

um processo fundamental para o fungo estabelecer infecção. A presença de receptor de laminina na superfície das leveduras de *P. brasiliensis* já foi demonstrada. A aderência do fungo à monocamada de células epiteliais foi significativamente reduzida na presença de anticorpo monoclonal anti-laminina. A relevância destes dados foi demonstrada *in vivo* em modelo hamster. Animais infectados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* que tinham sido previamente incubadas com laminina desenvolveram infecção testicular significativamente mais extensa do que animais infectados apenas com leveduras [10].

Como observado em estudos ultraestruturais de lesões de mucosas de pacientes, *P. brasiliensis* penetra ativamente na superfície da mucosa e parasita as células epiteliais, conseguindo evadir-se das defesas do hospedeiro e alcançar tecidos mais profundos [11]. Estes dados foram confirmados *in vitro* por meio de estudos usando culturas de células em monocamadas [12]. A ligação de *P. brasiliensis* às células epiteliais ou alveolares pode ter um papel crucial no processo.

O hospedeiro

Trabalhadores rurais da América Latina geralmente têm baixo nível sócio econômico e apresentam alto grau de má nutrição e alcoolismo, sendo o tabagismo muito comum entre esta população. Estas condições pré-existentes de risco repre-

sentam importantes fatores que modificam o progresso da doença uma vez que eles interferem com a formação de granulomas e mecanismos de defesa do hospedeiro [13].

Recentemente, o papel de alguns desses fatores de risco na progressão da doença foi avaliado em modelo experimental de inoculação intraperitoneal em ratos alcoolizados [14]. O álcool por si só não agrava a infecção ou afeta as respostas humoral e tardia, mas desenvolvem subnutrição que foi associado com infecção grave.

Mecanismos iniciais da defesa do hospedeiro

A PCM é muito mais freqüente em homens, afetando mulheres principalmente antes da menarca ou depois da menopausa. *P. brasiliensis* tem receptores para 17--estradiol no citoplasma e este hormônio inibe a transformação de micélio para levedura [15].

Os mecanismos de defesa primários interagem com o fungo na porta de entrada. Se o fungo persiste, respostas imunológicas específicas são requisitadas a destruir o fungo. Se os mecanismos são ineficientes os fagócitos e resposta imune não atuam eficientemente permitindo a adaptação do fungo e sua transformação.

O papel exercido pela fagocitose *in vivo* foi demonstrado pela inoculação intratesticular de *P. brasiliensis* em cobaias submetidos a bloqueio ou estimulação do sistema retículo endotelial e pelo modelo intraperitoneal de PCM murina com bloqueio prévio da ativação de macrófagos peritoneais [16]. Lesões extensivas necróticas e exudativas com grande número de fungos e um tipo mais disseminado da doença foram observados nesse modelo [17].

Em pacientes, estudos *in vitro* sobre quimiotaxia de leucócitos circulantes têm demonstrado que respostas adequadas sugerem que os fagócitos são capazes de alcançar o foco da infecção. A natureza das substâncias quimiotáticas é desconhecida. Entretanto, um exudato neutrofílico intenso é obtido quando sobrenadante de uma mistura de cultura de macrófagos peritoneais e *P. brasiliensis* é injetada no peritônio de animais. Este fator quimiotático solúvel aos neutrófilos foi caracterizado como uma proteína de baixo peso molecular [18].

Quando *P. brasiliensis* alcança os alvéolos pulmonares o fungo interage com os macrófagos induzindo a liberação de peptídeos que atraem neutrófilos, amplificando a resposta. Neutrófilos circulantes e

células do lavado brônquio alveolar de pacientes têm níveis normais de atividade fagocítica, embora eles diminuam sua capacidade de digerir leveduras e conídios de *P. brasiliensis* [19,20,21,22].

Estudos *in vitro* mostram que células murinas NK limitam o crescimento de *P. brasiliensis*, sugerindo que eles têm um papel defensivo durante a fase inicial de infecção. Por outro lado, linfócitos do paciente mostram uma capacidade diminuída de inibir o crescimento de *P. brasiliensis in vitro* quando comparada com linfócitos de controles saudáveis [23].

Mecanismos naturais de defesa são diretamente ligados ao conceito de resistência ou suscetibilidade ao parasita. Alguns fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento da infecção têm sido elucidados como a associação entre antígenos HLA (A9, B13) e doença, a caracterização de resistência e suscetibilidade de raças de camundongos com um modelo de hereditariedade [24]. *P. brasiliensis* é capaz de ativar o sistema complemento [25] resultando em efeito opsonização que facilita a fagocitose por macrófagos.

Mecanismos imunológicos

Quando o fungo invade os tecidos a interação de seus antígenos com o sistema imune do hospedeiro causa uma resposta imunológica que exerce uma influência fundamental no desenvolvimento da infecção. Embora mesmo os dois braços do sistema imune humoral e celular tenham funções específicas e independentes, é a sua interação que garante a sobrevivência do hospedeiro.

Pacientes com PCM não apresentam deficiência na produção de anticorpos, mas sim uma hiperatividade da resposta imune humoral, que resulta em altos títulos de anticorpos e hipergamaglobulinemia. Os anticorpos anti-*P. brasiliensis* podem ter papel nas defesas do hospedeiro contra o fungo pelo aumento da opsonização das células fúngicas parasíticas e da atividade dos fagócitos. Ainda, anticorpos interagem com antígenos circulantes e intersticiais, resultando em imunocomplexos que podem desregular a resposta imune celular específica.

Assim como em outras micoses profundas, a imunidade celular constitui um crucial mecanismo de defesa na PCM. Há várias evidências que *P. brasiliensis* foge das defesas do hospedeiro por inibição da resposta imune celular. Os mecanismos pelos quais o fungo induz depressão imune não são completamente elucidados.

Isto exclui vários fatores que podem interagir de maneira multifatorial, como fatores plasmáticos, antígenos circulantes, imunocomplexos, anticorpos específicos, células T supressoras específicas e grande envolvimento de linfonodos.

O granuloma paracoccidióidico

Paracoccidioidomicose é uma doença granulomatosa que é caracterizada pela formação de tubérculos epiteliais com áreas centrais de necrose, agregados de leucócitos polimorfonucleares, um halo linfomononuclear e fibrose. A resposta tissular do hospedeiro à presença das células fúngicas parasíticas é a típica inflamação granulomatosa epitelióide com número variável de células parasíticas e áreas de supuração. A resposta inflamatória granulomatosa com a formação de tubérculos epitelióides é tida como a mais evoluída forma de reatividade tecidual e a mais efetiva defesa biológica contra microrganismos invasores [26].

Evidências diretas e indiretas parecem indicar que o granuloma de *P. brasiliensis* pode representar uma resposta tecidual imune específica do hospedeiro para o fungo numa tentativa de destruir, bloquear e circunscrever o parasita e prevenir sua multiplicação. Evidência direta de que o granuloma paracoccidióidico esteja relacionado com a resposta imune mediada por células do hospedeiro é dada por dados de infecção natural em humanos e experimental em animais. Fava Neto [27] foi o primeiro a apontar esse fato pela classificação das formas clínicas da micose em dois tipos (1) benigna, infecção localizada com resposta imune celular persistente e (2) infecção disseminada com inflamação supurativa e afrouxamento da inflamação granulomatosa, mostrando extensas áreas de necrose e grande número de células fúngicas. Recentemente, essas duas formas foram redefinidas como pólos hiperérgico e anérgico da doença, respectivamente [28].

O mesmo padrão de correlação foi documentado em infecção experimental em camundongos normais e atímicos nu/nu. Em contraste com animais com sistema celular T intacto, os animais nu/nu mostraram alta mortalidade com lesões contendo poucos granulomas com numerosas células fúngicas. Novos experimentos demonstram que mesmo quando animais atímicos conseguem organizar uma inflamação granulomatosa, a ausência de respostas imune celular impede a morte dos fungos [29]. Esses dados foram interpretados

com evidência de ausência da estimulação de linfocinas pela atividade fungicida dos macrófagos. Tais observações são semelhantes às aquelas vistas em pacientes de PCM com AIDS ou naqueles que recebem terapia imunossupressiva [30].

Estudos microanatômicos do granuloma de *P. brasiliensis* por histoquímica e imunohistoquímica têm demonstrado que as células T formam um manto periférico ao redor de um agregado central de macrófagos. A maioria dos linfócitos é do tipo T helper com poucas células supressoras, indicando que aquelas células estão ativamente envolvidas na patogênese das lesões e no controle da doença [31,32]. A população histiocítica tem sido usada como marcador da enzima lisosima (lys) e da proteína S-100 antígeno-específica do tecido nervoso. A interação entre as células apresentadoras de antígenos e linfócitos resultaria na liberação de fatores estimulantes de células T, como a interleucina 2 (IL-2). Linfocinas liberadas por linfócitos ativados poderiam então atrair, fixar e ativar macrófagos no foco inflamatório. Os macrófagos ativados apresentariam aumentada a sua capacidade de matar o fungo, secretar citocinas e então se diferenciaria em células epitelióides de células gigantes. Ainda, o granuloma mostra um número variável de células NK e eosinófilos, cujas principais proteínas envolvem as células fúngicas e podem participar na morte dos parasitas [33].

Finalmente, ao redor dos tubérculos há numerosos linfócitos B e células plasmáticas que são principalmente produtoras de IgG. Os anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* produzidos localmente difundem para o granuloma e imunoprecipitam o antígeno, facilitando a sua eliminação e prevenindo a difusão dos componentes fúngicos.

As principais células efetoras no granuloma paracoccidióidico são os linfócitos T, dos subsets helper e citotóxico, macrófagos ativados, incluindo células gigantes e epitelióides, leucócitos polimorfonucleares ativados, ambos neutrófilos e eosinófilos, células NK, linfócitos B e células plasmáticas. Mais recentemente, vários dados *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado o papel exercido pelas citocinas tipo Th1 e Th2 na defesa do hospedeiro na PCM: i) Citocinas Th1 (γ -interferon, IL-2, IL-12) são associadas com resistência do hospedeiro contra a infecção; ii) Citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β) são associadas com a suscetibilidade do hospedeiro à infecção; iii) a detecção *in situ* de citocinas em modelos mu-

rinós de PCM tem revelado associação entre a presença de IFN- γ e resistência e IL-4 e suscetibilidade à infecção [34,35,36,37]. Entretanto, alguns estudos adicionais não têm mostrado uma polarização nas formas progressiva e regressiva em PCM humana e experimental.

O significado destas regulações e interações celulares e o papel exercido pela imunidade celular nas defesas do hospedeiro contra *P. brasiliensis* ao nível tecidual são observados em estudos *in vitro* realizados em pacientes com PCM, tais como a reduzida expressão de receptores de IL-2 nas células T no sangue periférico [38] e aumento da atividade fungicida de macrófagos pulmonares induzida por linfocinas [39], aumento da capacidade fungicida dos neutrófilos periféricos em camundongos [40]. Em concordância com esses dados estudos sobre imunização protetora na PCM têm indicado correlação positiva entre elevada resposta imune celular e restrição da infecção e no número de células fúngicas nos granulomas [41,42].

Imunoestimulantes de linfócitos T (levamisole, IFN- γ) têm sido utilizados em modelo murino experimental de PCM disseminada. Os resultados indicam restauração e manutenção parcial da resposta celular imune com um curso mais benigno [43]. O mesmo efeito tem sido obtido com fator de transferência de animais especificamente sensibilizados ou de animais normais [44].

No homem, glucanas de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido testadas em conjunto com drogas antifúngicas no tratamento das formas graves de PCM. O uso deste imuno estimulante não específico resulta em forte resposta ao tratamento com rápida cura e diminuição no número de recaídas [45].

Estes estudos pioneiros em imunoestimulação têm aberto novas vias para o tratamento baseado no uso da própria defesa do hospedeiro. Estudos dos mecanismos imunoregulatórios e as interações entre linfócitos e macrófagos na PCM são recentes. Estas são áreas que estão sendo desenvolvidas e que darão importantes contribuições a compreensão da patogênese desta micose.

IMUNODIAGNÓSTICO

No controle de uma infecção suspeita de PCM nenhum teste diagnóstico é superior ao isolamento do agente etiológico a partir de espécimes clínicos ou sua inequívoca identificação física nos espécimes clínicos e/ou em cortes histopatológicos do

tecido invadido. Entretanto, essas situações ideais nem sempre são possíveis e, então, diagnósticos baseados em testes sorológicos são indicados. No caso da PCM, testes sorológicos, como imunodifusão, são tão importantes que um teste positivo, mesmo em título baixo, é indicativo de infecção.

Nas últimas décadas temos visto uma expansão crescente no campo da imunologia permitindo o desenvolvimento de novas técnicas que foram gradualmente sendo adotadas por pesquisadores interessados no diagnóstico de doenças fúngicas. Vários métodos vêm sendo usados como possíveis ajudas em algumas infecções micóticas, principalmente na PCM. Muitos desses testes utilizam anticorpos poli ou monoclonais ou antígenos que podem ser facilmente quantificados com alta sensibilidade e tem resultado em métodos com melhor sensibilidade e especificidade.

O emprego com sucesso dos testes sorológicos para diagnóstico das infecções micóticas é muito importante devido à incidência e mortalidade das micoses, particularmente aquelas causadas por fungos oportunistas que têm mostrado um incrível aumento nos últimos anos, principalmente em doenças como a AIDS, câncer e hematológicas. Isto enfatiza a utilidade de técnicas padronizadas e antígenos como instrumentos diagnósticos na avaliação clínica e laboratorial de pacientes com suspeitas de infecções fúngicas. Antígenos fúngicos são de grande interesse não apenas para o estudo de suas propriedades fundamentais, mas também devido ao seu uso como reagentes para diagnóstico.

Nos últimos anos, a literatura científica sobre imunologia das micoses mostra um aumento dos trabalhos sobre testes sorológicos e diferentes preparações antigênicas. No início dos anos 80, Restrepo [46] revisou a extensa literatura sobre o sorodiagnóstico da PCM e no princípio dos anos 90, Mendes-Giannini et al. [47] escreveram um excelente capítulo sobre o assunto. Entretanto, no início dos anos 70, Fava Neto [48] e Negroni [49] também documentaram os problemas sobre os antígenos para diagnóstico de PCM.

Antígenos

Por muitos anos, diferentes preparações antigênicas têm sido utilizadas para o sorodiagnóstico da PCM. Entretanto, estes antígenos diferem em suas padronizações de laboratório para laboratório e incluem extratos sonificados de células leve-

duriformes, filtrados concentrados ou liofilizados, para citar apenas alguns. Ainda mais, cada antígeno é preparado com células cultivadas em diferentes meios de cultivo e sob diferentes condições, tais como o tempo de incubação, temperatura, tamanho do inóculo inicial, cultura estacionária ou sob agitação. É possível que diferentes preparações de antígenos possam variar consideravelmente em atividade e qualidade como resultado da falta adequada de padronização de lote para lote. Por outro lado, diferentes cepas de *P. brasiliensis* podem produzir diferentes quantidades e qualidade de antígenos, uma resposta que também é influenciada pelo meio de crescimento. Com esta variedade de problemas, não é surpresa que haja considerável discordância quanto à sensibilidade dos testes para imunodiagnóstico da PCM [50, 51, 52, 53, 54, 55, 56].

A mais importante contribuição na sorologia da PCM foi a identificação da glicoproteína de 43 kDa (gp43), inicialmente designada como um antígeno diagnóstico específico [57]. Esta glicoproteína é idêntica ao antígeno E₂ descrito primeiramente por Yarzabal et al. [58] e é na verdade a molécula responsável pela imunoprecipitação específica no teste de ID (banda 1) descrito por Restrepo e Moncada [59] e o arco E obtido em testes de imunoelektroforese, descrito por Restrepo e Drouhet em 1970 [54]. A gp43 é o principal exoantígeno do *P. brasiliensis* e sua síntese ao nível de ribossomos é feito por transporte ativo à membrana celular, onde é excretado por simples exocitose ou por lomasomos [60].

A especificidade dos testes sorológicos depende, sobretudo do antígeno usado. Antígenos brutos de *P. brasiliensis* têm componentes que são comuns com outros fungos e desta maneira, soros de pacientes com outras infecções micóticas podem reagir cruzadamente com ele. Por esta razão, nos últimos anos esforços vem sendo feitos para a obtenção de boas preparações antigênicas que possam ser utilizadas com especificidade e alta sensibilidade. Camargo et al [61] padronizaram o processo para produzir preparação antigênica útil para o sorodiagnóstico da PCM. O exoantígeno obtido depois de 7 dias de crescimento celular mostrou ser ideal para teste de imunodifusão e foi denominado de Ag7. Esta preparação antigênica foi obtida com a amostra B-339, conhecida desde os anos 60 por produzir antígenos estáveis. A escolha de culturas de 7 dias foi devido ao fato de que o crescimento está na metade da fase exponencial, antes

do decréscimo do número de células viáveis, quando começa a autólise com liberação de proteases, o que promove degradação das proteínas. Neste protocolo, o principal componente do exoantígeno é a gp43, o antígeno imunodominante. Com o passar dos anos a metodologia inicial foi modificada de modo a simplificar o processo de produção do Ag7 para ser acessível a todos os laboratórios, mesmo aqueles com poucos recursos. Atualmente, preparamos o Ag7, semeando o total do crescimento de 5 a 10 tubos de cultura do fungo em sua fase leveduriforme em 500 ml de meio e cultivando-o durante 7 dias, sob agitação constante, a 35°C. O fungo é morto com mertiolate, a cultura é filtrada em papel de filtro e o filtrado obtido é concentrado 20 a 30 vezes, dializado e a concentração protéica estimada. Neste momento o Ag7 é testado contra uma bateria de soros previamente confirmados de PCM. Se todos os soros selecionados mostram reação positiva, este antígeno é alicotado e conservado a 20°C até uso. Entretanto, se algum soro controle não reage, o antígeno é novamente concentrado e testado novamente. Em geral, o teor protéico é de 300 a 500 µg/ml (pelo método de Bradford) [62]. Em nossa experiência, gp43 é abundantemente secretada após sete dias de cultivo em diferentes meios. Em quase todas as preparações, quando o exoantígeno é analisado por meio de SDS-PAGE a gp43 representa de 80-90% da preparação.

Imunodifusão

Durante os últimos anos o teste de imunodifusão (ID) tem sido o teste de escolha para o diagnóstico inicial de pacientes suspeitos de PCM. O teste apresenta alta especificidade e sensibilidade podendo variar de 65 a 100% dependendo do tipo de antígeno utilizado [47, 63]. Recentemente, o antígeno Ag7 foi testado por um grupo internacional de pesquisadores com o objetivo de fornecer a laboratórios regionais, nas áreas endêmicas, um teste simples, sensível e específico para diagnóstico rápido e barato da PCM [64]. Os resultados mostraram que o teste de ID apresentou 84,3% de sensibilidade e 98,9% de especificidade, concluindo que naquelas condições o Ag7 pode ser visto como um importante instrumento diagnóstico na PCM. Entretanto, em nosso laboratório, resultados falso negativo ocorrem em 2 a 3 %, sendo que estas observações também foram relatadas por outros pesquisadores [65]. Nestes casos, os pacientes têm doen-

ça grave principalmente com grande comprometimento pulmonar. Por outro lado, o diagnóstico é facilmente fornecido pelo encontro de leveduras multibrotantes no escarro onde o *P. brasiliensis* é abundante e facilmente encontrado pelo exame direto com KOH a 30%. É nossa opinião que nessas situações e no momento do diagnóstico o sistema imune do paciente está deprimido e não há suficiente quantidade de anticorpos específicos para precipitar. O teste intradérmico com paracoccidioidina também é negativo. Então, o paciente recebe o tratamento inicial e depois de um período de 1 a 2 meses a imunidade é restaurada e o teste de ID torna-se positivo.

Outros testes para a sorologia da PCM são empregados dependendo da disponibilidade e exequibilidade de cada laboratório. Entre eles podemos citar a contraímunoeletroforese (47, 66), testes imunoenzimáticos tipo ELISA e variações e imunoblotting (67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75).

Seguimento sorológico do paciente

Não há consenso entre os médicos sobre o seguimento sorológico dos pacientes de PCM em tratamento com antimicóticos. Cada grupo adota seu próprio procedimento de acordo com sua experiência, de modo que diferentes protocolos são adotados. Mendes-Giannini et al. [47] mostraram por Western blotting uma queda significativa de anticorpos (IgG) anti-gp43 durante o tratamento bem sucedido, enquanto que um aumento ocorria nos momentos de recaídas. Camargo et al. [72] também utilizando Western blotting demonstrou que anticorpos anti-gp43 e gp70 diminuíam significativamente em pacientes em tratamento e ambas moléculas podem ser consideradas marcadoras para a PCM humana.

Mendes-Giannini et al [69] demonstraram que a queda de anticorpos IgG, IgA e IgM anti-gp43, por ELISA, correlaciona-se positivamente com a melhora clínica. Num série de estudos, Campos et al. [76, 77, 78] demonstraram que é difícil correlacionar os testes de fixação do complemento (FC) e imunofluorescência indireta (IFI) com a remissão clínica em avaliação a longo tempo de pacientes com PCM. Campos et al. [79] analisaram e compararam os testes de FC, contraímunoeletroforese (CIE), ID e Magnetic ELISA (MELISA) no seguimento sorológico de pacientes com PCM. Correlação positiva foi observada entre CF e CIE com manutenção ou recaída da PCM. MELISA e ID foram capazes de di-

ferenciar remissão de manutenção ou recaída nestes pacientes. Este fato não foi observado com FC e CIE. Soros anticomplementares em testes de FC foram identificados por ID e MELISA. Então, neste estudo, ID e MELISA representam vantagem alternativa ao teste de FC no diagnóstico e durante o seguimento dos pacientes com PCM. Mendes [80] reestudaram os testes sorológicos de ID, CIE, FC e IFI antes e durante o seguimento de pacientes. A comparação os testes sorológicos de acordo com a sequência de diluições e considerando as diferenças significantes de mais de uma diluição, revelaram que a concordância entre os testes variava de 54 a 80,3%. O tempo necessário para atingir resultados negativos foi de 15 a 19 meses, por dados de IFI. Os autores enfatizam que o tratamento precisa ser mantido por um ano após a negatização da sorologia. Alves [81] analisaram e compararam 3 métodos diferentes para o seguimento dos pacientes de PCM, ID, ELISA, e ELISA de captura (IgG). Os soros foram coletados antes do tratamento, aos 6, 12 e 18 meses de terapia. O estudo concluiu que os títulos obtidos por ID e ELISA de captura apresentaram uma queda significativa depois de 6 meses nos pacientes com boa evolução clínica, enquanto que no ELISA os títulos caíam apenas após 12 meses de tratamento. Entretanto, nenhum teste foi capaz de detectar recaída nesses pacientes. O autor concluiu que o teste de ID era a melhor opção entre os 3 testes estudados para o seguimento sorológico de pacientes com PCM.

Detecção de antígenos

No passado alguns investigadores tentaram detectar antígenos circulantes em pacientes com PCM usando diferentes modalidades de ensaios sorológicos. Entre eles, o ELISA de competição (82), testes radioimunológicos (83), CIE (84), imunoeletroforese-imunodifusão (85), inibição de hemaglutinação (86), imunoeletroforese linear invertida (87) e immunoblotting (88). Gómez et al. (89) foram os primeiros a usar anticorpos monoclonais para detectar antígeno circulante de 87 kDa em soros de pacientes de PCM por meio do teste de inibição de ELISA (inb-ELISA).

Detecção de antígenos em soro (gp43 e gp70).

Um dos principais problemas no sorodiagnóstico da PCM baseado na detecção de anticorpos é a reatividade cruzada com soros de pacientes com outras micoses,

principalmente com histoplasmose e doença de Jorge Lobo. Testes baseados em ID são geralmente considerados altamente específicos para diagnóstico, mas são poucos sensíveis, entre 65 e 100 % dependendo do tipo de antígeno empregado nos testes [90]. Por outro lado, testes com sensibilidade maior, como os imunoenzimáticos, apresentam problemas associados com especificidade devido à reatividade cruzada com soros de pacientes com outras micoses.

Uma metodologia mais racional para o diagnóstico de PCM pode ser a detecção de antígenos em soros e outros fluidos de pacientes suspeitos. A gp43 é o principal antígeno diagnóstico de PCM e foi pesquisada no passado por meio de diferentes testes, que variavam em sensibilidade e especificidade. A maioria dessas tentativas utilizou pequeno número de pacientes e, portanto, nenhuma ficou consolidada.

Mendes-Giannini et al. [88] detectou o antígeno gp43 em "pools" de soros de pacientes com PCM por meio da técnica de Western blot, mas nenhuma quantificação foi determinada. Freitas da Silva e Roque-Barreira [82] utilizando o teste de ELISA de competição detectou antígenos circulantes em 33,7% de 88 soros de pacientes de PCM, cujos níveis variaram de 0,03 a 3,4 µg/ml. Entretanto, reações cruzadas foram obtidas com soros de pacientes com aspergilose, criptococose e histoplasmose. O estudo mais refinado sobre antigenemia na PCM foi desenvolvido por Gómez et al. [89] usando anticorpos monoclonais anti-molécula de 87 kDa, por meio do teste de inibição de ELISA com resultados promissores.

Recentemente, nosso laboratório padronizou o teste de inibição de ELISA para detecção de gp43 no soro de pacientes com PCM conseguindo sua detecção em concentrações que variaram de 0,0053 a 30 µg/ml. A sensibilidade do teste foi de 95,1% e como maior sensibilidade em pacientes da forma aguda da PCM (100%) com concentração média de gp43 em 18,23 µg/ml. Entre os pacientes com a forma crônica, gp43 foi detectada em 95,71%, com concentração média de 8,55 µg/ml.

Nossos resultados mostraram que o teste para detecção de gp43 pode ser utilizado em ambas formas clínicas da doença. O teste fornece uma maneira rápida, sensível e específica de diagnóstico de PCM e ainda pode ser usado no seguimento sorológico dos pacientes sob medicação antifúngica pelo monitoramento da

concentração da gp43 no soro.

A detecção de gp43 em baixas concentrações em alguns soros humanos normais pode representar infecção subclínica na população de áreas endêmicas. Infecção subclínica é definida como uma infecção assintomática causada pelo *P. brasiliensis* em indivíduos normais que vivem em áreas endêmicas e têm prova positiva em teste intradérmico com paracoccidiodina [91]. Teste positivo de intradermorreação com paracoccidiodina na população saudável varia de 3,70 a 62,60%, dependendo da preparação antigênica utilizada [92]. Em estudos prévios, usando gp43 purificada como antígeno para intradermorreação ou o antígeno polissacarídico de Fava Netto verificamos positividade de 5% com ambas preparações [93].

Outro antígeno especial pesquisado em fluidos biológicos de pacientes com PCM é a molécula de 70kDa. Neste sentido, em estudos recentes verificamos que a detecção da gp70 em 81 amostras de soros de pacientes com PCM apresentou sensibilidade de 98,8%, com concentração média de 8,19 µg/ml, alcançando 100% nos pacientes com a forma aguda (concentração média = 11,86 µg/ml). Entre os pacientes com a forma crônica multifocal a sensibilidade foi de 98,43% (média = 7,87 µg/ml) e nos pacientes com a forma unifocal foi de 100%, com média de 4,83 µg/ml. Nenhuma reação cruzada foi observada com soros de pacientes com outras micoses.

Detecção de antígeno no líquido

O envolvimento do sistema nervoso central na PCM (neuroPCM) é secundário à disseminação hematogênica do fungo. NeuroPCM normalmente ocorre como manifestação de doença amplamente disseminada, mas ocasionalmente o sistema nervo central pode ser o único local da infecção. Nem sempre o sistema nervoso central é envolvido, entretanto, métodos neuro-radiológicos como tomografia computadorizada e imagens por ressonância magnética são necessários para identificar lesões que se expandiram para o cérebro. Neuro-PCM é normalmente representado por lesões múltiplas ou únicas que leva à deficiências motoras ou sensoriais, paralisia, mudanças mentais e hipertensão intracranial [48,49]. Entretanto, o diagnóstico definitivo de neuroPCM só pode ser definido depois da visualização do fungo em material de biópsia, isolamento do fungo ou por métodos sorológicos. Considerando a morbidade associa-

da com os procedimentos neurológicos, os médicos não estão propensos a indicar aspiração ou biópsias de lesões cerebrais. Entretanto, testes sorológicos sensíveis e específicos que determinam a presença de *P. brasiliensis* no líquido são indispensáveis. Marques-da-Silva et al. [94] detectaram gp43 e gp70 circulantes em líquido de pacientes com neuroPCM, com concentração média de 19,3 g/ml e 6,8g/ml, respectivamente. Estes resultados sugerem que o monitoramento de antígenos específicos de *P. brasiliensis* pode ser útil para definir o diagnóstico de neuroPCM. Por outro lado, a detecção de anticorpos no líquido mostrou-se negativo por meio do teste de imunodifusão, mas foi positivo, embora em títulos baixos, quando testado por ELISA. Estes dados, mesmo sendo originado de um número pequeno de pacientes (n=14) leva-nos a admitir que a detecção de antígenos por inibição de ELISA ou a detecção de anticorpos por ELISA convencional pode ser igualmente sensível para diagnóstico de neuroPCM. Desde que os valores para a gp43 foram sempre superiores do que os encontrados para a gp70, teste detectando apenas gp43 é suficiente para propósito diagnóstico.

Deteção de antígeno em lavado bronco-alveolar

Também, o teste de inibição de ELISA foi aplicado para detectar gp43 e gp70 em lavado bronco alveolar (LBA) [95]. Neste sentido, pacientes com PCM forneceram amostras de LBA e gp43 e gp70 foram detectadas em todas as amostras com concentração média de 9,38 µg/ml and 4,37 µg/ml, respectivamente. Amostras de LBA de pacientes com outras micoses não PCM forneceram resultados negativos. Estes resultados sugerem que o monitoramento de antígenos específicos de *P. brasiliensis* em amostras de LBA pode ser útil no diagnóstico de PCM pulmonar especialmente quando a infecção está em seu estágio inicial. Anticorpos não foram detectados em amostras de LBA quando testadas por imunodifusão.

Deteção de antígenos na urina

Até o momento, poucos relatos sobre a detecção de *P. brasiliensis* em urina foram descritos. Gp43 foi detectada em urina de pacientes com PCM e esta molécula foi detectada precocemente na urina de um paciente com a forma aguda da doença [96]. Gómez et al. [89] empregando o teste de inibição de ELISA relataram a presença de um antígeno de 87 kDa em urina, mas o

teste apresentou baixa sensibilidade. Marques da Silva [53] empregando teste de inibição de ELISA relata a detecção de gp43 (média = 8.65 µg/ml) and gp70 (média = 8.96 µg/ml) em urina de pacientes com PCM com 87.5% sensibilidade e 100% especificidade a ambas as moléculas. Nenhuma reação cruzada foi observada quando urina de pacientes com outras micoses foram testadas (histoplasmose, candidíase e criptococose). Apesar da alta sensibilidade esses antígenos não puderam ser detectados em 12,5% das amostras de urinas testadas.

Antigenemia durante terapia antifúngica

Não há consenso sobre o tempo ideal para o tratamento antifúngico para pacientes com PCM, mas várias publicações concordam que a detecção de anticorpos circulantes é um importante parâmetro para definir o tempo de parar com o tratamento antifúngico. Entretanto, pacientes com PCM têm uma forte resposta contra gp43 que pode persistir por muito tempo. Em contraste, alguns pacientes, dependendo do seu status imunológico são sorologicamente negativos no momento do diagnóstico e outros mostram baixos níveis de anticorpos específicos por longo período de tempo. Conseqüentemente, algumas vezes é difícil determinar se estes pacientes estão realmente curados [97].

Um dos principais alvos em PCM é estabelecer quando o médico deve para a terapêutica antimicótica porque não há consenso acerca de opções de tratamento ou mesmo quando o paciente está realmente curado. Embora a cura de lesões aparentes possa ocorrer dentro de um período curto de tempo depois de iniciado o tratamento, terapias longas são desejadas a fim de se evitar recidivas. Nestes casos, a resposta do hospedeiro precisa ser monitorada por métodos indiretos e, neste cenário, sorologia provê informações sobre prognóstico.

Devido a limitações dos testes de detecção de anticorpos, alguns pesquisadores têm avaliado a performance dos testes de detecção de antígenos circulantes de *P. brasiliensis* no diagnóstico de PCM. Alguns destes testes foram usados para detectar gp43 tiveram sucesso parcial.

Recentemente estudamos o comportamento da antigenemia por gp43 durante o tratamento de pacientes de PCM com Itraconazol (ITZ) até a cura aparente ao fim da terapia, depois de 8 a 12 meses [98]. PCM é uma infecção crônica que en-

volve o sistema retículo endotelial (SRE) assim como os pulmões. A definição de cura ou boa resposta clínica é algumas vezes difícil estabelecer considerando a baixa sensibilidade de culturas, seqüelas e limitações relacionadas à avaliação do status do SRE. Como conseqüência há consenso de que métodos outros que não envolvem cultura são excelentes instrumentos para melhor avaliar a resposta à terapia. Neste estudo, avaliamos os níveis de antígenos em 23 pacientes que foram tratados com sucesso com ITZ. A definição de uma boa resposta ao tratamento foi baseada na resolução de todos os sintomas e sinais relacionados à infecção, assim como na melhora dos achados radiológicos. É importante salientar que durante o período de 12 meses de tratamento e seguimento sorológico, nenhum paciente teve evidências de recaída ou de sinais radiológicos. Embora não fossemos capazes de avaliar o comportamento dos títulos de antígenos durante período de recaída da infecção, melhora clínica de todos pacientes foi seguida pela queda de níveis de antígenos a <5 µg/ml. Estes achados fortemente sugerem que antigenemia por gp43 pode ser um útil instrumento para monitorar a resposta terapêutica ao tratamento antifúngico. Resultados muito semelhantes foram obtidos quando a gp70 foi pesquisada nesses mesmos pacientes [99].

Conclusões

A PCM pesquisada por muitos cientistas e com alguns aspectos elucidados, ainda continua sendo um enigma em seus mecanismos de patogenicidade o que nos leva a continuar estudando seu agente etiológico, que mesmo fazendo 100 anos em 2008, o "velho *P. brasiliensis*" continua charmoso e atraindo muitos jovens para as bancadas.

A padronização de modelos experimentais, utilizando camundongos resistentes ou suscetíveis geneticamente controlados tem clarificado muitos aspectos da relação hospedeiro-parasita nas micoses. A identificação do gene da gp43 e a subseqüente síntese da molécula tem encorajado experimentos sobre vacinas em modelos experimentais e os resultados iniciais são promissores. A melhor compreensão da biologia molecular de parasitas tem aberto novos horizontes para o uso de ferramentas modernas na identificação de fungos em amostras fúngicas, como a hibridização "in situ" em biópsias, assim como análise molecular de isolados fúngicos do homem ou de solo. Finalmente, a imu-

nopatogênese da inflamação granulomatosa fúngica tem sido profundamente investigada usando anticorpos monoclonais para a identificação dos componentes celulares envolvidos na inflamação e as citocinas localmente secretadas, assim como o uso de animais experimentalmente depletados de células e receptores para os mediadores. O diagnóstico baseado na detecção de anticorpos é útil para diagnóstico de micoses sistêmicas, principalmente PCM e sua sensibilidade e especificidade dependem do antígeno e do teste utilizado. Infelizmente, há testes de detecção de anticorpos que utilizam antígenos brutos que apresentam baixa especificidade e sensibilidade. Conseqüentemente ocorre reatividade cruzada na sorologia das doenças micóticas. Isto limita o valor dos testes de detecção de anticorpos baseados em misturas de antígenos brutos. Atualmente, as principais moléculas de *P. brasiliensis* podem ser purificadas e testadas para o imunodiagnóstico, por exemplo, os antígenos de 43 kDa e 70 kDa de *P. brasiliensis*, que estão sendo usados e testados em suas formas nativas ou quimicamente tratados, com resultados muito promissores. Por outro lado, moléculas recombinantes também estão sendo ensaiadas em vários testes sorológicos. O diagnóstico de PCM por meio da detecção de antígenos circulantes é método relativamente recente e os ensaios por meio de inibição de ELISA tem-se mostrado excelente para esse propósito. Assim moléculas de 43 e 70 kDa podem ser detectadas em soro, líquido, lavado brônquio alveolar e em urina de pacientes com PCM e prover diagnóstico específico.

REFERENCES

- Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol* 1985;23:323-334.
- McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 1987;25:165-175.
- Bustamante B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sa-bouraudia* 1985;23:407-414.
- Franco M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1987;25:5-18.
- Montenegro MRG. Formas clínicas da paracoccidioidomycose. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1986;28:203-204.
- Zaccharias D, Ueda A, Moscardi-Bacchi M, Franco M, San-Blas G. A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J Med Vet Mycol*; 1986;24:445 - 454.
- Franco M, Peraçoli MT, Soares A, Montenegro MR, Mendes RP, Meira, DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5:115 149.
- Londero A T. Epidemiologia. In *Paracoccidioidomycosis*, Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM, eds. Sarvier-EDUSP, São Paulo, 1982, cap. 7
- Mendes-Giannini MJS, Moraes RA, Ricci TA. Proteolytic activity of 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990; 32: 384- 385.
- Vicentini AP, Gesztesi J-L, Franco MF, Souza W, Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Biding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immunol* 1994; 1465-1469.
- Brito T, Carvalho RPS, Castro RM, Furtado JS. Pathogenesis of experimental paracoccidioidomycosis. *PAHO Scient Publ* 1972; 254:257 260.
- Mendes-Giannini MJS, Ricci LC, Vemura A, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1994;189-197.
- Martinez R, Moya MJ. Associação entre paracoccidioidomycose e alcoolismo. *Rev Saúde Publ São Paulo* 1992; 26:12 16.
- Goldani LZ, Vanucchi H, Zucoloto S, Martinez R. Experimental paracoccidioidomycosis in alcoholic rats. *Braz J Med Biol* 1991;24:902-907.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover P, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immunol* 1984; 46:346 - 353.
- Kashino SS. Efeito do Bloqueio do Sistema Mononuclear Fagocítico na Paracoccidioidomycose Experimental em Camundongos Resistentes e Suscetíveis ao Fungo, Thesis, University of São Paulo, Institute of Biociences, São Paulo, 1989
- Periassu D. O sistema retículo-endotelial na blastomycose sul americana experimental da cobaia. Sua importância no tratamento sulfanilâmido. *J Bras Med* 1962; 6:503 505.
- Calich VLG, Vaz CAC, Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Brit J Exp Path* 1985;66:57 - 65.
- Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol* 1992;30: 161 - 168.
- Gohman-Yahr, Rothenberg A , Avila-Millán e, Rosquete R, Albomoz MC, Kanski A, Pereira K, Gómez MA, Román A, San Martín B. Las células fagocitárias. Su funcionamiento en las enfermedades granulomatosas por agentes vivos. El modelo de la paracoccidioidomycosis. *Ciencia Tec Venez* 1985;2: 193- 198.
- Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 161- 168.
- Brummer E, hanson LH, Stevens DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis*: evidence for nonoxidative mechanisms. *Intern J Immunopharmacol* 1988;10: 945 - 952.
- Peraçoli MTS, Soares AMVC, Mendes RP, Marques SA, Pereira PCM, Rezkallah-Iwasso MT. Studies of natural killer cells in patients wit paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1991;29:373 - 380.
- Calich VLG, Singer-Vermes LM, Russo M, Vaz CAC, Burger E. Immunogenetic in Paracoccidioidomycosis. In *Paracoccidioidomycosis*, Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G eds. 1994 CRC Press, Boca Raton Fla USA.
- Munk ME, Kajdacsy-Balla A, Del Negro G, Cuce LC, Silva WD. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1992;30:317 321.
- Brito T, Franco MF. Viewpoint. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med trop São Paulo* 1994; 36: 185-192.
- Fava Netto C. Contribuição ao estudo imunológico da blastomycose de Lutz. *Rev Inst Adolpho Lutz* 1961; 21:99 - 114.
- Lacaz CS. Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidioidomycose. In *Paracoccidioidomycose*. Del Negro G, Lacaz CS, Fialho AM Eds. Sarvier-EDUSP, São Paulo, 1982, chap.13.
- Miyaji M, Nishimura K. Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic nude mice infected with *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 1983; 82: 129 141.
- Londero AT, Santos W, Silva LA, Romero CD. Paracoccidioidomycose associada a droga imunossupressora em paciente com lupus eritematoso sistêmico. *J Pneumol* 1987;13: 224 227.
- Franco MF, Moscardi-Bacchi M, Bacchi CE, Defaveri J, Peraçoli MS, Biagioni L. Pathogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis* granuloma, in *Proc Cong Int Soc Med Vet Mycol*, Barcelona, 1988, 138.
- Moscardi-Bacchi M, Soares A, Mendes R, Marques S, Franco M. In situ localization of T lymphocytes subsets in human paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1989;27: 149 158.
- Wagner JM, Franco M, Kephart GM, Gleich GJ. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 66-72.
- Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998;31: 615-623.
- Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CG, Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VLG. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immunol* 1998; 66: 800-806.
- Silva CL, Silva MF, Faccioli LH, Pietro CL, Cortez AE, Foss NT. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 1995; 101; 314-320.
- Defaveri J, Zapparoli D, Campos BGA, Stefanini MC, Pinto FG. Cinética inflamatória na hipersensibilidade pulmonar induzida em camundongos pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. VI Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis. II Simposio Iberoamericano sobre relacion Hongo-hopedeiro. Montevideo, Uruguai. 1996.
- Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Mendes RP, Guartale AA, Marques SA, Soares AMVC. Pesquisa da expressão de receptores para interleucina-2 em linfócitos de pacientes com paracoccidioidomycose. In *Proc Bras Cong Imunol*. Caxambu, Brazil, 1988, 559.
- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* 1988;140:2786 2789.
- McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leucocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 603 608.
- Moscardi-Bacchi M, Franco M. Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. III. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985;18:101 108.
- Kamegasawa A, Viero RM, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Protective effect of prior immunization on ocular paracoccidioidomycosis in guinea pigs. *Mycopathologia* 1988;103: 35 42.

43. Rezkallah-Iwasso MT, Mota NGS, Gomes ME, Montenegro MR. The effect of levamisole on experimental paracoccidioidomycosis in the hamster; immunological and histopathological correlation. *Mycopathologia* 1984;84:171-180.
44. Peraçoli MTS, Montenegro MR, Soares AMVC, Mota NGS. Transfer of cell-mediated immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* in hamsters with dialysable leukocyte extracts. *J Med Vet Mycol* 1990;28: 35-46.
45. Meira DA, Pereira PCM, Machado JM, Mendes RP, Barraveira B, Pellegrino J Jr., Rezakallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Castilho LM, Thomazini I, Silva CL, Foss, NT, Curi, PR. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:496-503.
46. Restrepo A. Procedimientos serológicos en la paracoccidioidomycosis. *Adel Microbiol Enf Infecc* 1984;3:182-211.
47. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GM, Siqueira AM. Serodiagnosis. In Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G (eds), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press-Boca Raton, Fla. 1994;345-363.
48. Fava Netto C. The serology of paracoccidioidomycosis: present and future trends. In *Paracoccidioidomycosis*. Proc First Pan Am Symp Medellín, Colombia. Sci Publ. No.254. Washington DC: Pan American Health Organization, 1972; 209-213.
49. Negroni R. Serologic reactions in paracoccidioidomycosis. Proc First Pan Am Symp Medellín, Colombia. Sci Publ. No.254. Washington DC: Pan American Health Organization, 1972; 203-208.
50. Brumer SO, Jalbert M, Kaufman L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. *J Clin Microbiol* 1984;19:404-407.
51. McGowan KL, Buckley HR. Preparation and use of cytoplasmic antigens for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1985;22:39-43.
52. Negroni R. Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas serológicas en la blastomycosis sudamericana. *Derm Ibero Latinoamericana* 1968;4:409-416.
53. Restrepo A, Cano LE, Ochoa MT. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. *J Med Vet Mycol* 1984;22:23-29.
54. Restrepo A, Drouhet, E. Étude des anticorps précipitants dans la blastomycose sud-américaine par l'analyse immunoelectrophoretique des antigènes de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1970; 119:338-346.
55. Restrepo A, Moncada LH. Indirect fluorescent antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol* 1972;24:132-137.
56. Yarzabal LA, Bout D, Naquira F, Fruit J, Andrieu S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia* 1977; 15:79-85.
57. Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun* 1986;53:199-206.
58. Yarzabal L, Bout D, Naquira F, Fruit J, Naquira S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia* 1977;15:79-85.
59. Restrepo A, Moncada LH. Characterization of precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol* 1974;28:138-144.
60. Campo Aasen I, Cabral NA, Yarzabal L. Subcellular localization of antigen E2 of *Paracoccidioides brasiliensis*. An immunoenzymatic electron microscopy study. *Sabouraudia* 1980;18:167-171.
61. Camargo ZP, Unterkircher CS, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2147-2151.
62. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
63. Cano LE, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987;29:276-283.
64. Restrepo A. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. *ISHAM Myc Newsletter* 1992;59:4.
65. Del Negro GMB, Benard G, Assis GM, Vidal MSM, Garcia NM, Otani C; Shikanai-Yasuda MA, Lacaz CS. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 113-116.
66. Del Negro GMB, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MIN, Aguiar MSM, Lirio V, Lacaz CS. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991;33:277-280.
67. Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1984;20:103-108.
68. Camargo ZP, Guesdon J-L, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia* 1984, 81:31-37.
69. Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yassuda MA, Stolf AMS, Masuda A, Amato-Neto V, Ferreira AW. Antibody response to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 200-206.
70. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, and Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol* 1991;29:1610-1615.
71. Camargo ZP, Geszteszi J-L, Saraiva ECO, Taborca CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2377-2381.
72. Camargo ZP, Unterkircher CS, Travassos ZP. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol* 1989;27: 407-412.
73. Ortega G, Villanueva E, Preira J, Salma N, Albornoz MB. Characterization of de *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. Serological immunodiagnosis using Western blotting. *Acta Cient Venez* 1992; 43: 355-359.
74. Mendes-Giannini MJS, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Stolf AMS. Immunochemical study of *Paracoccidioides brasiliensis* by Western blotting. *Proc Enc Int Paracoccidioidomycosis*. Medellín, Colombia. 1986; 83.
75. Blotta MHSL, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:671-676.
76. Campos EP, Sartor JM, Hecht M & Franco MF. Aspectos clínicos e evolutivos de 47 doentes tratados pela Anfotericina B. *J Clin Microbiol* 1984;26: 212-216.
77. Campos EP, Torchio LN, Lima PRL, Gomes FCB, Ferracin ACM, Schellini RC & Bacchi CS. Paracoccidioidomycose genital feminina. Descrição de um caso clínico. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1986;28:56-60.
78. Campos EP & Cataneo AJM. Função pulmonar na evolução clínica de 35 doentes com paracoccidioidomycose. *Rev inst Med Trop S Paulo*; 1986;28:330-336.
79. Campos EP, Dib Neto, J, Unterkircher C & Camargo ZP. Serological evaluation in follow up of the paracoccidioidomycosis patients. *Rev Microbiol S Paulo*; 1990;21:11-17.
80. Mendes RP; Defaveri J, Sene MG, Rodrigues DR, Souza LR, Marcondes-Machado J & Meira DA. Serological follow up of paracoccidioidomycosis (PBM) patients under treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (suplemento 1) p.459. (resumo 215 TL).
81. Alves JR. Comparação entre três métodos sorológicos no seguimento de pacientes com paracoccidioidomycose. Tese de mestrado. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); 1996.
82. Freitas-da-Silva G, Roque-Barreira MC. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:381385.
83. Ferreira-da-Cruz MF, Galvão-Castro B, Daniel-Ribeiro CT. Sensitive immunoradiometric assay for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in human sera. *J Clin Microbiol* 1991; 29:12021205.
84. Rodrigues M C, Cassaguerra CM, Lacaz CS. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. Probable demonstration of circulating antigen by counterimmunoelectrophoresis test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26:285-287.
85. Garcia N M, Del Negro GB, Martins HP, Lacaz CS. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* circulating antigens by immunoelectrophoresis-immunodiffusion technique. Preliminary report. *Rev. Med. Trop. São Paulo* 1987; 29:327328.
86. Magaldi S W, Mackenzie DWR, Albornoz MB. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* circulating antigen by the passive hemagglutination inhibition in patients sera, p. 18. In *Proceedings Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis*. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, 1989. Caracas, Venezuela.
87. Magaldi S W, Mackenzie DWR. Detección de antigenemia y anticuerpos de *Paracoccidioides* mediante procedimientos electroforéticos invertidos, p. 80. 1986. In *Proceedings Colóquio Internacional sobre la Paracoccidioidomycosis*. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.
88. Mendes-Giannini M J S, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. 1989. Detection of the antigen 43,000-molecular weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27:28422845.
89. Gómez B L, Figueroa JL, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay EJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol* 1997; 35:32783283.
90. Cano L E, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 29:276-283.
91. Franco M., R.P. Mendes, M. Moscardi-Bacchi, M.T. Rezkallah-Iwasso. M.R. Montenegro. *Paracoccidioidomycosis*. *Baillieres Clin Trop Commun Dis* 1989; 4: 185.
92. Fava S.C., C. Fava Netto. 1998. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 40: 155-164.
93. Saraiva, E.C.O., Altamiani, A. Franco, M.F., Unterkircher C.S. & Camargo, Z.P. 1996. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J MedVet Mycol*, 34: 155-161.
94. Marque-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2005; 43:46804683.
95. Marques-da-Silva, S H, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Balthazar A B, Lopes JD, Camargo ZP. 2006. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vac Immunol* 13:1363-1366.
96. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GM, Siqueira AM. Serodiagnosis. Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G (eds), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press. Boca Raton, Fla. 1994; 345-363.
97. Franco M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet Mycol.* 1986;25: 5-18.
98. Marques da Silva SH, Queiroz-Telles F., Colombo AL, Blotta MHSL, Lopes JD, Camargo ZP. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J Clin Microbiol* 2003; 42:2419-2424.
99. Marques da Silva SH, Mattos Grosso, D., Lopes JD, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow up of patients undergoing antimycotic therapy. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4480-4486.

Bacteriologia Geral

Foi lançado recentemente pela Editora Guanabara-Koogan o livro *Bacteriologia Geral*, das professoras da Universidade Federal do Rio de Janeiro Alane Beatriz Vermelho, Maria do Carmo de Freire Bastos e Marta Helena Branquinha de Sá.

O livro apresenta 582 páginas e o conteúdo é dividido em 10 Capítulos que enfocam os aspectos principais do estudo de processos básicos da célula bacteriana. Após uma introdução aos principais grupos taxonômicos bacterianos, os capítulos abordam a Citologia, Nutrição e Crescimento, Controle do Crescimento por Processos Químicos e Físicos, Mecanismos de Obtenção de Energia, Genoma, Variabilidade Genética, Mecanismos de Transferência de DNA, Mecanismos de Ação dos Quimioterápicos e Resistência a Drogas.

Um dos pontos a destacar são as ilustrações de qualidade, tanto esquemas como fotos, que auxiliam muito a compreensão do texto e destacam os pontos principais. Também é muito interessante a quantidade de informações bioquímicas apresentadas nos esquemas, que dão embasamento para a discussão dos processos estudados.

O livro *Bacteriologia Básica*, ao abordar os processos básicos de morfologia e fisiologia da célula bacteriana, fornece subsídios para a compreensão dos processos realizados por bactérias de modo mais amplo, não apenas na área médica como também ambiental, industrial, entre outras. Cada assunto é aprofundado o suficiente para permitir plena compreensão dos processos, e são apresentados exemplos de cada sistema, bem como as variações encontradas entre as bactérias e eventualmente entre bactérias e outros organismos.

A abrangência dos assuntos abordados faz com que o livro seja de interesse para alunos de todas as áreas microbiológicas, tanto de graduação como especialização e pós-graduação.

Profa. Marilis V. Marques
Departamento de Microbiologia
ICB- USP

Cursos de Especialização em Microbiologia - 2009

Microbiologia de Alimentos Microbiologia Ambiental
Microbiologia Industrial
Microbiologia Clínica

Coordenador: Dra. Marina B. Martinez.
Profa. Titular da FCF-USP

Público Alvo:

Graduados da área de saúde, biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e interessados em trabalhar na área de microbiologia de alimentos, ambiental, industrial e clínica.

Data de início :

Março de 2009

Seleção para o curso:

Envio de curriculum
Ficha de Inscrição

Duração :

18 meses, sendo que as aulas são quinzenais, nas sextas das 19:00h as 23:00 e nos sábados das 9:00 as 18:00h

Carga Horária:

540 horas totais sendo, 360 horas de aulas e 180 horas de monografia

Avaliação :

Provas no final de cada disciplina e elaboração de monografia correspondente ao módulo cursado. O aluno será aprovado atendendo os seguintes critérios:

- média mínima 7,0 (sete) durante o curso;
- nota mínima 7,0 (sete) de monografia;
- frequência mínima de 85%.

Aguardem mais informações no próximo número e no nosso site
www.sbmicrobiologia.org.br

25^o
Congresso Brasileiro

micro biologia

De 08 a 12 de novembro
Porto de Galinhas-PE

**VENHA DISCUTIR SOBRE OS ASSUNTOS
MAIS IMPORTANTES DA MICROBIOLOGIA
NA MELHOR PRAIA DO BRASIL.**

Eixos Temáticos:

- Genética de Microrganismos
- Educação
- Resistência de Microrganismos
- Biotecnologia
- Bioempreendedorismo
- Pesquisa em Microbiologia Clínica
- Diagnóstico Microbiológico
- Bioprospecção
- Bioremediação

SBM SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA

Procedimento:

O interessado deverá preencher a ficha de adesão, especificando a categoria (Estudante de graduação, Estudante de Pós-Graduação ou Profissional).

Valores:

Estudantes: R\$ 90,00 (Anual)

Profissionais: R\$ 175,00 (Anual)

Formas de pagamento:

1. Depósito bancário **identificado** em nome da SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA (CNPJ 43.323.484/0001-12) e envio de uma cópia do comprovante via FAX (11) 3813-9647:

Banco do Brasil: 001 - Agência: 3559-9 - c/c: 16509-3

2. Enviar a ficha de adesão por E-mail (cadastro@sbmicrobiologia.org.br), solicitando o **boleto bancário**.

FICHA DE ADESÃO

DATA: _____ ANO DE REFERÊNCIA: _____

Categoria: () Estudante de Graduação () Estudante de Pós-Graduação () Profissional

Nome completo: _____

RG: _____ CPF: _____

Endereço Res: _____

_____ Bairro: _____

Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

TEL.: _____ FAX: _____

E-MAIL: _____

Instituição: _____

Departamento: _____

Cargo que exerce: _____

Titulação: _____

Endereço: _____

_____ Bairro: _____

Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

TEL.: _____ FAX: _____

E-MAIL: _____

Microbiologia Especializada em:

1. Alimentos (MAL); 2. Ambiental (MAM); 3. Básica (BAS); 4. Biotecnologia (BIO); 5. Clínica (MC); 6. Industrial (MIN); 7. Micologia (MI);
8. Micotoxinas (MX); 9. Oral (MO); 10. Solo (MS); 11. Veterinária (MV); 12. Virologia (VI); 13. Outros (especificar):

Endereço para correspondência: Residencial () Comercial ()



Diretoria

Biênio 2008-2009

Presidente

Marina Baquerizo Martinez (USP-SP)

Vice-presidente

Maria José M. Giannini (UNESP-SP)

1º Secretário

Carlos Taborda (USP-SP)

2º Secretário

Loreny Giugliane (UNB-DF)

1º Tesoureira

Adalberto Pessoa Jr. (USP-SP)

2º Tesoureira

Alexandre S. Rosado (UFRJ-RJ)

Conselho Fiscal:

Bernadete G. Franco (USP-SP)

Sergio E. L. Fracalanza (UFRJ-RJ)

Antonio Fernando Pestana de Castro (USP-SP)

Representantes de Área

SBM 2008-2009

Coleções de Cultura

- Lara D Sette, UNICAMP-SP
- Elisa Cupollilo, FIOCRUZ-RJ

Ensino

- Alexandre Lourenço, UNIP/UNISA/FMU -SP
- Maria Ligia C. Carvalho, USP-SP

Infecção Hospitalar

- Ana Lúcia Darini, USP-RP
- Jorge Sampaio Fleury, SP

Micro de Alimentos

- Bernadete G. Franco, USP
- Ricardo Dias, FUNED -MG

Micro Ambiental

- Irma Grivera, USP-SP
- Leda M. Hagler, UFRJ-RJ

Micro Clínica

- Lauro Santos Filho, UFPB-PB
- Pedro D'Azevedo, FFFCMPA-RS

Micro Industrial

- José Gregório, USP-SP
- Eleni Gomes, UNESP-Rio Preto

Micro Médica

- Elizabeth Marques, UERJ-RJ
- Waldir P Elias Jr, I. Butantan, SP

Micologia

- Rosana Puccia, UNIFESP-SP
- Marilene Vainstein, UFRGS-RS

Micotoxinas

- Marta Taniwaki ITAL-SP
- Myrna Sabino Instituto Adolfo Lutz-SP

Parasito-Hospedeiro

- Sandro R. de Almeida, USP-SP
- Marcelo Bozza, UFRJ-RJ

Solo

- Vivian H. Pelizzari, USP-SP
- Mariangela Hungria, EMBRAPA-PR

Veterinária

- Walter Lilenbaum, UFF-RJ
- Vasco Azevedo, UFMG-RJ

Virologia

- Maurício L. Nogueira, FAMERP-SP

Presidente do CBM 2007

Prof. Dr. Marina B. Martinez

**Diagnóstico Microbiológico
Racional e Relevância Clínica:
O Desafio da Atualidade**

16 a 19 de outubro de 2008
Centro de Convenções Serrano Resort
Gramado/RS

1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL

MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Cursos Pré-simpósio

16 de Outubro

Os cursos pré-simpósio acontecerão dia 16/10
das 9h às 13h e das 14h às 18h

MANHÃ 9h às 13h

1. Identificação de bactérias Gram-positivas problemáticas no laboratório de rotina

Ministrantes: Jorge Sampaio Lab. Fleury/SP e Pedro d' Azevedo UFCSA/RS

Ementa:

- 1) Identificação de CGP catalase-positivos - a.Qual a rotina recomendada (fluxogramas);b.Em que situações identificar os SCN
- 2) Identificação de CGP catalase-negativos - a.Alterações taxonômicas;b.Qual a rotina recomendada (fluxogramas);c.Limitações dos testes fenotípicos
- 3) Identificação de corineformes - a.Alterações taxonômicas;b.Qual a rotina recomendada;c.Em que situações identificar gênero e espécie
- 4) Identificação de Actinomicetos - a.Qual a rotina recomendada;b.Em que situações identificar gênero e espécie
- 5) Casos clínicos

2. Gestão de Processos em Laboratório de Microbiologia: qualidade e custos

Ministrantes: Cássia Zócolli - Lab. Santa Luzia /SC - e Carmen Oplustil - NBK/SP

Ementa:

Mapeamento de processos de rotinas (Hemocultura, urocultura, trato genital), passo a passo do processo.

Como manter a qualidade reduzindo custos

Redução de desperdícios

Mapa de Valor

3. Microbiologia Clínica básica: Processando materiais clínicos sem erros

Ministrante: Marina Martinez - FCF-USP/SP -HU/USP e Antônia Machado - UNIFESP/SP

Ementa:

Será feita uma revisão sobre diversas doenças infecciosas tendo como foco a coleta e tratamento das amostras clínicas assim como o isolamento e identificação dos principais agentes envolvidos.

Trato gastrointestinal

Trato urinário

Vias aéreas superiores e inferiores

Trato genital

Transudatos e exudatos

Septicemias

Meningites

4. Métodos em parasitologia clínica: foco na detecção de coccídios

Ministrante: Tiana Tasca UFRGS/RS

Ementa:

Nesse curso serão abordados aspectos biológicos e clínicos de parasitos emergentes e oportunistas, os coccídios *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayentanensis* e *Isospora belli*. O enfoque será no diagnóstico laboratorial dessas espécies, através de métodos de coloração específicos e morfometria

TARDE 14h às 18h

5. Identificação de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores no laboratório clínico: É possível? Como e o que fazer?

Ministrantes: Elizabeth Marques UERJ/RJ e Tyrone Pitt UK Monitor: Robson de Souza Leão - UERJ-RJ

Ementa:

- 1) Atualização na taxonomia dos BGN NFe sua implicação para a identificação .
- 2) Testes fenotípicos mais comumente usados e algumas "dicas" para a caracterização dos BGN-NF em laboratório clínico
- 3) Técnicas moleculares: PCR - espécie específicas; DNA-Microarray para identificação de espécies ; técnica de sequenciamento para análise filogenética: genes 16 S rRNA, recA e rpoB

6. Micologia no dia-a-dia do laboratório clínico

Ministrantes: Valério Aquino UFRGS/RS e Luiz Carlos Severo - UFRGS/RS Monitor: Flávio Matos de Oliveira

Ementa:

- 1) Introdução à micologia médica
- 2) Micoses superficiais e cutâneas
- 3) Micoses sistêmicas e oportunístico
- 4) Diagnóstico laboratorial das micoses

7. Usando a Biologia Molecular na Microbiologia Clínica

Ministrante: Vlademir Cantarelli - Lab. Weinmann/RS e Diogo A. Pilger Lab. Weinmann/RS

Ementa:

Descrição dos princípios básicos da reação em cadeia da polimerase convencional, PCR em tempo real com uso de SYBR Green e sondas, reação de sequenciamento de DNA e microarrays. Abordar questões técnicas, como sensibilidade, amostras clínicas e aplicações das técnicas acima nas diversas áreas da microbiologia clínica.

8. Novos padrões de resistência : Como incorporar a detecção no laboratório

Ministrantes: Ana Gales - UNIFESP/SP e Libera Dala Costa - UFPR/PR

Realização



Organização



51.32496164

microbiologia@prixeventos.com.br



www.sbmicrobiologia.org.br

Diagnóstico Microbiológico Racional e Relevância Clínica: O Desafio da Atualidade

16 a 19 de outubro de 2008
Centro de Convenções Serrano Resort
Gramado/RS

Programa Oficial

16 de outubro

07:30 - Abertura da secretaria e entrega de material

09:00 - 18:00 - Cursos Pré-evento

MANHÃ 9h às 13h

1. Identificação de bactérias Gram-positivas problemáticas no laboratório de rotina
2. Gestão de Processos em Laboratório de Microbiologia: qualidade e custos
3. Microbiologia Clínica básica: Processando materiais clínicos sem erros
4. Métodos em parasitologia clínica: foco na detecção de coccídios

TARDE 14h às 18h

5. Identificação de Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores no laboratório clínico: É possível? Como e o que fazer?
6. Micologia no dia-a-dia do laboratório clínico
7. Usando a Biologia Molecular na Microbiologia Clínica
8. Novos padrões de resistência : Como incorporar a detecção no laboratório

19:00 - 20:30 - Abertura oficial e atividade cultural

Conferência de Abertura

Conferencista: Ellen Jo Baron - USA

Impact of new technology on infectious disease and infection control practices

20:30 - Coquetel

17 de outubro

07:30 - Abertura da secretaria e entrega de material

09:00 - 10:00 - Conferências

Sala 1

A evolução da taxonomia , identificação e epidemiologia molecular de Enterococcus

Coordenador: Pedro d´Azevedo UFCSPA/RS

Conferencista: Lúcia Teixeira UFRJ/RJ

Sala 2

Resistência bacteriana em Bacilos Gram negativos- quando desconfiar e como detectar fenotipicamente os mecanismos mais frequentes.

Coordenadora: Ana Gales UNIFESP/SP

Conferencista: Marcelo Galas Argentina

Sala 3

Histoplasmose

Coordenadora: Marilene Vainstein UFRGS/RS

Conferencista: Luiz Carlos Severo - UFRGS/RS

10:00 - 10:30 - Coffee Break

10:30 - 12:30 - Mesas Redondas

Sala 1

Micobactérias de importância Clínica

Coordenador: Jorge Sampaio Lab. Fleury/SP

M.tuberculosis: epidemiologia e resistência

Palestrante: Maria Lúcia Rossetti FEPS/RS

Diagnóstico Clínico-laboratorial da Tuberculose

Palestrante: Rodrigo Pires dos Santos HCPA/RS

Micobactérias Não- Tuberculosis

Palestrante: Jorge Sampaio- Lab. Fleury/SP

Sala 2

Métodos moleculares no laboratório de Microbiologia Clínica: realidade ou ficção?

Coordenadora: Ana Lucia Darini FCFRP-USP/SP

Identificação bacteriana e viral

Palestrante: Vlademir Cantarelli Laboratório

Weinmann/RS

Deteção de elementos genéticos: realidade em Laboratórios de bacteriologia?

Palestrante: Ana Lucia Darini - FCFRP-USP/SP

Casos Clínicos

Palestrante: Clóvis Ams Cunha- UFPR/PR

Sala 3

Micoses Sistêmicas

Coordenadora: Marilene Vainstein - UFRGS/RS

Paracoccidioidomicose: abordagem clássica e molecular no diagnóstico e seguimento

terapêutico de pacientes

Palestrante: Maria José Giannini - UNESP/SP

Aspergilose: novos testes diagnósticos

Palestrante: Alessandro Pasqualatto - Santa

Casa de Porto Alegre/RS

Criptococose e seus agentes no Brasil

Palestrante: Márcia dos santos Lazéra -

FIOCRUZ/RJ

12:30 13:30 - Almoço Livre

13:30 14:30 - Avaliação de Pôsteres

14:30 16:30 - Mesas Redondas

Sala 1

Infecções virais emergentes

Coordenador: Vlademir Cantarelli Laboratório Weinmann/RS

Dengue

Palestrante: Claudia Santos- TECPAR/PR

Respiratórias

Palestrante: Nancy Bellei-UNIFESP/SP

Enteroviroses

Palestrante: Divina das Dores de Paula

Cardoso UFGOias/GO

Sala 2

Deteção da Resistência bacteriana no dia-a-dia

Coordenadora: Ana Lúcia Peixoto de Freitas UCPel-UFRGS/RS

Antibiograma por disco-difusão: atualizações

Palestrante: Flávia Rossi HClínicas USP/SP

Testes não-padronizados em cocos Gram Positivos

Palestrante: Cícero Dias UFCSPA/RS

MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Testes não-padronizados em Bacilos Gram Negativos

Palestrante: Elizabeth Marques UERJ/RJ

Sala 3

Antifúngicos

Coordenador: Sydney Hartz Alves - UFSM/RS

Testes de suscetibilidade a antifúngicos.

Onde estamos?

Palestrante: Sydney Hartz Alves - UFSM/RS

Validação de métodos para determinação de resistência a antifúngicos

Palestrante: Márcia de Souza Carvalho

Melhem - Instituto Adolfo Lutz/SP

Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de agentes das leveduras

Palestrante: Maria Aparecida de Resende - UFMG/MG

16:30 17:00 - Coffee Break

17:00- 18:00 - Conferência

Sala 1

The role of beta-lactamases in conferring resistance to the beta-lactams among Gram-negative rods

Coordenadora: Ana Lucia Darini - FCFRP-USP/SP

Conferencista: Laurent Poirel- França

18:00 19:30 - Microbiologia Nova Geração

18 de outubro

7:30 - Abertura da secretaria e entrega de material

09:00 - 10:00 - Conferências

Sala 1

Microbiota normal: Qual a importância clínica?

Coordenador: Vlademir Cantarelli Laboratório Weinmann/RS

Conferencista: Antoine Andremont - França

Sala 2

Tipagem molecular: como e quando realizar

Coordenador: Afonso L. Barth HCPA-UFRGS/RS

Conferencista: Tyrone Pitt - Inglaterra

10:00 - 10:30 - Coffee Break

10:30 - 12:30 - Mesas Redondas

Sala 1

Pneumonias o difícil papel do laboratório clínico

Coordenador: Jorge Sampaio Laboratório

Fleury/SP

Métodos quantitativos - qual o valor de sua utilização?

Palestrante: Antonia Machado-UNIFESP/SP

Deteção de patógenos oportunistas

Palestrante: Jorge Sampaio Laboratório Fleury/SP

Casos Clínicos

Palestrante: Alexandre Zavascki HCPA/RS

Sala 2

Hemocultura no dia-a-dia

Coordenadora: Ana Lúcia Peixoto de Freitas

UCPel-UFRGS/RS

Manejo das fases pré e pós-analíticas

Palestrante: Cássia Zocolli Laboratório Santa

Luzia/SC

Técnicas automatizadas e convencionais

Palestrante: Carmen Oplustil- NKB/SP

Como interpretar?

Palestrante: Antonio Pignatari-UNIFESP/SP

12:30 13:30 - Almoço Livre

13:30 14:30 - Avaliação de Pôsteres

14:30 16:30 - Mesas Redondas

Sala 1

Resistência Bacteriana : Novos tempos

Coordenadora: Libera Dalla Costa UFPR/PR

CA MRSA

Palestrante: Agnes Figueiredo UFRJ-RJ

Enterobactérias

Palestrante: Beatriz Meurer Moreira- UFRJ/RJ
Acinetobacter

Palestrante: Libera Dalla Costa - UFPR/PR

Sala 2

Métodos automatizados e semi automatizados em laboratório de microbiologia

Coordenador: Pedro d'Azevedo - UFCSPA/RS

Identificação/Resistencia em cocos Gram positivos

Palestrante: Pedro d'Azevedo - UFCSPA/RS

Identificação/resistência em bacilos Gram Negativo

Palestrante: Silvana Superti - HSLPUC/RS

Avaliando Custo Benefício

Palestrante: Cassia Zocolli Laboratório Santa Luzia/SC

16:30 17:00 - Coffee Break

17:00- 18:00 - Painel Nacional

Sala 1

Resistência bacteriana: Perfil no Brasil

Painelista: Ana Gales - UNIFESP/SP

Painelista: ANVISA

18:00 19:30

Painel Máster Internacional

Coordenador: Afonso Barth

Painelistas: Antoine Andremont - França ;Ellen

Jo Baron USA; Laurent Poirel- França;

Marcelo Galas Argentina ;Tyrone Pitt - Inglaterra

19 de outubro

7:30 - Abertura da secretaria

09:00 - 10:00 - Consenso em Microbiologia Clínica

10:00 - 10:30 - Coffee Break

10:30 - 12:00 - Consenso em Microbiologia Clínica



Difco. Quem usa faz por merecer.

interlab

DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S.A.

www.interlabdist.com.br
Pça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - 04330-130
Tel. Vendas: 11- 5564-9569 - Fax. Vendas: 11- 5564-9558