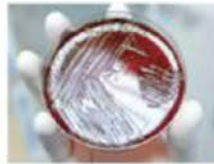


A revista do Microbiologista.

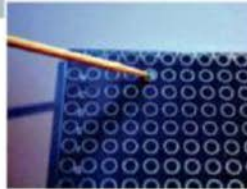
www.sbmicrobiologia.org.br

ISSN 1982-1301

**Colônias do
Microrganismo**



**Microrganismo
aplicado à placa**

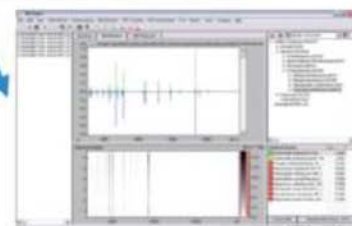


**Microrganismo recoberto
por matriz de HCCA**

**Obtenção do espectro de
massa por MALDI-TOF**

**Comparação com espectros de
referência de base de dados**

Identificação da espécie



Procedimento de espectrometria de massa MALDI-TOF

É com grande satisfação que publicamos a 23ª edição da Revista Microbiologia in Foco. Nas próximas edições a revista será modificada em sua estrutura para deixá-la mais atraente inclusive, com entrevistas e divulgação de novidades na área da microbiologia. Contudo, continuamos com os objetivos iniciais selecionando temas abrangentes e de interesse na divulgação da Microbiologia.

Voltamos a enfatizar que esperamos e contamos com a colaboração ativa dos leitores sugerindo temas e encaminhando artigos para publicação.

Esperamos que comunidade de microbiologistas continue a colaborar ativamente para que essa iniciativa possa alcançar o objetivo de divulgar a microbiologia nos mais diversos setores da comunidade brasileira.

Lembramos que a revista é de informação e divulgação e é composta de várias seções:

Seção 1: Ciência in foco: artigos de informação sobre temas relevantes

Seção 2: Resenhas: comentários sobre livros

Seção 3: Resumos comentados de trabalhos científicos relevantes

Seção 4: Homenagem a profissionais com destaque na fundação da SBM e no desenvolvimento da Microbiologia

Seção 5: Ensino em Microbiologia

Seção 6: Departamento in Foco: Departamentos em destaque: Notícias de interesse da Microbiologia

Seção 7: Leitor in Foco: espaço aberto ao leitor

Seção 8: Empresas in Foco - Informes publicitários: espaço destinado a empresas

Seção 9: Entrevistas com especialistas e temas da atualidade

Agradecemos a todos que colaboraram com a edição número 23 da revista Microbiologia in Foco e contamos com a colaboração dos colegas para futuros artigos.



Marina B. Martinez
Presidente

Carlos P. Taborda
Editor

Ciência in Foco

MICROBIOLOGIA NO ENSINO SUPERIOR: “ADOTE UMA BACTÉRIA!” (E O FACEBOOK®)! 5

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA. 10

O TRANSPORTE DE OLIGOPEPTÍDEOS NA FISIOLOGIA E PATOGÊNESE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *STREPTOCOCCUS* 17

Entrevistas e Opiniões

BIODIVERSIDADE AMEAÇADA. 24

EM BUSCA DE UM NOVO MODELO 25

UMA ESPERANÇA CONTRA AS MORTES CAUSADAS PELA PCM. 27

SELO DE QUALIDADE SBM 29

SBM IN FOCO 30

AGENDA IN FOCO 31

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO E APERFEIÇOAMENTO EM MICROBIOLOGIA 32

FIQUE SÓCIO 33

Expediente

SBM in Foco
Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Ano 5, nº 23
São Paulo: SBM, 2014

Periodicidade Trimestral

Editores:

Carlos P. Taborda e Marina B. Martinez

Tiragem:

2000 exemplares - Circulação Nacional
Distribuição gratuita para sócios SBM

Diagramação:

Hermano Design Editorial
hermano@nextis.com

Responsabilidade autoral:

Todos os artigos assinados são de responsabilidade dos respectivos autores

Responsabilidade editorial:

Tífani Luri N. Hanashiro

MICROBIOLOGIA NO ENSINO SUPERIOR: “ADOTE UMA BACTÉRIA!” (E O FACEBOOK®)!



Domingos Alexandre Ciccone Botte¹, Renata Damásio de Souza¹, Marco Aurélio Floriano Piantola^{1,2}, Rúbens Prince dos Santos Alves¹, Ophelis de Almeida França Junior¹ e Rita de Cássia Café Ferreira¹

¹ Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia

² Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia

A ciência é essencialmente uma rede temporal que conecta o passado ao presente e este ao futuro com o objetivo de expandir nossas capacidades intelectuais e tecnológicas. Ao longo da história vários instrumentos foram desenvolvidos para ajudar a humanidade a cumprir a função de transmitir seu legado. Um dos mais importantes e recentes é a internet, com suas inúmeras redes sociais ¹.

Mesmo entre os cientistas mais céticos em aceitar *sites* como o *Facebook*[®], as redes de trabalho/sociais estão amplamente presentes no cotidiano dos pesquisadores, seja por meio de aulas, congressos, orientações ou *peer-review*, etc. Além disso, todas essas atividades estão imbricadas à computação e às redes virtuais, como o *PubMed*, *Scopus*, e tantos outros aplicativos que contribuem de forma exponencial para o desenvolvimento científico ².

Notoriamente no campo educacional, diversos estudos indicam que a aplicação de ferramentas informáticas aproximam os atores escolares e maximizam a construção cognitiva^{3;4;5}. Dessa forma, os professores estão diante de um novo desafio: o de inovar seus métodos de ensino por meio da inserção de aplicações

multimídia e utilização de redes sociais na rotina acadêmica.

Pesquisas recentes demonstram que a tarefa é árdua. O sucesso do uso das tecnologias de informação e comunicação no ambiente escolar depende de vários fatores: (i) infraestrutura da instituição de ensino, (ii) ementa da disciplina, (iii) capacidade do professor para estruturar e aplicar programas de ensino da maneira adequada, (iv) acesso dos alunos a equipamentos ⁶. Porém, é importante frisar que não se prende a atenção de alunos apenas ligando computadores, projetores e iniciando uma apresentação de *PowerPoint*. Por vezes, tais ferramentas apresentam efeito oposto ao desejado, aumentando o número de estudantes dispersos durante a aula ^{7; 8; 9; 10}.

Vários trabalhos de conotação pedagógica mostram como utilizar as redes sociais no ensino superior. Portanto, para inovar na área é necessário que o professor também conheça a literatura sobre o tema, tanto para se atualizar e agregar novas abordagens didáticas com os alunos, quanto para divulgar o trabalho que vier a realizar ¹¹. Destaca-se que na área de microbiologia, a

Sociedade Americana de Microbiologia (ASM) patrocina o *Journal of Microbiology & Biology Education*, a principal revista voltada para a publicação de resultados obtidos no campo.

Dessa maneira, observa-se que a maioria dos artigos educacionais em microbiologia sustenta que o uso de práticas pedagógicas que envolvem informática, tem impacto positivo nos processos de aprendizagem, como demonstra a tabela 1. De fato, há uma tendência em incluir essas ferramentas tecnológicas nas metodologias docentes dos cursos regulares de graduação e de treinamento técnico em áreas clínicas ^{12; 13; 14; 15}

O ensino de microbiologia está, de modo geral, progredindo no país, porém ainda enfrenta dificuldades ²⁷. Com efeito: (i) muitos cursos na área da saúde não oferecem disciplinas relacionadas à licenciatura superior; (ii) a formação de professores universitários está pautada por pesquisas, produções voltadas às suas respectivas áreas de concentração, com pouco investimento nas áreas pedagógica e educacional; (iii) falta de proximidade do professor de ciências biológicas com metodologia de pesquisa qualitativa e de redação de textos na

TABELA 1 - MATERIAIS PEDAGÓGICOS VIRTUAIS PARA ENSINO DE MICROBIOLOGIA

Animações	http://www.nature.com/nrmicro/animation/index.html	16; 17
Vídeos	http://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-106j-systems-microbiology-fall-2006/	18; 19
Laboratórios virtuais	http://webcampus.drexelmed.edu/simulation/microbiology/lab1/	20
Jogos	http://www.nobelprize.org/educational/medicine/tuberculosis/tbc/index.html	21; 22
Mídias sociais	http://www.nature.com/nrmicro/info/info_social_media.html	23
Web 2.0	http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki	24
Aplicativos para smartphones/tablets	https://play.google.com/store/apps/details?id=appinventor.ai_fiptuon.Urina&hl=pt_BR	25; 26

área de humanas. Como resultado, no Brasil ainda são poucos os grupos de pesquisa empenhados em desenvolver técnicas didáticas aplicadas ao ensino superior²⁸.

No Brasil, o *Facebook*[®] abriga a marca de 76 milhões de usuários, que gastam em média 12,5 horas por mês lendo e postando conteúdo na plataforma. Desse modo, foi imperativa a escolha dessa rede social para a base do projeto. Destacamos que diversos trabalhos na área de educação apontam resulta-

dos positivos na construção do conhecimento e troca de informações entre os agentes escolares^{34; 35; 36}. Porém, ainda existe baixa participação pela utilização dessa ferramenta por parte do corpo docente^{10; 37; 38; 39; 40}.

Visando contribuir para superar essas dificuldades, este trabalho apresenta um projeto de ensino realizado no Departamento de Microbiologia do ICB-USP denominado "Adote uma Bactéria!". O programa, baseado na utilização do conceito de internet colaborativa

na rede social *Facebook*[®], teve o intuito de ampliar a troca de informações entre alunos de graduação, pós-graduação e professores na disciplina de Bacteriologia ministrada a alunos do curso de Bio-medicina (2013).

ADOTE UMA BACTÉRIA

O projeto "Adote uma Bactéria!" surgiu da necessidade de agregar o ambiente virtual com as aulas de graduação da disciplina de Bacteriologia com



Figura 1 - Integrantes dos grupos e seus respectivos gêneros de estudo. **A:** Lucas Nishida, Nicolli D. Costa e Souza, Ellen K. Okuda, Melissa R. de Araujo, Rafael Pegoraro, Pedro de Freitas Ribeiro e Lucas M. G. de Souza. **B:** Graziely P. de Almeida, Gabriela C. F. Leite, Lucas Grunheidt, Évelyn H. A. da Mata e Bruno Geise. **C:** Ayumi C. M. Komino, Anri Yamaguchi, Felipe G. Panicio, Patrick de Castro Neuhaus, Rafaella Jekabson e Plínio L. de Oliveira. **D:** Eiji Y. de Almeida, Érica O. Barbeiro, Fernanda M. Honda, Luiza M. P. Morales, Mariana de Mendonca, Nathalia M. de Andrade e Patrizia Dardi. **E:** Emily A. Ara, Lais C. Salla, Nicole Kleiber, Oscar T. Perez e Rodrigo A. S. Barreiro. **F:** Aline C. M. M. Costa, Evelyn T. Rodrigues, Fernanda F. Terra, Mariana T. Kanbe, Rafaella E. Gattas e Thayla H. H. Yoshida.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DOS GRUPOS POR TEMA.

Gênero bacteriano	Nº de alunos/grupos	Nº de mediadores/grupo	Postagens/grupo
A- <i>Neisseria sp</i>	5 membros	1	22
B- <i>Bacillus sp</i>	5 membros	1	25
C- <i>Mycobacterium sp</i>	6 membros	2	45
D- <i>Pseudomonas sp</i>	6 membros	2	20
E- <i>Clostridium sp</i>	7 membros	1	36
F- <i>Streptococcus sp</i>	7 membros	1	35

o objetivo de potencializar o processo de ensino-aprendizagem para além da sala de aula^{29,30}. Os recursos de informática, como apresentado anteriormente, já são amplamente utilizados como ferramentas de ensino em microbiologia, mas a utilização das redes sociais é muitas vezes colocada em contraponto ao desempenho acadêmico. Entretanto, as redes sociais também podem ser observadas sob outro prisma e exploradas como canal de interação entre professor-aluno e aluno-aluno, para maximizar a troca de informações relacionadas à disciplina e ampliar a difusão de conhecimento^{31,32}.

A metodologia do projeto consistiu em utilizar a rede social Facebook[®] como ambiente virtual, devido à ampla inserção e domínio de suas ferramentas por parte dos alunos de graduação, e também à facilidade de divulgação de ideias e posterior discussão²⁹. Desse modo, o professor responsável da disciplina criou e gerenciou um grupo secreto no Facebook[®] intitulado "Adote uma Bactéria!" (<https://www.facebook.com/groups/197823390397635/>). A principal vantagem dessa modalidade de grupo na plataforma consistiu na garantia da privacidade dos membros e do material postado. Adicionalmente, alunos de pós-graduação vinculados ao programa foram recrutados para participar como mediadores, para auxiliar os grupos na discussão das postagens.

Os alunos matriculados na disciplina de Bacteriologia no segundo semestre de 2013, da turma de Bacharelado de 2013 em Biomedicina, foram divididos em 6 grupos (Figura 1) responsáveis por "adotar" um gênero bacteriano com a tarefa de procurar, selecionar, postar conteúdos (artigos, revisões, animações, jogos) e responder a questões propostas relacionadas ao tema de estudo, durante os 2 meses finais da disciplina

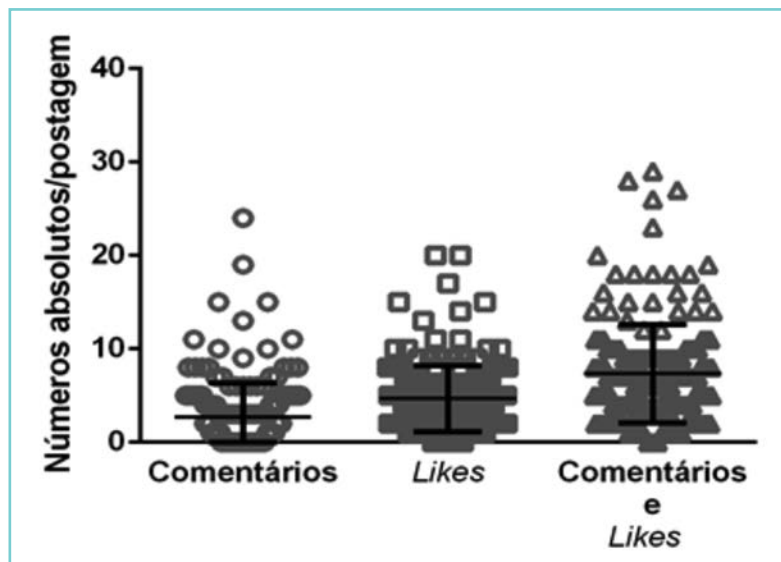


Figura 2 - Análise do tipo de interação que cada postagem gerou no grupo "Adote uma Bactéria!". Comentários (o), Likes (□), Comentários e Likes (Δ). Os resultados foram obtidos através da extração de dados do grupo com a ferramenta Netvizz v1.0. Os resultados estão expressos em números absolutos por postagem gerada e apresentados como média ± desvio padrão.

(Tabela 2). O professor e os mediadores orientaram os alunos na construção de novos conceitos, avaliaram e conduziram o rumo das postagens com o intuito de diagnosticar erros conceituais, esclarecer dúvidas e indicar possíveis tópicos pertinentes aos temas.

A avaliação dos alunos se deu por meio de 5 dispositivos: (i) prova I; (ii) prova final; (iii) atividade laboratorial; (iv) diagnóstico continuado na participação no projeto "Adote uma Bactéria!" e apresentação de um seminário referente ao gênero bacteriano adotado (v) Relatório. Para avaliar a percepção qualitativa dos alunos utilizou-se os próprios instrumentos de avaliação de disciplina da utilizados na USP. A análise dos dados estatísticos extraídos da avaliação foi realizada usando o aplicativo Netvi-

zz versão 1.0 (Digital Methods Initiative, Amsterdam, Netherlands)³³. Os resultados basearam-se na média geral da turma, contagem do número de postagens por grupo e relação da quantidade de: (i) comentários, (ii) Likes (iii) comentários com Likes por postagem (Figura 2). Os dados estão expressos em média com desvio padrão. A construção do gráfico foi realizada no programa Graphpad-Prism versão 6.0 (GraphPad software, San Diego, USA).

Nos dois últimos meses da disciplina (duração total 4 meses), foi implementado o projeto em paralelo às atividades curriculares regulares. Foram geradas 183 postagens ao total na página do grupo, realizadas tanto por estudantes de graduação, por mediadores e pelo professor (Tabela 2). Em relação a es-

tas postagens, cada uma gerou em média 2.7±3.6 comentários, 4.7±3.5 likes e 7.4±5.2 comentários com likes (Figura 2). Em relação ao seminário e os trabalhos escritos, observamos ótimo desempenho acadêmico refletido na média geral da turma que foi superior a 8.0 (8.7±0.57).

A análise qualitativa demonstrou que os alunos avaliaram positivamente o uso do Facebook® no projeto "Adote uma Bactéria!". Além disso, avaliaram a iniciativa como pioneira, destacando a importância de atividades baseadas em redes virtuais na vida acadêmica.

Portanto, consideramos que a atividade foi satisfatória, atingindo nossos objetivos iniciais de implementar uma prática inovadora no departamento baseada em redes sociais de modo a expandir o potencial de transmissão e discussão de materiais didáticos pertinentes ao curso de maneira extra sala de aula. Ressaltamos que essa iniciativa foi nossa primeira experiência utilizando sites sociais e iremos continuar implementando o projeto nas próximas turmas.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos da turma de Ciências Biomédicas (ano 2013). Aos mediadores, Milene T. Batista, Rafael Cavalcante, Roberto Nepomuceno, Jaime Amorim, Ewerton Ferreira, Nathalia Pasternak. Ao Prof^o Dr. Luís Carlos S. Ferreira.

REFERÊNCIAS

- MURPHY G, SALOMONE S (2013) Using social media to facilitate knowledge transfer in complex engineering environments: a primer for educators. *European Journal of Engineering Education*, 38 (1): 70-84.
- LU Z (2011) PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. *Database (Oxford)* 2011: baq036.
- RUTTEN N, VAN JOOLINGEN WR, VAN DER VEEN JT (2012) The learning effects of computer simulations in science education. *Computers & Education* 58 (1): 136-153.
- SANTA-ROSA JG, STRUCHINER M (2011) Tecnologia educacional no contexto do ensino de histologia: pesquisa e desenvolvimento de um ambiente virtual de ensino e aprendizagem. *Revista Brasileira de Educação Médica* 35: 289-298.
- ZUIN AAS (2010) O Plano nacional de educação e as tecnologias da informação e comunicação. *Educação & Sociedade* 31: 961-980.
- DRENT M, MEELISSEN M (2008) Which factors obstruct or stimulate teacher educators to use ICT innovatively? *Computers & Education* 51 (1): 187-199.
- ISSEKS M (2011) How PowerPoint Is Killing Education. *Teaching Screenagers* 68 (8): 74-76.
- NORDSTROM K, KORPELAINEN P (2011) Creativity and inspiration for problem solving in engineering education. *Teaching in Higher Education* 16 (4): 439-450.
- HILLA (2012) "I'm Ambivalent about It": The Dilemmas of PowerPoint. *Teaching Sociology* 40 (3): 242-256.
- ROLANDO LGR, SALVADOR DF, LUZ MRMP (2013) The use of internet tools for teaching and learning by in-service biology teachers: A survey in Brazil. *Teaching and Teacher Education* 34 (0): 46-55.
- MACHADO JLM, MACHADO VM, VIEIRA JE (2011) Formação e seleção de docentes para currículos inovadores na graduação em saúde. *Revista Brasileira de Educação Médica* 35: 326-333.
- MANTAS J (2010) Recommendations of the International Medical Informatics Association (IMIA) on Education in Biomedical and Health Informatics. First Revision. *Methods Inf Med* 49 (2): 105-120.
- CHANG A (2011) A Retrospective Look at 20 Years of ASM Education Programs (1990-2010) and a Prospective Look at the Next 20 Years (2011-2030). *Journal of Microbiology and Biology Education* 12 (1): 8-12.
- THOMSON RB, DOERN GV (2011) What Will the Role of the Clinical Microbiology Laboratory Director Be in 2015? *Journal of Clinical Microbiology* 49 (9): S68-S71.
- JENSEN JL (2012) A Call for a Community of Practice to Assess the Impact of Emerging Technologies on Undergraduate Biology Education. *Journal of Microbiology and Biology Education* 13 (1): 21-27.
- RICE SC (2013) Using Interactive Animations to Enhance Teaching, Learning, and Retention of Respiration Pathway Concepts in Face-to-Face and Online High School, Undergraduate, and Continuing Education Learning Environments. *Journal of Microbiology and Biology Education* 14 (1): 113-115.
- NICHOLLS C (1996) The Effect of Computer Animation on Students' Understanding of Microbiology. *Journal of Research on Computing in Education* 28 (3): 359.
- SÁNCHEZ M (2011) Bugs and Movies: Using Film to Teach Microbiology. *Journal of Microbiology and Biology Education* 12 (2): 206-207.
- JAMES J, MCMULLIN MF, MCGLADE K (2008) Developing an Online Video Lecture Series: eLearning for Undergraduate Medical Students. *World Conference on E-Learning in Corporate, Government, Healthcare, and Higher Education 2008*. Las Vegas, Nevada, USA: AACE: 927-932.
- MALDARELLI GA (2009) Virtual lab demonstrations improve students' mastery of basic biology laboratory techniques. *Journal of Microbiology and Biology Education* 10 (1): 51-57.
- FARRELL D (2011) Developing e-Bug web games to teach microbiology. *J Antimicrob Chemother* 66 (5): v33-38
- BELLOTTI F, BERTA R, DE GLORIA A (2010) Designing Effective Serious Games: Opportunities and Challenges for Research. *International Journal of Emerging Technologies in Learning (iJET)* 5 (2010): 22-35.
- RACANIELLO VR (2010) Social Media and Microbiology Education. *PLoS Pathog* 6 (10): e1001095.
- SHEE K (2010) Research, Collaboration, and Open Science Using Web 2.0. *Journal of Microbiology and Biology Education* 11 (2): 130-134.
- CHARANI E (2013) An analysis of the development and implementation of a smartphone application for the delivery of antimicrobial prescribing policy: lessons learnt. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (4): 960-967.
- VISVANATHAN A, HAMILTON A, BRADY RRW (2012) Smartphone apps in microbiology—is better regulation required? *Clinical Microbiology and Infection* 18 (7): E218-E220.
- ODA W, DELIZOICOV D (2012) Docência

no Ensino Superior: as disciplinas Parasitologia e Microbiologia na formação de professores de Biologia. *Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências* 11 (3): 101-121.

28. JACOBUCCI DFC, JACOBUCCI GB (2009) Abrindo o Tubo de Ensaio: o que sabemos sobre as pesquisas em Divulgação Científica e Ensino de Microbiologia no Brasil? *Journal of Science Communication* 8 (2): 1-8.

29. DONLAN L (2012) Exploring the views of students on the use of Facebook in university teaching and learning. *Journal of Further and Higher Education*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/0309877X.2012.726973>.

30. VENTURA R QUERO MJ (2013) Using Facebook in University Teaching: A Practical Case Study. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 83 (0): 1032-1038.

31. AYDIN SA (2012) Review of research on Facebook as an educational environment. *Educational Technology Research and Development* 60 (6): 1093-1106.

32. MANAGO AM, TAYLOR T, GREENFIELD PM (2012) Me and my 400 friends: The anatomy of college students' Facebook networks, their communication patterns, and well-being. *Developmental Psychology* 48 (2): 369-380.

33. RIEDER B (2013) Studying Facebook via data extraction: the Netvizz application. *Proceedings of the 5th Annual ACM Web Science Conference*. Paris, France: ACM: 346-355.

34. PATON C (2011) Experience in the Use of Social Media in Medical and Health Education. *Nursing and Health Professions Faculty Research* 6. Disponível em: < http://repository.usfca.edu/nursing_fac/6 >.

35. LEE WB (2013) Using Facebook to Better Engage College Students in Learning. In: CHANG RS, JAIN LC (2013) *Advances in Intelligent Systems and Applications - Volume 1*: Springer Berlin Heidelberg 20 (41): 403-408.

36. BOSCH TE (2009) Using online social networking for teaching and learning: Facebook use at the University of Cape Town. *Communica-*

tio 35 (2): 185-200.

37. MAHDIZADEH H, BIEMANS H, MULDER M (2008) Determining factors of the use of e-learning environments by university teachers. *Computers & Education* 51 (1): 142-154.

38. da SILVA MP; MOLINA LGG (2011) Adesão dos docentes universitários aos recursos da web 2.0 para disseminação e compartilhamento da informação e do conhecimento. *Semina: Ciências Sociais e Humanas* 32 (1): 65-76.

39. POPOIU MC, GROSSECK G, HOLOTESCU C (2012) What do We Know about the Use of Social Media in Medical Education? *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 46 (0): 2262-2266.

40. ALGERS A (2013) The development of a new methodology for knowledge sharing in the interface between university and society — An example from the meat sector. *Meat Science* 95 (3): 672-678.

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA



João Nobrega de Almeida Júnior^{1,2}, Thais Sabato Romano Di Gioia^{1,3}, André Mario Doj^{1,4,5,6},

Flávia Rossi¹

¹ Serviço de Microbiologia, Divisão de Laboratório Central, HC-FMUSP

² Instituto de Medicina Tropical da USP

³ Microbiologia Laboratórios DASA

⁴ Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, UNIFESP

⁵ Laboratório de Análises Clínicas Hospital do Coração (HCOR)

⁶ Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Albert Einstein

RESUMO

Espectrometria de Massa MALDI-TOF emerge como tecnologia promissora para identificação de bactérias, fungos e actinomicetos. O baixo custo das análises, agilidade e possibilidade de identificação diretamente de amostras clínicas são atrativos da nova tecnologia.

As identificações são realizadas ao comparar o espectro de massa do analito com espectros de referência de banco de dados. Existem duas plataformas disponíveis no mercado nacional, Microflex LT™ (Bruker Daltonics/BD Diagnostics) e VITEK MS™ (BioMérieux), sendo que esta última já dispõe de registro na ANVISA para utilização em laboratórios de Microbiologia Clínica. Os desempenhos das plataformas para identificação dos patógenos são similares e existem algumas limitações, como ausência de

espectros de referência para alguns patógenos mais raros. Porém programas como Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics/BD) e SARAMIS (BioMérieux) permitem a criação de espectros de referência ou super espectros *in-house*, melhorando o desempenho das identificações. Estudos recentes mostram o potencial da tecnologia para identificar mecanismos de resistência e para racionalização do uso de antimicrobianos.

1. INTRODUÇÃO

A espectrometria de massa (EM) começou a ser aplicada na identificação de microrganismos nos anos 1970 (1).

Porém, o grande impulso para desenvolvimento da tecnologia foi dado em 1987 por Tanaka et al. que conseguiram ionizar grandes moléculas por laser ao utilizar uma matriz composta

por partículas de cobalto e glicerol (2). A demonstração da ionização de proteínas através da combinação de feixes de laser de determinado comprimento de onda e de uma matriz conferiu prêmio Nobel de química para Tanaka em 2002 (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/).

O princípio da tecnologia MALDI-tempo de voo (*time of flight*) (MALDI-TOF) pode ser descrito da seguinte forma: íons de massa e carga diferentes quando submetidos a um campo elétrico se deslocam e a distância percorrida em determinado tempo é função da relação carga/massa. A primeira etapa consiste em misturar a amostra com a matriz, e posteriormente evaporação dos solventes e cristalização. O depósito formado pela amostra e pela matriz é realizado sobre uma placa metálica. A placa metálica por sua vez é introduzida

no espectrômetro de massa e feixes de laser UV de determinado comprimento de onda são emitidos sobre cada depósito. A matriz absorve a energia do laser e ocorre evaporação da amostra com a formação de íons com massas diferentes. Os íons formados com carga +1 movimentam-se sob a influência do campo elétrico, atravessam grades de extração e atingem o tubo de voo, no qual em sua extremidade se encontra o detector. Os menores íons chegam em primeiro tempo ao detector. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. A soma de íons analisados forma o espectro de massa da amostra analisada. O eixo das abscissas corresponde à relação massa/carga e no eixo das ordenadas encontram-se a intensidade do sinal que é relacionada à quantidade de íons de mesma massa/carga (3). Os princípios da tecnologia citada estão ilustrados na figura 1 e foram explicitados por Croxatto A et al. em 2011 (4).

A principal vantagem da tecnologia de EM MALDI-TOF sobre outras técnicas laboratoriais para identificação de microrganismos é a agilidade para obtenção do resultado. Entre a confecção do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de trinta minutos (4).

Dois instrumentos MALDI-TOF são disponíveis no mercado para uso em laboratórios clínicos: Microflex LT® (Bruker Daltonics/BD) e VITEK MS® (BioMérieux). Os dados de EMs são comparados a banco de dados que contém espectros de referência (ER) (Biotyper, Bruker Daltonics/BD) ou “super espectros” (Myla/SARAMIS, BioMérieux) para identificação de espécies.

O software Biotyper® (Bruker Daltonics/BD) utiliza até 100 picos de qualidade (excedem uma relação sinal/ruído pré-definida) entre 3000 e 15000 D para criar um EM o qual é comparado aos ERs levando em consideração o número de picos e suas intensidades compatíveis para calcular valores que são expressos em valores de *Logscore* (LS) entre 0-3. Valores de LS inferiores a 1.7 são considerados insuficientes, entre 1.7-2.0 são classificados como suficientes para identificação de gênero e se superior à 2.0, identificação de espécie é assegurada.

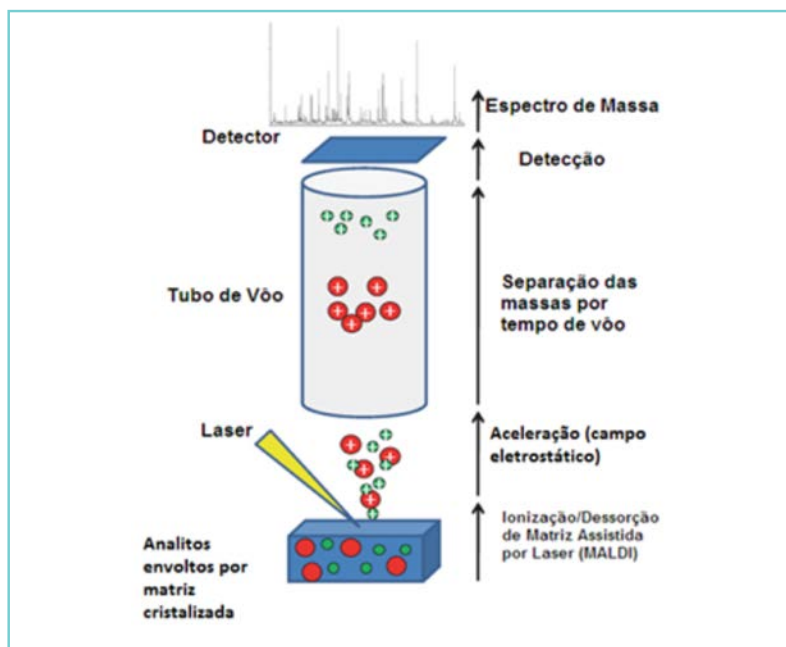


Figura 1 - Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF) (Adaptado de: Croxatto A et al, 2012).

Já o software SARAMIS® (BioMérieux) utiliza picos comuns a cepas de mesma espécie (entre 15-20) para construir um *super espectro*. Os resultados produzidos pelo VITEK MS® (BioMérieux) são divididos em categorias como “good ID”, quando o EM obtido encontrou boa correlação com “super espectro” da base de dados (60-99,9% de compatibilidade, apenas um patógeno), discriminação baixa ou “low discrimination” (>60%-99,8% de probabilidade, dois patógenos) ou “no ID” (<60% de probabilidade, valor de confiança).

2. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS

A identificação de bactérias Gram positivas pela EM MALDI-TOF vem sendo amplamente utilizada com bons resultados. Estudos recentes demonstraram altas taxas de correlação entre os resultados produzidos pela EM MALDI-TOF e técnicas de identificação de referência como PCR e sequenciamento. Para identificação de espécies de *Staphylococcus*, Carbonelle et al e Dubois et al encontraram taxas de correlação de 99,3% entre a EM e técnicas molecu-

lares (sequenciamento do gene *rpoB* e microarray respectivamente) (5,6).

Os *Staphylococcus coagulase-negativo* constituem um grupo diverso de espécies bacterianas. A correta discriminação e identificação das espécies é um desafio uma vez que muitas espécies apresentam uma similaridade genética muito próxima (7). A identificação pela EM MALDI-TOF, de acordo com a literatura, variou de 93,2% a 99,2% quando comparado com técnicas sequenciamento (8,9).

Em relação aos *Staphylococcus aureus*, a identificação na rotina microbiológica convencional apresenta alta acurácia. Entretanto, alguns erros ainda podem ocorrer, principalmente entre *Staphylococcus coagulase-positivo não-S. aureus*. Szabados et al evidenciaram 100% de correlação na identificação pela EM MALDI-TOF e sequenciamento genético (10).

O gênero *Streptococcus*, compreende um grande número de espécies e tem sofrido mudanças taxonômicas na última década. Fenotipicamente, os *Streptococcus* têm sido classificados em grupos, com base na característica de hemólise apresentada pela colônia em

ágar sangue e diferenças antigênicas (grupos de Lancefield). A identificação de espécies pode ser realizada por reações bioquímicas (bile solubilidade), testes de sensibilidade frente a alguns antimicrobianos (optoquina e bacitracina) e testes de aglutinação. No entanto, estes testes também podem levar a falha na identificação precisa das espécies.

Alguns estudos avaliaram o desempenho da EM MALDI-TOF para a identificação destes agentes. Cherkaoui et al encontraram 100% de concordância na identificação de *Streptococcus* β -hemolítico quando comparado com outras metodologias (11). Lartigue et al avaliaram a performance da EM para identificação de *Streptococcus agalactiae* e também evidenciaram 100% de concordância (12).

Em relação aos *Streptococcus pneumoniae* e e *Streptococcus* grupo viridans, taxas de concordância de 99 e 100% respectivamente tem sido observadas segundo alguns autores, sugerindo que a identificação pelo método de EM MALDI-TOF é precisa e segura para ser utilizada na identificação destes agentes. Porém, devido à escassez e à semelhança de ER das espécies *S. pneumoniae* e *S. mitis* do Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics/DB), erros de identificação envolvendo as duas espécies foram citados (4).

Os *Enterococcus* são importantes patógenos humanos podendo apresentar multi-resistência a diversas classes de antimicrobianos. A identificação precisa destes agentes é fundamental, pois a terapia antimicrobiana pode variar de acordo com as espécies identificadas. Isolados de *Enterococcus faecalis* são geralmente sensíveis a ampicilina, enquanto que de *Enterococcus faecium* usualmente são resistentes a esta droga. Fang et al demonstraram que a EM MALDI-TOF possui elevada acurácia para identificação destas espécies (13).

A identificação de *Bacillus* spp. por técnicas manuais e automatizadas é um desafio no laboratório clínico. Usualmente, os resultados não são liberados até espécie, exceto em situações em que ocorre suspeita clínica de infecção por *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*. A técnica de EM MALDI-TOF, entretanto,

tem demonstrado bons resultados. Segundo alguns estudos chegando a 100% de sensibilidade, incluindo identificação de amostras liofilizadas de *B. Anthracis* que podem ser utilizadas em bioterrorismo(14).

A identificação das espécies do gênero de *Listeria* é fundamentada em reações sorológicas, atividade hemolítica, capacidade de crescimento em baixas temperaturas e utilização de carboidratos específicos. A técnica de EM MALDI-TOF tem demonstrado ser uma alternativa rápida e acurada para identificação de espécies do gênero. Estudo conduzido por Barbuddhe et al demonstrou 100% de concordância de identificação quando comparada a técnicas convencionais e seqüenciamento do 16S rRNA (15).

Já em relação a identificação de bacilos do gênero *Corynebacterium*, bons resultados foram reportados utilizando a EM. Para estas espécies, mesmo técnicas moleculares são desafiadoras (16).

3. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS

Em 2010 foi publicado estudo que avaliou EM MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker Daltonics) para identificação de 327 isolados em laboratório de Microbiologia Clínica (17). Os resultados foram comparados com metodologia fenotípica (VITEK²® ou API system[®], BioMérieux), com esclarecimento dos casos discordantes através do sequenciamento da região 16S rRNA. Dentre as bactérias Gram Negativas (BGN), foram analisadas enterobactérias, cocobacilos do grupo HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella* e *Kingella*) e não fermentadores. As identificações foram consideradas corretas em 96,6%, 84% e 92% respectivamente. Dentre os não fermentadores, a extração em tubo com etanol e ácido fórmico foi necessária em 37% dos isolados, porém 5,4% tiveram erros de identificação e 3,6% não dos isolados não foram identificados. O desempenho para identificação de espécies de enterobactérias e bactérias do grupo HACEK foi de 98% de acertos (17).

Em 2011, nosso grupo do Serviço de

Microbiologia do HC-FMUSP comparou a identificação de BGN por VITEK²® (BioMérieux) versus VITEK MS (BioMérieux®). Foram analisadas 40 enterobactérias, 61 não fermentadores (24 *Burkholderia cepacea* complex, 6 *Pseudomonas aeruginosa* e 6 *Acinetobacter* spp., entre outros mais raros) e 23 outros Gram negativos (7 cocobacilos, 4 *Neisseria* spp. entre outros mais raros). A EM apresentou resultados concordantes em 37 (92,5%) enterobactérias, com discordâncias para 2 isolados de *E. cloacae* e 1 *Citrobacter freundii*. Dentre os BGN não fermentadores, houve concordância para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia cepacea* complex. Porém não foi possível diferenciar as espécies do complexo *B. cepacea*. Em 2013 tivemos a oportunidade de retestar tais cepas após upgrade do software SARAMIS® (BioMérieux), e obtivemos sucesso na diferenciação das espécies. Dentre o grupo de outros Gram Negativos houve concordância das identificações dos cocobacilos usuais da rotina (3 *Moraxella catarrhalis*, 3 *Haemophilus influenzae* e 1 *Aggregatibacter aphrophilus*), 3 *Neisseria meningitidis* e houve 1 cepa em que ambas metodologias identificaram apenas como *Neisseria* spp.

A principal limitação desta metodologia citada pela literatura é a identificação de *Shigella* spp. como *E. coli* devido a semelhanças dos espectros de massa entre as duas bactérias (4).

4. IDENTIFICAÇÃO DE ANAERÓBIOS

A EM MALDI-TOF tem especial importância na identificação e patógenos que requerem longos tempos de incubação ou que apresentam inativação bioquímica para algumas provas de identificação. Os anaeróbios são exemplos destes tipos de patógenos. A acurácia da identificação de anaeróbios Gram positivos e Gram negativos pelo foi estudada por diversos autores sendo encontrada concordância em nível de espécie entre 90 a 97% quando comparada a técnicas moleculares de identificação (18,19).

Nosso grupo comparou o desempenho da EM MALDI-TOF (Microflex LT, Biotyper 2.0) e do sistema automatizado

VITEK2® (BioMérieux) para identificação de 91 isolados de anaeróbios, entre eles 53 isolados de *Bacteroides fragilis*, 16 de *Clostridium* spp, 11 *Peptostreptococcus* spp, 4 de *Prevotella* spp, 2 *Actinomyces* spp. Houve concordância de gênero em 90 isolados (97%), sendo que os resultados pela EM foram finalizados em metade do tempo em comparação àqueles obtidos pelo VITEK2® (BioMérieux).

5. IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS E OUTROS ACTINOMICETOS AERÓBIOS

O diagnóstico laboratorial da TB e das micobacterioses é feito pela baciloscopia e cultura. A baciloscopia ainda é o método de eleição e deve ser realizado para todos os casos suspeitos de TB pulmonar, por ser fácil, acessível e de rápida execução, porém possui baixa sensibilidade e não é específico (20). Já cultura é o método mais sensível e permite o isolamento da micobactéria para identificação da espécie e teste de sensibilidade às drogas. Sua grande desvantagem ainda é o tempo para crescimento da cepa, com média de 15 a 30 dias para crescimento em meio sólido e 12 a 20 dias em meio líquido (20). A partir do crescimento da cepa, deve-se proceder a identificação, que mais comumente é feita por testes fenotípicos, como detecção da produção da niacina, redução do nitrato e avaliação de inibição do crescimento em meio contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB) que levam cerca de 15 dias para definição entre cepa Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ou Micobactérias Não Tuberculosas (MNT).

Neste cenário, a EM MALDI-TOF apresenta-se como um método de diagnóstico rápido na identificação da cepa de micobactéria, com publicações recentes em ambas plataformas, e uma variedade de protocolos sendo testados. Devido a natureza infecciosa do MTB e da parede celular da micobactéria ser rica em ácidos micólicos sua identificação requer uma etapa de inativação da cepa por aquecimento, seguida de uma etapa de extração proteica (21).

Em recente estudo conduzido por Machen *et al*, a EM MALDI-TOF foi avaliada para identificação de 107 cepas de micobactérias a partir de culturas sólidas

com a comparação de dois protocolos de extração (22). Entre as micobactérias analisadas, havia 64 isolados de *M. avium* complex, 18 *M. tuberculosis* complex, 9 *M. kansasii*, 4 *M. fortuitum*, 3 *M. abscessus* e 2 *M. goodii*. Após inativação das suspensões em etanol a 70%, a ruptura das células foi realizada em termobloco a 95°C por trinta minutos no protocolo A, e no protocolo B a lise das células foi realizada com pérolas de vidro de 0.5mm e agitação por vortex durante 15 minutos. Ácido fórmico (85% protocolo A e 70% protocolo B) e acetonitrila também foram utilizados. O desempenho na identificação de espécie do protocolo A foi de 82,2% e do protocolo B de 88,8%, após o acréscimo de 50 super espectros no banco de dados SARAMIS (22).

Bactérias do gênero *Nocardia* spp. são importantes agentes causadores de infecção principalmente em pacientes imunossuprimidos (23). A identificação das bactérias deste gênero é desafiadora, uma vez que compreende análise do aspecto da colônia em meios de cultura, microscopia e provas bioquímicas. A identificação de espécies requer a análise molecular da região 16S do rDNA e *hsp65* (24). O principal estudo realizado que avaliou a EM MALDI-TOF para identificação de espécies de *Nocardia* foi publicado por Verroken *et al* (25). Foram incluídas 153 cepas, sendo que 110 foram utilizadas para criação de banco de dados *in-house* de ER. As extrações foram realizadas por fervura e posteriormente com etanol e ácido fórmico. *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. farcinica*, *N. otitidiscaviarum*, *N. nova*, *N. asteroides* estavam entre as espécies analisadas. As 43 cepas restantes foram submetidas à identificação pelos bancos de ER Biotyper 3.0® (Bruker Daltonics/BD) e o banco *in-house* de 110 ER. Houve 44% de identificações corretas de espécie através do banco de ER Biotyper 3.0® (Bruker Daltonics/BD) e 88% para o banco de ER *in-house* (25).

6. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

A identificação de fungos por EM MALDI-TOF é uma revolução na micologia. As técnicas fenotípicas para identi-

ficação de leveduras, como auxonogramas, ou mesmo a micromorfologia para identificação de fungos filamentosos podem exigir muitos dias para finalização. A agilidade e precisão da análise proteômica poderá em muitas ocasiões substituir a necessidade da utilização de ferramentas moleculares. As bases de dados de ER dos diferentes fabricantes foram submetidas a atualizações fazendo com que espécies raras sejam identificadas e erros de identificação sejam menos frequentes. Porém, a criação de base de dados de ER *in-house* pode ser necessário para identificação de espécies mais raras de leveduras, e para alguns gêneros de fungos filamentosos é condição *sine qua non*.

Grande número de artigos estudaram a identificação de leveduras do gênero *Candida* com desempenho superior às técnicas fenotípicas comerciais, como API 32ID (BioMérieux) e Vitek 2 (BioMérieux), possibilitando a diferenciação de espécies que antes só era possível por técnicas moleculares, como *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, e também *C. nivariensis* e *C. bracarensis* (21). A identificação das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* também é possível pela EM MALDI-TOF e dois estudos foram além, demonstraram acurácia próxima de 100% para diferenciação dos diferentes genótipos das duas espécies (26,27).

Fungos filamentosos também podem ser identificados por EM MALDI-TOF, porém, diferentemente de leveduras cuja extração pode ser realizada diretamente no spot da placa com ácido fórmico, é necessário protocolo de extração de com etanol e ácido fórmico em tubo para obtenção de espectros passíveis de identificação. Estudo realizado por Lau *et al* mostrou que após a criação de banco de dados de ER *in-house* com 249 cepas de referência das coleções CBS® e ATCC® (nomeado "NIH Mold Database") contendo 152 espécies de 76 gêneros, com 180 fungos hialinos, 70 demáceos, 27 zigomicetos, 7 dermatofitos e 10 fungos dimórficos, conseguiu 89% de identificações de espécies corretas após desafio com 421 isolados clínicos, sendo que a base de dados Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) identificou corretamente apenas 3 isolados, o que evidenciou a neces-

sidade de criação de nova base de ER pelo fabricante (28). Esta nova base de ER para identificação de fungos deve ser lançada em breve e foi formulada com o auxílio de micologistas e com fungos da coleção CBS. Dados preliminares mostram bom desempenho deste novo banco de ER para identificação de fungos artroconidiados (29).

7. IDENTIFICAÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Dados da literatura sobre a identificação de patógenos diretamente de amostras clínicas são concentrados principalmente em protocolos de extração de amostras de balões de hemocultura e de urina (Kok, 2012, Croxatto 2012). Apenas um artigo cita o diagnóstico de um caso de meningite por *Streptococcus pneumoniae* que foi realizado após centrifugação e extração das proteínas do sedimento de amostra de líquido cefalorraquidiano (Hartmeyer 2010).

Diversos estudos analisaram o desempenho da técnica para identificação de bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras diretamente de frascos de hemocultura (30,31). O impacto clínico da agilidade na identificação dos patógenos responsáveis por infecção de corrente sanguínea pode ser expressivo, com redução de mortalidade (32). O processamento das amostras pode ser resumido pelo protocolo estabelecido por Christner et al no qual é feita a coleta de cerca de 6ml de sangue do frasco que apresentou crescimento, em seguida é realizada a sedimentação inicial de eritrócitos e glóbulos brancos por centrifugação lenta (ex. 140g, 10 minutos) e o sobrenadante é utilizado para nova centrifugação (ex. 1000g, 5 minutos) para obtenção do sedimento. A partir do sedimento é realizada a extração convencional com ácido fórmico 70% (33). Há disponível kit de extração comercial, Sepsityper® (Bruker Daltonics/BD), porém estudo comparativo com metodologia in-house mostra desempenho similar entre identificações obtidas para identificação de 181 amostras monomicrobianas envolvendo bactérias Gram positivas e Gram negativas (34). O mesmo estudo analisou o desempenho das plataformas Vitek MS® (BioMérieux) e Microflex LT® (Bruker Daltonics) para identifica-

ção de gênero e espécie, com resultados similares, cerca de 80% de identificações corretas de espécie e 90% de gênero. Frascos de hemocultura contendo carvão e amostras polimicrobianas são as principais limitações da técnica (21). Recentemente, March-Rosselló et al obtiveram 97.3% e 98.4% de identificações corretas de bactérias Gram negativas e Gram positivas ao submeterem 4 spots para cada frasco de hemocultura monomicrobiana para análise e utilizando logscore acima de 1.4 como valor de referência (35).

A utilização da técnica de EM MALDI-TOF para identificação de patógenos de amostras urinárias apresenta bom desempenho, principalmente para bactérias Gram negativas, porém com necessidade de centrifugação e extração com ácido fórmico, apresentando sensibilidade analítica de 10⁵ UFC/ml (21).

8. DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A aplicação da EM MALDI-TOF também se estende a detecção de resistência bacteriana. A caracterização do mecanismo de resistência por tal técnica pode antecipar a escolha terapêutica, podendo impactar diretamente nas taxas de morbidade e mortalidade dos processos infecciosos, principalmente nos pacientes hospitalizados e imunodeprimidos (36).

Atualmente a detecção direta dos mecanismos de resistência tem sido alvo de diferentes pesquisadores, uma vez que potencialmente traz inúmeros benefícios, no entanto ainda há inúmeras questões na forma de preparação e interpretação adequada destes resultados, diferentemente dos processos já padronizados. Há trabalhos publicados com detecção específica de alguns mecanismos relevantes, mas não o antibiograma de uma forma completa. A determinação do mecanismo de resistência em tempo reduzido pode impactar as ações de controle de bactérias multi-resistentes como o *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), enterobactérias resistentes aos carbapenens (CRE) e enterococos resistente à vancomicina (VRE).

Edwards e Jones em 2000 foram

os primeiros a analisar as diferenças de cepas de *S. aureus* com resistência a metilicina (MRSA) por através dos espectros do MALDI-TOF (37). Eles utilizaram células bacterianas intactas e 5-cloro-2 mercaptobenzotiazol como matriz. Detectaram um total de 14 picos específicos de MRSA e 2 picos específicos para MSSA. Técnicas utilizando lisados celulares também foram descritas, porém possuem etapas intermediárias trabalhosas que no laboratório de rotina são poucas práticas para implementação (36).

A detecção de betalactamases também tem sido descrita por diferentes autores através da EM MALDI-TOF, através da demonstração da hidrólise do antimicrobiano frente à exposição a estas enzimas (38). Estas enzimas podem ser divididas em diferentes classes moleculares e podem ser classificadas como dependentes de serina (classe A, C e D) e as zinco dependentes ou metaloenzimas (classe B) (39). Recentemente, enzimas que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos (carbapenemases do grupo A, B e D) tem sido alvo de preocupação tanto do ponto de vista terapêutico como epidemiológico, pois há uma disseminação bastante rápida de algumas carbapenemases como KPC (grupo A) e NDM (grupo B) (40). A EM MALDI-TOF possibilitam detecção precoce destas enzimas, mas não as diferenciam, agregando, no entanto, valor importante ao resultado microbiológico e ao programa de uso racional de antibiótico (antibiotic stewardship) (36). Algumas destas aplicações podem ser realizadas na rotina laboratorial enquanto outras somente em laboratórios de referência devido à complexidade (36).

9. IMPACTO NO USO RACIONAL DE ANTIMICROBIANOS.

O impacto da aplicação rotineira da EM MALDI-TOF em microbiologia e consequentemente em programas de uso racional de antibióticos tem gerado um número grande de publicações na literatura (32,41,42). Recentemente Huang e cols publicaram os resultados obtidos em estudo pré e pós quasi-experimental que mediu a incorporação desta tecnolo-

gia em 501 pacientes com hemoculturas positivas com e sem intervenção na escolha terapêutica. Os resultados foram comparados com uma séria histórica de 256 pacientes. A comparação dos resultados do grupo cujas culturas foram identificadas de forma convencional contra o grupo no qual as identificações foram obtidas por EM MALDI-TOF mostrou redução no tempo de identificação (84.0 vs 55.9 horas, $P < .001$) e impacto no tempo da escolha adequada do antibiótico (30.1 vs 20.4 horas, $P = .021$), além da otimização da antibioticoterapia (90.3 vs 47.3 horas, $P < .001$). As taxas de mortalidade foram reduzidas (20.3% vs 14.5%), assim como tempo de internação em unidade de terapia intensiva (14.9 vs 8.3 dias). A mudança de antibiótico conduzida pelo resultado precoce foi associada com uma tendência na redução de mortalidade na análise multivariada (odds ratio, 0.55, $P = .075$) (32).

10. LIMITAÇÕES

Apesar dos ganhos que poderão ser proporcionados pela EM MALDI-TOF ao laboratório de Microbiologia Clínica, a incipiente tecnologia apresenta algumas limitações a serem apontadas: a) os bancos de dados de ER disponíveis precisam de novas versões com a inclusão de espécies que ainda não são representadas; b) algumas espécies filogeneticamente próximas podem ter perfis idênticos de EM e não serem diferenciadas; c) culturas polimicrobianas podem causar problemas para identificação diretamente de amostras clínicas; d) ainda são incipientes os estudos de detecção de patógenos resistentes aos antimicrobianos ou mecanismos de resistência, sendo ainda necessário o cultivo dos microrganismos para realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.

11. CONCLUSÃO

A aplicação do MALDI-TOF em Microbiologia Clínica é um avanço que permitirá, além da identificação precoce de microrganismos a partir de cultura, detectar os patógenos diretamente de hemoculturas, reduzir o tempo necessário para escolha antimicrobiano adequado, e consequentemente, diminuir a morta-

lidade relacionada às infecções e o uso desnecessário de antibióticos.

Sua ampla aplicação em Microbiologia Clínica, baixo custo por análise e principalmente a agilidade para obtenção dos resultados são outros atrativos da tecnologia.

REFERÊNCIAS

1. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975; 47:219–225.
2. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1988(20): 151–3.
3. Carbonnelle E, Nassif X. [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. *Médecine Sci MS*. 2011 Oct;27(10):882–8.
4. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):380–407.
5. Carbonnelle E, Beretti J-L, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, et al. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2007 Jul;45(7):2156–61.
6. Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostzewska M, Schmit PO, Talon R, et al. Identification of a variety of Staphylococcus species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010 Mar;48(3):941–5.
7. Kim M, Heo SR, Choi SH, Kwon H, Park JS, Seong M-W, et al. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci. *BMC Microbiol*. 2008;8:233.
8. Dupont C, Sivadon-Tardy V, Bille E, Dauphin B, Beretti JL, Alvarez AS, et al. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Jul;16(7):998–1004.
9. Loonen AJM, Jansz AR, Bergland JNB, Valkenburg M, Wolffs PFG, van den Brule AJC. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr;50(4):1437–9.
10. Richter C, Hollstein S, Woloszyn J, Kaase M, Gatermann SG, Szabados F. Evaluation of species-specific score cut-off values for various Staphylococcus species using a MALDI Biotyper-based identification. *J Med Microbiol*. 2012 Oct;61(Pt 10):1409–16.
11. Cherkaoui A, Emonet S, Fernandez J, Schorderet D, Schrenzel J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of Beta-hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3004–5.
12. Lartigue M-F, Héry-Arnaud G, Hague-noer E, Domelier A-S, Schmit P-O, van der Mee-Marquet N, et al. Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2009 Jul;47(7):2284–7.
13. Fang H, Ohlsson A-K, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical Enterococcus isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2012 Nov;31(11):3073–7.
14. Dybwad M, van der Laaken AL, Blatny JM, Paaau A. Rapid identification of *Bacillus anthracis* spores in suspicious powder samples by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Appl Environ Microbiol*. 2013 Sep;79(17):5372–83.
15. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostzewska M, Hof H, Domann E, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Sep;74(17):5402–7.
16. Coltella L, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, Menichella D, Sorge R, et al. Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2013 Sep;32(9):1183–92.
17. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in con-

- ventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):900–7.
18. Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schumann R, Eschrich K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):372–6.
19. La Scola B, Fournier P-E, Raoult D. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe.* 2011 Jun;17(3):106–12.
20. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.
21. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):547–603.
22. Machen A, Kobayashi M, Connelly MR, Wang YFW. Comparison of Heat Inactivation Method and Cell Disruption Protocols for Identification of Mycobacteria from Solid Culture Media using MALDI-TOF VITEK Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013 Sep 25;
23. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection.* 2010 Apr;38(2):89–97.
24. Conville PS, Fischer SH, Cartwright CP, Witebsky FG. Identification of nocardia species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):158–64.
25. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov;48(11):4015–21.
26. Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS One.* 2012;7(5):e37566.
27. Posteraro B, Vella A, Cogliati M, De Carolis E, Florio AR, Posteraro P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul;50(7):2472–6.
28. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013 Mar;51(3):828–34.
29. Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, Theelen B, Arabatzis M, Velegraki A, et al. MALDI-TOF MS identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts. *J Clin Microbiol.* 2013 May 15;
30. Kok J, Chen SCA, Dwyer DE, Iredell JR. Current status of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Pathology (Phila).* 2013 Jan;45(1):4–17.
31. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380–407.
32. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013 Nov;57(9):1237–45.
33. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobotka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1584–91.
34. Chen JHK, Ho P-L, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1733–9.
35. March-Rosselló GA, Muñoz-Moreno MF, García-Loygorri-Jordán de Urriés MC, Bratos-Pérez MA. A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2013 May;32(5):699–704.
36. Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jan;26(1):103–14.
37. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2000 Mar;49(3):295–300.
38. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011 Sep;49(9):3321–4.
39. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2013 Aug;19(4):549–59.
40. Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 May;18(5):439–48.
41. Tamma PD, Tan K, Nussenblatt VR, Turnbull AE, Carroll KC, Cosgrove SE. Can matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) enhance antimicrobial stewardship efforts in the acute care setting? *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am.* 2013 Sep;34(9):990–5.
42. Béraud G, Garcia M, Rahbari-Oskoui FF. Impact of maldi-tof will be highly dependent on the clinician. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013 Nov;57(10):1501–2.

O TRANSPORTE DE OLIGOPEPTÍDEOS NA FISIOLOGIA E PATOGÊNESE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *STREPTOCOCCUS*



Roberto Nepomuceno de Souza Lima¹; Sérgio Olavo Pinto da Costa²; Rita de Cássia Café Ferreira^{1,2}

¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

1. O GÊNERO *STREPTOCOCCUS*

Os *Streptococcus* constituem um gênero de bactérias gram-positivas caracterizadas por morfologia que varia de dois a muitos cocos em cadeia. Trata-se de um gênero altamente diversificado que engloba desde organismos comensais capazes de colonizar variados nichos do corpo humano, como *Streptococcus gordonii*, a patógenos capazes de afetar diversos tecidos, como *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* (YE e cols. 2013; PAUL e cols. 2012; SIMELL e cols. 2012). Sua composição engloba 40 espécies e múltiplos grupos cuja taxonomia foi modificada diversas vezes durante os anos (KÖHLER, 2007). Rebeca Lancefield, no início da década de 1930, sistematizou uma classificação dos estreptococos baseada na presença de antígenos de superfície soro-específicos, incluindo carboidratos da parede celular e ácidos lipoteicóicos, em grupos denominados por letras maiúsculas de A a W.

Porém existem estreptococos que não apresentam um antígeno de Lancefield, como *Streptococcus pneumoniae* (SI-TKIEWICZ e cols., 2010). A maioria dos *Streptococcus* patogênicos e/ou oportunistas fazem parte do chamado grupo piogênico dos estreptococos e classificados nos grupos A, B, C e G de Lancefield, e são responsáveis por doenças como a cárie dental, faringite, celulite, otite média, artrite séptica, meningite, endocardite infecciosa, abscessos de múltiplos órgãos, fascite necrosante, septicemia, síndrome do choque tóxico, entre outros (FISCHETTI e cols. 2006). Essa multiplicidade de doenças possui uma correlação direta com a capacidade dessas bactérias obterem nutrientes nas mais diferentes condições de crescimento, um fato possível pela presença de complexos sistemas de captação ativa. Dentre esses sistemas, os mais prevalentes são os pertencentes à família de transportadores ABC, complexos protéicos, responsáveis pela captação de uma grande gama de substâncias como será apresentado a seguir.

2. TRANSPORTADORES ABC

A nutrição bacteriana depende da presença e capacidade de uma bactéria reconhecer e transportar nutrientes essenciais para sua sobrevivência. Dentre os mecanismos utilizados para esse fim podemos classificá-los entre transportadores passivos e ativos, sendo que os últimos necessitam de uma fonte de energia para que o soluto seja internalizado (STIEGER e cols 2007). Como parte da categoria dos transportadores ativos temos como destaques os transportadores da família ABC (*ATP-binding cassette*) de transporte, os quais perfazem a mais abundante família de proteínas bacterianas, sendo codificadas por 5 a 15% dos genes presentes no genoma bacteriano (DASSA e cols 2001). Os transportadores ABC são sistemas ubíquitos de transporte, associados à captação e secreção de diversos solutos, incluindo metais, poliaminas, açúcares e oligopeptídeos. Como característica primordial, esses transportadores são compostos por três

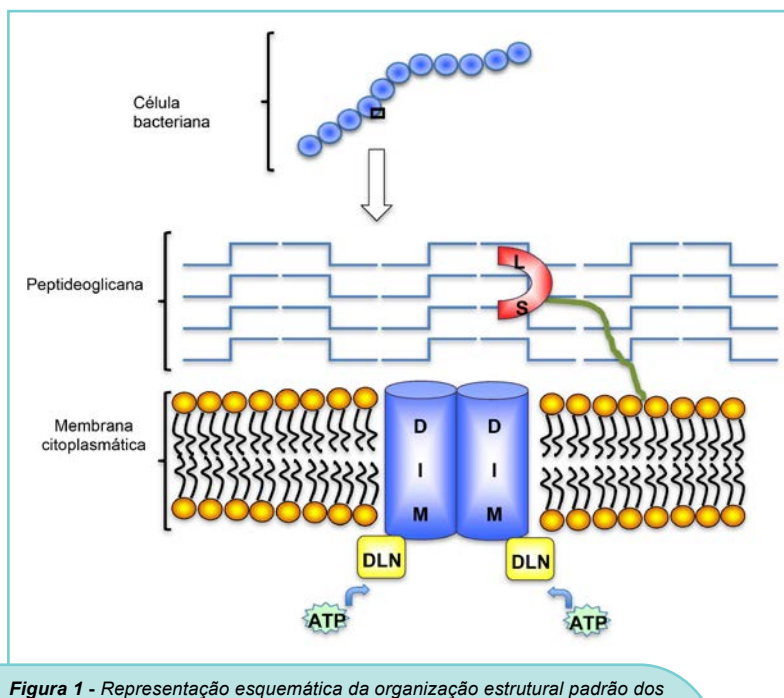


Figura 1 - Representação esquemática da organização estrutural padrão dos sistemas bacterianos ABC de transporte e sua localização. DIM – Domínio integral de membrana; DLN – Domínio ligador de nucleotídeo; LS – Domínio ligador de substrato. Em bactérias gram-positivas o domínio ligador de substrato é uma lipoproteína ancorada à membrana citoplasmática.

domínios funcionais, o domínio integral de membrana (DIM), o domínio ligador de nucleotídeos (DLN) e o domínio ligador de substrato (LS), este último presente apenas nos sistemas de captação, também conhecidos como importadores (figura 1). DIM é responsável pela formação de um poro na membrana citoplasmática, por onde o soluto a ser transportado irá transitar, enquanto que o DLN é o componente responsável pela hidrólise do ATP e fornecimento de energia para o sistema. Já o LS é o componente responsável pelo reconhecimento do soluto e seu direcionamento para os demais componentes do transportador, responsável tanto pela afinidade quanto pela especificidade deste. Dentre seus componentes observa-se uma maior conservação naqueles que representam o DLN, nos quais encontram-se sequências clássicas de aminoácidos conhecidas como motivos *WalkerA* e *WalkerB*, relacionados à capacidade hidrolisadora, e o motivo de assinatura LSGGQ, também conhecido como peptídeo de ligação, por se encontrar entre *WalkerA* e *WalkerB*

(DASSA e col 2001). Já os componentes ligadores de substrato apresentam menor conservação, fato relacionado aos diferentes solutos capazes de serem internalizados.

Em bactérias, um dos solutos captados por transportadores ABC a ser destacado, são os oligopeptídeos, peptídeos formados por dois ou mais aminoácidos, que são internalizados pelo sistema Opp encontrado amplamente distribuído entre as bacterianas. Além de serem nutrientes importantes para a sobrevivência, os oligopeptídeos também pode interferir em aspectos associados à virulência e patogenicidade, em especial de *Streptococcus*.

3. CAPTAÇÃO DE OLIGOPEPTÍDEOS

Os transportadores ABC de oligopeptídeos, também conhecidos como transportadores Opp, são capazes de reconhecer e permitir a captação de cadeias que variam entre 2 a 18 aminoácidos (MONNET e cols. 2003). A caracterização desse sistema, com relação à sua

composição e funcionalidade é baseada em estudos realizados em diversos organismos (AMES e cols. 1973; ACOSTA e cols. 2005; NAKAMATSU e cols. 2007). Como observado para os demais sistemas de transporte da família ABC, esse sistema apresenta um conjunto de proteínas especializadas, sendo as proteínas OppB e OppC responsáveis pela formação do domínio integral de membrana, as proteínas OppD e OppF as responsáveis pelo domínio ligador de nucleotídeos e a proteína OppA, ou domínio ligador de substrato, que confere a afinidade e especificidade do sistema. (KLEPSCH e cols., 2011) (figura 2).

Uma característica marcante deste transportador que o faz diferenciar da maioria dos transportadores ABC é a capacidade de reconhecer e captar os mais diversos oligopeptídeos, com grande variação de sequência de aminoácidos que os compoem. Essa característica é fornecida pela proteína OppA que promove a grande afinidade e baixa especificidade de sistema. Esse transportador é comumente codificado por um operon policistônico no qual observamos uma organização que, em estreptococos, apresenta grande variação (figura 2). Na maior parte dos casos ocorre o aumento no número dos genes que codificam a proteína OppA, mas por que isso ocorre?

As razões para uma maior número de cópias de genes que codificam a proteína OppA podem ser: 1- existência de algum grau de especificidade nos aminoácidos que podem ser ligados à esse domínio, sendo necessário mais de uma cópia com especificidade diferente para aumentar a diversidade de oligopeptídeos a serem captados; 2- necessidade de um maior número desse componente em relação às demais proteínas que compõem o sistema Opp, visto que é ele o primeiro a reconhecer e ligar-se ao oligopeptídeo para depois encaminhá-lo para os demais componentes do sistema. Deste modo um maior número de cópias de proteína confere capacidade de captar oligopeptídeos no ambiente.

Dentre as bactérias que empregam os sistemas de transporte Opp, os estreptococos apresentam um auto grau de variação nos habitats que colonizam, variando da superfície da pele de ma-

míferos, passando pela cavidade oral e por suas secreções. Com isso o estudo desse sistema se torna particularmente interessante nesse gênero bacteriano.

4. IMPORTÂNCIA NA CAPACIDADE DE CAPTAR OLIGOPEPTÍDEOS

A capacidade de captação de oligopeptídeos por bactérias influi diretamente no seu crescimento e adaptação ao habitat em que se encontra. Diversos estudos demonstram que ao eliminarmos alguns componentes do sistema Opp de estreptococos podemos observar uma redução na capacidade de crescimento e/ou um aumento no tempo de geração dessas bactérias (ALLOING e cols. 1994; JENKINSON e cols. 1996; GARAUULT e cols. 2002; TAYLOR e cols. 2003; SAMEN e cols. 2004). Esses estudos revelam que a presença e funcionalidade do sistema Opp confere uma vantagem adaptativa para esses microrganismos que passam a contar com fontes complexas de aminoácidos e nitrogênio. No entanto, o sistema Opp de transporte não é o único associado à capacidade de captação de peptídeos, já que em bactérias podemos encontrar simportes e outros transportadores ABC capazes de captar aminoácidos ou conjuntos pequenos de peptídeos, como o sistema Dpp responsável pela captação de dipeptídeos e o sistema Tpp, responsável pelo transporte de tripeptídeos. Esses sistemas estariam relacionados com a internalização de peptídeos que minimizam ou mascaram a influência que o sistema Opp poderia apresentar em condições laboratoriais de cultivo em meios ricos de nutrientes, como observado por Nepomuceno e cols. 2007.

A falta da capacidade de internalização de oligopeptídeos gerada pela mutação e deleção dos componentes do sistema Opp de transporte, conforme previamente indicado, interfere com a fisiologia bacteriana. No entanto esses mutantes demonstram, em bactérias patogênicas, alterações no perfil de virulência que não são simplesmente justificados pela diminuição na capacidade de internalizar nutrientes, como será visto a seguir.

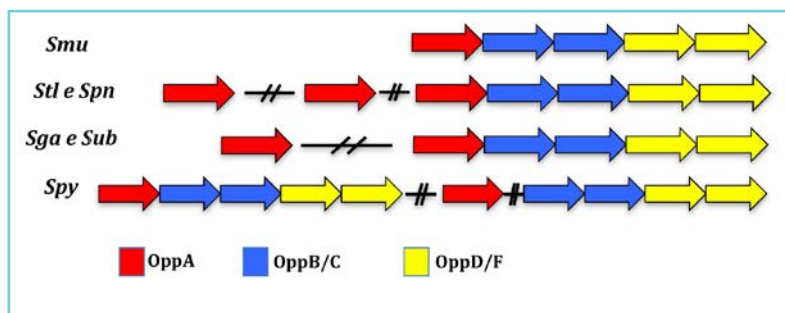


Figura 2 - Diferentes organizações do operon opp encontrado em Streptococcus. As maiores variações observadas no arranjo do operon opp de Streptococcus se encontra no aumento do número de cópias do do gene que codifica o domínio ligador de substrato, que pode estar presente no mesmo operon opp ou em locais distintos do genoma bacteriano. Smu – Streptococcus mutans UA159; Stl – Streptococcus thermophilus LMG18331; Spn – Streptococcus pneumoniae TIGR4; Sga – Streptococcus agalactiae 2603 V/R; Sub – Streptococcus uberis 0140J; Spy – Streptococcus pyogenes SSI-1. Adaptado de Nepomuceno e cols., 2007.

5. PAPEL DOS TRANSPORTADORES OPP NA PATOGENESE DE STREPTOCOCCUS

Além do papel fundamental relacionado à captação de oligopeptídeos, o sistema Opp participa em funções que excedem aquela de simples captação de nutrientes importantes. De fato diversos grupos relatam que, de forma direta ou indireta, a eliminação de componentes do sistema Opp reduz a virulência de diversos estreptococos, chegando a gerar atenuação em modelos animais. Um fator interessante desses dados reside no fato de, em bactérias gram-positivas, o sensoriamento intercelular ser conduzido pela produção, exportação e captação de peptídeos, o que indicaria que sistemas de transporte desses compostos, como o sistema Opp, podem desempenhar um papel importante nessa comunicação intercelular (CLAVERYS e cols. 2000).

5.1 Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria que não apresenta o antígeno de Lancefield e está presente na flora normal de 40 a 60% dos indivíduos analisados. Quando os mecanismos de defesa do hospedeiro encontram-se reduzidos, essa bactéria é capaz de colonizar diversos nichos eucarióticos,

sendo responsável por uma gama de doenças que incluem desde pneumonia à meningite em pacientes susceptíveis (AUSTRIAN, 1986).

Deste modo, um dos principais fatores relacionados à sua patogênese se encontra na capacidade de colonização em tecidos. Cundell e cols em 1995, com o intuito de buscar novos fatores relacionados à capacidade de aderência à células eucarióticas, gerou uma biblioteca de mutantes e os analisou frente a capacidade de aderir à células epiteliais e endoteliais, que representam os principais sítios de colonização de *S. pneumoniae*. Dentre os trinta mutantes analisados, em três foi possível observar uma redução de 50% na capacidade de ligação às células analisadas. Entre os genes mutados se encontra o alelo *ami*, um dos três domínios ligadores de oligopeptídeos observados em *S. pneumoniae*. A tríade Ami-AliA/AlIB foi a primeira permease de oligopeptídeos observada entre as bactérias gram-positivas (ALLOING e cols, 1990). Ela é composta pelos domínios ligadores de substrato AmiA, AliA e AliB, ortólogos de OppA, os domínios transmembrânicos AmiC e AmiD e os domínios ligadores de nucleotídeo AmiE e AmiF. Segundo abordagens similares baseadas em bibliotecas de mutantes, tanto Lau e cols em 2001 quanto Hava e cols em 2002 comprovaram que a eliminação dos genes *amiB*, *amiA* e *amiC* resultaram na atenuação da cepa TIGR

de *S. pneumoniae* em modelos murinos de infecção. No entanto, trabalhos mais recentes com a cepa D39 demonstraram que os mutantes nesse transportador tiveram alterados apenas sua capacidade de aderência à nasofaringe e não nos aspectos invasivos do desenvolvimento da patogênese (KERR e cols 2004). Essas diferenças nas respostas observadas frente a modelos *in vivo* de infecção podem ser atribuídas a variações singulares de cada cepa de *S. pneumoniae* (BLUE e cols 2003).

A alteração na capacidade de aderência promovida pela mutação no sistema Opp de transporte em *S. pneumoniae* pode ser atribuída à ligação direta do domínio LS a moléculas presentes no tecido, ou a contribuição indireta que esse sistema pode apresentar sobre adesinas bacterianas. Essa contribuição se deve a estudos que demonstraram a relação entre o sistema de transporte Opp e à capacidade de sensoriamento extra-celular observado em *S. pneumoniae* (CLAVERY e cols. 2000). Em bactérias gram-positivas, o sensoriamento extra-celular é baseado na capacidade de sintetizar, exportar e captar peptídeos que indicam a concentração celular da população. Quanto maior a população bacteriana, maior a concentração de peptídeos exportados a serem reconhecidos pelas bactérias, que por fim alteram a expressão global de seus genes. Em *S. pneumoniae*, esses achados são baseados em dois princípios: a presença de peptídeos extra-celulares levariam à sua internalização e posterior clivagem por peptidases, levando à liberação de aminoácidos livres, que formariam um conjunto atuando na regulação global bacteriana. Por outro lado, a exaustão de nutrientes poderia ser sensorizada pela permease de oligopeptídeos Ami-A/AlaI/AlaB. Um exemplo está na indicação de que o conjunto de aminoácidos podem ser reconhecidos por proteínas reguladoras globais que ativam ou inibem a expressão de operons, como observado para o controle do desenvolvimento de competência natural em *S. pneumoniae*. Um forte candidato ao papel do regulador está em um ortólogo da proteína CodY de *B. subtilis* encontrado em *S. pneumoniae*, que por sua vez é um ortólogo da proteína Lrp de *E.*

coli descrita como proteína regulada pelo conjunto de aminoácidos captados pelo sistema Opp (SERRA e cols. 1996; CALVO e cols. 1994).

Por outro lado, a captação de aminoácidos e a modificação de seu conjunto intracelular podem levar a formação da resposta estrigente por acúmulo de ppGpp (CASHEL e cols. 1996). A resposta estrigente é reconhecida como uma resposta global à escassez de nutrientes e ao estresse bacteriano. Quando ocorre o acúmulo de ppGpp dois fenômenos gerais são observados: a diminuição na expressão de genes envolvidos na biossíntese de macromoléculas e o aumento da expressão de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos. (LEMO e cols. 2004).

5.2 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes, também conhecido como estreptococo do grupo A (GAS), é um habitante normal da microbiota humana. Encontrado em sua maior concentração em superfícies mucosas, também é responsável por infecções oportunistas e primárias. Capaz de promover sua invasão em tecidos eucarióticos, esse patógeno pode causar desde casos leves e recorrentes de otite média, a casos mais raros e graves de choque tóxico ou fascite necrosante (STEER e cols. 2012).

Estudos relacionados ao sistema de transporte de oligopeptídeos em *S. pyogenes* tiveram início em 1996 com Podbielski e cols. Esses autores caracterizaram a composição e organização genética do operon *opp* em *S. pyogenes* e demonstraram o alto grau de conservação de seus componentes em relação aos ortólogos gênicos encontrados em *S. pneumoniae*. O sistema de transporte Opp afeta a patogênese do *S. pneumoniae*. Sendo esse um sistema de captação conservado em *S. pyogenes*, a busca pelo possível papel do sistema Opp de transporte na patogênese de *S. pyogenes* foi iniciada a partir da obtenção de mutantes nos componentes DLN (Podbielski e cols. 1996). A cepa CS101 do sorotipo M49 de *S. pyogenes* utilizada nesse estudo demonstrou ter o sistema Opp de transporte ativo, visto que na presença do peptídeo aminopterina (peptídeo tóxico,

análogo de ácido fólico, capaz de inibir a síntese de ácidos nucleicos, sabidamente transportado pelo sistema Opp – PINE, 1960) levou à morte dessa cepa bacteriana, enquanto que os mutantes do sistema Opp resistiram a uma concentração 20 vezes superior desse peptídeo. Apesar disto, a mutação desse sistema não apresentou modificação na capacidade e na cinética de crescimento em condições laboratoriais de meio rico ou parcialmente rico, bem como manteve inalterada sua capacidade de ligação a proteínas séricas e a células epiteliais. Esse perfil de adesão não elimina a possibilidade de o componente OppA estar diretamente relacionado à interação com componentes eucariotos, conforme observado para *S. pneumoniae*, pois os mutantes de GAS analisados apresentam a proteína intacta e mutação apenas no domínio ligador de nucleotídeos. Por outro lado, a análise do perfil de produção de proteases extracelulares, uma característica relacionada a invasividade desta espécie bacteriana, pela cepa mutante demonstrou uma redução na capacidade em degradar caseína, uma fosfoproteína, apresentando uma redução entre 50 e 70% na atividade proteásica do sobrenadante da cultura da cepa mutante em relação à selvagem, bem como o perfil alterado de proteínas extracelulares secretadas (SHANLEY e cols. 1996, PODBIELSKI e cols. 1996).

Análise do perfil de aderência a queratinócitos, um dos requisitos mais importantes para a avaliação da patogenicidade de GAS, foi realizada com mutantes específicos para deleção do gene *oppA* bem como para o operon *opp* completo. Em ambos os casos o perfil observado divergia do encontrado em *S. pneumoniae*, visto que foi observado um aumento na capacidade de adesão aos queratinócitos em comparação com a cepa selvagem. No entanto, esse fato foi acompanhado da verificação da diminuição da produção de ácido hialurônico associado à célula bacteriana, o que permitiu uma melhor exposição das adesinas presentes na superfície de GAS, e não por uma interação direta das proteínas do sistema Opp com as células eucarióticas (DARMSTADT e cols. 2000). Por fim, um mutante isogênico no gene *oppA* da cepa A-20 de GAS foi analisado quanto à expressão de uma série de fatores

de virulência, apresentando resultados diversos, como por exemplo, o aumento de expressão de alguns genes que codificam exotoxinas pirogênicas estreptocócicas, ao mesmo tempo em que foi verificado a diminuição de outros genes do mesmo grupo (WANG e cols. 2005). Essa mesma cepa foi utilizada em testes *in vivo* para análise da patogenicidade das cepas selvagem e mutante de GAS e foi observado uma diminuição na mortalidade e no dano tecidual de camundongos Balb/c quando da ausência do gene *oppA*, ressaltando que o sistema Opp, e mais especificamente a proteína OppA, apresenta papel importante na virulência de GAS.

5.3 *Streptococcus mutans*

S. mutans é um patógeno oral capaz de aderir à superfície dental e, em conjunto com outros fatores, promover a desmineralização dessa superfície abiótica, causando a cárie. Para que o desenvolvimento dessa patogenia seja efetivo, *S. mutans* deve ser capaz de aderir firmemente ao dente e produzir uma película de polissacarídeos capaz de impedir a ação tamponante da saliva. Sua adesão íntima ao elemento dental se deve à presença de adesinas específicas de seu envoltório, com destaque para a proteína P1, capaz de reconhecer e ligar componentes da saliva adsorvidos à superfície do dente (Brady e cols. 2010). Uma vez aderido a essa superfície, *S. mutans* promove a formação de polissacarídeos extra-celulares (PEC) pela ação das enzimas glicosiltransferases (Gtf), capazes de sintetizar PEC a partir de açúcares como sacarose (Bowen e cols., 2011).

A caracterização do sistema de transporte Opp de *S. mutans* demonstrou que esse é codificado pelos cinco genes encontrados em outros estreptococos, *oppA*, *B*, *C*, *D* e *F*. Apesar da observação dos genes do sistema Opp, em *S. mutans*, apenas uma cópia do domínio LS está presente, diferindo das demais bactérias desse gênero. Quando o sistema foi deletado do genoma de *S. mutans*, não foi observado aumento na resistência à aminopterina, indicando a presença de sistemas alternativos capazes de internalizar esse peptídeo. De modo semelhante, a cepa mutante não

alterou seu perfil de aderência à superfícies abióticas ou sua capacidade de internalizar DNA exógeno (NEPOMUCENO e cols. 2007).

Além do estudo realizado com *S. mutans*, outras bactérias orais tiveram seus sistemas de transporte Opp analisados. Esse grupo de estreptococos engloba bactérias das mais diversas classes de Lancefield, como o grupo K de *S. salivarius*, grupo H de *S. gordonii* e estreptococos não classificados, como o *S. sobrinus* (KILLIAN, 2002). Em 1990, Jenkinson e colaboradores identificaram uma proteína de superfície de 76kDa que posteriormente foi sequenciada e analisada pelo mesmo grupo como um ortólogo da proteína AmiA. Quando o gene que a codifica foi inativado, observou-se que *S. gordonii* apresentava uma redução na sua capacidade de adesão à película adquirida, uma camada de proteínas salivares adsorvidas ao dente, bem como uma redução em sua capacidade de agregação com saliva e com fluidos corpóreos como soro (JENKINSON e cols. 1990, JENKINSON, 1992). Esse ortólogo ficou conhecido como proteína HppA que, além das alterações na capacidade de aderência, demonstrou uma redução no taxa de replicação celular em meio rico, retardamento na indução do estado de competência natural e aumento da resistência à aminopterina, confirmando ser esse o sistema responsável pela captação de oligopeptídeos (JENKINSON e cols. 1996).

5.4 Outros *Streptococcus*

S. agalactiae, agente causador de infecções invasivas em neo-natos apresenta um sistema Opp com dois parálogos da proteína OppA, que possuem uma sobreposição nos peptídeos preferencialmente captados, e são relacionados com a capacidade dessa bactéria aderir a células epiteliais, fibrinogênio e fibronectina, apresentando uma redução de aderência na ordem de 26% a 35% quando da ausência do domínio integral de membrana, OppB (SAMEN e cols., 2004).

Ademais a estreptococos patogênicos humanos, o sistema Opp de transporte foi analisado em outras espécies bacterianas, como aquelas que são capazes

de crescer em leite e promover infecções intramamárias em gado leiteiro. *S. uberis* teve seu sistema de transporte de oligopeptídeos identificado em 2002, no qual um mutante no gene que codifica o domínio ligador de nucleotídeos, *oppF*, tornou-se incapaz de incorporar aminoácidos essenciais de peptídeos específicos, uma característica importante para seu crescimento em leite (SMITH e cols. 2002). Um parálogo do gene *oppA*, distante do operon *opp* primariamente descrito nessa espécie bacteriana, foi encontrado e mutantes específicos demonstraram que esse não era prioritariamente empregado na internalização de peptídeos, apesar de sua expressão ser aumentada consideravelmente quando a bactéria foi inoculada em leite, indicando que esse parálogo, nomeado *oppA2* apresenta um papel na virulência bacteriana, possivelmente como um mecanismo sensor do meio ambiente (*quorum-sensing*) (TAYLOR e cols. 2003). *S. thermophilus*, outra bactéria com capacidade de crescer na presença de leite, apresenta três parálogos do gene *oppA*, envolvidos diretamente com a internalização de peptídeos (Figura 2). De fato existe uma sobreposição entre os peptídeos preferencialmente captados pelos parálogos e a eliminação de qualquer um destes reduz a capacidade de crescimento bacteriano (GARAULT e cols. 2002; JUILLE e cols. 2005). Fora seu papel na internalização de nutrientes, o sistema Opp de *S. thermophilus* participa ativamente na indução do estado de competência dessa bactéria, visto que sua presença regula a ativação do gene *comX*, responsável por codificar o peptídeo de estímulo à competência (CSP) em estreptococos (GARDAN e cols., 2009).

6. PARA ONDE CAMINHA O ESTUDO DOS TRANSPORTADORES OPP NA PATOGENESE DE *STREPTOCOCCUS*.

A participação do sistema Opp na fisiologia e patogenicidade de *Streptococcus* está indicada na figura 03 e tabela 01. Como é possível notar, os diversos trabalhos que buscaram identificar o papel do sistema de transporte de oligopeptídeos na fisiologia e virulência dos estreptococo-

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA OPP NA FISIOLÓGIA E PATOGENICIDADE DE *STREPTOCOCCUS*.

Bactéria	Característica relevante	Gene mutado	Referência
<i>S. pneumoniae</i> TIGR	Atenuação em modelos murinos de infecção	<i>amiA</i> , <i>amiB</i> , <i>amiC</i>	Lau e cols. 2001
<i>S. pyogenes</i>	Redução na mortalidade e em danos teciduais de camundongos	<i>oppA</i>	Wang e cols. 2005
<i>S. gordonii</i>	Redução na capacidade de adesão	<i>hpaA</i>	Jenkinson e cols 1990, 1992
<i>S. mutans</i>	Não houve alteração na patogenicidade	<i>oppA-F</i>	Nepomuceno e cols. 2007
<i>S. agalactiae</i>	Redução na capacidade de adesão	<i>oppB</i>	Samen e cols. 2004
<i>S. uberis</i>	Possível papel no <i>quorum-sensing</i>	<i>oppA2</i>	Taylor e cols. 2003
<i>S. thermophilus</i>	Redução na expressão de CSP	<i>oppA</i>	Garadan e cols. 2009

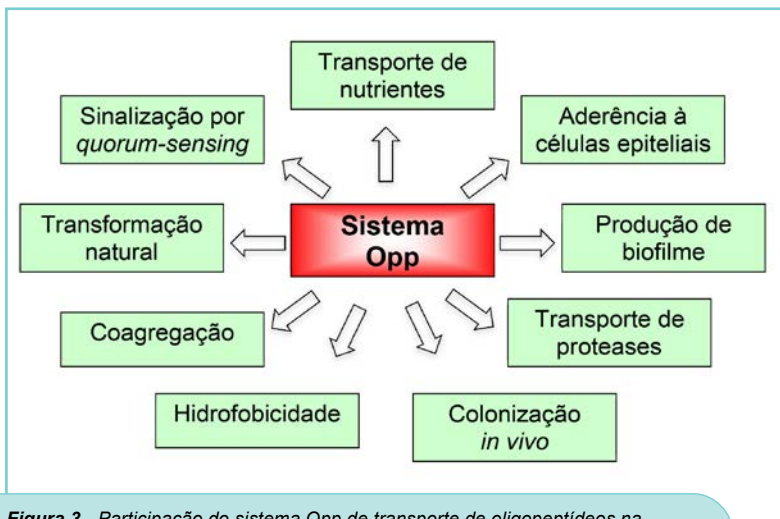


Figura 3 - Participação do sistema Opp de transporte de oligopeptídeos na fisiologia e patogenicidade de *Streptococcus*.

cos demonstraram uma grande variação de função desse sistema. Independente do nicho de colonização, podemos encontrar sistemas que agem exclusivamente como captadores de nutrientes, como aqueles envolvidos em mecanismos refinados de comunicação intercelular, *quorum-sensing*, mesmo dentro da mesma espécie bacteriana, mas em cepas distintas. Esse fato apenas reforça a riqueza de dados que podem porvir de estudos em um número maior de estreptococos, demonstrando a relevância do sistema Opp de transporte em bactérias, especialmente naquela envolvida na regulação global de expressão gênica de uma célula.

REFERÊNCIAS

Acosta MBR, Ferreira RCC, Ferreira LCS, Costa SOP (2005). Intracellular polyamine pools, oligopeptide-binding protein A expression, and resistance to aminoglycosides in

Escherichia coli. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** **100:** 789-793.

Alloing G, Trombe MC, Claverys JP (1990). The *ami* locus of the gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of gram-negative bacteria. **Mol Microb.** **4:** 633-644.

Alloing G, Phillip P, Claverys JP (1994). Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport nby the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. **J Mol Biol.** **241:** 44-58.

Ames BN, Ames GFL, Young JD, Tsuchiya D, Lecocq J (1973). Illicit transport: the oligopeptide permease. **Proc Nat Acad Sci.** **70:** 456-458.

Austrian R (1986). Some aspects of the pneumococcal carrier state. **J Antimicrob Chemother.** **18 Suppl A:** 35-45.

Blue CE, Mitchell TJ (2003). Contribution of a

response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. **Infect Immun.** **71:** 4405-4413.

Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, Jenkinson HF (2010). The changing faces of *Streptococcus mutans* antigen I/II polypeptide family adhesins. **BMol Microb.** **77:** 276-286.

Bowen WH, Koo H (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferase: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.** **45:** 69-86.

Calvo JM, Matthews RG (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. **Microb Rev.** **58:** 466-490.

Cashel M, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D (1996). The stringent response. p. 21458-1496. In Neidhrdt FC, Curtiss III RC, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schacchter M, Umberger AE (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. vol. 1. ASM Press, Washington, DC.

Claverys JP, Grossiord B, Alloing G (2000). Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? **Res Microbiol.** **151:** 457-463.

Cundell DR, Pearce BJ, Sandros J, Naughton AM, Masure HR (1995). Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. **Infect Immun.** **63:** 2493-2498.

Dassa E, Bouige P (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. **Res Microbiol.** **152:** 211-229.

Darmstadt GL, Mentele L, Podbielski A, Rubens CE (2000). Role of group A *Streptococcal* virulence factors in adherence to keratinocytes. **Infect Immun.** **68:** 1215-1221.

- Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (2006). Gram-positive pathogens. 2nd edition, ASM Press, Washington DC, USA;
- Garault P, Le Bars D, Besset C, Monnet V (2002). Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. **J Biol Chem.** **277**: 32-39.
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V (2009). The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. **J Bacteriol.** **191**: 4647-4655.
- Hava D, Camilli A (2002). Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. **Mol Microb.** **45**: 1389-1405.
- Jenkinson HF, Easingwood RA (1990). Insertional inactivation of the gene encoding a 76-kilodalton cell surface polypeptide in *Streptococcus gordonii* Challis has a pleiotropic effect on cell surface composition and properties. **Infect Immun** **58**: 3689-3697.
- Jenkinson HF (1992). Adherence, coaggregation, and hydrophobicity of *Streptococcus gordonii* associated with expression of cell surface lipoproteins. **Infect Immun.** **60**: 1225-1228.
- Jenkinson HF, Baker RA, Tannock GW (1996). A binding-lipoprotein-dependent oligopeptide transport system in *Streptococcus gordonii* essential for uptake of hexa-heptapeptides. **J Bacteriol.** **178**: 68-77.
- Juille O, Bars DL, Juillard V (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. **Microb.** **151**: 1987-1994.
- Kerr AR, Adrian PV, Estevão S, Groot R, Alloing G, Claverys JP, Mitchell TJ, Hermans WM (2004). The Ami-AliA/AliB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. **Infect Immun.** **72**: 3902-3906.
- Killian, M. 2002. Streptococcus and enterococcus, p. 174-188. In Greenwood, D., Slack, R.C.B. and F.F. Peutherer (eds). Medical Microbiology, 16th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Klepsch MM, Kovermann M, Löw C, Balbach J, Permentier HP, Fusetti F, de Gier JW, Slotboom DJ, Berntsson RPA (2011). *Escherichia coli* peptide binding protein OppA has a preference for positively charged peptides. **J Mol Biol.** **414**: 75-85.
- Köhler W (2007). The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Int J Med Microbiol.** **293**: 133-150.
- Lau GW, Haataja S, Lonetto M, Kensit SE, Marra A, Bryant AP, McDevitt D, Morrison DA, Holden DW (2001). A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. **Mol Microb.** **40**: 555-571.
- Lemos JAC, Brown Jr TA, Burne RA (2004). Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun.** **72**: 1431-1440.
- Monnet V (2003). Bacterial oligopeptide-binding proteins. **Cell Mol Life Sci.** **60**: 2100-2114.
- Nakamatsu EH, Fujihira E, Ferreira RCC, Balan A, Costa SOP, Ferreira LCS (2007). Oligopeptide uptake and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* K12. **FEMS Microbiol Lett.** **269**: 229-233.
- Nepomuceno RSL, Tavares MB, Lemos JA, Griswold AR, Ribeiro JL, Balan A, Guimarães KS, Cais S, Burne RA, Ferreira LCS, Ferreira, RCC (2007). The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence, and characterization. **Oral Microb Imm.** **22**: 277-284;
- Paul SP, Jerwood S (2012). Group A streptococcal septicemia, meningitides and cerebral abscess: case report and literature review. **Turk J Pediatr.** **54**: 180-183.
- Pine MJ (1960). Uptake of aminopterin by *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** **79**: 827-834.
- Podbielski A, Pohl B, Woischnik M, Körner C, Schmidt KH, Rozdzinski E, Leonard BAB (1996). Molecular characterization of group A streptococcus (GAS) oligopeptide permease (Opp) and its effect on cysteine protease production. **Mol Microb.** **21**: 1087-1099.
- Samen U, Gottschalk B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2004). Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. **J Bacteriol.** **186**: 1398-1408.
- Serron P, Sonenshein AL (1996). CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. **J Bacteriol.** **178**: 5910-5915.
- Shanley, TP; Schrier, D; Kapur, V; Kehoe, M; Musser, JM; Ward, PA (1996). Streptococcus cysteine protease augments lung injury induced by products of group A streptococci. **Infect Immun** **64**: 870-877.
- Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL, Pneumococcal carriage group (2012). The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert Rev Vaccines** **11**: 841-855.
- Sitkiewicz I, Hryniewicz W (2010). Pyogenic *Streptococci* – danger of re-emerging pathogens. **Pol J Microb.** **59**: 219-226.
- Smith AJ, Kitt AJ, Ward PN, Leigh JA (2002). Isolation and characterization of a mutant strain of *Streptococcus uberis*, which fails to utilize a plasmin derived β -casein peptide for the acquisition of methionine. **J App Microb.** **93**: 631-639.
- Steer AC, Lamagni T, Curtis N, Carapetis JR (2012). Invasive group A *Streptococcal* disease. **Drugs.** **72**: 1213-1227.
- Stieger B, Higgins CF (2007). Twenty years of ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Pflugers Arch.** **453**: 543.
- Taylor BL, Ward PN, Rapier CD, Leigh JA, Bowler LD (2003). Identification of a differentially expressed oligopeptide binding protein (OppA2) in *Streptococcus uberis* by representational difference analysis of cDNA. **J Bacteriol.** **185**: 5210-5219.
- Wang CH, Lin CY, Luo YH, Tsai PJ, Lin YS, Lin MT, Chuang WJ, Liu CC, Wu JJ (2005). Effects of oligopeptide permease in group A *Streptococcal* infection. **Infect Immun.** **73**: 2881-2890.
- Ye P, Harty D, Commandeur Z, Hunter N (2013). Binding of *Streptococcus gordonii* to oral epithelial monolayers increases paracellular barrier function. **Microb Path.** **56**: 53-59.

Biodiversidade ameaçada

por Vanessa Vieira

Expansão da produção de etanol tem impactado a diversidade de micro-organismos nos solos do cerrado brasileiro

Nos últimos dez anos, o petróleo foi alçado ao posto de grande vilão do aquecimento global. O etanol, por outro lado, passou a ser visto como alternativa ecologicamente correta frente à liberação de gases do efeito estufa resultante da queima de combustíveis fósseis. Graças ao uso desse biocombustível e da bioeletricidade o Brasil reduz em 22% ao ano suas emissões de CO₂. Com o etanol reabilitado, as lavouras de cana de açúcar se expandiram e hoje ocupam mais de nove milhões de hectares em todo o país. Nesse período, a produção do álcool combustível duplicou, atingindo 23 milhões de metros cúbicos.

Nesse processo, o Cerrado brasileiro se transformou na mais nova fronteira agrícola do setor sucroalcooleiro. Para se ter uma ideia, nos últimos cinco anos as áreas de cultivo nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul cresceram 300%, um fenômeno largamente impulsionado pelo programa brasileiro de biocombustíveis. Entretanto, pouco se conhece sobre o impacto do avanço das lavouras de cana sobre esse bioma, um dos maiores reservatórios mundiais de biodiversidade. Estima-se que o cerrado responda por um terço da biodiversidade brasileira e, conseqüentemente, por pelo menos 5% de toda a diversidade biológica do planeta. Faltam informações, sobretudo, no que diz respeito ao impacto dessa cultura sobre as comunidades bacterianas do solo do Cerrado e sobre suas propriedades.

Pensando nisso, pesquisadores do Centro de Energia Nuclear em Agricultura da Universidade de São Paulo; do Instituto de Microbiologia Paulo Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro; da Embrapa Solos e do Centro de Ecologia Microbiana da Michigan State University, dos Estados Unidos, uniram esforços para avaliar a estrutura das comunidades bacterianas do solo do cerrado em três situações: vegetação nativa; lavouras mecanizadas de

cana-de-açúcar e lavouras com coleta braçal, nas quais a queima da palha da cana precede a colheita. Para analisar a diversidade de filos e populações bacterianas os cientistas recorreram métodos de ponta, como o piro-sequenciamento.

Os resultados encontrados revelaram uma grande proporção de micro-organismos ainda não descritos, o que reforçou a crença na necessidade de preservar a biodiversidade desse bioma. “O solo do cerrado é um ecossistema muito complexo, com uma grande variedade bacteriana da qual uma parte substancial permanece desconhecida”, diz o pesquisador Alexandre Rosado, da UFRJ. Mas o que mais chamou a atenção foi a verificação de uma redução da população bacteriana nas áreas de cultivo de cana, em relação às áreas nativas. “Concluímos que o cultivo de cana de açúcar promoveu mudanças estruturais significativas na comunidade bacteriana, com o filo Firmicutas e a classe Acidobacteria sendo os grupos mais afetados”, comenta Alexandre.

Mas há diferenças no tamanho do impacto ambiental provocado por cada sistema produtivo. Os autores do estudo concluíram, por exemplo, que nas lavouras mecanizadas, onde não há queima da palha da cana, o dano sobre as co-

munidades bacterianas é menor do que o verificado nas lavouras de coleta manual. As comunidades bacterianas presentes nestas últimas foram as que mais diferiram das encontradas nas regiões de vegetação nativa. “Mais pesquisas serão necessárias para que possamos administrar? Não entendi o impacto provocado pelas mudanças no uso do solo através dos anos”, diz Alexandre Rosado.

REFERENCIAS

Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure, publicado na PLOS One <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0059342>

Estatísticas do setor sucroalcooleiro (Página da Única - União da Indústria de Cana de Açúcar) <http://www.unica.com.br/faq/>

Biodiversidade do cerrado. Post do jornalista Washington Novaes, especialista em meio-ambiente e consultor do primeiro relatório nacional sobre biodiversidade, no blog Mundo Sustentável, de André Trigueiro (GloboNews) <http://www.mundosustentavel.com.br/2012/05/desmatamento-no-cerrado-e-consequencias/>

MUDANÇAS NAS PROPRIEDADES DO SOLO

A seguir, algumas variações encontradas pelos pesquisadores nas amostras de solo de cerrado pesquisadas

Parâmetros	Controle	Colheita mecanizada	Colheita manual com queima
pH	6.6 ^a	6.4 ^a	5.8 ^b
Exchangeable Al	BD	BD	BD
Exchangeable Ca	11.4 ^a	10. ^b	4.3 ^c
Exchangeable Mg	3.9 ^a	2.1 ^b	1.6 ^c
Exchangeable Na	1.7 ^a	2.8 ^a	BD
Exchangeable K	306.6 ^b	735.6 ^a	280.0 ^b
Exchangeable H+Al	4.8 ^b	5.0 ^b	6.5 ^a
Total P	102.3 ^a	34.6 ^{ab}	32.6 ^b
SB ¹	16.1 ^a	14.2 ^b	6.6 ^c
CEC ²	20.9 ^a	19.0 ^b	13.1 ^c
V ³	77.0 ^a	74.7 ^a	50.4 ^b

Em busca de um novo modelo

por Vanessa Vieira

Em todo o mundo, cresce a pressão pela abolição do uso de animais em experimentos científicos. No Brasil, alguns pesquisadores têm estudado alternativas de modelos in vivo para substituir os testes feitos em mamíferos.

Após ter seu laboratório invadido por ativistas em outubro, o instituto de pesquisas Royal anunciou no começo de novembro o encerramento de suas atividades em São Paulo. No mês anterior, um grupo de manifestantes penetrou no Instituto – localizado em São Roque, a 66 quilômetros da capital paulista – para resgatar 178 cães da raça beagle usados em testes da indústria farmacêutica. Na nota em que justifica sua decisão, a direção do instituto afirmou que a retirada dos animais provocou “elevadas e irreparáveis perdas” e que o grupo teme pela segurança de seus funcionários. O episódio criou polêmica e popularizou um debate que já vem acontecendo nos bastidores, entre cientistas, governos, defensores dos direitos dos animais e as indústrias cosmética e farmacêutica.

No mundo todo, não faltam iniciativas para estimular a pesquisa de novos modelos de pesquisa e de ensino que não dependam da experimentação em animais. Uma das instituições que atua nessa linha é o European Resource Centre for Alternatives in Higher Education (Eurca), uma organização que pretende desenvolver métodos inovadores e criativos, e de alta qualidade, para substituir o uso de animais no ensino. Alguns projetos do centro são a criação de um banco de recursos didáticos alternativos, em sua maioria modelos eletrônicos; a montagem de uma rede de professores que disseminem ativamente suas experiências e boas práticas e o desenvolvimento de uma base de dados de modelos alternativos avaliados e testados por colegas.

Na esfera das pesquisas científicas, o Frame (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments, da Inglaterra) quer eliminar o uso de animais nos laboratórios, por meio de três práticas:

redução, aprimoramento e substituição. “Onde o uso dos animais atualmente é necessário, o Frame defende a redução dos números de espécimes envolvidos para o mínimo possível e o aprimoramento dos procedimentos para minimizar o sofrimento causado”, afirmam os organizadores da instituição, em sua página na internet. O passo seguinte seria a substituição progressiva dos animais nos testes. “Acreditamos que a atual escala de experimentação com animais é inaceitável”, acrescentam. Isso porque, segundo o sistema regulador europeu *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH)*, entidade que testa substâncias químicas, estima que seriam necessários 3,9 milhões de animais para realização dos ensaios com as substâncias químicas catalogadas cuja toxicidade ainda não foi avaliada para futuro uso em remédios e cosméticos.

Na América, uma das mais prestigiosas instituições de ensino do mundo, a Johns Hopkins School of Public Health, criou o seu Centro de métodos alternativos para os Testes com Animais. O centro incentiva o desenvolvimento e validação de alternativas aos animais na pesquisa, nos testes de produtos e na educação divulgando práticas e para isso está financiando uma bolsa de pós-doutorado de 40 000 dólares oferecida pelo Fundo Americano de Alternativas à Pesquisa Animal e pela Sociedade de Anti-viviseção da Nova Inglaterra.

No Brasil, universidades e entidades como a Sociedade Brasileira de Métodos Alternativos à Experimentação Animal e Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos têm se reunido na tentativa de divulgar a importância dessa temática no Brasil. Em 2010, foi realizado na Universidade Estadual Pau-

lista (Unesp) o fórum *Alternative and in vitro methods for the safety assessment of chemicals and their impact to the health and the environment: updating and perspectives* que contou com a presença de pesquisadores brasileiros e estrangeiros, como Thomas Hartung, diretor do Centro de Alternativas aos Testes em Animais da Universidade Johns Hopkins; Troy Seidle, diretor de pesquisa e toxicologia da organização de proteção aos animais Humane Society International, Chantra Eskes que trabalhou no European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) e atualmente é consultora e membro do Executive Board from the European Society of In Vitro Toxicology (ESTIV) e Dermeval de Carvalho, da Associação Brasileira de Cosmetologia. Ao lado de estudiosos da USP, UFSC, UFRJ, e de representantes de órgãos como Conceia, Anvisa, Fapesp, CNPq e Ministério da Ciência e Tecnologia, eles discutiram como reunir esforços para avançar na formulação de novas soluções de modelos de pesquisa. Uma das ideias é criar um núcleo para facilitar o desenvolvimento nas áreas de validação, revisão e adoção de métodos alternativos, propondo o financiamento de pesquisas relevantes e divulgando informação atualizada sobre o tema.

Alguns cientistas brasileiros já estão trabalhando no desenvolvimento de novos modelos de pesquisa *in vivo*. Um deles é a pesquisadora Liliâne Scorzoni, bolsista de pós-doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. No estudo *Antifungal Efficacy during Candida krusei Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile*, publicado em parceria com pesquisadores do Instituto de Salud Carlos III, da Espanha, e da Universidade de An-

tioquia, na Colômbia, Scorzoni e colegas da UNESP investigaram o uso de hospedeiros invertebrados no estudo de doenças fúngicas. Mais especificamente, os pesquisadores observaram larvas de traça da cera *Galleria mellonella* e o nematóide *Caenorhabditis elegans*, infectados com o fungo *Candida krusei*. O objetivo era avaliar a viabilidade desses modelos não-convencionais em análises sobre a eficácia de drogas antifúngicas. “Alguns aspectos da resposta inata desses hospedeiros são semelhantes ao que ocorre nos mamíferos. As larvas podem ser incubadas numa gama de temperaturas entre 25 e 37 graus Celsius, permitindo simular o habitat natural do fungo e as condições de infecção dos mamíferos. Além disso, assim como nos modelos em mamíferos, é possível introduzir por injeção doses exatas dos patógenos nas larvas”, dizem os pesquisadores no artigo.

Uma das limitações para a completa eliminação dos testes com animais é que, atualmente, ainda não é possível substituí-los em uma série de experimentos científicos, principalmente no desenvolvimento de medicamentos des-

tinados ao consumo humano. Porém, para a professora Maria José Mendes Giannini, pró-reitora de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista (Unesp) e membro do Conselho Superior da Fapesp, questões éticas, custos e resultados mais rápidos são alguns dos benefícios que incentivam o uso progressivo de modelos alternativos. “Os ensaios em animais podem apresentar dificuldades de correlação com os resultados em seres humanos. Por outro lado, alguns métodos alternativos aos animais vêm mostrando, inclusive, maior correlação com os estudos realizados em seres humanos. Um exemplo desta prática é o uso de células humanas para avaliar diversos efeitos toxicológicos que permitiriam melhor previsão de resposta a substâncias e produtos”, avalia.

Enquanto alguns cientistas, como a equipe da professora Maria José Giannini, se adiantam na pesquisa de novas alternativas de estudo, um levantamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação aponta que 195 das 375 instituições que usam animais em pesquisas

no Brasil estão com seus relatórios de prestação de contas atrasados e podem ter suas atividades suspensas. Os relatórios trazem informações sobre a quantidade de cobaias usadas em cada experimento, sobre as empresas beneficiadas pelos testes e sobre acidentes e mortes dos bichos durante os procedimentos. Segundo o Concea, essas instituições já foram advertidas e podem ser descredenciadas.

FONTES

Antifungal efficacy during Candida krusei infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. PLoS One – 2013;8(3):e60047. doi: 10.1371/journal.pone.0060047. Epub 2013 Mar 28

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments – <http://www.frame.org.uk/>

The Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) – <http://caat.jhsph.edu/>

The European Centre for the alternatives in higher education – http://www.academia.edu/970586/The_European_resource_centre_for_alternatives_in_higher_education

Uma esperança contra as mortes causadas pela PCM

por Vanessa Vieira

Uma vacina terapêutica poderia reduzir o tempo de tratamento e evitar sequelas e recidivas dessa infecção fúngica sistêmica

Em dezembro de 2009, a atriz americana Brittany Murphy – estrela de filmes como *Garota Interrompida* e *As Patrincinhas de Beverly Hills* – foi encontrada morta em sua mansão em Los Angeles. A causa da morte era uma combinação de pneumonia, anemia e intoxicação por remédios para infecção respiratória. Apenas seis meses mais tarde, o marido de Brittany, o roteirista britânico Simon Monjack, também veio a óbito. A autópsia concluiu que a morte dele fora causada por pneumonia aguda e severa deficiência de ferro. A revelação provocou a abertura de uma nova linha de investigação – a de que a morte do casal, na realidade, teria sido provocada pela maciça infestação de fungos na mansão, castigada pelo mofo.

Pouca gente sabe, mas algumas formas de infecções fúngicas podem ser altamente letais. É o caso da paracoccidiodomicose (PCM), uma doença pulmonar causada pelos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Entre 1996 e 2006, 1.853 pessoas morreram de PCM no Brasil. Essa micose sistêmica é a décima principal causa de mortes entre doenças infecciosas no Brasil e deixa mais vítimas fatais do que a conhecida Doença de Chagas.

A paracoccidiodomicose foi descrita por Adolfo Lutz em 1908 e ocorre principalmente nas zonas rurais do Brasil e de outros países da América do Sul. Suas vítimas são predominantemente trabalhadores rurais do sexo masculino, fumantes e etilistas crônicos, com condições nutricionais e socioeconômicas precárias. Talvez por sua incidência em uma população mais pobre, que vive distante dos grandes centros, a doença ainda seja desconhecida do grande público. A infecção por *Paracoccidioides* é

adquirida pela inalação dos conídios do fungo, que se alojam nos pulmões e se transformam em leveduras ao alcançar os alvéolos pulmonares. Embora a aquisição do fungo resulte tipicamente em infecções assintomáticas, em indivíduos com baixa imunidade, a doença pode se disseminar para outros órgãos, como baço e fígado.

ALTERNATIVA DIAGNÓSTICA

O tratamento convencional da paracoccidiodomicose é baseado na administração prolongada de drogas antifúngicas, como sulfonamidas, anfotericina B ou azóis. Em casos graves, a aplicação dessas drogas acontece por via endovenosa. Mas não há garantias, mesmo após o fim do tratamento, da completa destruição do fungo. O tratamento inicial pode demorar de dois a seis meses, mas tratamentos prolongados são necessários com frequência, e podem durar mais de dois anos. Recidivas são comuns, principalmente quando o tratamento não é seguido até o fim. A doença invariavelmente exige afastamento do trabalho ou da escola e, nos casos mais graves, a internação hospitalar prolongada também tem um alto custo. Mas uma nova opção de tratamento poderia advir da criação de uma vacina contra esse fungo.

Uma das tentativas nesse sentido envolveu o uso de amostras de *P. brasiliensis* de baixa virulência para imunizar camundongos. Essa infecção prévia foi capaz de proteger os

animais de uma infecção posterior por uma cepa de alta virulência, induzindo a resposta imune celular por meio da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ efetivos. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo em que os

camundongos foram imunizados com leveduras de alta virulência, atenuadas por radiação gama.

Ensaio de contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia) e histologia do pulmão, fígado e baço dos animais mostraram que houve redução de quase 100% da carga fúngica, além de altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a, específicos contra *P. brasiliensis*.

VACINAS DE DNA

Outra linha de pesquisa de vacinas contra a PCM aposta no uso da glicoproteína GP43, considerada o principal antígeno diagnóstico da paracoccidiodomicose. Em 1986, uma equipe da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), em parceria com o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná constatou que a GP43 reage com os anticorpos de praticamente 100% dos pacientes com a doença. Dez anos mais tarde, pesquisadores do Departamento de Microbiologia, Imunologia de Parasitologia da Unifesp fizeram o sequenciamento genômico do *P. brasiliensis* e, a partir desse ponto, apontaram um peptídeo -- o décimo de um painel de 25 -- que ficou conhecido como P10, capaz de estimular a resposta imunológica. "O peptídeo P10 tem o poder de induzir a produção de interferon gama e interleucina 2, substâncias que modulam a resposta imune à doença", explica Carlos P. Tabora, professor associado do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e chefe do Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/LIM53 da Universidade de São Paulo.

Para desenvolver uma vacina a partir

do P10, os cientistas começaram a pesquisar a melhor forma de fazer com que esse peptídeo reagisse com as células do sistema imunológico. "Vários veículos de entrega foram testados: nanopartículas, flagelina, células dendríticas", detalha Taborda. As células dendríticas, transfectadas com um plasmídeo contendo a sequência de DNA do P10, revelaram-se uma das melhores opções.

Quando testada em camundongos, tanto de forma profilática como terapêutica, a vacina de DNA contendo a sequência codificadora do peptídeo P10 mostrou-se capaz de ativar os linfócitos T e de reduzir a carga fúngica e o dano

aos tecidos infectados. A aplicação repetida da vacina de DNA gerou células de memória, conferindo uma proteção de longo prazo e preservando a integridade do tecido infectado. "A vacinação terapêutica com antígenos pode estimular a resposta das células imunológicas e se somar ao efeito protetor da quimioterapia, contra-atacando as possíveis recidivas e reduzindo as sequelas fibróticas", comenta Carlos P. Taborda, da USP.

Agora, o próximo passo para transformar uma vacina como essa numa alternativa ao tratamento convencional a paracoccidiodomicose é a realização de testes em humanos. "Nosso grande

desafio é conseguir recursos para fazer esses testes, que são muito caros", diz o pesquisador da USP. Segundo ele, o maior interesse em investir numa vacina terapêutica contra a PCM seria dos governos estadual e federal, já que o público-alvo desse tipo de tratamento é uma população carente, que não está no radar dos grandes laboratórios. Um avanço que poderia representar redução de tempo e de custos nos longos tratamentos contra a PCM, além de uma esperança para os milhares de vítimas anônimas dessa doença ainda largamente ignorada.

Selo de Qualidade SBM

Confiança na qualidade do produto

Em 2009 a Sociedade Brasileira de Microbiologia implantou o Selo de Qualidade SBM, com o objetivo de promover a certificação de produtos sanitariamente adequados quanto à presença de microrganismos. Em paralelo ao Selo, foi criado o Departamento de Avaliação de Produtos pela SBM, responsável pelas análises e pesquisas dos produtos, incluindo as embalagens e informações ao consumidor.

A certificação do produto começou a ser uma exigência do mercado e os fabricantes passaram a se preocupar mais em adequar sua produção e seus produtos dentro de parâmetros qualitativos e com preços competitivos. O programa de certificação da SBM visa certificar produtos quanto a sua qualidade microbiológica e/ou sua capacidade germicida.

O processo de certificação pela SBM segue um programa internacional, cujas diretrizes emanam da Organização Mundial de Saúde.

O primeiro produto a receber o Selo de Qualidade da SBM foi o Dettol® produzido pela empresa Reckitt-Benckiser nas formas de sabonete em barra, sabonete líquido e gel anti-séptico. Este selo foi concedido após avaliação de parecer técnico-específico emitido por especialistas indicados pela SBM.



Como solicitar o Selo SBM

As empresas interessadas em encaminhar seus produtos para avaliação do programa de certificação da SBM devem:

- Enviar carta à Sociedade Brasileira de Microbiologia e solicitar que o produto, fabricado ou comercializado no Brasil seja analisado para receber o Selo de Qualidade SBM;
- Também é preciso enviar estudos já realizados sobre o produto, como análises, pesquisas e formulação, além de informações adicionais que houver;
- Caso a comissão de avaliação achar necessário, novos testes em laboratórios credenciados poderão ser solicitados.

Vigência é de 24 meses

Depois do envio deste material, o SBM firma com a empresa solicitante um protocolo de pesquisa, informando os objetivos, procedimentos e tempo de estudo. A realização dos ensaios dura entre 30 a 90 dias e todas as análises realizadas, materiais e equipamentos utilizados obedecem a normas específicas para cada produto. Sendo o produto aprovado, deverá a Empresa assinar um Contrato que rege todos os pontos do relacionamento com a SBM, passando a efetuar um pagamento mensal pela utilização da marca. Este valor mensal também é definido conforme o resultado da análise do Questionário de Perfil da Empresa.

Para tornar possível mais essa atividade da SBM, foi realizado um convênio de parceria com empresa tradicional em proficiência, a Controllab.

Para obtenção de maiores esclarecimentos entre em contato com:
sbm@sbmicrobiologia.org.br

MICROBIOLOGIA *in foco*

SBM IN FOCO - A forma direta de falar com os microbiologistas.



Apresentamos o plano de comercialização para 1 ou 4 edição (ões) da Revista Microbiologia in Foco.

Periódico da Sociedade Brasileira de Microbiologia, com tiragem de 2000 exemplares e distribuição gratuita. Revista de informação e divulgação sobre temas em bacteriologia, micologia e virologia nas várias áreas de abrangência da Microbiologia: ambiental, agrícola, básica, de alimentos, industrial, médica humana e veterinária e oral.

A revista ainda conta com espaços para divulgação de consensos, agenda científica, atualidades e oportunidades de trabalho.

Venha fazer parte deste veículo de informação atualizada!

Atenciosamente,

Marina Baquerizo Martinez e Carlos P. Taborda - Editores
Sociedade Brasileira de Microbiologia

VALORES:

Capa Final Interna	1 edição R\$ 2.000,00	4 edições – R\$ 4.000,00 cada
Capa Final Externa	1 edição R\$ 2.500,00	4 edições – R\$ 5.200,00 cada
½ página (par)	1 edição R\$ 1.000,00	4 edições – R\$ 1.600,00 cada
Página Inteira (par)	1 edição R\$ 1.850,00	4 edições – R\$ 3.600,00 cada
½ página (impar)	1 edição R\$ 1.350,00	4 edições – R\$ 2.400,00 cada
Página Inteira (impar)	1 edição R\$ 2.150,00	4 edições – R\$ 4.400,00 cada

FORMA DE PAGAMENTO: 15 dias após a edição da Revista, através de boleto bancário com recibo oficial.

página inteira

21 x 28 cm

1/2 página

18 x 12 cm

Para anunciar entre em contato com Jair Cagnotto:

E-mail: financeiro@sbmicrobiologia.org.br

Telefone: (11) 3813-9647 ou 3037-7095

SBM SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA

WWW.SBMICROBIOLOGIA.ORG.BR

AGENDA 2014

Data: 1 a 6 de junho de 2014

Congresso Internacional de Micoplasmologia (IOM2014)

Blumenau - SC



Data: 22 a 24 de outubro de 2014

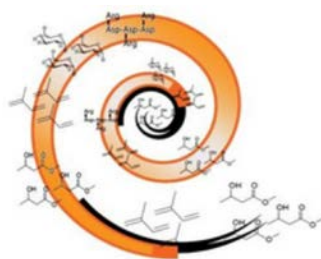
XVI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental

João Pessoa - PB



Data: 28 de setembro a 1 de outubro de 2014

14th International Symposium on Biopolymers Santos - São Paulo - Brazil



Data: 22 a 24 de outubro de 2014

4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica

João Pessoa - PB



Data: 12 a 15 de outubro de 2014

12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos (COLMIC) IV IAAP Latin America

13º Simpósio Internacional ABRAPA de Segurança de Alimentos

Symposium of the International Commission on Food Mycology

Foz do Iguaçu - Hotel Rafain



Data: 5 a 8 de novembro de 2014

XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia (2014 ALAM)

IV Congreso Colombiano de Microbiologia (4CCM 2014)

Catagena de Indias, Colombia.



SBM SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA

CURSOS

ESPECIALIZAÇÃO

Carga horária

904h compostas por 504 h presenciais, 200h de monografia e 200h de estudo dirigido.

Especialização em Microbiologia Clínica

Propósito principal

diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas.

Público alvo

graduados da área de saúde, biologia e profissionais atuantes em microbiologia médica.

Especialização em Microbiologia Ambiental / Industrial

Propósito principal

utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse comercial.

Público alvo

microbiologistas atuantes na área ambiental/industrial

Especialização em Microbiologia de Alimentos

Propósito principal

origem e estabelecimento da microbiota de alimentos cárneos, lácteos e vegetais.

Público alvo

graduados da área da saúde, em biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e microbiologistas atuantes na área de alimentos.

Local e Data

Quinzenalmente às sextas-feiras (19-23h) e aos sábados (9-18h)
Universidade São Paulo – Campus Butantã

Informações

Coordenação Pedagógica da SBM
curso @sbmicrobiologia.org.br
+55 11 3037-7095
www.sbmicrobiologia.org.br – link “cursos”

SBM SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
MICROBIOLOGIA

CURSOS

APERFEIÇOAMENTO

Carga horária

252h presenciais + 200h de estudo dirigido

Aperfeiçoamento em Microbiologia Clínica

Propósito principal

diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas.

Público alvo

graduados da área de saúde, biologia e profissionais atuantes em microbiologia médica.

Aperfeiçoamento em Microbiologia Ambiental / Industrial

Propósito principal

utilização de microrganismos para geração de produtos de interesse comercial.

Público alvo

microbiologistas atuantes na área ambiental/industrial

Aperfeiçoamento em Microbiologia de Alimentos

Propósito principal

origem e estabelecimento da microbiota de alimentos cárneos, lácteos e vegetais.

Público alvo

graduados da área da saúde, em biologia, veterinária, engenheiros de alimentos e microbiologistas atuantes na área de alimentos.

Local e Data

Quinzenalmente às sextas-feiras (19-23h) e aos sábados (9-18h)
Universidade São Paulo – Campus Butantã

Informações

Coordenação Pedagógica da SBM
curso @sbmicrobiologia.org.br
+55 11 3037-7095
www.sbmicrobiologia.org.br – link “cursos”

Os sócios da SBM têm direito a descontos especiais nos eventos promovidos ou patrocinados pela SBM. Para usufruir do desconto de associado em nossas atividades é imprescindível estar anuente a dois anos consecutivos com a sociedade. Além disso, têm acesso livre à revista científica *Brazilian Journal of Microbiology* (BJM) e que se destina à publicação de trabalhos de pesquisa originais, notas breves e revisões, envolvendo todos os aspectos da Microbiologia. É considerada uma das revistas científicas mais importantes do nosso país. O BJM tem uma política muito severa de avaliação dos trabalhos submetidos à publicação, sendo cada manuscrito avaliado por pelo menos dois revisores criteriosamente selecionados.

A revista *Microbiologia in Foco* tem o objetivo de promover o intercâmbio de informações científicas entre os associados, publicando os autores nacionais de expressão. Adota o mesmo critério de avaliação e excelência que a SBM sempre adotou. Enviaremos o último número da *Microbiologia in Foco* a todos os novos associados, após sua efetiva associação.

Fique sócio da SBM.

Veja informações no site: www.sbmicrobiologia.org.br

Lembre-se: um sócio da SBM integra a maior e mais representativa associação da comunidade científica que atua na microbiologia nacional.

Valores para associação

Categoria de Sócio	Anuidade 2014
Aluno de Graduação	R\$ 55,00
Aluno de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado)	R\$ 105,00
Pós-Doutorando	R\$ 165,00
Professional	R\$ 195,00
Assinatura Jurídica	R\$ 355,00

Diretoria

Biênio 2014-2015

SBM 2014-2015

Presidente

Marina Baquerizo Martinez (USP-SP)

Vice Presidente

Carlos Pelleschi Taborda (USP-SP)

1º Secretário

Gustavo Henrique Goldmann (FCRP-SP)

2º Secretário

Elizabeth de Andrade Marquez (UERJ – RJ)

1º Tesoureiro

Carla Taddei de Castro Neves (USP-SP)

2º Tesoureiro

Ana Lucia Figueiredo Porto (UFRP – PE)

Conselho Fiscal

Alexandre Soares Rosado (UFRJ-RJ)

Lauro Santos Filho (UFPB-PB)

Ana Lucia da Costa Darini (FCFRP – SP)

Representantes de Área

SBM 2014-2015

Coleções de Culturas

- Manuela da Silva, Fiocruz/RJ
- André Rodrigues - UNESP / Rio Claro

Ensino

- Maria Magali Stelato - PUC/Campinas
- Marcela Pelegrine Peçanha - PUC-SP / UNISO

Genética de Microrganismos e Bioinformática

- Gustavo Goldman – USP/SP
- Iran Malavazi - UFSCAR

Infecção Hospitalar

- Afonso Luis Barth - UFRGS
- Lauro Santos Filho - UFPB

Micologia

- Célia Maria de Almeida Soares, UFG, GO
- Rosely Maria Zancopé Oliveira - FIOCRUZ

Micotoxinas

- Idjane Oliveira - UFPE/PE
- Beatriz Thie Iamanaka - ITAL - SP

Microbiologia Ambiental

- Valéria Mia – UNICAMP
- Raquel Peixoto – UFRJ

Microbiologia Clínica

- Ana Lucia da Costa Darini - USP/Ribeirão Preto
- Jorge Luiz Mello Sampaio - USP/SP

Microbiologia de Alimentos

- Elaine de Martins - USP/Ribeirão Preto
- Mariza Landgraf - USP/São Paulo

Microbiologia do Solo

- Fernanda Andrade - UFC
- Vânia Maria Maciel Melo – UFC

Microbiologia Industrial e Biotecnologia

- Luiz Henrique Guimarães – USP/Ribeirão Preto
- Adalberto Pessoa Junior - USP/SP

Microbiologia Veterinária

- Rinaldo Aparecido Mota – Universidade Federal Rural de Pernambuco
- Miliane Moreira Soares de Souza - UFRJ

Patogenicidade Bacteriana

- Agnes Marie Sá Figueiredo - UFRJ
- Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral – Univ. Federal de São Paulo

Patógeno-Hospedeiro

- André Báfica - UFSC
- Leticia Carneiro - UFRJ

Virologia

- Flávio Guimarães da Fonseca – UFMG/MG
- Luciana Barros de Arruda, UFRJ-RJ

