

SBM SOCIEDADE  
BRASILEIRA DE  
MICROBIOLOGIA

#01

# MICROBIOLOGIA

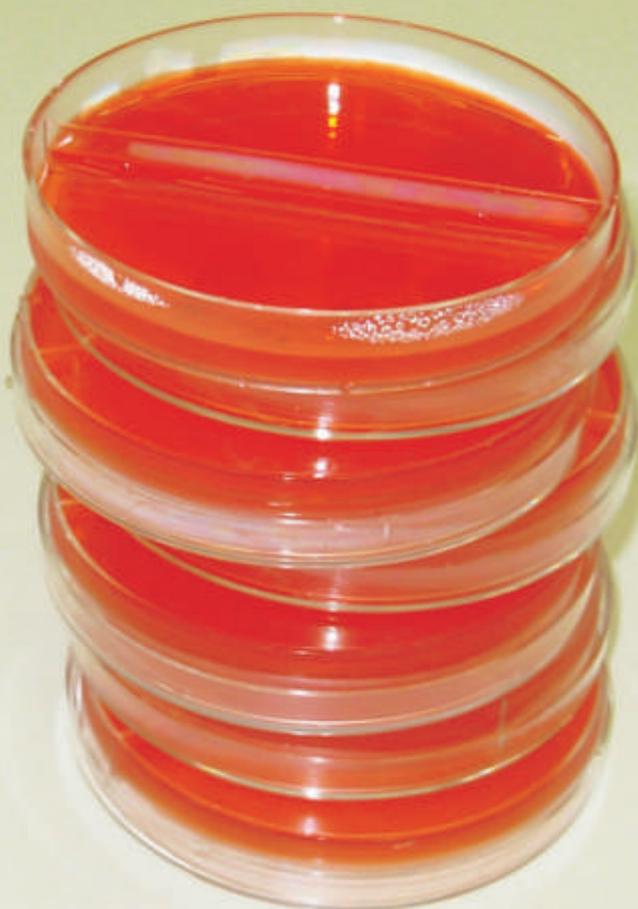
*in foco*

julho - 2007

**A revista do  
Microbiologista.**

informativo sbm • ano 1 • [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)

# Um novo enfoque em Microbiologia.



## Consensos

**Testes de  
Sensibilidade  
In Vitro a  
Antifúngicos  
2006**

## SBM 50 anos

**Prof. Dr. Luiz  
Rachid Trabulsi**

# Diretoria

Biênio 2006-2007

## Presidente

Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez  
presidente@sbmicrobiologia.org.br

## Vice-presidente

Profa. Dra. Marisa Landgraf

## 1º Secretário

Prof. Dr. Jorge Luís de Melo Sampaio

## 2ª Secretária

Profa. Dra. Loreny Gimenez Giugliano

## 1º Tesoureira

Profa. Dra. Marcia Alves Pinto Mayer

## 2º Tesoureiro:

Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado

## Conselho Fiscal:

Membro: Bernadette Franco (FCF-USP)  
Membro: Antonio Fernando Pestana de Castro (ICB- USP)  
Membro: Carlos Pelleschi Taborda (ICB-USP)

# Representantes de Área

SBM 2006-2007

## Microbiologia Médica

Beatriz Guth, UNIFESP, SP  
Agnes Sá Figueiredo, UFRJ, RJ  
medica@sbmicrobiologia.org.br

## Infecção Hospitalar

Carlos Emilio Levy, CINHE Boldrini, SP  
Katia Regina Netto dos Santos, UFRJ, RJ  
hospitalar@sbmicrobiologia.org.br

## Microbiologia Clínica

Lauro Santos Filho, UFPb, PB  
Pedro Alves D'Azevedo, FFFCMPA, RS  
clinica@sbmicrobiologia.org.br

## Relação Parasita-Hospedeiro

Carlos Pelleschi Taborda, USP,SP  
Marcelo Torres Bozza, UFRJ, RJ  
parasito.hosp@sbmicrobiologia.org.br

## Microbiologia Ambiental

Leda C. S. Mendonça Hagler, UFRJ, RJ  
Irma Nelly Gutierrez Rivera, USP, SP  
ambiental@sbmicrobiologia.org.br

## Microbiologia de Solos

Alexandre Rosado, UFRJ, RJ  
Mariangela Hungria, EMBRAPA, PR  
solo@sbmicrobiologia.org.br

## Microbiologia de Alimentos

Mario Killner, SFDK, SP  
Ricardo Souza Dias, FUNED, MG  
alimentos@sbmicrobiologia.org.br

## Microbiologia Industrial

Adalberto Pessoa Jr, USP, SP  
Glaucia Pastore, UNICAMP, SP  
industrial@sbmicrobiologia.org.br

## Microbiologia Veterinária

Walter Lilenbaum, UFF, RJ  
Silvio Arruda Vasconcellos, USP, SP  
veterinaria@sbmicrobiologia.org.br

## Micologia

Maria José Mendes Giannini, UNESP, SP  
Rosane Christine Hahn, UFMT, MT  
micologia@sbmicrobiologia.org.br

## Virologia

Maria Lucia Racz, USP, SP  
Divina das Dores de Paula Cardoso,  
UFG, GO  
virologia@sbmicrobiologia.org.br

## Coleções de Cultura

Rosana Filomena Vazoller, USP, SP  
Lara Durães Sette, UNICAMP, SP  
colecacao@sbmicrobiologia.org.br

## Ensino de Microbiologia

Maria Ligia Carvalhal, USP  
Márcia Zorello Laporta  
ensino@sbmicrobiologia.org.br

## Sociedade Brasileira de Microbiologia

Av. Professor Lineu Prestes, 2415  
ICB III - Cidade Universitária  
05508-900 - São Paulo/SP  
Telefax: 55.11.38139647  
www.sbmicrobiologia.org.br  
sbm@sbmicrobiologia.org.br

# Prezado Microbiologista,

Temos o prazer de trazer até vocês uma nova publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia com escopo principal de divulgação científica, **Microbiologia in foco**. Será uma publicação trimestral com tiragem inicial de 2.000 exemplares, que serão distribuídos para Departamentos de Universidades e Faculdades, Indústrias, Laboratórios e outros serviços ligados à Microbiologia.

A Revista será de informação e divulgação exclusivamente sobre bactérias, fungos e vírus nas várias áreas de abrangência da Microbiologia e várias seções comporão, em princípio, o corpo da revista:

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: SBM 50 anos - Homenagens a profissionais com destaque na fundação da SBM e no desenvolvimento da Microbiologia.

Seção 5: Ensino em Microbiologia.

Seção 6: Departamentos *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 às Empresas. Esse primeiro número foi elaborado com sugestões de colegas próximos à diretoria da SBM e os artigos incluídos são dos convidados que prontamente se dispuseram a colaborar.

Para os próximos números, esperamos e contamos com sua colaboração ativa, enviando sugestões, informações, enfim tudo que achar conveniente para divulgação.

Com mais esse canal de comunicação, a SBM espera promover e incentivar cada vez mais a geração e disseminação de conhecimentos em Microbiologia.

Para o sucesso desta publicação, a SBM conta com a sua adesão: leia, critique, espalhe a notícia, contribua com artigos, sugestões, informações, enfim tudo que achar pertinente. Juntos, com certeza essa iniciativa da SBM terá o alcance e a penetração esperada para que a Microbiologia seja divulgada nos mais diversos setores da comunidade brasileira.

Escrevam para [vgambale@usp.br](mailto:vgambale@usp.br) ou [taborda@usp.br](mailto:taborda@usp.br).

Os Editores contam com vocês.



**Marina B. Martinez**  
Presidente

**Walderez Gambale**  
**Carlos P. Taborda**  
Editores

## Expediente

**SBM in Foco**  
*Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia*

Vol. 1, nº 1 (Julho, Agosto, Setembro)  
São Paulo: SBM, 2007

Periodicidade Trimestral

**Editores**  
Carlos Taborda  
Walderez Gambale

**Marketing e Publicidade:**  
**Prix Eventos**  
Silvia Neglia - Diretora  
Fone/fax: 51.32496164  
[microbiologia@prixeventos.com.br](mailto:microbiologia@prixeventos.com.br)

## Ciência in Foco

### METANO

Mudanças Climáticas Globais e a Microbiologia . . . . . 4

### EPIDEMIA DE AIDS E SEGURANÇA

#### TRANSFUSIONAL:

Grupo de hemocentros brasileiros se une ao Retrovirus Epidemiology Donor Study . . . . . 10

### TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA:

Correspondências históricas. . . . . 13

### RNA INTERFERÊNCIA:

A nova corrida do ouro . . . . . 17

### SEGURANÇA DE ALIMENTOS:

Novas ferramentas de gestão dos riscos microbiológicos . . . . . 22

## Consensos

### TESTES DE SENSIBILIDADE IN VITRO A ANTIFÚNGICOS 2006

. . . . . 24

## SBM 50 anos

**PROF. DR. LUIZ RACHID TRABULSI** . . . . . 35

**Notícias in Foco** . . . . . 37

**Agenda in Foco** . . . . . 37

**Editoração e Impressão:**  
Dolika Áfa Artes Gráfica: (51) 3343.5533  
Diagramação: André Saboia

**Tiragem:** 2000 exemplares  
Circulação Nacional - Distribuição Gratuita

**Responsabilidade editorial:**  
Todos os artigos assinados são de responsabilidade dos respectivos autores.

# METANO

## Mudanças Climáticas Globais e a Microbiologia.



Vivian H. Pellizari \*,  
Cristina R. Nakayama,  
Ana Carolina V. Araújo,  
Rhavena G. Liotti e  
Rosana F. Vazoller

Laboratório de Microbiologia Ambiental,  
Departamento de Microbiologia,  
Instituto de Ciências Biomédicas,  
Universidade de São Paulo.  
\* vivianp@usp.br.

Culminando com a liberação da quarta parte do Relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) da ONU, o debate sobre os impactos futuros associados à mudança climática nunca esteve tão em alta. Muitas destas mudanças, que incluem alterações na atmosfera, oceano e ecossistemas terrestres, apesar de fazerem parte da história natural do planeta foram aceleradas pelos seres humanos. No entanto, pouco é lembrado sobre as contribuições microbianas para a ocorrência ou solução destas alterações. Este fato não é de difícil compreensão, sobretudo ao considerarmos o reduzido conhecimento que possuímos em relação ao impacto da atividade antropogênica nas comunidades microbianas, bem como sobre a diversidade microbiana ou microbiodiversidade nos diferentes ecossistemas do planeta. Entretanto, não restam dúvidas quanto à importância da atividade microbiana nas reações químicas que ocorrem na superfície terrestre, em outras palavras, sobre o comando exercido pelos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos.

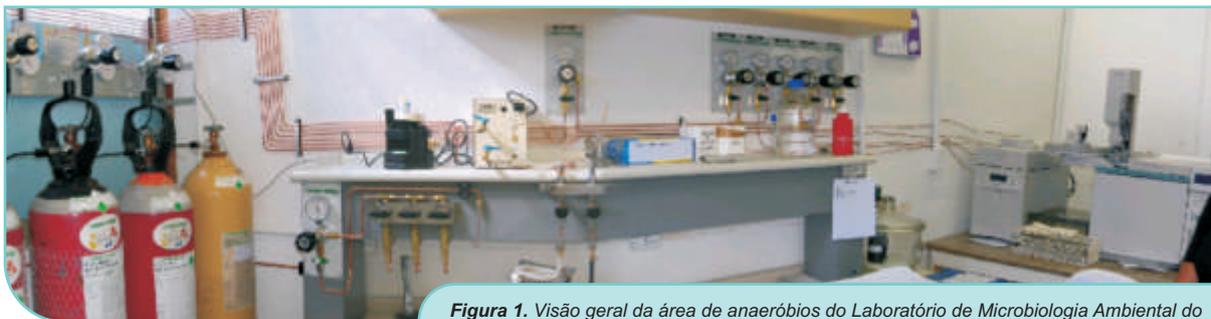
Os microrganismos são elementos chave nas mudanças climáticas globais, e compete também aos microbiologistas empreender investigações que gerem conhecimento sobre o papel desses seres vivos nas alterações do Planeta, bem

como nas adversidades e venturas conseqüentes das modificações no equilíbrio de ecossistemas. Um dos pontos focais das mudanças climáticas, sem dúvida, refere-se à questão dos gases de efeito estufa (GEE). Os GEEs relacionam gases como o metano, os óxidos de nitrogênio, os halo-metanos e o mais conhecido de todos, o dióxido de carbono. A contribuição biológica na composição atmosférica é marcante. Porém, sem hesitação, pode-se afirmar que é a compreensão da microbiota envolvida na formação e consumo dos gases, notadamente os de efeito estufa (GEE), que fará surgir novas fronteiras do conhecimento sobre o aquecimento terrestre, mediante um exame microscópico de eventos de extraordinário impacto a todo o Planeta.

Desde a origem da vida na Terra os microrganismos vêm modificando a composição da atmosfera. O primeiro oxigênio molecular foi produzido a 3.8 bilhões de anos atrás pelas cianobactérias ou algas verde-azuladas. Com o acúmulo desse oxigênio, várias formas de vida surgiram, adaptadas principalmente a utilizar o oxigênio para otimizar seu metabolismo. A presença do oxigênio na atmosfera permitiu também a formação da camada de ozônio que passou a proteger a terra dos raios ultravioleta contribuindo para a colonização da Terra.

Lançar luz sobre a contribuição microbiana na composição e regulação de gases atmosféricos, revela muitos grupos microbianos envolvidos com a geração de gases, como fotossintetizantes, fermentativos acidogênicos, sulfato-redutores, desnitrificantes, metanogênicos, metanotróficos, entre outros. Alguns deles são espécies bastante conhecidas no âmbito da Microbiologia Ambiental e Sanitária, e possuem imensurável valor à Biotecnologia aplicada ao Saneamento Ambiental, quer seja pelos processos clássicos do tratamento anaeróbio de resíduos ou pelos mais modernos como as notáveis práticas *in situ* da biorremediação.

Há alguns anos, o grupo de pesquisas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas USP vem dedicando-se à microbiologia envolvida com os GEEs, particularmente o gás metano. Iniciou seus trabalhos com o apoio do Programa Biota- FAPESP. Nessa oportunidade, estruturou-se a área para manipulação de organismos produtores e consumidores de gases (Figura 1), o que viabilizou os estudos sobre diversidade microbiana funcional em amostras de áreas contaminadas do Sistema Estuarino Santos-São Vicente e a constatação da geração do gás metano nos sedimentos e coluna d'água locais. Em conseqüência,



**Figura 1.** Visão geral da área de anaeróbios do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

elucidaram-se grupos procariontes anaeróbios degradadores de organoclorados sob metanogênese, além de complementar as investigações de exploração tecnológica da atividade microbiana na área estuarina conduzidas por pesquisadores da Escola de Engenharia de São Carlos USP (NAKAYAMA, 2005; SAIA *et al.*, 2007).

Posteriormente, o grupo do LMA atuando junto ao Programa Antártico Brasileiro - Proantar, viabilizou em parceria com o INPE- São José dos Campos - determinações *in situ* do gás metano (Figura 2) e detectou grupos metanogênicos e metanotróficos na Baía do Almirantado (NAKAYAMA, 2006). Mais tarde, foi através das investigações com amostras de aterros sanitários em estudos sobre barreiras biológicas à GEE, que o grupo de pesquisas confirmou sua competência no estudo sobre fisiologia e identificação de organismos consumidores do gás metano os metanotróficos (LIOTTI, 2007). O domínio dos métodos clássicos e moleculares do tema "organismos envolvidos no ciclo do metano" estimulou as pesquisas sobre

a presença dos grupos procariontes produtores e consumidores desse GEE na região amazônica, possibilitando a integração do LMA no PRONEX-Rondônia do Departamento de Microbiologia do ICB-USP.

O enfoque desse artigo não pretende cobrir todos os microrganismos envolvidos com os GEEs, mas buscar esclarecer um dos mais importantes grupos da natureza envolvidos com a produção do gás metano, bem como apontar algumas curiosidades sobre os organismos consumidores do metano, os metanotróficos.

O gás metano é um dos GEE priorizados em 1997 pelo Protocolo de Kyoto (2004). Segundo Holmes (1999), nos últimos 300 anos as emissões do gás metano aumentaram aproximadamente 1% ao ano, sendo o potencial de absorção de radiação infravermelha pelo metano estimado em 21 equivalentes de  $\text{CO}_2$  (KIGHTLEY *et al.*, 1995; HANSON & HANSON, 1996; BOECKX & CLEEMPUT, 2000), ou seja, ele é ao menos vinte vezes mais potente que o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o gás mais conhecido do efeito estufa.

O efeito estufa é conseqüente da ação desses gases que, em conjunto, impedem que a radiação infravermelha seja totalmente retransmitida da Terra para o espaço. Embora esse processo seja vital para a manutenção da temperatura no planeta, o aumento na concentração dos GEEs podem alterar os padrões de absorção e reflexão da radiação infravermelha e, conseqüentemente, resultar na elevação da temperatura média da superfície terrestre, com possível derretimento das calotas polares e o aumento do nível dos oceanos. O metano, apesar de lançado em menor quantidade, tem um poder no aquecimento global superior ao causado pelo gás carbônico. Aliado a esse fato, o tempo de vida relativamente curto do metano na atmosfera, de 8 a 12 anos, estimula os estudos tecnológicos e científicos em direção à redução de sua emissão (USEPA, 2006).

A produção do metano pode se dar tanto por processos biogênicos quanto abiogênicos. Cerca de  $\frac{1}{4}$  da emissão total de metano na atmosfera é abiogênica, o que inclui fontes como extração, transporte, distribuição e consumo de combustíveis fósseis (ex.: fissura em tubulações, combustão incompleta entre outros). As fontes biogênicas de metano, resultantes da atividade de microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea*, as arqueias metanogênicas, incluem tanto as naturais, quanto aquelas geradas pela atividade antrópica. Dentre as primeiras, podem-se citar os sedimentos alagados ( $100\text{-}200 \text{ Tg}^1\text{CH}_4/\text{ano}$ ), os hidratos de metano, os solos congelados, os corpos de água doce, os oceanos, os cupins e as combus-



**Figura 2.** Cúpula para coleta de metano na interface oceano-atmosfera (a); junção da cânula de saída da cúpula com a seringa utilizada para a amostragem do gás (b).

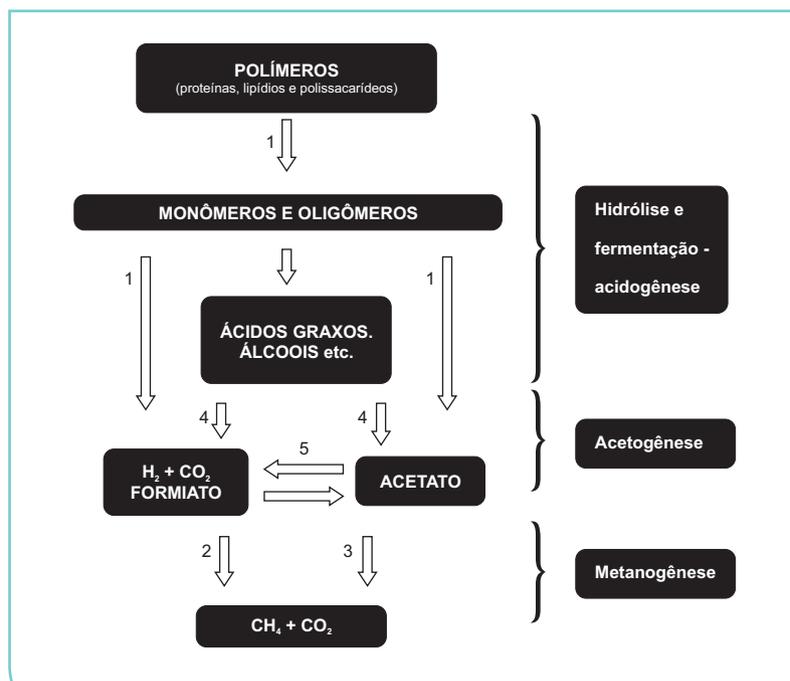
1. Teragrama (Tg) = unidade métrica de massa igual a 1012 g ou 1 megaton (um milhão de toneladas métricas). É uma unidade freqüentemente empregada em ciência da atmosfera e outros contextos científicos nos quais grandes massas são consideradas.

tões espontâneas em ambientes secos (USEPA, 2006). Como exemplos de atividades humanas que levam a uma grande geração de metano devem-se mencionar as atividades agropecuárias principalmente a criação de gado e os arrozais, com respectivamente 65-100 TgCH<sub>4</sub>/ano e 25-150 TgCH<sub>4</sub>/ano, correspondendo de 15 a 45% das emissões antropogênicas e a queima de biomassa e o tratamento de lixo, especialmente os sistemas de aterros sanitários (NAKICENOVIC & SWART, 2000; GARCIA *et al.*, 2000), além de áreas alagadas criadas pelo homem, como represas e hidrelétricas. Estima-se que as emissões relacionadas a atividades humanas são responsáveis por 60% da emissão global desse gás para a atmosfera (USEPA, 2006). A Tabela 1 apresenta exemplos de fontes naturais e antropogênicas, bem como quantidades de emissão e consumo do metano no ambiente. Os valores mostram que, no balanço final, há emissão de metano da ordem de 40 Tg/ano, um resultado final oriundo das atividades antropogênicas.

A produção biogênica do metano é comandada pelas arqueias metanogênicas e constitui o passo final do fluxo de carbono em habitats anaeróbios como sedimentos marinhos, de água doce, solos alagados, ambientes geotermais, trato digestivo de ruminantes etc. A conversão da matéria orgânica a metano ocorre pela cooperação entre diferentes grupos de microrganismos, como mostrado no esquema da Figura 3.

Apesar do enorme significado da emissão biogênica do metano, há relativamente poucos estudos sobre as comunidades microbianas metanogênicas em campos abertos, como em sedimentos de alagados, rios, lagoas, represas e oceanos (KEMNITZ, 2004).

Na Bacia Amazônica, por exemplo, há progressos no reconhecimento da presença do metano tanto em rios quanto em represas, bem como indicações da ação microbiana na geração do gás (CO<sub>2</sub> SCIENCE, 2004). Como apontado nos experimentos conduzidos no âmbito do LBA<sup>2</sup> (Experimento de Larga Escala da Biosfera-Atmosfera da Amazônia)<sup>2</sup>, em



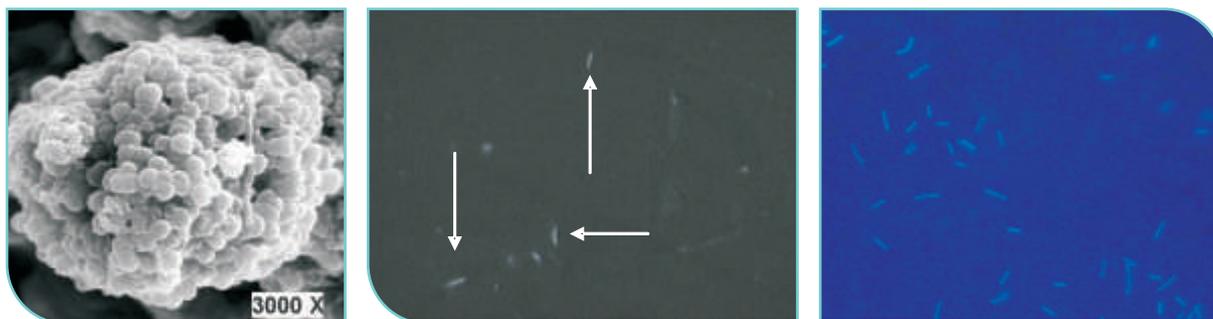
**Figura 3:** Fluxo de carbono na degradação de matéria orgânica em ambientes naturais. Os números ao lado das setas referem-se ao tipo de microrganismo responsável pela realização do respectivo passo na degradação: 1 - bactérias fermentadoras primárias, 2 - arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, 3 - arqueias metanogênicas acetoclasticas, 4 - fermentadoras acetogênicas, 5 - homoacetogênicas.

que se destacam aspectos importantes de pesquisa para a região, como o sistema climático, o ciclo biogeoquímico do carbono, a química e física da atmosfera, além da hidrologia e química de águas superficiais, há um considerável desconhecimento dos valores existentes no Brasil que forneçam uma base sólida para estimativas de fatores de emissão e absorção para os gases de efeito estufa-chaves (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, e N<sub>2</sub>O), bem como dos gases reativos que controlam o potencial oxidante da atmosfera (O<sub>3</sub>, CO, NO<sub>x</sub>, NO<sub>y</sub>, e hidrocarbonetos) e que afetam a concentração do CH<sub>4</sub>. Em conjunto, os gases reativos e os aerossóis atmosféricos afetam significativamente o balanço radiativo atmosférico de modo ainda desconhecido para a região Amazônica, atingindo os ciclos biogeoquímicos de nutrientes essenciais para a Floresta Amazônica. Além disso, as alterações ocasionadas pelo uso do solo na Amazônia afetam a concentração de gases de efeito estufa, de aerossóis e de gases que regu-

lam a capacidade de oxidação da atmosfera. Em estudos que relacionam a emissão do metano e a variação climática na região da Floresta Nacional de Tapajós, próximo a Santarém, revelou-se que a perda de água do solo, devido à variação do índice de pluviosidade inibiu a produção de gases como o nitroso (NO<sub>2</sub>) e o metano. Ainda, a redução do metano foi confirmada em 4 vezes mais do que a normalmente determinada, provavelmente como um efeito direto da aeração do solo que pode causar alteração na atividade de grupos de microrganismos como os desnitrificantes, metanogênicos e metanotróficos (DAVIDSON *et al.*, 2004).

Os resultados de pesquisas do LMA na Bacia do Rio Madeira, em Rondônia, revelam a presença do gás metano em áreas consideradas tanto eutrofizadas como não eutrofizadas (Araújo, dados não publicados), e os experimentos de isolamento mostram a presença de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e acetotróficas

2. Projeto Temático aprovado pela FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Setembro de 1997. Interações Físicas e Químicas entre a Biosfera e a Atmosfera da Amazônia no Experimento LBA.



**Figura 4.** Fotomicrografias de arqueias metanogênicas. (a) micrografia eletrônica de varredura de células metanogênicas; (b) bacilos retos sob luz UV. As fotos são apenas ilustrativas, uma vez que não se encontram inseridas as ordens de magnitude.

em sedimentos dos Rios Madeira e Floresta.

Estudos de arqueias metanogênicas em ambientes marinhos são mais comumente associados aos sedimentos. Altas taxas de produção de metano foram detectadas em sedimentos de estuários, pântanos, deltas de rios e em bacias marinhas isoladas (BERNARD, 1979; SANSONE & MARTENS, 1981), com produções que resultam não apenas no acúmulo de metano no sedimento, como no transporte do gás para a atmosfera (SANSONE & MARTENS, 1981). De uma maneira geral, os diversos processos de respiração que ocorrem nos sedimentos marinhos são geralmente estratificados, devido a um gradiente decrescente de potencial de oxidação-redução formado como consequência do consumo de oxigênio, nitrato e manganês, ferro e sulfato, nesta ordem, por grupos específicos de microrganismos (BRAKER *et al.*, 2001). Nessa lógica, considera-se que a metanogênese ocorre abaixo da faixa de redução de sulfato, em camadas mais profundas do sedimento, onde se desenvolvem condições de anaerobiose estrita e baixos valores de potencial de oxidação-redução.

Estudos sobre a caracterização de comunidades metanogênicas também têm sido feitos em sedimentos associados a áreas de hidratos de metano (formações compostas por metano envolto por moléculas de água congelada que se formam sob condições de alta pressão, baixa temperatura e altas concentrações de gás), os quais constituem grandes depósitos do gás aprisionados em áreas oceânicas profundas. Nesses estudos, foram encontradas seqüências de *Archaea* pertencentes

predominantemente a grupos metanogênicos, mostrando sua relação com a gênese das grandes formações de hidratos de metano.

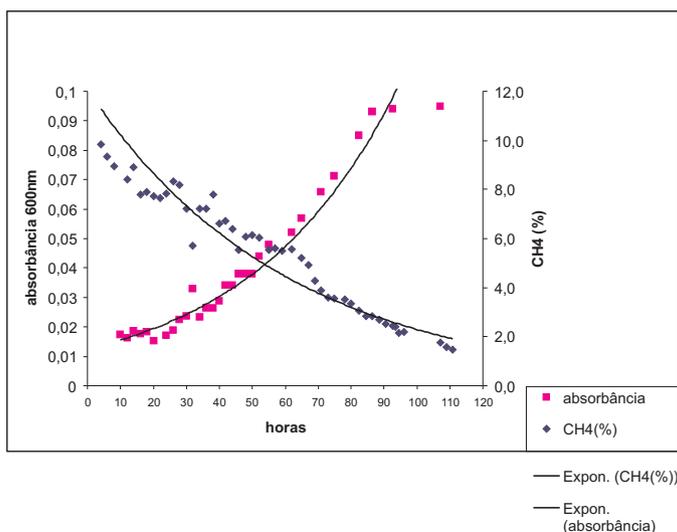
As pesquisas realizadas no LMA no âmbito do Programa Antártico Brasileiro têm revelado a produção do metano e a atividade metanogênica em diversos pontos da Península Antártica, particularmente na Baía do Almirantado. A Figura 4 mostra morfologias de arqueias metanogênicas. Estudos sobre respostas das células expostas à luz UV durante os estudos de isolamento revelaram que ambas as morfologias predominantes, cocos e bacilos, apresentaram auto-fluorescência, característica que distingue as arqueias metanogênicas que possuem a enzima  $F_{420}$ , envolvida na via de produção do metano e responsável por essa à luz nesse comprimento de onda (NAKAYAMA, 2006).

O estudo de comunidades microbianas envolvidas com GEE no ambiente é de grande relevância, sobretudo em regiões como a Antártica, uma vez que essa é uma área que vem sofrendo alterações em decorrência do aquecimento global, e constitui-se ainda em um ambiente prístino, com características particulares que tornam justificáveis as pesquisas envolvendo o ciclo do metano na região.

Como anteriormente observado, as fontes do metano são inúmeras, notadamente as antropogênicas, e sua redução na atmosfera pode se dar por reações fotoquímicas, mas também pela notável capacidade microbiana de realizar sua oxidação biológica (OBM), exercida pelas bactérias metanotróficas. Representantes das metanotróficas foram isolados de uma grande variedade de ambientes, tais como

amostras de pântanos, charcos, rios, arrozais, oceanos, lagoas, alagados, terras de prados, bosques decíduos, vertedouros, lodos de esgoto, aterros sanitários e sedimentos da região Antártica (HANSON & HANSON, 1996; WISE *et al.*, 1999; KNIEF *et al.*, 2003), obviamente todos relacionados com a presença biogênica do metano.

Dentre os vários ambientes em que se encontram as metanotróficas, destacam-se os solos de cobertura, sendo exemplos os solos de floresta, os agrícolas, os desertos (BOECKX & CLEEMPUT, 2000) e aqueles que recobrem os aterros sanitários (KIGHTLEY *et al.*, 1995). Os solos servem como biofiltros do gás  $CH_4$  produzido, formando uma espécie de barreira biológica. As velocidades de oxidação do metano variam com o conteúdo de água na terra, o destino da terra, e concentração de nutrientes, em especial da amônia. A quantidade de  $CH_4$  atmosférico consumida pela oxidação nos solos foi calculada de 40 a 60 Tg por ano, uma quantidade que é aproximadamente igual ao aumento anual de metano atmosférico durante o último século. Os aterros sanitários, por exemplo, são responsáveis por 5 a 6% das emissões de GEE gerados pela ação antropogênica (BÖRJESSON & SVENSSON, 1997). No solo de cobertura desses aterros, onde ocorre a atividade metanotrófica, o lançamento de  $CH_4$  para a atmosfera é calculado em 30 a 70 Tg por ano. As metanotróficas presentes nas camadas de cobertura dos aterros sanitários podem apresentar velocidades consideradas altas de oxidação do  $CH_4$  - até 45 g ou 3 moles.  $m^{-2}.dia^{-1}$ , constituindo os valores mais elevados de oxidação do  $CH_4$  já observados para solos, o que faz dessas comunidades verdadei-



**Figura 5.** Representação gráfica da cinética de consumo de metano de uma cultura isolada de aterro sanitário, monitoramento de absorvância e porcentagem de metano por 111 horas.

ras barreiras biológicas à emissão do metano para a atmosfera (HANSON & HANSON, 1996).

Os pesquisadores do LMA estudaram amostras de cobertura de solo de aterro sanitário, adaptando-se para tal as técnicas empregadas no cultivo de organismos anaeróbios estritos que proporcionam condições atmosféricas controladas em frascos de cultivo. Alguns dos isolados obtidos na pesquisa pertenceram ao gênero *Methylocystis*, bem como possuíam o gene para a enzima metano-monooxigenase (*pmoA*) que apresenta alta similaridade com a seqüência de aminoácidos das pMMOs da Família *Methylocystaceae*, gênero *Methylocystis*. O estudo cinético das culturas durante o consumo do metano e crescimento celular revelou um tempo de geração da ordem de 26h (Figura 5). O isolamento e cultivo de bactérias metanotróficas a partir de amostras do solo de cobertura de um aterro sanitário em atividade indicaram a ocorrência da OBM relevante ao controle da emissão do gás metano, favorecendo a formação das barreiras biológicas. Resultados como esses auxiliam a tecnologia ambiental inserida nos campos da biologia, engenharia, química, física geotécnica etc. a fim de potencializar o desenvolvimento de métodos biológicos para a redução de emissão

do gás metano para a atmosfera.

Quando comparado ao volume de informações disponíveis sobre bactérias metanotróficas em ambientes terrestres ou em corpos de água doce, o conhecimento sobre esse grupo em ambientes marinhos ou salinos é escasso, e os resultados direcionam-se quase sempre à classificação microbiana e menos aos aspectos funcionais de sua presença. Particularmente em um estudo realizado com amostras de sedimento e água de uma lagoa marinha na Antártica, BOWMAN *et al.* (1997) isolaram uma nova espécie de bactéria metanotrófica ressaltando a dificuldade que encontraram durante a fase de isolamento desses microrganismos. Assim, embora seja possível conhecer a composição das comunidades metanotróficas através de técnicas moleculares empregando genes funcionais, a dificuldade em se obter culturas de laboratório faz com que as informações sobre a ecologia e fisiologia desse grupo em ambientes marinhos ainda seja insuficiente. O LMA vem desenvolvendo estudos nesse sentido, como parte da pesquisa que visa à caracterização do ciclo do metano na região da península antártica. Estudos da diversidade das bactérias metanotróficas na coluna d'água têm sido desenvolvidos e cultivos dessas células também já foram

obtidos e confirmados através da detecção do gene *pmoA*, que codifica para a enzima metano oxigenase, específica do grupo, e por análises cromatográficas do consumo de metano. As pesquisas na região têm se concentrado ainda na caracterização dessas culturas e quantificação das populações metanotróficas nas amostras ambientais.

A correta projeção dos efeitos do aumento dos GEEs para a economia e o clima do planeta e a viabilidade e o sucesso das ações mitigadoras dependem diretamente do conhecimento acumulado sobre os processos geradores e consumidores desses gases. Os relatórios do IPCC têm mostrado que, embora progressos importantes tenham sido feitos, ainda há várias lacunas de informação a serem preenchidas. No caso do ciclo do metano, o preenchimento dessas lacunas passa invariavelmente pelo estudo dos grupos microbianos associados à produção e ao consumo do gás, que tem sido o foco de estudo do LMA. Dessa forma, as pesquisas realizadas vêm contribuindo não apenas para a geração de informações sobre a microbiologia do metano em amostras ambientais e sistemas antropogênicos, mas tem também se concentrado no desenho de estratégias de estudo eficientes e no aprimoramento das técnicas de cultivo dessas comunidades microbianas. Esse conhecimento poderá auxiliar na geração de estimativas mais realistas das emissões e da dinâmica do ciclo do metano em sistemas naturais e antropogênicos, assim como contribuirá para o desenvolvimento de tecnologias envolvendo o controle da emissão ou aproveitamento do gás como fonte de energia.

#### Bibliografia

- BERNARD, B.B. Methane in Marine Sediments. **Deep-Sea Research** v.26A, p.429-433, 1979.
- BOECKX, P.; VAN CLEEMPOT O. Methane oxidation in landfill cover soils. *Trace Gas Emissions And Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 197-213, 2000.
- BÖRJESSON, G.; SVENSSON, B.H. Seasonal and diurnal methane emission from a landfill and their regulation by methane oxidation. **Waste Management and Research**, v.15, p.33-34, 1997.
- BOWMAN, J.P.; MCCAMMON, S.A.; AND SKERRATT, J.H. (1997). *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from antarctic marine-salinity, meromictic lakes. **Microbiology-UK**.v.143: 14511459.
- BRAKER, G., AYALA-DEL-RIO, H.L., DEVOL, A.H.,

FESEFELDT, A., AND TIEDJE, J.M. (2001) Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (nirS) and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, 67:1893-1901.

**CO<sub>2</sub> Science**. (página da internet) Disponível em <http://www.co2science.org/journal/v7/v7n31c3.htm>> Acesso em 10 nov 2004.

DAVIDSON, E.A.; ISHIDA, F.Y.; NEPSTAD, D.C. Effects of an experimental drought on soil emissions of carbon dioxide, methane, nitrous oxide and nitric oxide in a moist tropical forest. **Global Change Biology**, v.10, p.718-730, 2004.

GARCIA, J.L.; PATEL, B.K.C.; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v.6, p.205-226, 2000.

HANSON, R.S. AND HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiology Reviews**, v.60, p.439-471, 1996.

HOLMES, A.J.; ROSLEV, P.; MCDONALD, I.R.; IVERSEN, N.; HENRIKSEN, K.; MURRELL, J.C. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.33123318, 1999.

KEMNITZ, D.; CHIN, K.; BODELIER, P.; CONRAD, R. Community analysis of methanogenic archaea within a riparian flooding gradient. **Environmental Microbiology**, v.6, p.449-461, 2004.

KIGHTLEY, D.; NEDWELL, D. B.; COOPER, M. Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.592-601, 1995.

KNIEF, C.; LIPSKI, A.; DUNFIELD, P. Diversity and activity of Methanotrophic bacteria in different upland soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.6703-6714, 2003

**LBA Experimento de Grande Escala da Biosfera-Atmosfera na Amazônia** (página da internet) Disponível em <<http://lba.cptec.inpe.br/lba/?p=3>> . Acesso em 30 jan 2006.

LIOTTI, R.G. Ocorrência de bactérias metanotróficas em amostra de aterro sanitário através da determinação do potencial de oxidação do metano e da caracterização de culturas enriquecidas. Dissertação (Mestrado em Ciências Área de Concentração: Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 111p.

NAKAYAMA, C.R. Degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP), 2, 3, 4-triclorofenol (2,3 4-TCP) e 2, 6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente. Tese (Doutorado em Ciências Área de Concentração: Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. 187p.

NAKICENOVIC, N. & SWART, R. Eds. **Special Report on Emission Scenarios, Intergovernmental Panel on Climate Change**. (página da internet) Disponível em <<http://www.grida.no/climate/ipcc/emission/index.htm>>

Acesso em 28 nov 2004.

SAIA, F.T. Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Tese (Doutorado em Engenharia) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. 326p.

SANSONE, F.J.; MARTENS, C.S. (1981) Methane productions from acetate and associated methane fluxes from anoxic coastal sediments. **Science**. v.211, p.707-709.

UNFCCC. **The United Nations Framework Convention on Climate Change** (página da internet). Disponível em <<http://unfccc.int/resource/convkp.html>> . Acesso em 08 mai 2004.

USEPA **United States Environmental Protection Agency Methane: Science** (página da internet) Disponível em <<http://www.epa.gov/methane/scientific.html>> . Acesso em 08 mai 2007.

WISE, M.G.; MCARTHUR, J.V.; SHIMKETS, L.J. (1999) Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65: 4887-4897.

WUEBBLES, D.J. & HAYHOE, K. (2002) Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Reviews** v.57, p.177-210.

**Tabela 1: Estimativas de fontes e sorvedouros de metano. (Adaptado de Wuebbles & Hayhoe, 2002).**

<b>Fontes e Sorvedouros .....</b>	<b>Tg/ano*</b>
<i>Fontes Naturais</i>	
Áreas alagadas .....	100 (92 232)
Cupins .....	20 (2 22)
Oceanos .....	4 (0,2 2)
Sedimentos marinhos .....	5 (0,4 12,2)
Fontes geológicas .....	14 (12 36)
Queimadas naturais .....	2
<b>Subtotal .....</b>	<b>145</b>
<i>Fontes Agropecuárias</i>	
Fermentação entérica (principalmente pecuária) .....	81 (65 100)
Plantações de arroz alagadas .....	60 (25 90)
<b>Subtotal .....</b>	<b>141</b>
<i>Outras Fontes Atropogênicas</i>	
Gás natural .....	30 (25 50)
Mineração de carvão .....	46 (15 64)
Outros combustíveis fósseis .....	30 (6 60)
Queima de biomassa .....	50 (27 80)
Disposição de resíduos .....	61 (40 100)
<b>Subtotal .....</b>	<b>217</b>
<b>Total emitido .....</b>	<b>503 (41 660)</b>
<i>Sorvedouros</i>	
Reação com radicais hidroxila na atmosfera .....	- 445 (360 530)
Oxidação no solo .....	- 30 (15 45)
Remoção na estratosfera .....	- 40 (32 48)
<b>Total absorvido .....</b>	<b>- 515 (430 600)</b>

\* Número entre parênteses representam variações nas estimativas feitas em diferentes trabalhos.

# EPIDEMIA DE AIDS E SEGURANÇA TRANSFUSIONAL

Grupo de hemocentros brasileiros se une ao Retrovirus Epidemiology Donor Study



**Ester Sabino**

*Livre-docente pela Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP  
Chefe do Departamento de Biologia Molecular da  
Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo*

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um bom exemplo de como um agente com um longo período de incubação pode espalhar silenciosamente numa população antes de ser descoberto.

O HIV é uma zoonose. Esta conclusão se baseia no fato de existirem inúmeros vírus semelhantes ao HIV que infectam diferentes espécies de símios africanos. A caça a estes animais para alimentação é comum na África o que exporia com frequência os caçadores ao sangue dos animais infectados. É possível que os eventos de transmissão inter-espécie tenham ocorrido múltiplas vezes no passado, porém a infecção ficava restrita a poucos indivíduos e sua transmissão entre humanos era pouco eficiente. No século XX, vários acontecimentos no continente africano mudaram a estrutura populacional (guerras, êxodo rural, mudanças de comportamento com aumento significativo das doenças sexualmente transmissíveis). Neste novo ambiente, o HIV pode ser transmitido para um número maior de pessoas conseguindo se adaptar ao novo hospedeiro e ser transmitido de forma mais eficiente.

Existe um caso bem documentado de HIV de 1959 na região do Congo, porém apenas no final da década de 70 ele chegou aos EUA, provavelmente proveniente do Haiti.

A síndrome só foi reconhecida em 1981, quando foram descritos os primeiros casos em homossexuais masculinos dos Estados Unidos. Demorou cerca de um ano para que a origem da epidemia fosse associada a um agente infeccioso. A nova síndrome chegou a ser associada a outros vírus como o Citomegalovírus, ou ao uso de drogas comum na época como nitrito de isobutil. De certa forma, esta demora em fazer compreender que se tratava de um novo agente infeccioso, atrasou a implementação de medidas preventivas em relação à transmissão por transfusão sanguínea.

Os primeiros doadores HIV positivos doaram em 1978, mas somente no final 1982 foram descritos os primeiros casos de recipientes infectados nos EUA. No início de 1983, os bancos de sangue americanos iniciaram a exclusão de indivíduos com fatores de risco da doação. Com esta medida a prevalência de doadores HIV positivo na

cidade de São Francisco caiu de 1% em 1983 para 0,2% em 1985 quando um teste foi disponibilizado para a triagem sorológica para o HIV. Mesmo com as medidas rapidamente introduzidas pelos bancos de sangue americanos, os casos de infecção por transfusão sanguínea abalaram a opinião pública. A procura por um sangue sem risco para transmissão de HIV passou a ser uma política de saúde nos EUA independente do custo. A epidemia de HIV mudou totalmente a prática da transfusão sanguínea. Desde a forma como o doador é selecionado até a indicação médica de transfusão sanguínea.

A cada novo agente infeccioso que surge os bancos de sangue são chamados para dar uma resposta rápida para o problema. O governo americano dedicou verbas específicas para pesquisa relacionada à segurança transfusional, foi organizado um estudo multicentrico denominado Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS) que desenvolve pesquisas relacionadas a este tema naquele país.

Na medida que novas epidemias surgem como SARS, Influenza, Dengue e mais recentemente Chikungunya vírus,

mostram a necessidade da organização de redes de pesquisa mundiais para que rapidamente desenvolvam estudos que permitam o reconhecimento de um novo agente e tomadas de medidas preventivas.

Neste sentido o NIH abriu uma chamada internacional para que países em desenvolvimento submetessem propostas para se unir à rede americana REDS. O Brasil e a China foram as duas propostas vencedoras. O grupo do Brasil tem a participação da Fundação Pró-Sangue (FPS), Hemominas, HemoPE.

A hemoterapia no Brasil teve início na cidade do Rio de Janeiro, com a implantação do primeiro banco de sangue, em 1941. Rapidamente ocorreu uma proliferação dos bancos de sangue devido à disseminação, entre o meio médico, do arsenal terapêutico representado pelo sangue e seus componentes. Nos anos 50, a doação remunerada de sangue consolidou-se, no Brasil, como importante fonte de recurso para a captação de doadores. Em 1967, quando a Previdência Social passou a comprar sangue para ser utilizado em sua rede própria de hospitais e a custear sangue e hemocomponentes utilizados em hospitais conveniados, o problema da doação remunerada agravou-se.

No final da década de 70 e início da 80 houve uma iniciativa para a implementação de hemocentros públicos e um maior controle do sangue. A doação remunerada foi proibida e iniciou-se o processo de obtenção de doadores entre familiares de pacientes internados. A epidemia da AIDS fortaleceu esta iniciativa e os Hemocentros foram criados em todos os Estados.

Na década de 90 e início do novo milênio houve um esforço para implementação de novos testes de triagem, o Brasil foi o primeiro país na América Latina a triar para HCV e HTLV (1993) melhorar, desenvolver regulamentações sobre o procedimento nos bancos

de sangue e maior controle sobre a qualidade do sangue.

Neste sentido o Brasil está muito à frente de outros países em desenvolvimento como a China e a Índia, onde transmissão por HIV ainda ocorre pela não realização dos testes sorológicos.

Apesar de tudo isso, ainda o risco de transmissão de HIV por transfusão sanguínea é de 1/60.000 no Brasil. Este risco é decorrente da janela imunológica do HIV período que dura em torno de 22 dias, em que o vírus está presente mas o anticorpo, detectado pelo teste de ELISA, ainda não foi produzido.

A janela imunológica porém não explica por si só o fato do risco residual no Brasil ser tão mais alto que o americano. A prevalência de HIV é muito

os indivíduos tem uma maior chance de estarem na janela imunológica (HIV, HCV). Muitas destas perguntas se referem atitudes relativas a sexualidade do doador que os pode constranger ou que os faça sentir estigmatizado ou excluído. É provável que a nossa triagem clínica não seja tão eficaz quanto a americana, ou então que indivíduos recém expostos procurem o banco de sangue para testagem de HIV.

Neste sentido a FPS tem desenvolvidos estudos relacionados a motivação do doadores e sobre seu conhecimento sobre janela imunológica do HIV. Trabalho de Gonzalez et al publicado na revista VOX Sanguinis em 2006, mostra que em cerca de 9% dos doadores o resultado dos testes é um motivo

*"... o Brasil está muito à frente de outros países em desenvolvimento como a China e a Índia, onde transmissão por HIV ainda ocorre pela não realização dos testes sorológicos."*

semelhante na população geral dos dois países. No entanto entre doadores de sangue a prevalência nos EUA é 10 vezes menor.

Antes de um voluntário ser aceito como doador os bancos realizam uma triagem clínica com o objetivo de evitar algum problema para o doador. Assim indivíduos com doenças cardíacas, com alguma doença hematológica, que foram operados recentemente ou recebendo algum medicamento são excluídos da doação. Esta triagem também é usada para prevenir doenças que possam ser transmitidas pelo sangue, e que os testes sorológicos não detectam ou porque não existe teste laboratorial para elas como a variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob (vCJD), ou porque

importante para a doação de sangue. Estes indivíduos sabem menos sobre a janela imunológica do HIV e acreditam que os testes usados no banco de sangue detectam 100% dos casos.

Sem um entendimento correto do problema da janela imunológica, é provável que muitos doadores omitam dados na entrevistas por constrangimento ou por acreditarem que estas perguntas são irrelevantes.

Os bancos de sangue costumam ser alvo frequente de debates nos jornais sobre as perguntas realizadas na triagem de doador. Estas reclamações partem de pessoas que pouco entendem da dificuldade do processo de obter sangue com alta segurança.

Entender os motivos que levam a

doação no Brasil e a frequência pela busca de testes é um passo muito importante na segurança transfusional. Os testes de biologia molecular diminuem 65% da janela imunológica. Assim, mesmo que estes testes sejam introduzidos no Brasil, o risco de transmissão será de 1/150.000.

Os EUA e Europa introduziram testes de biologia molecular (NAT) em sua rotina. O risco nos EUA era de 1/600.000 antes desta iniciativa, diminuindo para 1/2.000.000. Apesar desta medida não ser efetiva em relação ao custo, os bancos de sangue optaram pela introdução ao invés de enfrentar a opinião pública e os desdobramentos jurídicos que seguem cada transmissão transfusional pelo HIV.

Apesar de haver intenção do Brasil em introduzir o teste de NAT, o custo da implementação fez a portaria inicial ser revogada.

O processo de desenvolvimento do

os kits de biologia molecular como carga viral de HIV e HCV não são desenvolvidos no país.

Com o estabelecimento de grandes hemocentros com infra-estrutura adequada, a pesquisa relacionada a segurança transfusional iniciou graças ao esforço individual de pesquisadores em vários centros do país. Não existe uma rede nacional com objetivo específico de analisar nossos dados e propor novas medidas. Em geral as decisões são tomadas baseadas na literatura estrangeira, ou em pequenas experiências.

Em 2005, O NIH optou por abrir uma concorrência internacional para que outros países fizessem parte do seu estudo multicêntrico REDS. Além da verba direcionada a pesquisa ser substancial (total da chamada de 8 milhões de dólares para 3 centros), esta era uma oportunidade rara que iria permitir a interação dos investigadores brasilei-

para a melhoria da pesquisa em transfusão sanguínea. Este projeto foi orçado em US 2 milhões e terá duração de 4 anos.

Em primeiro lugar, estaremos desenvolvendo ferramentas de informática que permitirão guardar os dados dos três hemocentros em um banco único (datawarehouse). No total teremos 500.000 doações por ano nos três centros. Este esforço poderá ser base de um sistema nacional para integração de dados de outros bancos de sangue. Os dados nacionais ainda são coletados de forma manual, e muito simplificada. Este trabalho estará sendo realizado no laboratório de banco de dados do IME USP.

Os projetos de pesquisa em si estarão focados em HIV, doença de Chagas e estudos epidemiológicos relacionados à motivação do doador e recusa.

No caso do HIV, pretendemos monitorar a prevalência e a incidência nos doadores e calcular o risco residual de transmissão nos 3 centros. Os doadores HIV positivos serão entrevistados e será realizado teste de genotipagem para definirmos resitência primária no país.

Um dos estudos estará focado em analisar as motivações e o motivo de recusa, no intuito de melhorar o questionário pré doação mais efetivo.

O estudo de doença de Chagas pretende reconvocar doadores cuja sorologia foi positiva há 5-10 anos atrás. Pretendemos verificar a taxa de mortalidade e evolução da doença. Com isso pretendemos ajudar o entendimento da história natural da doença. Este estudo também servirá para analisar novos testes sorológicos usados para confirmação diagnóstica.

Seguramente o projeto RDS ajudará a aglutinar centros de excelência no país colocando seus pesquisadores em contato com o que existe de mais desenvolvido em relação à segurança transfusional e manter o Brasil na liderança da América Latina.

## *Projeto manterá pesquisadores brasileiros em contato com o que existe de mais desenvolvido em relação à segurança transfusional .*

NAT nos EUA é interessante. Em 1996 o NIH abriu uma concorrência de US\$ 6 milhões para que empresas colocassem uma proposta de desenvolvimento de um teste para bancos de sangue. A empresa Chiron que hoje vende o produto para o mundo inteiro foi a vencedora da chamada.

Na Alemanha pequenas empresas de biotecnologia se desenvolveram para suprir a necessidade dos bancos de sangue na realização dos testes "in house". A introdução do NAT no Brasil poderia seguir a mesma estratégia da Alemanha e ajudar na implementação de empresas de biotecnologia na área diagnóstica. Hoje praticamente todos

ros com o grupo com maior experiência em estudos sobre segurança transfusional no mundo.

Escrever a proposta foi já uma grande aventura, a estrutura do projeto é muito diferente daquela que estamos acostumados. Os projetos têm que ser baseados em dados preliminares. O grupo têm que demonstrar capacidade de realizar o que está propondo.

Apenas duas propostas foram escolhidas: o Brasil e a China. A proposta brasileira é coordenada pela Fundação Pró-Sangue e conta com o HemoMinas e o HemoPE.

Seguramente o desenvolvimento do projeto REDS no Brasil será um marco

# TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Correspondências históricas.



**Luiz R. Travassos**

Unidade de Oncologia Experimental,  
Professor Titular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,  
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

Fred Griffith descreveu em seu trabalho de 1928 que pneumococos encapsulados mortos pelo calor podiam transmitir o fenótipo capsular a pneumococos não patogênicos de tal forma que esses últimos tornavam-se capazes de infectar camundongos. Esse fenômeno foi chamado de transformação. O médico, que morreu no Ministério de Saúde Pública durante o bombardeio de Londres pelos germânicos em 1941, sugeriu na época que uma proteína enzimaticamente ativa poderia ser o agente transferido. O efeito de pneumococos mortos S, tipo III no aumento da virulência da amostra R derivada do tipo II, era observado somente in vivo, mas não *in vitro*. Um aquecimento a 60°C (mas não a 100°C) por 15 min era seguro, permitindo a transformação (Griffith, 1928).

O modelo experimental de Griffith foi adotado por Oswald Avery no Instituto Rockefeller em New York e todo o trabalho subsequente que culminou na publicação de 1944 (Avery et al., 1944) associando a indução da transformação ao ácido desoxiribonucleico (DNA), esteve ligado ao seu laboratório.

Não é frequentemente enfatizado que quem intermediou a adoção do modelo de Griffith foi Martin Henry Dawson, um "English Canadian" como a ele se referia R.J.Dubos. Como me escreveu Michael Marshall, o qual prepara uma biografia de M. H. Dawson, esse pesquisador publicou amplamente sobre o fenômeno de

transformação e de forma mais relevante levou o assunto a grandes reuniões científicas e "mais crucialmente nos corredores fora das sessões plenárias". M. Marshall lembrou-me com orgulho que da mesma forma que ele, Dawson, Avery e Colin MacLeod eram todos de Nova Scotia, Canadá e que Nova Scotia é uma pequena província de 900.000 pessoas.

Dawson iniciou as experiências de transformação no laboratório de Oswald Avery mesmo com as objeções desse último. Os resultados de Griffith foram confirmados, mas Dawson inicialmente não obteve sucesso na transformação *in vitro* e igualmente não conseguiu transformar amostras R do bacillus de Friedlander com bactérias mortas do tipo S II de *Pneumococcus* (Dawson, 1930). Contudo, o pesquisador juntamente com R.H.P. Sia no ano seguinte, já publicava uma técnica de indução de transformação de tipos de pneumococos *in vitro* (Dawson e Sia, 1931). Simultaneamente, J.L. Alloway (1931) extraiu o princípio ativo a partir de células mortas pelo calor, recuperando-o em filtrados.

Somente, no entanto, com a publicação do trabalho de Avery, MacLeod e McCarty (1944) 13 anos depois, ficou estabelecida a natureza do princípio transformante como sendo o DNA. Não é surpresa, pois, que inúmeras comemorações tenham ocorrido no mundo inteiro para relembrar esse fato histórico que revolucionou toda a Genética, a Biologia

e a Medicina. Uma dessas comemorações ocorreu na Rockefeller University em 2 de Fevereiro de 1979, portanto celebrando o 35º aniversário da publicação dessa descoberta revolucionária. No Caspary auditorium, diversos pesquisadores se reuniram alguns lembrando os argumentos e discussões havidas na época, inclusive com acusações fora de propósito como "você defendia que eram as proteínas que transmitiam os caracteres genéticos", e a projeção de protocolos experimentais históricos por um remanescente da trinca. Eu tive a oportunidade de presenciar essa grande festa. E, da mesma forma que ouvi, fiz a mim mesmo a pergunta que René Dubos tinha insinuado. E se Dawson tivesse sido um French Canadian, não traria ele um modelo de transformação desenvolvido por pesquisadores franceses ou de outros países, mas escritos ou comunicados em francês?

Essa idéia me veio a mente estimulado pelo trabalho de meu pai, Joaquim Travassos em 1930, baseado no fenômeno da aglutinabilidade transmissível descrito pelas pesquisadoras romenas J. Cantacuzène e O. Bonciu em 1926 e comunicado à Academia de Ciências da França. Escrevi então um "Feature Article" para ASM News da American Society for Microbiology sobre Transformação bacteriana "revisited" e levantando várias referências da década de 1920-1930 (Travassos, 1979).

Esse artigo levou um tempo razoável para ser publicado considerando a natureza das ASM News. Um dia, no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, onde trabalhava, ouvi o comentário de que eu tinha publicado uma nota revolucionária sobre transformação bacteriana contestando o que era descrito em todos os livros-textos. Na verdade, eu não contestava nada, mas adicionava informação perdida na penumbra da história. O que ficou marcado, no entanto, era a citação do trabalho de Cantacuzène e Bonciu de 1926, portanto, dois anos antes da publicação dita pioneira de Griffith.

Cantacuzène e Bonciu (1926) mostraram que estreptococos eram aglutinados pelo soro de convalescentes de escarlatina após as bactérias, originalmente não aglutináveis, terem sido cultivadas em meio contendo produtos filtrados, acelulares de pacientes com escarlatina, como urina ou exudato tonsilar. A aglutinação em altos títulos pelos soros de convalescentes de escarlatina era uma propriedade estável e específica dos estreptococos hemolíticos. As pesquisadoras observaram alteração no perfil de aglutinação de 2 estreptococos, um isolado do sangue de septicemia puerperal e outro, do tipo viridans. Em relação à metodologia usada, o exudato faríngeo era emulsificado em caldo simples, deixado repousar por 2-3 h, adicionado a idêntico volume de meio de cultura, filtrado em filtro de Chamberland L3 e o teste de esterilidade feito pela incubação por 48 h, possivelmente a 37 °C. Estreptococos a serem transformados eram então cultivados nesse meio por 24 h. Antes dessa cultura, esses estreptococos aglutinavam com soro de escarlatinoso com títulos de 1:10 a 1:40. Após a cultura com produtos de pacientes com escarlatina os títulos aglutinantes subiam para 1:500-1:1000. Outros sub-cultivos em meio enriquecido com aqueles produtos aumentavam ainda mais esses títulos. A conclusão mais relevante desse trabalho foi a de que a propriedade aglutinante era permanentemente incorporada pelos estreptococos desde que ela resistia a subcultivos sucessivos dessas bactérias em meio

sólido não enriquecido com os produtos de pacientes convalescentes de escarlatina. Apesar disso, curiosamente, as autoras concluíram que a propriedade aglutinante era “hereditariamente persistente” sendo devida a uma adsorção ao contrário de absorção do elemento específico.

Ainda em 1926, Martin e Lafaille no Institut Pasteur usaram 4 amostras de estreptococos de casos de endocardite, oftalmia purulenta, pleurisia e infecção puerperal. Essas bactérias não reagiam com soros de convalescentes de escarlatina, mas, após uma única passagem em presença de urina filtrada e exudato tonsilar passaram a ser aglutinadas pelos soros de escarlatinosos em títulos de 1:1000-1:2000. O fenótipo aglutinante era mantido mesmo após 5 subculturas em agar simples. Esse trabalho confirmava pois os resultados de Cantacuzène e Bonciu. Essas autoras relataram um ano depois (1927) que embora os estreptococos eram as bactérias mais capazes de transformação com os produtos de pacientes com escarlatina, outras espécies igualmente adquiriram a propriedade aglutinante. Entre elas estavam *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* e *Staphylococcus*, mas não meningococos B, bacilos pseudo-diféricos ou *Proteus* X19. A aglutinação transmissível foi também confirmada por Zoeller e Meersseman (1927) embora somente em *Streptococcus* e não em outras espécies.

Em 1929, Sacquépée et al. influenciados pela idéia de que a aglutinação transmissível era devida a adsorção, possivelmente de um vírus filtrável, tentaram inativá-lo com iodo, um conhecido agente antiviral. O tratamento com iodo não inativou a propriedade transformante de um filtrado de urina de escarlatinoso. O filtrado resistia ainda ao aquecimento a 100 °C por 10 min. Esses autores verificaram ainda que o *Streptococcus* transformado mantinha a propriedade aglutinante mesmo após 10 meses de repiques no laboratório ou 10 passagens em agar sangue.

Travassos (1930) no Instituto Butantan, São Paulo, discutiu a hipótese viral para justificar o fenômeno de Cantacuzène e Bonciu, na época referido como

um elemento “dragged along” ou “entrainé” no estreptococo. Na sua visão as eventuais partículas de vírus adsorvidas seriam progressivamente diluídas nas subculturas sucessivas da bactéria. Na verdade, os títulos aglutinantes era mantidos mesmo após várias passagens em meios de cultivo. O fenômeno da aglutinação transmissível foi reproduzido por Travassos (1930) usando coelhos infectados pela amostra Dick I que era aglutinável a um título de 1:640. As fontes do princípio transformante foram a urina dos animais coletada diretamente da bexiga, bem como emulsões do fígado, coração e rim, filtradas em filtro Chamberland L3, com teste de esterilidade feito. Seis amostras de *Streptococcus* não reativas ou indiferentes, foram crescidas em meio suplementado com os produtos dos coelhos infectados. Com exceção de uma, as outras amostras foram transformadas com títulos aglutinantes de 1:320 a 1:1280. A capacidade de transformação dos produtos dos coelhos infectados não foi afetada pelo aquecimento a 55 °C por 1 h. A aglutinabilidade dos estreptococos transformados era mantida mesmo após 5 passagens em caldo glucose (em comunicação pessoal, soube que até 27 passagens foram feitas sem perda da capacidade aglutinante). A conclusão explicitamente enunciada nesse trabalho foi a de que um fator filtrável estava presente tanto nos produtos de pacientes com escarlatina como de animais experimentalmente infectados, o qual era absorvido por estreptococos indiferentes que passavam a ser aglutinados como soro de convalescente de escarlatina. O fator de transformação resistia ao aquecimento o que sugeria que não era um elemento vivo, e era igualmente resistente ao tratamento com iodo, sugerindo que a aglutinabilidade transmissível era devida a “adsorção e integração do elemento específico” ao invés de adsorção à célula bacteriana.

Inevitavelmente, após a publicação do Feature Article em ASM News, recebi de Joshua Lederberg, Premio Nobel, então Presidente da Rockefeller University, a seguinte nota com algumas separatas.

Ao: Dr Travassos  
8/17/79

### História da Transformação

Acho que você gostaria que eu trouxesse à sua atenção que esse trabalho inicial foi realmente extensivamente revisto em publicações anteriores e.g. referências # 11, 17,

26a,b; 33,39,56...(lista anexa).

Desculpe mas não tenho separatas das revisões maiores. Você tem razão: cientistas geralmente não retem por muito tempo uma perspectiva histórica.

Agradeço por relembrar alguns detalhes adicionais no seu artigo à ASM.

Joshua Lederberg

Um fac-simile dessa nota foi reproduzida por Rudolf Hausmann no seu livro História da Biologia Molecular traduzido de "...und wollten versuchen, das Leben zu verstehen..." e publicado pela Sociedade Brasileira de Genética

em 1997. Comenta Hausmann que Lederberg "opinou que estes trabalhos [incluindo os de Cantacuzène e Bonciu] foram bastante discutidos em revisões; mas [que] fazendo-se um levantamento da literatura científica, vê-se que esta

afirmação não corresponde à realidade!

Em resposta a Nota de Joshua Lederberg, respondi com a carta abaixo traduzida:

Prezado Prof. Lederberg

Muito grato pelo Memo/Reply e separatas anexas.

A maioria das revisões sobre Transformação bacteriana começam com declarações como: "a transformação bacteriana foi observada pela primeira vez por Griffith" (Bact.Rev., 16: 31, 1952) ou "a primeira transdução bem-autenticada foi a transformação de tipos de pneumococos" (Physiol.Revs., 32: 403, 1952). Livros texto em Microbiologia obviamente seguem a mesma linha e pode-se perguntar se a contribuição de Griffith foi absolutamente única na introdução de um novo conceito que não apareceria de outras contribuições contemporâneas devido a dados experimentais insuficientes ou não confiáveis. É evidente, no entanto, que as descobertas subsequentes de Avery e outros, usando o modelo de Pneumococcus, trazem um corpo de evidências formidável que tende a minimizar outros esforços contemporâneos ao trabalho de Griffith.

De modo fortuito eu focalizei no trabalho de Cantacuzène e Bonciu (1926) lendo a Nota de meu pai (Joaquim Travassos) publicada em 1930 num periódico prestigioso regional. O que chamou minha atenção foi que a publicação sobre a transformação de *streptococos* não foi um trabalho isolado desde que inspirou contribuições subsequentes de outros

laboratórios por pelo menos 6 anos. Tendo em vista as limitações de métodos e critérios da época (1926), imaginei que a contribuições em conjunto de todos os trabalhos citados no artigo da ASM eram tão confiáveis e relevantes quanto a de Griffith (1928), com o primeiro trabalho tendo sido publicado 2 anos antes. Por que então esses trabalhos não são geralmente citados em paralelo ao de Griffith para introduzir o conceito da Transformação bacteriana? Depois de uma breve exumação do trabalho de Cantacuzène e Bonciu (1926) em sua excelente revisão no Heredity (1948), ele caiu novamente em quase completo esquecimento nas mentes da maioria dos microbiologistas. E de fato, além de contestar a prioridade de Griffith de acordo com o exposto acima, a série de trabalhos do artigo da ASM ainda nos surpreende com altas eficiências dos fenômenos de transformação relatadas, e a possibilidade de transformação inter-espécies nas condições usadas por Cantacuzène & Bonciu e outros.

O artigo da ASM teve como objetivo provocar uma reavaliação dessas contribuições históricas de tal forma que uma descrição simples de resultados foi dada, sem comentários, para permitir uma reavaliação e criticismo sem preconceitos. Agradeço novamente pela sua atenção e interesse.

Luiz R. Travassos, Professor UFRJ

Passaram-se anos e em 1999 recebi novamente outra carta de Joshua Leder-

berg, agora Professor-emeritus da Rockefeller University procurando reviver a

nossa correspondência.

Em uma de suas cartas escreveu:

“Eu tomei conhecimento de algumas publicações do laboratório de Cantacuzene desde 1945. Existe uma tradição ainda mais extensa da “paraglutinação” de filtrados ou culturas mixtas desde, talvez, 1908 (Kuhn-Woithe). Mas eu as achei difíceis de interpretar na ausência de reprodução precisa, e tendo aglutinação como única marca. Algumas experiências podem ter sido exemplos válidos de transdução. Outras eu suspeito serem a seleção por colicinas de bacteriófagos, ou outros inibidores, para variantes rugosas (aglutináveis): é difícil dizer.

Há ainda o trabalho de Theobald Smith (1894) que pode ter sido uma antecipação, mas muito difícil de interpretar em retrospectiva.

Eu não estava a par do seguimento (“follow-up”) de seu pai no Brasil.

Tome nota também de Sanfelice (1893) o qual tenho alguma confiança que se tratava de uma transferência de toxigenidade mediada por fagos; mas poderia ser uma contaminação de esporos. Gostaria de reconhecer nossa dívida para com esses pioneiros em sua luta para constituir uma base conceitual para o que chamamos hoje de genética bacteriana. Na eventualidade, foi Griffith 1928 ? Avery et al. 1944 que conduziu ao caminho de construção continua até o presente. Obrigado por trazer essa matéria a nossa atenção.”

Na verdade, do que foi dito e argumentado para explicar o esquecimento histórico do trabalho de Cantacuzene e Bonciu, nenhuma justificativa relevante foi apresentada além do fato de que existiam outras publicações anteriores, mais ou menos criticáveis por envolverem fenômenos outros que não da transformação pura e simples. Dois fatos parecem sempre ter sido deixados de lado: 1) as preparações contendo o princípio transformante dos vários trabalhos da década de 1920-1930 eram aquecidas ou tratadas com iodo, o que presumivelmente eliminava elementos vivos ou toxinas termo-lábeis de ação seletiva (vírus, bacteriófagos, proteínas); 2) várias sub-culturas foram realizadas para garantir absorção e integração do princípio ativo, bem como diluição de qualquer produto simplesmente adsorvido às bactérias.

Em seu Guest commentary ao Journal of Bacteriology (2003) Sanford A. Lacks disse que o entendimento científico é um grande edifício para o qual muitos contribuem. Seu trabalho sobre o mecanismo molecular da incorporação de DNA na transformação é um reflexo disso. Em 1962, Lacks propôs que uma fita do DNA duplex era degradada e que a outra fita entrava na célula (Lacks, 1962). Esta conversão a uma fita única explicava a eclipse da atividade transformante imediatamente após a incorporação do DNA, uma vez que DNA desnaturado era pobremente incorporado pelas células e não servia de “tem-

plate” para transcrição. Esse fato era importante na determinação do destino do DNA ao ser incorporado e importante marco no entendimento da transformação. Conforme ele próprio relatou, Lacks ficou surpreso ao ler na tese de Pierre Schaeffer publicada em 1961 e apresentada à Universidade de Paris: “Une hypothèse est proposée d’après laquelle la pénétration de la molécule d’ADN dans la bactérie requiert une structure à double chaîne, alors que la synapse, dont dépend l’intégration, requiert au contraire une chaîne polynucléotidique unique”. Levou certo tempo para reconhecer que mentes diferentes podem chegar a resultados convergentes e até iguais e que devem conviver com isso.

O reconhecimento dos dados científicos independentemente de sua origem e de seus autores, e a sua citação precisa é uma atividade essencial que somente enobrece o pesquisador e a Ciência, contribuindo igualmente para um relato histórico justo e fidedigno.

## Referências

- Griffith, F. 1928 The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.*, 27: 113-159
- Avery, O.T., MacLeod, C.M. & McCarty, M. 1944 Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.*, 89: 137-158.
- Dawson, M.H. 1930 The transformation of pneumococcal types. II. The interconvertibility of type-specific S pneumococci. *J. Exp. Med.*, 51: 123-147.

Dawson, M.H. & Sai, R.H.P. 1931 In vitro transformation of pneumococcal types. I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro. *J. Exp. Med.*, 54: 681-699.

Alloway, J.L. 1931 The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by the use of filtered pneumococcus extracts. *J. Exp. Med.*, 55: 91-99.

Travassos, L.R. 1979 Bacterial transformation revisited: Familiar and unfamiliar results of the 1920-1930 decade. *ASM News*, 45: 420-422.

Cantacuzene, J. & Bonciu, O. 1926 Modifications subies para des streptocoques d’origine non scarlatineuse au contact de produits scarlatineux filtrés. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 182: 1185-1187.

Martin, R. & Lafaille, A. 1926 Action de produits scarlatineux filtrés sur l’agglutinabilité des streptocoques non scarlatineux et de divers autres microbes par le sérum des convalescents de scarlatine. *C.R. Soc. Biol.*, 95: 284-286.

Cantacuzene, J. & Bonciu, O. 1927 Modifications subies par des bactéries autres que les streptocoques au contact de produits scarlatineux filtrés. *C.R. Soc. Biol.* 96: 1443-1446.

Zoeller, C. & Meerssman, F. 1927 Le phénomène d’agglutinabilité transmissible. *C.R. Soc. Biol.*, 96: 760-761.

Sacquépée, E., Liégeois, M. & Fricker, J. 1929 Recherches sur l’agglutinabilité conférée au streptocoque par les filtrats de produits scarlatins. *C.R. Soc. Biol.*, 100: 1187-1189.

Travassos, J. 1930 Nota sobre o fenomeno de agglutinabilidade transmissível de Cantacuzene e Bonciu. *Brasil Medico*, 44: 699-702.

Hausmann, R. 1997 História da Biologia Molecular. Sociedade Brasileira de Genética, Gráfica e Editora F.C.A., Ribeirão Preto, Brazil

Smith, T. 1894 Modification, temporary and permanent, of the physiological characters of bacteria in mixed cultures. *Trans. Assoc. Amer. Physicians* 9: 85-109.

Sanfelice, F. 1893 Untersuchungen uber anaerobe Mikroorganismen. *Z. Hyg. Infektionsk.* 14: 339-393.

Lacks, S.A. 2003 Rambling and scrambling in bacterial transformation - a historical and personal memoir. *J. Bacteriol.*, 185: 1-6

Lacks, S. 1962 Molecular fate of DNA in genetic transformation of pneumococcus. *J. Mol. Biol.*, 5: 119-131.

# RNA INTERFERÊNCIA

A nova corrida do ouro.



**Carlos F. M. Menck**

Depto. de Microbiologia,  
Professor Titular do Instituto de Ciências Biomédicas  
Av. Prof. Lineu Prestes 1374 - CEP 05508-900  
São Paulo- SP - Brasil

## Redescobrimo o metabolismo da célula.

A revelação de que a molécula de RNA tinha atividade catalítica, em meados dos anos '80, já nos havia alertado que estas provavelmente desempenham funções muito mais relevantes do que simples mensageiros ou fábricas de proteínas. Porém, ainda não estávamos preparados para mudanças tão drásticas na forma de como a célula controla seu metabolismo. O início da descoberta começou com fatos inusitados, e difíceis de explicar, em plantas, mais especificamente petúnia, no início da década de '90. Foram construídas plantas transgênicas que super-expressavam genes para produção de pigmentos, e se esperava que estas gerassem flores com coloração violeta escuro (em comparação com plantas selvagens que têm flores violeta-claro). Entretanto, para surpresa dos pesquisadores, as plantas apresentavam flores brancas, devido à ausência de síntese do pigmento, por silenciamento do transgene e do gene endógeno!

Esse fenômeno de silenciamento gênico em plantas também foi observado em outros organismos, ficando conhecido como co-supressão. Porém, o mecanismo de silenciamento era desconhecido. Alguns anos mais tarde, os

grupos dos pesquisadores americanos Andrew Z. Fire e Craig C. Mello publicaram em conjunto resultados de seus trabalhos com o modelo biológico *Caenorhabditis elegans* (um verme nematóide), revelando que pequenas moléculas de RNA dupla-fita (**RNA<sub>df</sub>**) poderiam silenciar a expressão de genes (Fire et al, 1998). Os experimentos apresentados chamam atenção pela simplicidade. Ao analisar os efeitos já conhecidos de inibição de expressão gênica por moléculas de RNA simples fita anti-senso e também senso (similar aos dados de co-supressão), os pesquisadores descobriram que o uso simultâneo das duas moléculas tinha um efeito sinérgico. Alguns experimentos e controles suplementares revelaram que a molécula efetora era, na verdade, o RNA<sub>df</sub>, e o significado desta descoberta foi muito bem avaliado e discutido. Pela habilidade do RNA<sub>df</sub> de interferir na expressão genética, o mecanismo começou a ser chamado de RNA interferência, ou simplesmente **RNAi**.

Alguns poucos anos mais tarde (2001) confirmou-se a existência do mesmo mecanismo em células humanas, o que evidenciou a alta importância evolutiva da via de RNAi em eucariontes em geral, e abriu perspectivas de uso desse mecanismo como base para silenciamento gênico em mamíferos, com

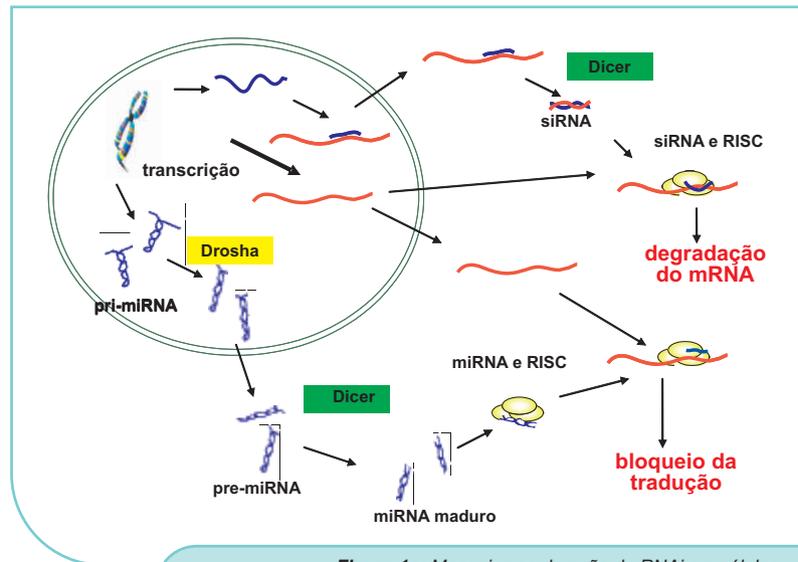
grande potencial tecnológico (Elbashir et al, 2001). Descobriu-se também que pequenas moléculas de RNA são sintetizadas nas células, a partir do seu genoma, de modo a produzir estruturas similares a grampos, formando moléculas de RNA<sub>df</sub> (conhecidos como microRNA, ou **miRNA**) que controlam a expressão de genes celulares, mudando radicalmente a forma com que o metabolismo celular deve ser investigado. Em 2006, apenas 8 anos após sua descoberta, os Dres. Fire e Mello receberam o Prêmio Nobel de Medicina.

## Mecanismos de ação de RNAi

A via metabólica de processamento pelo RNAi está ilustrado na figura 1. A ilustração separa os processos celulares endógenos, e aqueles induzidos artificialmente por moléculas exógenas. Nos processos celulares (figura 1A), genes que codificam grupos de microRNAs são transcritos a partir da RNA polimerase II, como microRNAs primários (**pri-miRNAs**), que podem corresponder a moléculas com comprimento de milhares de nucleotídeos, que são poliadeniladas e recebem o 5'-cap, como os RNAs mensageiros celulares. Porém, ainda dentro do núcleo, esses pri-miRNAs são clivados por RNases (**Drosha** ou **Pasha**) e processados para

formar estruturas de RNA de fita dupla em grampo, conhecidos como pre-microRNAs (**pre-miRNAs**) com cerca de 70 bases. Estas moléculas são exportadas ao citoplasma (pela enzima Exportina-5) e são novamente clivadas por uma RNase III, **Dicer**, resultando em duplexes de 19 a 23 pares de base.

Essas moléculas de RNA de fita dupla se associam ao complexo **RISC** (do inglês "RNA Induced Silencing Complex"), que promove a interação com moléculas de RNAs mensageiros que sejam complementares a uma das fitas da duplex (conhecido como RNA guia). Dois mecanismos de silenciamento, a partir dessa interação, são bem conhecidos para silenciamento gênico: bloqueio da tradução e degradação da fita alvo. Enquanto a primeira ocorre principalmente em moléculas de miRNA cuja complementaridade é apenas parcial, em alguns casos a similaridade entre a molécula de miRNA e parte do RNA mensageiro alvo é total, resultando na clivagem e degradação específica deste transcrito. É importante salientar que, em casos de complementação incompleta, moléculas de miRNA podem regular centenas de genes, e cada gene alvo pode ser regulado por múltiplos miRNAs, demonstrando a complexidade dessa rede de regulação gênica.

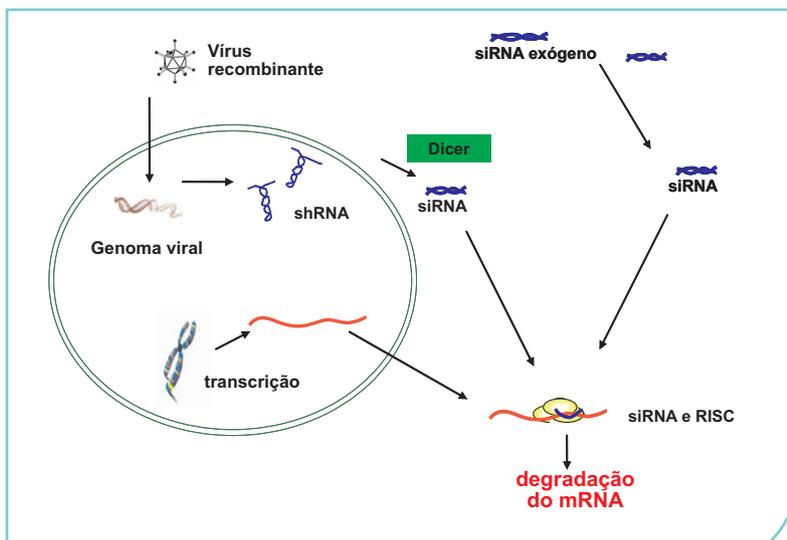


**Figura 1a:** Mecanismos de ação de RNAi em células: São apresentados dois tipos de moléculas de RNAi endógenas: miRNA, que bloqueia tradução e siRNA que promove a degradação do mRNA;

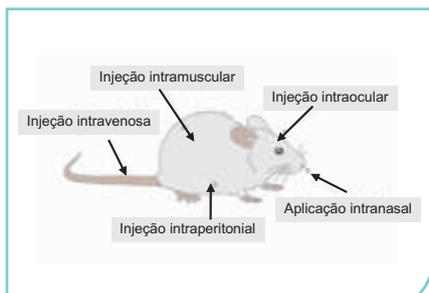
Pelo menos um terceiro mecanismo de silenciamento pode também ocorrer, ao nível transcricional. Nesse caso, foi demonstrado que duplexes de RNA tendo similaridade com promotores gênicos também pode resultar na metilação desse promotor ou mesmo remodelamento da cromatina, com conseqüente redução dos níveis de transcrição daquele gene (Morris et al, 2004).

#### Emprego do mecanismo de RNAi para estudos funcionais.

Além de ser uma descoberta que revolucionou a nossa forma de ver as células, o uso de RNAi como ferramenta para inibir a expressão de genes específicos também revolucionou nossa forma de determinar o papel de genes em células de vários organismos, incluindo humano. Para isso foram desenvolvidas várias estratégias que permitem a redução de expressão de genes específicos ("knock-down"), através de moléculas de RNAi complementares (figura 1B). Para células humanas, pode-se, por exemplo, transfectar pequenas moléculas de RNA de fita dupla (19 a 30 bp) diretamente nas células em cultura, visando a degradação específica de um gene. Essas moléculas, conhecidas como **siRNA** ("small interfering RNA"), precisam ter algumas características de seqüência particulares para serem ativas e o silenciamento de seu gene alvo possibilita a obtenção de várias informações da função exercida pela proteína que ele codifica na célula, através de uma abordagem genética simples. Atualmente, várias empresas de biotecnologia oferecem moléculas de siRNA, cujas seqüências são obtidas através de algoritmos



**Figura 1b:** Moléculas de RNAi podem ser introduzidas a partir de vetores exógenos, seja através de vetores (em geral virais) recombinantes (que codificam shRNAs), ou então através de duplexes (siRNA) exógenos.



**Figura 2:** Vias possíveis de introdução de moléculas de RNAi em animais, como protocolos pré-clínicos.

próprios, para qualquer gene que o cliente pretenda silenciar. Outra característica importante é o tamanho da duplex que deve ter 19 a 30 pb, uma vez que tamanhos maiores podem induzir respostas interferon em células animais. Vários desses algoritmos são livres para uso ("free-ware") e podem ser acessados diretamente na internet. Para a maioria de genes humanos (e de alguns outros organismos), as empresas propõem 3 moléculas de siRNAs previamente desenhados, com garantia de que pelo menos dois desses podem reduzir em pelo menos 70% a expressão do gene alvo.

Alternativamente, vetores (em geral derivados de vírus como adenovírus, retrovírus ou vírus adeno-associados) podem ser transduzir genes que expressam uma molécula de RNA palindrômica, que pode gerar uma duplex de RNA na forma de grampo, conhecida como **shRNA** (do inglês "short hairpin RNA"). Como o siRNA, shRNA tem como objetivo o silenciamento do gene alvo em estudo. Essa estratégia apresenta como vantagens a possibilidade de uma eficiente transdução, pelo vírus, do gene de shRNA, e, no caso de retrovírus, a obtenção de linhagens celulares que apresentem o silenciamento do gene alvo de modo permanente.

É importante destacar que a maior parte dos genes identificados com o sequenciamento do genoma humano não apresenta função conhecida. Além disso, as estratégias de inativação gênica por nocaute ("knock-out") envol-

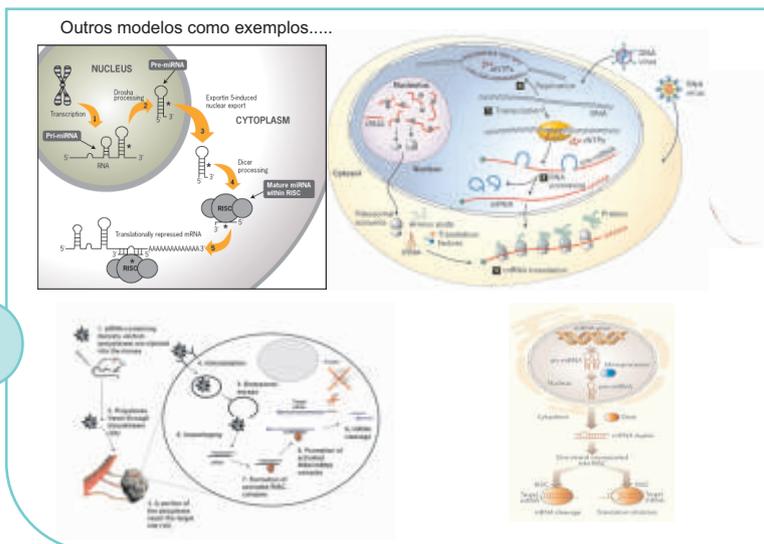
vem processos de recombinação homóloga, muito pouco eficientes em células de mamíferos, e praticamente impossíveis de serem realizadas em células humanas. Logo, o emprego dessas abordagens envolvendo os mecanismos de RNAi abriu perspectivas de se realizar estudos de genômica funcional para células humanas, nos quais podem ser obtidas, pelo menos teoricamente, informações sobre toda e qualquer sequência do genoma humano.

#### Interferindo na expressão gênica *in vivo*.

Em 2001, ao se anunciar pela primeira vez, com estardalhaço na mídia, a conclusão do sequenciamento do genoma humano, a expectativa de que a informação gerada fosse útil para cura de doenças de origem genética se espalhou rapidamente. Essa excitação rapidamente se transformou em frustração

pela falta de resultados rápidos, o que era perfeitamente compreendido por aqueles que trabalharam no projeto genoma e que conheciam as limitações das informações geradas. Uma das razões para a demora na obtenção de resultados concretos em termos de produtos, que poderiam resultar em melhoria de saúde, foi a falta de ferramentas que nos permitissem intervir no genoma.

No entanto, uma luz parece ter surgido com a descoberta da ação de RNAi em células humanas e de outros mamíferos. Apesar, desta descoberta não datar mais do que 6 anos, muito rapidamente se mostrou que vetores virais ou pequenas moléculas de siRNA podem atuar diretamente *in vivo*, o que já resultou em mais de uma centena de trabalhos científicos publicados, no quais testes (a maior parte deles com resultados positivos) mostram o funcionamento de RNAi em experimentos com animais. Mesmo



**Tabela 1: ALGUNS ALVOS PARA TERAPIA COM siRNA**

Tipo de doença	Alvo	Rota de administração
Neovascularização ocular	VEGF	Intravítrea
Doenças respiratórias	Genes virais (RSV, Influenza)	Intranasal
Hepatites virais	Genes virais (HBV e HCV)	Intravenosa
Hipercolesterolemia	APOB	Intravenosa
Tumores em geral	Vários alvos, com foco em genes envolvidos em controle do ciclo celular	Intratumoral

que na maior parte das vezes sejam empregados camundongos, há vários casos de experimentos pré-clínicos com primatas não humanos (Zimmermann et al, 2006), e mesmo alguns Protocolos Clínicos em Fase I (de segurança no uso em humanos), alguns já concluídos, sem que se verificasse nenhum efeito tóxico. É possível que em mais dois ou três anos seja lançado o primeiro produto farmacológico formado apenas por uma pequena molécula duplex de RNA, que atue silenciando a expressão de um gene. Essa velocidade no desenvolvimento de um produto baseado em siRNA é espantosa e deve-se a vários fatores, incluindo os extensos trabalhos anteriores para terapia gênica e a alta eficiência dessas moléculas na modulação da expressão gênica. Entretanto, várias barreiras ainda têm que ser superadas, incluindo a informação recente de que a transdução de shRNA, através de vírus adeno-associados, resultou na morte hepática dos animais. Provavelmente, essa morte ocorreu devido a saturação do mecanismo de RNAi, interferindo com a exportação de miRNAs endógenos do núcleo para o citoplasma (Grim et al, 2006).

#### **Desenvolvimento de Terapia por siRNA.**

O primeiro desafio a ser vencido para o desenvolvimento desse tipo de terapia é a definição de um gene alvo. Vários são os problemas de saúde que resultam de expressão aumentada de um ou mais genes, entre eles, tumores, hipercolesterolemia, infecções virais, etc (Tabela 1). E estes têm sido extensivamente investigados em trabalhos com células e em animais. A seleção de duplexes que modulem especificamente o gene alvo pode ser trabalhosa, e, como foi dito acima, existem atualmente vários algoritmos que podem ser usados para obter várias sequências candidatas para cada gene. Essas sequências devem ser testadas em laboratório, preferencialmente através de culturas celulares. Um problema importante nessa escolha con-

siste na redução de expressão em genes diferentes do alvo (Jackson et al, 2003) em uma célula contendo siRNA, fenômeno este chamado de efeito "off-target". Aparentemente, este efeito ocorre pelo reconhecimento de sequências similares, mas não idênticas, ao alvo, que são encontradas na região 3' não traduzida de vários genes, através do mecanismo de miRNA. Várias são as abordagens para superar o problema de "off-target", sendo que a identificação de dois siRNA para um mesmo gene alvo pode assegurar que o gene é responsável pelo fenótipo celular observado.

Uma vez definida uma ou mais moléculas de duplexes de siRNA eficientes no silenciamento do gene alvo, o desafio é a forma de entrega dessas moléculas em um organismo. O uso de duplexes de RNA (siRNA) ou vetores virais (shRNA) deve ser escolhido dependendo do objetivo do trabalho. Moléculas pequenas e artificiais de siRNA estão se tornando cada vez mais populares pela versatilidade e facilidade com que se pode introduzi-las nas células e *in vivo*. Além disso, são consideradas como drogas pequenas e assim poderão ser usadas em pouco tempo como produtos farmacêuticos comuns, sem as questões de biossegurança normalmente levantadas para vetores virais. Questões como a instabilidade da molécula de siRNA (sobretudo *in vivo*) está sendo contornada através de modificações químicas que aumentam o tempo de ação, mantendo ou mesmo melhorando suas características farmacocinéticas, sem reduzir seu efeito no silenciamento gênico. Além disso, processos de entrega têm tido sucesso através do uso de vesículas de lipossomos e complexos com polissacarídeos, que além de aumentar a eficiência do processo de entrega do siRNA nos tecidos do animal, também garantem a estabilidade da molécula.

#### **Principais alvos para terapia por RNAi: em busca do ouro.**

Vários são os alvos já testados para

estudos com siRNA em animais, e alguns são apresentados na tabela 1 (e ilustrado na figura 2). Um órgão que tem sido focado nesses estudos é o olho, e doenças genéticas associadas. A possibilidade de introdução localizada do siRNA diretamente por injeção ocular, reduzindo a necessidade de material (em relação a aplicações sistêmicas) favorece o desenvolvimento e sucesso desses estudos. Destacam-se processos de inibição do gene *VEGF* ("vascular endothelial growth factor"), que pode promover vascularização próxima a retina, o que está associado à doença de degeneração macular relacionada a idade (AMD, do inglês "age-related macular degeneration"), que provoca a perda de visão em milhões de idosos no mundo inteiro. Várias empresas farmacêuticas já concluíram testes pré-clínicos em animais e iniciaram protocolos clínicos Fase I com humanos, sendo que pelo menos alguns desses protocolos já concluíram essa Fase e está recrutando pacientes para Fase II.

A facilidade de introdução de moléculas de siRNA em pulmão, através de inalação com administração intranasal, também tem propiciado resultados promissores. Doses relativamente baixas de siRNA, com ou sem reagentes de transfecção como lipossomos, tem se mostrado eficientes na inativação de genes virais que provocam doenças respiratórias. Entre os vírus alvos desses experimentos de terapia, destacamos o vírus respiratório sincicial (RSV, que já está sendo testado em protocolo clínico em Fase I, pela empresa Alnylam Pharmaceuticals) e mesmo o vírus influenza H5N1, que provoca a temida gripe aviária.

Outros alvos incluem a redução da apolipoproteína B (APOB) no fígado, o que em macacos resultou em significativa redução de colesterol no sangue. Vários vírus mortais como hepatite B, hepatite C, rotavírus e HIV (vírus da imunodeficiência humana, AIDS), também têm sido considerados excelentes alvos para terapia com siRNA. Esses resultados com vírus têm sido muito promissores,

porém pode haver problemas para o seu bom funcionamento. Isto porque o mecanismo de RNAi pode ser novo para nós, mas acredita-se que a origem desse mecanismo nas células ocorreu provavelmente a bilhões de anos, como uma estratégia de combate a infecções virais. Com isso, os vírus puderam, com o tempo, evoluir sistemas de defesa contra a maquinaria celular. De fato, vários exemplos já mostraram que os vírus como RSV, HIV e vaccinia têm mecanismos específicos para suprimir a maquinaria de RNAi celular e que existe, de fato, uma importante interface de relações patógeno-hospedeiro, nas quais as moléculas de miRNA são efetores críticos (Barik e Bitko, 2006; Scaria et al, 2006).

A inibição da expressão de vários genes-alvo tem sido proposta como possível terapia para vários tipos diferentes de tumores. Os alvos para combate ao câncer envolvem uma grande quantidade de vias: oncogenes, mediadores de ciclo celular e apoptose, genes envolvidos em degradação e estabilidade proteica, angiogênese, moléculas relacionadas a invasão metastática e adesão celular. Além disso, siRNA também pode auxiliar no tratamento com radiação ionizante e agentes quimioterápicos. Nesse caso os alvos para silenciamento são genes que codificam proteínas anti-apoptóticas, de multi-resistência a drogas e mesmo envolvidas no reparo de DNA, pois estas atuam na defesa da célula aos agentes terapêuticos, que na maior parte das vezes atua causando lesões no genoma celular (Pai et al, 2005).

### Conclusões

O avanço obtido em tão pouco tempo de pesquisa na área é impressionante, mesmo dentro da dinâmica ciência da Biologia. A forma como enxergamos a célula eucarionte mudou completamente nos últimos anos, e aparentemente estamos apenas iniciando nossas descobertas de como funcionam os mecanismos de RNAs regulatórios na célula. Por exemplo, recentemente

foram divulgados dados que indicam que moléculas de dsRNA direcionadas a algumas regiões do promotor celular podem ativar genes e não silenciá-lo. Essas moléculas foram batizadas como **RNAa** ("RNA activators"), o que pode ampliar ainda mais a complexidade do sistema (Li et al, 2006). Além disso, apesar dos mecanismos de RNAi serem descritos apenas para eucariontes, recentemente foram propostos sistemas de RNAi similares para bactérias (Marakova et al, 2006).

Da mesma forma, o uso de mecanismos de RNAi para processos terapêuticos tem avançado muito rapidamente, mas ainda temos um longo caminho a percorrer. Durante a década de '80, artigos sobre Terapia Gênica anunciavam a 4ª Revolução da Medicina. Apesar de alguns resultados positivos terem sido alcançados, as dificuldades encontradas e os problemas criados pela introdução de vírus recombinantes em organismos, infelizmente, não permitiram que essa revolução ocorresse como previsto. O conhecimento acumulado, no entanto serviu de base para a rápida obtenção de resultados promissores com RNAi. Além disso, o pequeno tamanho dessa molécula permite que seu tratamento seja similar ao dispensado a drogas farmacêuticas, normalmente usadas em processos terapêuticos. É possível que essa Revolução Médica esteja prestes a acontecer, finalmente (Dykxhoorn and Lieberman, 2006). Alguns sites de empresas que tem trabalhado com RNAi fazem grandes promessas ("RNAi pode auxiliar a combater toda e qualquer doença genética humana", [www.sirna.com](http://www.sirna.com)), chegando a propor o uso de siRNA para reduzir o crescimento de pêlos, em áreas em que isso for indesejado. Essa proposta, com o "knock-down" do gene "hairless" (cuja versão mutada foi identificada em famílias cujos afetados não apresentam pêlos), permite se antever um mercado bilionário, que visa um objetivo mais estético do que médico. Entretanto, a aplicação de terapia baseada na molécula de siRNA

deve ser analisada com otimismo cauteloso, e ainda requer intenso trabalho de pesquisa, mesmo porque precisamos conhecer melhor o próprio mecanismo celular de RNAi.

### Referências:

- Barik S, Bitko V. Prospects of RNA interference therapy in respiratory viral diseases: update 2006. *Expert Opin Biol Ther*. 2006 Nov;6(11):1151-60.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):231-5.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494-8.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):537-41.
- Jackson AL, Bartz SR, Scheller J, Kobayashi SV, Burckhardt J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 2003 Jun;21(6):635-7. Epub 2003 May 18.
- Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 14;103(46):17337-42.
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. 2006 Mar 16;1:7.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1289-92.
- Pai SI, Lin YY, Macaese B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*. 2006 Mar;13(6):464-77.
- Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*. 2006 Oct 11;3:68.
- Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliensky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006 May 4;441(7089):111-4. Epub 2006 Mar 26.

# SEGURANÇA DE ALIMENTOS

## Novas ferramentas de gestão dos riscos microbiológicos.



**Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco**

*Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo*

### Histórico

Durante décadas, os riscos associados ao consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos eram avaliados exclusivamente através de padrões e critérios microbiológicos pré-estabelecidos. Para isso, agências de vigilância da segurança dos alimentos e estabelecimentos produtores de alimentos recorriam a análises microbiológicas para determinar se os alimentos estavam de acordo com esses padrões e critérios e, conseqüentemente, se eram seguros do ponto de vista de saúde do consumidor. No entanto, logo se percebeu que análises laboratoriais são uma ferramenta muito limitada para assegurar a segurança dos alimentos, principalmente quando o índice de contaminação é baixo. Por exemplo, em um processamento industrial em que se produz um lote de alimento no qual existe uma unidade contaminada para cada duzentas unidades produzidas (0,5%), mesmo se forem analisadas 100 unidades do lote, a probabilidade de aprovar esse lote é 61% (ICMSF, 2002). Os padrões e critérios microbiológicos possuem maior aplicação em produtos acabados, com pouca ou nenhuma contribuição para a solução de problemas durante um processo produtivo (REIJ & SCHOTHORST, 2000).

Era, portanto, necessário que os produtores de alimentos agissem de forma pró-ativa, utilizando outras ferramentas para assegurar a segurança dos alimentos. Nessa esteira surgiu o sistema HACCP, cuja eficácia

depende de prévia implantação das Boas Práticas de Higiene. O principal foco do sistema HACCP é identificar e controlar as etapas de um processo produtivo que afetam a produção de um alimento seguro, visando não ultrapassar limites que possam colocar em risco a saúde da população. Embora todos os produtores que se preocupam com a segurança dos alimentos que produzem tenham sistemas HACCP implantados, é difícil correlacionar os limites estabelecidos com os impactos à saúde pública, principalmente em países com dados epidemiológicos precários. Também não é possível avaliar se planos HACCP semelhantes, aplicados a processos produtivos diferentes, garantem um mesmo nível de proteção (ICMSF, 2002). Essas limitações, e a necessidade de estimar de forma mais adequada o impacto potencial da segurança dos alimentos junto à saúde pública e os custos econômicos associados a doenças transmitidas por alimentos, resultou no desenvolvimento de uma nova ferramenta de gestão de segurança, denominada Análise de Risco.

A partir de 1995, com o Acordo Sanitário e Fitossanitário, da Organização Mundial do Comércio, a Análise de Risco tornou-se uma estratégia importante na área de segurança alimentar (WTO, 1995). Esse Acordo visa proteger a saúde humana, animal e de plantas, impedir o protecionismo e prevenir a criação de barreiras desnecessárias ao comércio internacional. Segundo o acordo,

alimentos podem ser importados livremente desde que não comprometam o nível de proteção ao consumidor exigido pelo país importador. Esse nível de proteção estabelecido em um país denomina-se ALOP (*Appropriate Level of Protection*, ainda sem tradução oficial para o português). No rastro do Acordo Sanitário e Fitossanitário e da Análise de Risco, o Codex Alimentarius oficializou novas ferramentas de gestão dos riscos microbiológicos, como os FSO (*Food Safety Objectives*) e PO (*Performance Objectives*) e os PC (*Performance Criteria*) e MC (*Microbiological Criteria*), ainda sem tradução oficial para a língua portuguesa, descritos em seguida.

### ALOP (*Appropriate Level of Protection*)

Segundo a OMS, define-se ALOP como o nível de proteção considerado adequado por um país que estabelece uma medida sanitária ou fitossanitária para proteger a saúde humana, animal e de plantas em seu território (ICMSF, 2002; ILSI, 2004). Um ALOP pode ser expresso pelo número de casos anuais aceitáveis (ou toleráveis) de uma determinada enfermidade causada por um microrganismo em um alimento para cada 100.000 habitantes de um país. Um ALOP envolve, portanto, três elementos: o alimento, o patógeno e o consumidor. Para ser estabelecido, é necessário conhecer a frequência de determinada doença, o alimento mais comumente envolvido e as características das pessoas afetadas (idade, condi-

ções imunológicas, presença de outras patologias, etc), o que somente é possível quando se faz uma Análise de Risco.

#### Análise de Risco

Uma Análise de Risco tem três componentes, a Avaliação do Risco, a Gestão do Risco e a Comunicação do Risco, do qual participam autoridades sanitárias, produtores, comunidade científica e consumidores (ICMSF, 2002; ILSI, 2004).

Na Avaliação de Risco, determina-se qual(is) o(s) perigo(s) de relevância em determinado alimento, qual o perfil do consumidor, qual a concentração do(s) perigo(s) nesse alimento, qual a concentração do perigo que causa danos potenciais ao consumidor (avaliação dose-resposta) e qual a gravidade desses danos, chegando-se então a uma estimativa de risco.

Na Gestão do Risco, são estabelecidas as estratégias para manter os perigos microbiológicos sob controle. Nessa eta-

tração de um perigo microbiológico em um alimento no momento do consumo de forma a atender o ALOP estabelecido (ICMSF, 2002; ILSI, 2004). Exemplos: enterotoxina estafilocócica em queijo:  $\leq 1$  g/100g, aflatoxina em amendoim:  $\leq 15$  g/kg, *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo:  $< 100$ g, *Salmonella* em produtos à base de frango, prontos para consumo: ausência em 100g.

#### PO (Performance Objectives)

Um FSO, estabelecido para um alimento no momento de seu consumo, precisa ser transformado em um parâmetro mensurável durante a cadeia produtiva. Assim, o PO corresponde a um objetivo de desempenho a ser atingido em um determinado momento da cadeia produtiva de um alimento. Como um FSO, um PO deve atender o ALOP estabelecido. Exemplo: carcaças de frango crus positivas para *Salmonella*: máximo 15%.

#### PC (Performance criteria)

Um PC corresponde à mudança na frequência e/ou concentração de um perigo em um alimento que deve ser obtida através da aplicação de uma ou mais medidas de controle, de forma a se alcançar um PO ou FSO. Entende-se por medida de controle toda e qualquer ação que pode prevenir ou eliminar um perigo ou reduzi-lo a um nível aceitável. Exemplos: redução 12D de *Clostridium botulinum* em conservas de baixa acidez, redução 5D de *Escherichia coli* O157:H7 em cidra de maçã, redução 6D de *Listeria monocytogenes* em alimentos refrigerados prontos para consumo.

#### MC (Microbiological Criteria)

Um MC é um padrão microbiológico que define a aceitabilidade do produto, ou lote de produtos, baseado na ausência, presença ou número de microrganismos por unidade de massa, área ou lote. Um MC depende, portanto, de análise laboratorial. Para se estabelecer um MC para um alimento é ne-

cessário ter evidências da existência de um perigo real ou potencial nesse alimento, conhecer a microbiota da matéria prima, conhecer os efeitos do processamento, determinar as probabilidades e consequências da contaminação e multiplicação durante manipulação, saber as condições em que o alimento será armazenado e consumido, a categoria dos consumidores em risco, a relação custo/benefício do uso do critério, bem como o uso pretendido do alimento. Segundo o Codex Alimentarius, o estabelecimento de MCs deve levar em conta a importância do perigos microbiológico, a metodologia analítica a ser adotada, o plano de amostragem, os limites e a tolerância de resultados que não atendem esses limites. São exemplos de MCs: *Listeria monocytogenes* em queijo fresco: máximo 100g, *Salmonella* em produtos a base de frango prontos para consumo: ausência em 25g.

#### Conclusões

Sopram novos ventos na área de segurança microbiológica de alimentos. De uma época em que os perigos microbiológicos nos alimentos eram monitorados usando padrões microbiológicos estabelecidos apenas em função do que era operacionalmente alcançável, estamos passando para uma nova fase, em que os critérios microbiológicos dependem de informações relacionadas com a saúde da população, como ALOPs, FSOs, POs e PCs. Mais do que nunca é necessário o trabalho interativo de governos, cientistas, industriais e consumidores.

#### Referências Bibliográficas

- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Food Hygiene. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. CAC/GL 30-1999. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1999.
- ILSI. Food Safety Objectives. Role in Microbiological Food Safety Management. ILSI Europe Report Series. ILSI Europe 2004
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) *Microorganisms in Foods 7 - Microbiological Testing in Food Safety Management*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2002..
- REIJ, M.W., SCHOTHORST, M. Critical notes on microbiological risk assessment of food. *Braz. J. Microbiol.* v.31, p.1-8, 2000.
- WORLD TRADE ORGANIZATION. The WTO Agreement on the application of Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS Agreement). Disponível em <http://www.wto.org>

*"Na Gestão do Risco, são estabelecidas as estratégias para manter os perigos microbiológicos sob controle."*

pa, o gestor de risco, tendo em vista os dados gerados na Avaliação de Risco, verifica quais as opções possíveis para gerir esse risco (HACCP, Boas Práticas de Higiene, etc.), implementa essas ações e monitora seu funcionamento para saber se o risco está, de fato, sendo controlado. A tarefa do gestor de risco é avaliá-lo levando em conta não apenas características científicas, mas também considerações sociais, éticas e econômicas, decidindo quais ações são necessárias e quais ações são possíveis.

Na Comunicação do Risco, as partes interessadas (consumidores, produtores, governos) são informadas a respeito da gravidade do problema, quando existente.

#### FSO (Food Safety Objective)

Exaustivos trabalhos conjuntos da ICMSF e Codex Alimentarius permitiram chegar a uma definição de consenso para esse novo conceito de gestão: um FSO corresponde à máxima frequência ou concen-

# TESTES DE SENSIBILIDADE IN VITRO A ANTIFÚNGICOS 2006

## Introdução

A importância clínica das infecções causadas por fungos aumentou de modo substancial nas últimas décadas, devido a vários fatores, como doenças ou tratamentos com perfil imunossupressor, e uso excessivo de antibióticos (6, 55, 56, 63).

A incidência relativamente alta de infecções graves, sobretudo as causadas por fungos oportunistas e emergentes, como espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Pichia* e zigomicetos, é cada vez mais preocupante, em vista do elevado grau de mortalidade causado por essas infecções e das dificuldades no seu controle, além dos custos de hospitalização.

Pesquisas realizadas nos Estados Unidos e na Europa demonstram que desde a década de 1979 até os dias atuais, a incidência de micoses invasivas causadas por *Candida* aumentou 40 vezes, ocupando o 3° ou o 4° lugar do total de septicemias nosocomiais, e as causadas por *Aspergillus* aumentou 6,5 vezes, com índices de mortalidade de até 40% e 85%, respectivamente. Estes índices devem ser considerados alarmantes, porque a maioria dos pacientes que morrem por infecção fúngica invasiva tem doença subjacente para as quais, atualmente, existem tratamentos eficazes (2, 13, 15, 51, 80, 97, 100).

As falhas no tratamento dessas infecções podem ser atribuídas à resistência clínica ou à resistência microbiológica. A determinação de correlação entre ambas as resistências ainda é bastante limitada, o que aumenta a importância de estudos para se conhecer o perfil de sensibilidade de cepas clínicas e o espectro de ação dos antifúngicos. Além disso,

com a disponibilidade de novos antifúngicos e estratégias terapêuticas, a detecção de resistência poderia ser vital no momento de eleger uma alternativa terapêutica (31,49,51,79).

Do ponto de vista microbiológico e clínico, o conceito de sensibilidade e resistência é aplicado para classificar um isolado como sensível ou resistente (63). No aspecto microbiológico, uma cepa é considerada resistente a um antifúngico quando a concentração inibitória mínima (CIM) é mais elevada que a habitualmente encontrada para a espécie dessa cepa. Para definir a CIM habitual do antifúngico frente a essa espécie, é necessário realizar um número representativo de testes com diferentes isolados e desenhar a distribuição gráfica da curva nor-

mal de sensibilidade e o valor modal da CIM. Tomando-se esta curva como base, quando um teste resulta em um valor de CIM alto, situado no extremo ou fora do gráfico, do ponto de vista microbiológico o isolado é resistente, pois não está dentro dos limites de sensibilidade da maioria dos membros de sua espécie. A sensibilidade de isolados de *Candida*, e de outros gêneros de leveduras, varia conforme a espécie e, dentro de uma mesma espécie podem existir cepas com perfis de sensibilidade diversos. A resistência pode ser de três tipos: intrínseca, primária ou secundária. A intrínseca é dita quando nenhum membro de uma espécie é sensível ao antifúngico, ou seja, todos são insensíveis. Denomina-se resistência primária quando, dentro de uma espé-



**Coordenadora**  
**Arlete Emily Cury**  
Universidade de São Paulo



## Colaboradores

1. **Claudete Rodrigues Paula**  
Universidade de São Paulo
2. **Márcia de Souza Carvalho Melhem**  
Instituto Adolfo Lutz
3. **Maria do Rosário Rodrigues Silva**  
Universidade Federal de Goiás
4. **Maria José Soares Mendes Giannini**  
Universidade Estadual Paulista

cie normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se uma cepa com resistência natural contra o mesmo, sem necessidade de contato prévio com a droga.

Resistência secundária ocorre quando uma cepa, previamente, sensível desenvolve resistência à droga após ter sido exposta a ela. Do ponto de vista clínico pode haver isolados considerados resistentes em termos microbiológicos, mas que respondem à terapia, desde que a concentração do fármaco no local da infecção pode estar muito mais elevada do que as CIMs encontradas para aqueles isolados. Portanto, um isolado resistente do ponto de vista clínico é aquele que continua a crescer e levar à sintomatologia, apesar da concentração do fármaco ser máxima no local da infecção (31). A classificação de uma levedura como resistente deveria levar em conta, além da CIM, a concentração do antifúngico no sítio da infecção (7,67). A relação numérica do CIM com a concentração da droga obtida *in vivo* é denominada CIM farmacodinâmico.

Na última década foram avaliados vários métodos para provas de sensibilidade *in vitro* a antifúngicos e alguns deles são atualmente indicados como referência, servindo para validar outras provas, incluindo sistemas comerciais. De modo geral, um mesmo método não contempla o estudo de distintos tipos de fungos, i.e., leveduras e fungos filamentosos (bolores) e, para tanto, foram necessárias algumas modificações técnicas. Mesmo assim, os estudos de sensibilidade para fungos filamentosos ainda podem ser considerados precários quando comparados aos de leveduras.

Devido a diversos fatores, a aplicação dos testes de sensibilidade para fungos ainda é limitada e os estudos relacionados aos mesmos podem ser considerados muito aquém daqueles estabelecidos para bactérias. Os testes de sensibilidade a antifúngicos devem ser realizados a partir de cultivo puro, após a identificação do isolado, de modo ideal em espécie, e sua manutenção até a análise deve seguir normas específicas para garantir a qualidade das provas (27).

#### Métodos de referência

Entre os testes preconizados para detectar resistência a antifúngicos, apenas

alguns deles foram até agora suficientemente avaliados em estudos amplos e bem conduzidos a fim de comprovar boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial, além de correlação com a evolução clínica dos pacientes. Os mais conhecidos e difundidos são os do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), denominado, desde 2005, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicados a partir de 1985, sob a forma de documentos. Para provas de sensibilidade aos antifúngicos com leveduras a última versão de 2002 é a M27-A2 (73) e suplemento M27-S2 publicado em 2006, e para fungos filamentosos a M38-A de 2004 (74).

Entretanto, sua aplicação é restrita a alguns fármacos, para determinados gêneros e espécies de fungos e a correlação entre os resultados destas provas e a resposta *in vivo*, ainda não está totalmente estabelecida. Além disso, sua execução é complexa e requer tempo prolongado para leitura de resultados, o que limita, entre outros fatores, a utilização das mesmas como provas rotineiras.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adquiriu os direitos autorais, para a língua portuguesa, dos documentos CLSI/NCCLS M27-A2 e M38-A e tornou-os disponíveis, através do site: <http://www.anvisa.gov.br>.

#### Método CLSI M27-A2 e Modificações: Características Gerais

##### Técnica utilizada e agentes avaliados

O M27-A2 é o método mais bem estudado e o documento pertinente contém técnicas de diluição em meio líquido, microdiluição em tubos de ensaio e microdiluição em placas de microtitulação, para determinar a CIM. Foi desenvolvido para testes com leveduras, incluindo espécies de *Candida* e de *Cryptococcus*, frente à anfotericina B, 5-fluorocitosina e azólicos, incluindo cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, além de posaconazol e ravuconazol, estes últimos ainda não comercializados no Brasil. Indica o uso de meio líquido RPMI-1640, inoculo inicial de  $1-5 \times 10^6$  cel/mL, ajustado por espectrofotômetro a 530nm, incubação a 35°C, uso de

cepas-controle ATCC. É essencial utilizar os reagentes do modo como recomendado.

#### Leitura do teste

A leitura do teste é visual e na técnica de microdiluição usa-se um espelho para comparar a turvação em cada cavidade a do controle de crescimento, sem adição de droga. Valores de 0 a 4 são atribuídos de acordo com o grau de inibição, considerando a seguinte equivalência: 0 = oticamente claro, significando inibição total de crescimento, 1 = levemente turvo, 2 = proeminente redução da turvação, 3 = leve redução da turvação, 4 = ausência de inibição. A CIM para anfotericina B é a menor concentração que inibiu totalmente o crescimento, correspondendo ao valor 0. O valor de CIM para os azólicos e 5FC é a menor concentração que resulta em proeminente redução da turvação, ou seja, valor 2. Na microdiluição, o valor 2 corresponde à 50% de inibição. Esse critério de leitura, para drogas azólicas minimiza o erro decorrente do fenômeno *trailing* ou crescimento residual, apresentado por algumas espécies, p.ex. *C.tropicalis*. Este ocorre quando a turvação se mantém, mesmo com o aumento da concentração da droga.

A leitura de inibição do crescimento da levedura por ação da droga é realizada após 48 horas de incubação para leveduras do gênero *Candida* spp. e 72 horas para *Cryptococcus* spp. Esse período pode ser reduzido, respectivamente, para 24h e 48h, como referido no documento. Para a maioria dos isolados, a diferença entre leitura de 24 horas *versus* 48 horas é mínima e não altera o perfil de sensibilidade (i.e. não se altera quando o isolado é lido como "sensível" ou "resistente"). Entretanto, alguns isolados mostram aumento significativo de CIM ao longo do tempo (p.ex., para fluconazol varia de 0,5 µg/mL com 24 horas de incubação a 256 µg/mL com 48 horas).

Para auxiliar a resolução desse problema a metodologia M27-A2 para *Candida* proporcionou tanto limites de CIM com 24 horas quanto com 48 horas de incubação para as duas cepas controle de qualidade (CQ) e oito agentes antifúngicos sistêmicos.

O ideal é que as placas sejam lidas com 24 horas de incubação se houver crescimento suficiente.

#### Interpretação dos resultados

Os antifúngicos para os quais existe consenso (73) quanto aos pontos de cor-

te são: fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina, conforme expresso na tabela 1.

Esses parâmetros baseiam-se em valores de doses séricas, estudos realizados principalmente em pacientes com candidíase orofaríngea e em alguns casos de infecções profundas. A correlação entre resistência *in vitro* e *in vivo* é mais evidente na candidíase orofaríngea. A discordância para outras formas é atribuída às numerosas variáveis que influem na resposta ao tratamento e na complexidade dos pacientes com infecções invasivas, mas os estudos de correlação relacionados aos mesmos foram realizados sem especificação por doença de base e incluindo poucas cepas com resistência *in vitro* (31,108). Para voriconazol, existe a sugestão do CIM com valor igual ou maior a 4µg/mL para classificar cepas resistentes e menor ou igual a 1µg/mL para cepas sensíveis, sendo CIM de 2µg/mL relativo a cepas com sensibilidade dependente da dose (S-DD).

#### \*Sensibilidade dependente de dose

Os mesmos pontos de corte são utilizados em testes com isolados de

*Cryptococcus* spp., para os quais parece existir certa correlação entre CIM elevada e falha de tratamento (73,111). Entretanto, há propostas diferentes da preconizada no método de referência, sendo indicada CIM de 16µg/mL como preditor de falha terapêutica para fluconazol (3); este valor é menor que o proposto no documento M27-A2 (NCCLS, 2002).

As pesquisas com anfotericina B se encontram em fase menos avançada de desenvolvimento. Observou-se apenas certa correlação entre fracasso terapêutico e CIM = 2 µg/mL (76) ou = 0,38 µg/mL (20), mas esses trabalhos foram realizados com técnicas diferentes da-

quelas preconizadas nos métodos de referência.

Frente a anfotericina B a maioria das espécies de *Candida* é inibida em valores de CIM entre 0,25 e 1,0 µg/mL. Entretanto, deve-se ressaltar que o método M27-A2 não permite de modo consistente detectar cepas resistentes. Valores de CIM > 1,0 µg/mL merecem atenção porque podem indicar resistência. Estudos com outros meios, tais como Antibiotic Medium 3 suplementado com 2% de glicose, mostraram a possibilidade de detecção mais segura de resistência, mas esse meio apresenta substancial variabilidade entre lotes.

#### Correlação "in vitro-in vivo"

Quando as provas de sensibilidade são utilizadas como subsídio a clínica na detecção de resistência aos antifúngicos, a correlação entre os resultados obtidos e a resposta à terapêutica não é, de modo geral, considerada boa. Os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI para interpretar os resultados dessas provas com fluconazol, itraconazol, fluorocitosina e voriconazol são aplicáveis apenas em infecções por leveduras e têm utilidade limitada, dependendo da forma clínica (30,42,79,108).

Esse método é capaz de detectar resistência *in vitro* a antifúngicos azólicos. Os dados disponíveis indicam que existe correlação entre resistência *in vitro* e falha terapêutica, porém não há entre sensibilidade e falha terapêutica (42).

Estudos relacionados aos métodos de referência continuam em andamento, de tal modo que recentemente o CLSI publicou o documento M27-S2 (24), um suplemento do M27-A2, que inclui critérios para interpretação dos resultados em testes de microdiluição, com pontos de corte para os novos antifúngicos sistêmicos atualmente disponíveis. A correlação entre esses resultados e a resposta clínica, ainda deve ser mais bem avaliada.

#### Modificações no método

O método europeu de referência, indicado pelo grupo europeu *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) para avaliar leveduras fermentadoras, traz modificações no sentido de suprir algumas falhas encontradas no método norte-americano de referência. Propõe encurtar o período de incubação, aumentar a concentração do inóculo e realizar leitura acurada, por meio de espectrofotometria, para calcular a inibição (104). Mesmo assim, apresenta limitações técnicas como as descritas para o M27-A2, incluindo dificuldades para detectar a resistência à anfotericina B, ocorrência de crescimento residual (*trailing*) em testes com azólicos e fluorocitosina. Mostra correlação com os valores de CIM obtidos com o método de referência, porém difere quanto aos pontos de corte propostos pelo CLSI, os quais não podem ser aplicados para classificar as cepas avaliadas pelo método EUCAST. Para EUCAST os pontos de corte propostos para fluconazol são: ≥ 16 µg/mL para cepas resistentes, 4 ou 8µg/mL para S-DD e ≤ 2 para cepas sensíveis.

#### Método CLSI M38-A: Características Gerais

##### Técnica utilizada e agentes avaliados

O documento M38-A descreve um método de microdiluição para determinar sensibilidade em alguns fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Pseudallescheria boydii*, *Sporothrix schenckii* e *Rhizopus* spp., causadores de infecções invasivas. Não existe, porém, comprovação definitiva de que o meio de cultura e o procedimento para a preparação do inóculo, indicados no documento, sejam os mais adequados. O meio de cultura recomendado é o mesmo indicado no documento M27-A2 e o inóculo deve ser ajustado, com auxílio de espectrofotômetro, para conter 0,4 x 10<sup>4</sup> a 5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL. Entretanto, a densidade óptica (DO) a 530nm, requerida no ensaio, depende do tamanho dos conídios ou esporangiosporos do fungo em estudo. Há necessidade de adição de Tween 20, como agente surfactante, para preparar inóculo de *Aspergillus* spp.

Os principais problemas relacionados ao teste incluem: dificuldade na padronização do inóculo, crescimen-

**Tabela 1. Pontos de corte para interpretar os testes de sensibilidade em leveduras (73). Dados em µg/mL**

Antifúngico	Sensível	S-DD (*)	Intermediária	Resistente
Fluconazol	≥8	16-32	-	≥64
Itraconazol	≤0,125	0,25-05	-	≥ 1
5-fluorocitosina	≤=4	-	8-16	≥= 32

\*Sensibilidade dependente de dose

to lento de algumas espécies, fungos que não produzem esporos e ausência de pontos de corte. Embora estudos adicionais recomendem outros processos de mensuração (UFC/mL e cel/mL) no preparo do inóculo (43,54,98), não existe, ainda, um consenso para que substituam aquele indicado no método de referência.

Além disso, esse teste apresenta as mesmas limitações técnicas apontadas para os testes de sensibilidade em leveduras (31,49).

#### Leitura do teste

As placas de microtitulação são incubadas a 35°C e podem ser lidas após 24 horas para espécies de *Rhizopus*; 48 horas para espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Sporothrix*; 72 horas para *Pseudallescheria boydii* (fase sexuada de *Scedosporium apioerpermum*). A turvação deve ser avaliada com auxílio de espelho e comparada com o controle de crescimento sem adição de droga. A classificação numérica varia de 0 a 4, como descrito para leveduras no M27-A2. A CIM para anfotericina B, itraconazol, voriconazol e para posaconazol é a menor concentração com classificação 0 (oticamente clara). A CIM para 5-fluorocitosina, fluconazol ou para cetoconazol é a menor concentração com classificação 2 ou inferior (50% de redução de crescimento).

#### Interpretação dos resultados

Para anfotericina B o ponto de leitura é bem definido e os valores de CIM nos testes com a maioria dos fungos filamentosos se encontram entre 0,5 e 2,0 µg/mL.

Entretanto, algumas espécies como *Aspergillus terreus*, *Acremonium strictum*, *Pseudallescheria boydii* e *Scedosporium prolificans* são inibidas somente em valores de CIM de 2 a 16 µg/mL. Embora poucos dados estejam disponíveis, valores de CIM acima de 2 µg/mL foram associados a fracassos terapêuticos em casos de aspergilose invasiva. O meio RPMI pode, no caso de fungos filamentosos, também ser inadequado para detectar resistência a anfotericina B. Para 5-fluorocitosina a maioria dos valores de CIM é maior que 64 µg/mL, sendo as únicas exceções alguns isolados de *Aspergillus* e fungos demáceos. De modo similar, para o fluconazol a maioria

dos valores de CIM é maior que 64 µg/mL, sendo exceções apenas alguns isolados de fungos dimórficos e dermatófitos. Para itraconazol, voriconazol e posaconazol o ponto de leitura é bem definido e os valores de CIM, para a maioria dos fungos filamentosos, estão entre 0,03 e 16 µg/mL. Ainda não foram definidos pontos de corte para testes

com esses fungos e os dados disponíveis de estudos *in vivo* são muito limitados.

#### Correlação "in vitro-in vivo"

Os valores adotados para interpretar os resultados desse teste baseiam-se nos propostos para leveduras. Entretanto, nos últimos anos foram relatados casos de falhas terapêuticas com itraconazol em infecções por *Aspergillus* com CIM = 8 mg/L (32,34). Para anfotericina B, alguns autores verificaram que CIM = 2 mg/L para espécies de *Aspergillus* ou de *Rhizopus*, isoladas de modelos animais, era compatível com resistência terapêutica (33).

#### Execução dos Testes: recomendações

**1. Identificação do isolado.** Isolados de leveduras devem ser identificados, no mínimo, em *Candida albicans*, *Candida*

teste, também requer rigoroso controle do pH, ao redor de 7,0 ± 0,3, para preservar a capacidade inibitória.

**3. Inóculo e cepas controle.** Embora os métodos de referência descrevam com precisão todos os procedimentos para preparar e executar os testes, deve-se ressaltar a importância da realização de contagem em placa ou em hematocítmetro, a partir da suspensão inoculada, para se comprovar a isenção de erros na preparação do inóculo quando na implantação do método. Também é importante lembrar que cepas-controle devem ser incluídas em todas as provas a fim de validar os resultados.

**4. Leitura dos resultados.** Quando se realiza leitura visual em provas com leveduras, o erro mais comum é interpretar crescimento residual, observado com azólicos, como significativo de resistência. Isto só pode ser evitado com capacitação adequada.

**5. Procedimentos em situações especiais.** Uma das principais limitações das provas de sensibilidade a antifúngicos é o fato de não serem aplicáveis a todas as espécies. Fungos de crescimento lento como *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e muitas espécies filamentosas não crescem bem nos meios de cul-

"Os principais problemas no teste da microdiluição incluem: dificuldade na padronização do inóculo, crescimento lento de algumas espécies, fungos que não produzem esporos e ausência de pontos de corte."

spp. ou outro gênero, para se proceder à avaliação apenas com aqueles antifúngicos para os quais existe reconhecida resistência do isolado em questão.

**2. Antifúngicos.** Os antifúngicos devem ser obtidos em forma de princípio ativo, solicitando-os às respectivas empresas produtoras ou adquirindo-os de um distribuidor credenciado. Devem ser acompanhados de informações pertinentes como número do lote, potência, prazo de validade e condições de conservação. As preparações para uso clínico não devem ser empregadas, uma vez que podem conter excipientes ou formulações indesejáveis. O processamento dos antifúngicos, em qualquer etapa do

tura recomendados para estudos de sensibilidade, o que influi na confiabilidade do resultado, diminuindo sua utilidade terapêutica. Modificações nos métodos de referência para contemplar fungos de crescimento lento foram propostas (27,31,107), mas nenhuma delas foi até agora validada. Por isso, a decisão em utilizá-las requer que os resultados sejam interpretados com cautela.

**6. Informe dos resultados.** Os resultados dos testes de sensibilidade aos antifúngicos devem ser informados como o de outros antibiogramas quantitativos, referindo o valor de CIM. Os métodos recomendados pelo CLSI também permitem informar se o isolado é: "sensí-

vel”, “sensível dependente de dose” ou “resistente”, seguindo os pontos de corte recomendados nos documentos pertinentes.

**7. Uso na rotina.** É recomendável que as técnicas de diluição em caldo como as dos métodos de referência sejam realizadas por laboratórios que tenham um número elevado de isolados, além de experiência suficiente na execução dos testes. Executá-las de modo esporádico impede um controle efetivo do teste, o que pode produzir erros. Quando se tem um número baixo de isolados ou necessidade de técnicas de menor complexidade indica-se o uso de métodos disponíveis no comércio para analisar a sensibilidade aos azólicos. Estes métodos, de difusão por discos, fitas e microdiluição devem ser executados dentro de programas de qualidade interno e externo, junto a um laboratório de referência. Esses métodos permitem fornecer informações de modo relativamente rápido, que podem ser de utilidade clínica.

**8. Restrições** (27,49) • Ainda existem dificuldades técnicas para se detectar resistência a anfotericina B;

- O crescimento residual (*trailing*) descrito em testes com fármacos fungistáticos, como os azólicos e a fluorocitosina, ainda não está controlado;

- A interpretação dos resultados deve ser feita com cuidado. Não existem pontos de corte para muitas espécies e antifúngicos;

- Essas técnicas mostram baixa correlação *in vitro-in vivo* em casos de micoses invasivas;

- O método M38-A não pode ser utilizado com fungos filamentosos que não produzam conídios ou esporangiospóros, requerendo, para tanto, adaptações ou modificações.

#### Métodos Rápidos

Os procedimentos indicados nos referidos documentos do CLSI e EUCAST não são aplicáveis a estudos de sensibilidade rotineiros como os realizados em laboratórios clínicos. Estes requerem testes de execução simples, leitura fácil e resultado rápido para que tenham utilidade terapêutica, além de custo relativamente baixo. Entretanto, a utilização desta prova só pode ser indicada quando apresenta boa concordância com a técnica de referência, uma vez que, em teo-

ria, os pontos de corte para sensibilidade ou resistência são estabelecidos com as técnicas de referência. Com o objetivo de atender a esses requisitos, foram desenvolvidos métodos considerados rápidos, incluindo o método preconizado pelo CLSI no documento M44-A (72). Embora alguns deles tenham demonstrado boa concordância com os de referência, o que pode permitir que sejam úteis no auxílio a recomendações terapêuticas, esses métodos também devem ter controle de qualidade adequado (27,39,49).

#### Método CLSIM44-A

O M44-A descreve uma prova sensível e prática, validada para testes de sensibilidade em *Candida* spp., utilizando discos impregnados com fluconazol ou com voriconazol. Este método ainda não foi validado para provas com outros gêneros de leveduras e com fungos filamentosos. O documento inclui critério de interpretação para os diâmetros de halos obtidos com discos de fluconazol e valores esperados para cepas-padrão. Indica o uso de agar Müeller-Hinton suplementado com 0,2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno. O agar Müeller-Hinton é facilmente encontrado no comércio e mostra aceitável reprodutibilidade entre lotes, a glicose proporciona adequado crescimento para a maioria das leveduras e a adição do azul de metileno realça a definição do halo. O pH do meio deve estar entre 7,2 e 7,4 à temperatura ambiente e após gelificação. O inóculo é ajustado com espectrofotômetro e o teste é incubado a 35°C, por 24 horas. Algumas cepas para as quais ocorre crescimento insuficiente após 24 horas podem requerer leitura após 48 horas de incubação. Discos de papel contendo fluconazol (25 µg) ou voriconazol (1 µg) encontram-se comercialmente disponíveis. O teste é de baixa complexidade, equivalente ao antibiograma, e seu custo não é elevado, sendo, portanto, adequado como método de triagem.

Essa prova somente classifica os isolados em “sensível”, “sensível dependente de dose” e “resistente”, não sendo possível determinar com precisão valores de CIM (66,72,75,84). Recomenda-se que todas as cepas que aparecem como “resistentes” sejam confirmadas por meio do método de microdiluição M27-A2 (16,39,49).

#### Sistemas comerciais

Existem vários sistemas comerciais para realizar testes de sensibilidade aos antifúngicos, incluindo, entre outros, ASTY (Kyokuyo Pharma-Cential, Japão), ATB FUNGUS 2 (Api-BioMérieux, França), Candifast (International Microbio, Itália), Etest (AB Biodisk, Suécia), Fungitest (Bio-Rad, França), Integral Systems Yeast (Liofilchen Diagnostics, Itália), Mycostandard (Institut Pasteur, França), Mycototal (Behring Diagnostic, França) e Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic System, EUA). Apenas o Etest, o ATB Fungus 2 e o Candifast têm distribuidores no Brasil.

Diversos desses sistemas foram bem estudados, mas apenas alguns deles demonstraram potencial suficiente para se constituir em uma alternativa para os laboratórios assistenciais. Entre estes se destacam o ATB FUNGUS 2, o Sensititre YeastOne e o Etest, os quais mostraram boa reprodutibilidade e indiscutível capacidade em detectar a resistência *in vitro* aos azólicos, sobretudo ao fluconazol, quando comparados ao método de referência para leveduras (11,38).

#### ATB FUNGUS 2®

Este método de microdiluição para leveduras apresenta boa correlação com os de referência norte-americano e europeu. Consiste de uma cartela plástica com câmulas contendo diversas concentrações de 4 antifúngicos: fluconazol, itraconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina. O inóculo da levedura é preparado com solução salina 0,85% com base na escala 2 de MacFarland e a reação de inibição de seu crescimento ocorre após 24-48 h de incubação à 35°C. A leitura é realizada a “olho nu” com base na turvação obtida em cada câmula. Os resultados são fornecidos em CIM (µg/mL) de cada droga.

#### Sensititre® YeastOne

Este é um método de microdiluição em caldo, baseado no padrão M27-A2.

Cada teste consiste de uma placa de microtitulação descartável a qual contém concentrações de seis agentes antifúngicos, incluindo anfotericina B, cetoconazol e itraconazol (0,008 a 16 µg/mL), além de fluconazol (0,125 a 256 µg/mL) e 5-fluorocitosina (0,03 a 64

µg/mL). O teste contém azul de Alamar como indicador colorimétrico, o qual melhora a leitura do ponto de inibição mediante mudança de cor azul para rosa. Os resultados são expressos em CIM e estudos comparativos com os métodos CLSI mostraram resultados equivalentes (28,61,87,94).

De modo geral, o Sensititre YeastOne é um teste reprodutível, fácil de ser executado, os pontos de leitura são claramente visíveis. Os reagentes apresentam prazo de validade amplo e o teste também pode ser aplicado a fungos filamentosos, sobretudo aqueles com elevada produção de esporos como *Aspergillus* (17).

#### **Etest®**

Este é um método de difusão em ágar que utiliza uma tira contendo um gradiente de concentração do antimicrobiano, de tal modo que permite a determinação de CIM. Etest é utilizado para prova de sensibilidade com vários antibacterianos e está também disponível para agentes antifúngicos, incluindo anfotericina B, 5-fluorocitosina, cetoconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina, com gradiente de concentração variando de 0,002 a 32 µg/mL, e fluconazol, com gradiente de 0,016-256 µg/mL.

As dificuldades do Etest em provas para fungos estão usualmente relacionadas à escolha do meio de cultura a ser utilizado e à definição do valor de CIM, correlacionado à zona de inibição de crescimento. O agar RPMI, suplementado com 0,2% de glicose de acordo com o CLSI, é recomendado por diversos autores e pelo fabricante (1,9,19). Recentemente, o uso do agar Müller-Hinton, acrescido de azul de metileno, foi preconizado como uma alternativa menos onerosa e mais eficaz que o

RPMI (10,85).

Nesse teste, a CIM é a concentração de antifúngico no ponto de intersecção da elipse de inibição de crescimento com a tira. A leitura pode ser subjetiva devido ao efeito "trailing" observado com algumas cepas. Como resultado, os valores de CIM podem ser superiores aos esperados, sendo importante repetir qualquer resultado interpretado como "resistente", em paralelo com a cepa-controle ou confirmá-lo por outro método (39). Em testes com azólicos e 5FC, esse fenôme-

no pode ocorrer sob forma de colônias de tamanho menor no interior da elipse de inibição do que as do exterior. Essas colônias não devem ser consideradas para determinação da CIM (1,27).

Com anfotericina B, toda colônia no interior da elipse de inibição, independentemente de seu tamanho, deve ser considerada para a leitura da CIM. Não existem pontos de corte para interpretação dos resultados obtidos nesta técnica comercial, mas recomenda-se que sejam seguidos os indicados nos métodos de referência (1,27). Este teste parece ser o mais indicado para detectar resistência a anfotericina B (83,110).

Etest é simples de ser realizado e os antifúngicos podem ser individualmente analisados. Foi amplamente avaliado tanto para leveduras quanto para fungos filamentosos e a maioria dos trabalhos demonstrou uma concordância aceitável com os métodos do CLSI e EUCAST (10,28,35,65,70,94). A correlação entre os resultados *in vivo-in vitro* em casos de candidíase vaginal (25) e bucal (102) foi alta.

#### **Execução dos Testes: Recomendações**

1. Todos os procedimentos devem seguir as normas de biossegurança em microbiologia, as quais devem estar contidas em um protocolo normalizado do laboratório.

2. Embora os métodos rápidos possam ser uma alternativa para laboratórios assistenciais, só devem ser empregados aqueles para os quais existem estudos demonstrando boa correlação com os métodos de referência.

#### **Outros Métodos Rápidos**

As dificuldades relacionadas à execução das técnicas de referência também estimularam a pesquisa de outros métodos, considerados rápidos, para aplicação em provas de sensibilidade a antifúngicos.

Entre esses métodos, destaca-se a citometria de fluxo, que é mais bem estudada tanto em testes com leveduras (4,18,44,99,106) como com fungos filamentosos (91,106). Os resultados dessas provas podem ser obtidos em poucas horas e sua concordância com método de referência foi considerada boa. Entretanto, para aplicação prática da me-

todologia são necessários, ainda, estudos mais amplos, relacionados à reprodutibilidade dos resultados e à concordância destes com a resposta terapêutica (106).

#### **Indicações dos testes de sensibilidade a antifúngicos**

##### **Casos individuais**

Considerando-se o desempenho das técnicas comerciais, assim como as limitações acima citadas para os métodos de referência, a realização de provas de sensibilidade a antifúngicos em laboratórios assistenciais é recomendada apenas em situações especiais. Estas recomendações se baseiam em pareceres de especialistas, frente a evidências científicas da importância da aplicação destas provas para a decisão terapêutica. Assim, estes testes são recomendados para cepas provenientes de infecções invasivas e de pacientes com algum tipo de imunossupressão. Também são indicados em casos de fracasso terapêutico ou pacientes que receberam profilaxia antifúngica prévia. Todas as amostras de leveduras pertencentes a espécies pouco frequentes, das quais se desconhece o perfil de sensibilidade *in vitro* devem ser submetidas ao teste. Nessas situações, os testes de sensibilidade podem auxiliar a eleger o tratamento mais adequado ou a variar a estratégia terapêutica específica, aumentando a dose do antifúngico, utilizando outro fármaco ou instaurando uma terapia combinada.

Além disso, a detecção de resistência em uma espécie isolada de determinado caso individual, pode servir como um dado importante para vigilância de resistência na espécie em questão (14,31,40,42,49,57,59).

##### **Estudos epidemiológicos**

Os estudos epidemiológicos são considerados fundamentais. A vigilância epidemiológica das infecções fúngicas hospitalares e ambulatoriais pode auxiliar no conhecimento de possíveis reservatórios, vias de transmissão e fatores de risco da infecção, assim como do perfil de sensibilidade das diferentes espécies e sua incidência.

Esses estudos devem ser realizados de modo periódico e os dados relativos à distribuição de espécies e ao perfil de sensibilidade devem ser informados às

autoridades de saúde pública. Deste modo, podem ser estabelecidos quais são os tratamentos iniciais mais adequados ou se estes devem ser modificados quando foi identificada uma espécie cuja sensibilidade é previsível. Exemplo desta última situação inclui o isolamento de *C. krusei* de paciente tratado com fluconazol. Embora essa levedura tenha resistência inata ao fluconazol, é sensível a anfotericina B e aos novos azólicos, como o voriconazol. Em algumas espécies de *Aspergillus* não-*fumigatus*, sobretudo, *A. terreus* e *A. flavus*, assim como em *Fusarium* spp e *Scedosporium apiospermum*, é comum a resistência à anfotericina B, mas não aos novos azólicos. Nesse contexto, a identificação do isolado em espécie minimiza a importância de realização do teste de sensibilidade (27,31,79,108).

No Brasil, existem diversos estudos epidemiológicos bem fundamentados e conduzidos, relacionados ao perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos. A grande maioria foi realizada com cepas isoladas de pacientes das regiões sudeste e centrooeste do país. Alguns desses trabalhos, publicados nos últimos três anos, mostram aumento na resistência ao fluconazol e itraconazol em *Candida* não-*albicans*, e o surgimento de novos agentes causadores de fungemia (22,23,78,80,81). Entretanto, a frequência de resistência em cepas isoladas de infecção de corrente sanguínea no Bra-

sil, ainda é difícil de avaliar, devido a distintos fatores. A infecção não é de notificação compulsória e, portanto, as taxas são subestimadas. Alguns trabalhos usaram métodos inadequados para manutenção, purificação e identificação acurada de espécies, ou parâmetros (meio de cultura, formulação das drogas, cepas-padrão, etc) não recomendados para avaliar a sensibilidade aos antifúngicos (62). Mesmo com essas restrições e sem considerar o método laboratorial pa-

ra isolamento, manutenção e identificação dos agentes, além de tipo de paciente e hospital, pode-se traçar um perfil limitado da ocorrência de resistência no Brasil. O gênero *Candida* constitui o agente prevalente dessas infecções, seguindo-se *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp. O agente de candidemia prevalente é *C. albicans*, sendo as outras espécies, em frequência variável: *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. obtusa*, *C. famata*, *C. lyopolitica* e *C. rugosa*. De modo geral, estudos brasileiros mostram que as taxas de resistência desses isolados a antifúngicos azólicos são baixas, alcançando menos de 3%, excetuando-se *C. glabrata*, que tem habilidade para desenvolver resistência (8, 23, 52, 69, 90, 92, 105).

Apesar de a maioria dos isolados de *C. albicans* ser sensível ao fluconazol e ao itraconazol, alguns deles podem apresentar resistência adquirida a esses triazólicos de primeira geração (25,36,60,64,81,86,88,89).

Portanto, amostras provenientes de pacientes tratados com esses antifúngicos, devem ter sua sensibilidade avaliada *in vitro*, no caso de falha terapêutica. Além disso, a resistência não é restrita a esses antifúngicos, havendo também resistência cruzada com os novos azólicos (25,41,71,79).

A resistência em leveduras a anfotericina B é raras vezes encontrada.

Entretanto, para algumas como *Tri-*

cimes clínicos dessa natureza seja raramente solicitada. Em estudos brasileiros, a maioria dos isolados de candidíase bucal foi obtida de pacientes portadores de HIV. Esses estudos referem-se às regiões sul e sudeste, no período dos últimos dez anos e os testes mais empregados foram os de difusão em disco (72) e microdiluição (73). Pesquisas publicadas nos anos de 2004 e 2006 (5,68) mostram um percentual maior de isolados de *C. albicans* com perfil SDD (sensível dependente de dose) e resistentes ao fluconazol do que de isolados sensíveis, sendo que alguns apresentaram resistência cruzada a outros azólicos. Em estudos anteriores (21,101) os resultados revelaram índices menores de isolados SDD e resistentes. Esses dados sugerem que o aumento de valores de CIM ocorreu em função do tempo e, provavelmente, à maior exposição dos pacientes a esses azólicos.

Em relação, à candidíase bucal pelas espécies não-*albicans*, o quadro é semelhante ao descrito em estudos no exterior, em que *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam os menores índices de sensibilidade (5,21,101). Por outro lado, há também interesse em se pesquisar a sensibilidade de isolados da microbiota da cavidade bucal de indivíduos com fatores de imunossupressão. Um estudo (53) realizado por meio do teste de difusão com discos em espécies não-*albicans*, mostrou a ocorrência de resistência ao fluconazol (21,9%), principalmente em *C. rugosa* (100%) e *C. glabrata* (57%).

Em isolados de fluidos vaginais, foi também relatada sensibilidade diminuída aos azólicos, tanto em *C. albicans* como não-*albicans* (96). Pesquisadores que utilizaram o método EUCAST (29) verificaram que, entre as cepas estudadas, 9,8% de *C. albicans* eram resistentes ao fluconazol, e 11,7% e 23,5% de não-*albicans* eram resistentes, respectivamente, ao fluconazol e ao itraconazol (50).

No Brasil, muitos estudos apontam que a maioria dos isolados humanos de *C. neoformans* é sensível *in vitro* ao fluconazol e ao itraconazol, mas até 50% das cepas são resistentes a 5-fluorocitosina (45,58,77,95,103). Alguns autores (46) encontraram um intervalo de CIM de fluconazol de 0,5 a 16 µg/mL para isolados clínicos. Assim, as fre-

*"A vigilância epidemiológica das infecções fúngicas hospitalares e ambulatoriais pode auxiliar no conhecimento de possíveis reservatórios, vias de transmissão e fatores de risco da infecção assim como do perfil de sensibilidade das diferentes espécies e sua incidência."*

quência de resistência em cepas isoladas de sangue (93). A resistência secundária a anfotericina B está bem comprovada em *C. lusitanae*, uma espécie pouco freqüente, mas descrita como agente de fungemia em trabalhos brasileiros (8,52).

A resistência a antifúngicos em isolados bucais e vaginais tem sido também pesquisada, embora a avaliação de espé-

ciologia

qüentes falhas da terapia com fluconazol nos casos de meningite criptocócica em pacientes portadores de AIDS reforçam a hipótese que, mesmo no Brasil, cepas de *C. neoformans* resistentes a esse azólico podem ser mais freqüentes do que se acreditava. Valores de CIM relativamente altos foram encontrados em isolados clínicos provenientes da região sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), mostrando que apesar de a maioria dos isolados ser sensível, há uma tendência de aumento de CIM, podendo ser verificada a presença de percentuais de isolados com perfil de SDD (47).

Um estudo realizado com método EUCAST em amostras clínicas de *C. neoformans*, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, mostrou diminuição da sensibilidade em isolados seqüenciais para fluconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B (48). Em contraste, outro trabalho, empregando a metodologia M27-A2, mostrou taxas altas de sensibilidade para azólicos, incluindo voriconazol, em isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* (103).

Os estudos com fungos filamentosos, em particular dermatófitos, têm mostrado que a maioria dos isolados é sensível aos antifúngicos azólicos. Em uma avaliação do perfil de sensibilidade de 53 isolados clínicos de *Trichophyton rubrum* verificou-se, por meio do Etest, que para apenas quatro deles o fluconazol apresentou valores de CIM iguais ou superiores a 256 µg/mL. (37). Em outra pesquisa com 68 isolados clínicos de *T. rubrum*, utilizando metodologia EUCAST, somente uma amostra oriunda de uma paciente com tinea da face mostrou resistência clínica e *in vitro* ao fluconazol e ao itraconazol (12).

Dados do perfil de sensibilidade das espécies podem servir como orientação terapêutica e são essenciais para vigilância da resistência aos agentes antifúngicos.

Esses dados sugerem que, ao contrário do que ocorre em outros países (36, 64, 82, 86, 109), em algumas regiões do Brasil o fluconazol e o itraconazol ainda podem ser boas opções para o tratamento inicial de determinadas infecções fúngicas e que é necessário o estabelecimento de um contínuo programa de vigilância para identificar possíveis mudanças na distribuição de espécies e

padrões de sensibilidade a antifúngicos no país.

#### Recomendações Técnicas

Como regra geral recomenda-se que os testes de sensibilidade sejam realizados com um método de referência, uma vez que demonstraram elevada reprodutibilidade entre laboratórios e foram avaliados em estudos de correlação. Estes testes devem ser realizados em instituições sanitárias que as executam de modo rotineiro, seguindo um sistema estrito de controle de qualidade dos resultados. Por outro lado, os métodos comerciais que demonstraram boa concordância com os métodos de referência e reprodutibilidade inter-laboratorial, podem ser uma alternativa para alguns laboratórios assistenciais, uma vez que detectam a resistência aos azólicos com bastante confiabilidade (28,35,61,70,87). Nestes casos, assim como em qualquer procedimento laboratorial, é de suma importância a garantia de qualidade dos exames por programas de controle de qualidade interno e externo. São aconselháveis estudos de comparação dos testes comerciais com os padrões, o que permite conhecer a confiabilidade dos resultados dos estudos de sensibilidade para cada instituição de saúde.

A determinação do perfil de sensibilidade de um isolado clínico pode servir à orientação terapêutica do caso em questão e também pode servir como um dado importante para vigilância da resistência dos agentes etiológicos. Dada à gravidade das infecções hospitalares por fungos, em particular as de corrente sanguínea por leveduras, o monitoramento da resistência em unidades assistenciais que permita um delineamento regional e temporal, estratificado segundo tipo de hospital, grupo de paciente e localização anatômica, serve de base para um programa nacional de controle de infecção no ambiente hospitalar. Os laboratórios de hospitais devem ser capacitados e supervisionados, de modo uniforme, em métodos de identificação e testes de sensibilidade a antifúngicos para proverem resultados acurados e comparáveis. Centros de referência devem prover ensaios padrões e educação continuada aos laboratoristas que alimentam um sistema regional ou nacional sobre informação da resistência a antifúngicos. A noti-

ficação adequada do perfil de resistência das espécies induz ao estabelecimento de diretrizes estratégicas de atuação dos órgãos oficiais de vigilância epidemiológica e sanitária para prevenção e controle da disseminação de resistência microbiana.

Apesar de ser prioritária a notificação da resistência em amostras de fungos,

não deve se restringir às cepas hospitalares. As ações de todos os programas: municipal, estadual e/ou nacional que contemplam diagnóstico de doenças causadas por fungos, como: Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, Micoses Sistêmicas e Doenças Respiratórias devem ser ampliadas, com vistas à capacitação de laboratoristas dos serviços de saúde em testes de resistência a antifúngicos, além da identificação acurada do agente etiológico dessas infecções.

Por outro lado, a Micologia Médica encontra-se em uma fase de grande estímulo à pesquisa de novos procedimentos laboratoriais. Métodos que permitam caracterizar, em espécie, isolados de casos graves ou determinar a sensibilidade aos antifúngicos nesses isolados, mas de modo rápido e confiável, são extremamente necessários nos dias atuais. A execução dessas pesquisas deve ser considerada como prioritária, principalmente por órgãos governamentais.

#### Referências

1. AB Biodisk. Etest Technical Guide, <http://www.abbdiodisk.com>.
2. Abi-Said, D.; Anaissie, E.; Uzun, O.; Pinzcowski, H.; Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.*, 24:1122-1128, 1997.
3. Aller, A. I.; Martin-Mazuelos, E.; Lozano, F.; Gomez-Mateos, J.; Steele-Moore, L.; Holloway, W. J.; Gutiérrez, M. J.; Recio, F. J.; Espinel-Ingroff, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 1544-8, 2000.
4. Alvarez-Barrientos, A.; Arroyo, J.; Canton, R.; Nombela C.; Sanchez-Perez, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:167-195, 2000.
5. Alves, S. H.; Da Matta, D. A.; Azevedo, A. C.; Loreto, E. S.; Boff, E.; Santurio, J. M.; Guarro, J. *In vitro* activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. *Mycoses*, 49: 220-225, 2006.
6. Anaissie, E.; Body, G. P.; Kantarjian, H. New spectrum on fungal infections in patients with cancer.

Rev. Infect. Dis., 11: 369-378, 1989.

7. Andes, D., Stamsted, T., Conklin, R. Pharmacodynamics of Amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 922-926, 2001.

8. Antunes, A.G.V.; Pasqualotto, A.C.; Diaz M.C.; D'azevedo, P.A.; Severo, L.C. - Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 46: 239-241, 2004.

9. Arikan, S.; Gur, D., Akova, M. Comparison of Etest, microdilution and colorimetric dilution with reference broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses*, 40: 291-296, 1997.

10. Auler, M.E. *Investigação do perfil infeccioso da candidíase vulvovaginal: fatores de virulência e sensibilidade antifúngicas*. São Paulo, 2002 (Dissertação. Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

11. Bae, H. G.; Sohn, Y. H.; Shin, J. H.; Kim, M. N. The evaluation of clinical utility of ATB FUNGUS 2 for antifungal susceptibility testing in *Candida* species. *Korean J. Clin. Microbiol.*, 7: 156-163, 2004.

12. Baeza, L. C. *Determinação dos subtipos moleculares através do RAPD e perfis de susceptibilidade frente a drogas antifúngicas de dermatófitos da região de Araraquara-SP*. Araraquara, 2002. (Dissertação. Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP).

13. Beck-Sague, C.; Jarvis, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J. Infect. Dis.*, 167:1247-1521, 1993.

14. Berenguer, J.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Richard, C.; Alvarez, M.; Sanz, Miguel. A.; Gaztelurrutia, L.; Ayats, J.; Martinez-Suarez, J.V. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and review of the literature. *Scedosporium prolificans* Spanish Study Group. *Medicine*, 76: 256-265, 1997.

15. Cantón, E.; Carrilo-Munos, A.; Peman, J.; Otero, A.; Ubeda, P.; Viudes, A.; Gobernado, M. Fluconazole susceptibilities of bloodstream *Candida* spp. isolates as determined by Nosocomial Committee for Clinical Laboratory Standards Method M27-A and two other methods. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2197-2200, 1999.

16. Capoor, M. R.; Nair, D.; Deb, M.; Verma, P. K.; Srivastava, L.; Aggarwal, P. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58: 344-348, 2005.

17. Carrillo-Muñoz, A. J.; Quindós, G.; Ruesga, M.; Del Valle, O.; Cantón, E.; Hernández-Molina, J. M.; Santos, P. *In vitro* antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensitre YeastOne™. *Mycoses*, 49: 293-297, 2006.

18. Chaturvedi, V.; Ramani, R.; Pfaller, M. A. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.*, 42 : 2249-2251, 2004.

19. Chen, C. A.; O'Donnell, M. L.; Gordon, S.; Gilbert, G. L. Antifungal susceptibility testing using Etest: comparison with broth microdilution technique. *J. Antimicrob. Chemother.*, 37: 265-273, 1996.

20. Clancy, C.J.; Nguyen, M. H. Correlation between *in vitro* susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1289-1290, 1999.

21. Colombo, A.L.; Da Matta, D.; De Almeida, L.P.; Rosas, R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Braz. J. Infect. Dis.* 6,118-23, 2002.

22. Colombo, A.L.; Melo, A. S. A.; Rosas, R.F.C.; Salomão, R.; Briones, M.S. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 46: 253-257, 2003.

23. Colombo, A. L.; Nakagawa, Z.; Valdetaro, F.; Branchini, M. L. M.; Kussano, E. J. U.; Nucci, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med. Mycol.*, 41: 235-239, 2003.

24. Committee for Clinical Laboratory Standards. Quality control minimal inhibitory concentration limits for broth microdilution and MIC interpretive breakpoints - second edition. Committee for Clinical Laboratory Standards: informational supplement M27-S2. Wayne, Pa., 2006.

25. Costa, C. R.; Lemos, J. A.; Passos, X.S.; Araújo, C.R.; Cohen, A.J.; Souza L.K.H.; Silva, M.R.R. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia* 162: 45-50, 2006.

26. Costa, M.; Passos, X. S.; Miranda, A. T. B.; Araújo, R. S. C.; Paula, C. R.; Silva, M. R. R. Correlation of *in vitro* itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patient with vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia* 157: 43-47, 2004.

27. Cuenca-Estrela, M.; Gironés, I. G.; Mazuelos, E. M.; Garcia, J. P.; Pontón, J.; Rodriguez-Tudela, L. J. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a los antifúngicos 21. Cercenado, E.; Cantón, R. (ed.). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>, 2006.

28. Cuenca-Estrela, M.; Gomez-Lopez, A.; Mellado, E.; Rodriguez-Tudela, J.L. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin. Microbiol. Infect.*, 11: 486-492, 2005.

29. Cuenca-Estrela, M.; Lee-Yang, W.; Ciblak, M. A.; Arthington-Skaggs, B. A.; Mellado, E.; Warnock, D. W.; Rodriguez-Tudela, J. L. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 3644-3647. 2002.

30. Cuenca-Estrela, M.; Rodriguez-Tudela, J. L. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7 (Suppl 2): 48-53, 2001.

31. Cuenca-Estrela, M.; Rodríguez-Tudela, J.L. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev. Iberoam. Micol.*, 19: 133-138, 2002.

32. Denning, D. W. Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.*, 26: 781-803, 1998.

33. Denning, D. W.; Radford, S. A. Oakley, K. L.; Hall, L.; Johnson, E. M.; Warnock, D. W. Correlation between *in vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40: 401-414, 1997.

34. Denning, D. W.; Venkateswarlu, K.; Oakey K. L.; Anderson, M. J.; Manning, N. J.; Stevens, D. A.; Warnock, D. W.; Kelly, S. L. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:1364-1368, 1997.

35. Dias, A.L.T.; Matsumoto, F.E.; Melhem, M.S.C.; Auler, M.E.; Siqueira, A.M.; Paula, C. R. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J. Med. Mycol.*, no prelo, 2006.

36. Diekema, D. J.; Messer, S. A.; Boyken, L.; Tendolkar, S.; Hollis, R.; Pfaller, M. Prospective global surveillance for *Candida* spp. infection: four year results from the ARTEMIS study. Abstract M-2238. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., December, 2005.

37. Dos Santos, J. I.; Vicente, E. J.; Paula, C. R.; Gambale, W. Phenotypic characterization of Trichophyton rubrum isolates from two geographic locations in Brazil. *Eur. J. Epidemiol.* 17: 729-735, 2001.

38. Durussel, C.; Parreno, D.; Nougier, L.; Monin, V.; Zambardi, G.; Bille, J. Comparative study of various methods, NCCLS, M27-A2, EUCAST, and ATB FUNGUS 2 (bio-Merieux) for the *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida* sp. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prague, 2004, p.902.

39. Ellis, D. Antifungal susceptibility testing. <http://www.mycology.adelaide.edu.au>, 2005.

40. Ellis, D.; Marriott, D. Hajjeh, R. A.; Warnock, D.; Meyer, W.; Barton, R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med. Mycol.*, 38 (Suppl. 1): 173-182, 2000.

41. Escobar, C. M.; Zuluaga, A. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Med Cutan Iber Lat Am* 32: 231-242, 2004.

42. Espinel-Ingroff, A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Rev. Esp. Quimioter.*, 13: 161-166, 2002.

43. Espinel-Ingroff, A.; Dawson, K.; Pfaller, M.; Anaissie, E.; Breslin, B.; Dixon, D.; Fothergill, A.; Paetznick, V.; Peter, J.; Rinaldi, M. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.*, 39: 314-319,

1995.

44. Favel, A.; Peyron, F.; De Méo, M.; Michel-Nguyen, A.; Carrière, J.; Chastin, C.; Regli, P. Amphotericin B susceptibility testing of *Candida lusitanae* isolates by flow cytometry: comparison with the Etest and the NCCLS broth microdilution method. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43: 227-232, 1999.

45. Fernandes, O. F. L.; Passos, X. S.; Souza, L. K. H.; Miranda, A. T. B.; Cerqueira, C. H. P. V.; Silva, M. R. R. *In vitro* susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 839-841, 2003.

46. Franzot, S. P.; Hamdan, J. S. In vitro susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 822-824, 1996.

47. Fusco-Almeida, A. M. *Caracterização molecular de polimorfismos e do gene ERG11 associados a mecanismos de resistência a drogas antifúngicas em isolados clínicos de Cryptococcus neoformans*. Araraquara, 2005, 130 p. (Ph.D. Thesis. Instituto de Química. UNESP).

48. Fusco-Almeida, A. M.; Matsumoto, M. T.; Lilian Cristiane Baeza, L. C.; Oliveira e Silva, R. B. de; Kleiner, A. A. P.; Melhem, M. S. C. M.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Research*. In press.

49. Gadea, I.; Cuenca-Estrella, M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22: 32-39, 2004.

50. Galle, L. C.; Mendes-Giannini, M. J. S. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40: 229-236, 2004.

51. Galvadà, J.; Ruiz, I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección fúngica invasiva por *Candida* spp. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21: 498-508, 2003.

52. Godoy, P.; Tiraboschi, I. N.; Severo, L. C.; Bustamante, B.; Calvo, B.; Almeida, L. P.; Matta, D. A.; Colombo, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp bloodstream isolates from Latin American Hospitals *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 401-405, 2003.

53. Gonçalves, R. H. P.; Miranda, E. T.; Zaia, J. E.; Mendes Giannini, M. J. S. Species diversity of yeast in oral colonization of insulin-treated diabetes mellitus patients *Mycopathologia*, 162, 83-9, 2006.

54. Guarro, J.; Pujol, I.; Aguilar, C.; Llop, C.; Fernandez-Ballart, J. Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 385-7, 1998.

55. Guiot, H. F. L.; Fibbe, W. E.; Vant't Wout, J. W. Risk factor for fungal infections in patients with malignant disorders: Implications and emoiric therapy and prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.*, 18: 525-532, 1994.

56. Hadley, S.; Karchmer, A. W. Fungal infections

in solid organ transplant recipients. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 9: 1045-1074, 1995.

57. Hazen, K. C. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 462-478, 1995.

58. Igreja, R. P. *Sensibilidade in vitro de amostras de Cryptococcus neoformans isoladas de pacientes do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, 1993 (Dissertação. Mestrado Faculdade de Medicina, UFERJ).

59. Krcmery, V.; Krupova, I.; Denning, D. W. Invasive yeasts infections other than *Candida* spp. in acute leukaemia. *J. Hosp. Infect.*, 41: 181-194, 1999.

60. Le Guennec R.; Reynes, J.; Mallie, M.; Pujol, C.; Janbon, F.; Bastide, J. M. Fluconazole and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol.* 33: 2732-2737, 1995.

61. Lombardi, G.; Farina, C.; Andreoni, S.; Fazio, P.; Faggi, E.; Manso, E.; Nanetti, A.; Mazzoni, A. Comparative evaluation of Sensititre® YeastOne vs NCCLS M27A protocol and E-test for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Mycoses*, 47: 397-401, 2004.

62. Maffei, C. L.; Melhem, M. S. C.; Schreiber, A. Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. <http://www.anvisa.org.br/serviços>, 2007.

63. Marr, K. A.; Carter, R. A.; Crippa, F.; Wald, A.; Corey, L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 909-917, 2002.

64. Martinez-Suarez J. V.; Rodriguez-Tudela, J. L. Patterns of in vitro activity of itraconazole antifungal agents against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 1512-1516, 1995.

65. Matsumoto, F. E.; Gandra, R. F.; Ruiz, L. S.; Auler, M. E.; Marques, S. A. V.; Pires, M. F. C.; Gamba, W.; Paula, C. R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. *Micopathologia*, 154: 63-69, 2001.

66. Meis, J.; Petrou, M.; Bille, J.; Ellis D, Gibbs D. Global Antifungal Surveillance Group. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. Global antifungal surveillance group. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 36: 215-223, 2000.

67. Melhem MSC. *Manual de Microbiologia Clínica Aplicada ao Controle de Infecção Hospitalar*, APECIH, 2002.

68. Melo, N. R.; Taguchi, H.; Jorge, J.; Pedro, R. J.; Almeida, O. P.; Fukushima, K.; Nishimura, K.; Miyaji, M. Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 425-431, 2004.

69. Miranda, E. T. *Identificação de espécies de Candida de diferentes unidades hospitalares por técnicas clássicas e PCR Enzimaimunoensaio. Padrão genotípico e suscetibilidade a drogas antifúngicas*. Araraquara, 2001 (Dissertação. Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas,

UNESP).

70. Morace, G.; Amato, G.; Bistoni, F.; Fadda, G.; Marone, P.; Montagna, M. T.; Oliveri, S.; Polonelli, L.; Rigoli, R.; Mancuso, I.; La Face, S.; Masucci, L.; Romano, L.; Napoli, C.; Tatò, D.; Buscema, M. G.; Belli, C. M. C.; Piccirillo, M. M.; Conti, S.; Covan, S.; Fanti, F.; Cavanna, C.; Alò, F. D.; Pitzurra, L. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Broth Microdilution Method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 2953-2958, 2002.

71. Myoken, Y.; Kyo, T.; Sugata, T.; Murayama, S. Y.; Mcami, Y. Breakthrough fungemia caused by fluconazole-resistant *Candida albicans* with decreased susceptibility to voriconazole in patients with hematologic malignancies. *Haematologica*, 91: 287-288, 2006.

72. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa, 2004.

73. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M27-A2. Wayne, Pa, 2002.

74. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M38-A. Wayne, Pa, 2002.

75. Negri, M. *Leveduras do gênero Candida isoladas de colonização de Infecção hospitalar. Caracterização fenotípica e sensibilidade aos antifúngicos*. São Paulo, 2006. (Dissertação. Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

76. Nguyen, M. H.; Clancy, C. J.; Yu, V. L.; Yu, Y. C.; Morris A, J.; Snyderman, D. R.; Sutton, D. A.; Rinaldi M. G. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J. Infect. Dis.*, 177: 425-430, 1998.

77. Pappalardo MCSM. *Criptococose em Aids: estudo clínico e microbiológico em 35 pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, entre 1995 e 1997*. São Paulo, 2002. (Dissertação. Mestrado. Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde).

78. Pasqualotto, A. C.; Sukienik, T. C.; Severo, L. C.; Amorim, C. S. de; Colombo, A. L. An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a Brazilian pediatric intensive care unit. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 26: 553-558, 2005.

79. Patterson, T. Antifungal susceptibility testing: issues and controversies. *ISAAR*: 63-65, 2005.

80. Paula, C. R.; Krebs, V.; Auler, M. E.; Ruiz, L. S.; Matsumoto, F. E.; Silva, E.; Diniz, E.; Vaz, F. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. *Med. Mycol.*, 44:

479-484, 2006.

81. Paula, C. R.; Matsumoto, F.E.; Auler, M.E.; Cury, A.E. Sensibilidade aos antifúngicos das leveduras de interesse médico: leveduras de infecção e ambiente hospitalar, leveduras de quadros de vulvovaginite e isolados de *Cryptococcus neoformans* Folder. Instituto de Ciências Biomédicas. USP, 2004. <http://www.icb.usp.br/~crpmicol>.

82. Perkins, A.; Gomez-Lopez, A.; Mellado, E.; Rodrigues-Tudela, J. L.; Cuenca-Estrella, M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var *neofomans*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56: 1144-1147, 2005.

83. Peyron, F.; Favel, A.; Nguyen, A. M.; Regli, P.; Bolmström, A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanaea* by Etest. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 339-342, 2001.

84. Pfaller, M.A.; Boyken, L.; Messer, S.A.; Tendolkar, S.; Hollis, R.J.; Diekema, D.J. Comparison of results of voriconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a Central Reference Laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 5208-5213, 2005.

85. Pfaller, M.A.; Boyken, L.; Messer, S.A.; Tendolkar, S.; Hollis, R.J.; Diekema, D.J. Evaluation of the Etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4977-4979, 2004.

86. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.; Jones, R.N.; Sader, H. S.; Fluit, A. C.; Hollis, R. J.; Messer, A. S. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and vancomycin of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3254-3259, 2001.

87. Pfaller, M.A.; Espinel-Ingroff, A.; Jones, R.N. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole and ravuconazole. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4577-4580, 2004.

88. Pfaller, M.A.; Lockhart, S. R.; Pujol, C.; Swails-Wenger, J. A.; Messer, S. A.; Edmond, M. B.; Jones, R. N.; Wenzel, R. P.; Soll, D. R. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 1518-1529, 1998.

89. Pfaller, M. A., Messer, S. A.; Hollis, R. J.; Jones, R. N.; Doern, G. V.; Brandt, M. E.; Hajjeh, R. A. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 33: 217-222, 1999.

90. Pukinskas, S. R. B. S. *Infecção hospitalar por leveduras em unidade de terapia intensiva infantil: abordagem epidemiológica*. São Paulo, 2002 (Dissertação. Mestrado. Faculdade de Saúde Pública. USP).

91. Ramani, R.; Gangwar, M.; Chaturvedi, V. Flow

cytometry antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus* and comparison of mode of action of voriconazole vis a vis amphotericin B and itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 3627-3629, 2003.

92. Resende, J. C. P.; Resende, M. A. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. from hospitalized patients. *Mycoses*, 42: 642-644, 1999.

93. Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Barry, A. L.; Nelson, P. W.; Webb, C. D. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 40-44, 1995.

94. Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Galgiani, J. N.; Bortlett, M. S.; Espinel-Ingroff, A.; Ghannoum, M. A.; Lancaster, M.; Odes, F. C.; Rinaldi, M. G.; Walsh, T. J.; Barry, A. L. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 24: 235-247, 1997.

95. Rezende, C. *Aspectos fenotípicos e moleculares de amostras de Cryptococcus neoformans da região de Araraquara e Ribeirão Preto relacionados aos perfis de suscetibilidade*. Araraquara, 2002, 150p. (Dissertação. Mestrado. Instituto de Química, UNESP).

96. Ribeiro, M. A.; Dietze, R.; Paula, C. R.; Da Matta, D. A.; Colombo, A. L. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia*, 151: 5-10, 2001.

97. Rodero, L.; Dalel, G.; Cordoba, S.; Soria M.; Canteros, C.; Hochenfellner, F. Estudio multicentrico sobre candidiasis nosocomial em la Republica Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.*, 31: 114-119, 1999.

98. Rodriguez-Tudela J.L., Chryssanthou E, Petrakou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.*, 41: 5236-5237, 2003.

99. Rudensky, B.; Broidie, E.; Yinnon, A. M.; Weitzman, T.; Paz, E.; Keller, N.; Raveh, D. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55: 106-109, 2005.

100. Ruiz, L.S.; Sugizaki, M.F.; Montelli, A.C.; Paula, C. R. Fungemia by yeast occurrence and phenotypic study of samples isolated at the Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - São Paulo, Brasil. *J. Mycol. Med.*, 15: 13-21, 2005.

101. Sant'Ana, P. L.; Millan, E. P.; Martinéz, R.; Telles, F. Q.; Ferreira, M. S.; Alcantara, A. P.; Carvalho, M. T.; Colombo, A. L. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Brasil*, 97: 253-257, 2002.

102. Silva, M. R. R.; Costa, M. R.; Miranda, A. T. B.; Fernandes, O. F. L.; Costa, C. R.; Paula, C. R. Evaluation of Etest and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida*

spp strains isolated from oral cavities of AIDS patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 44: 121-125, 2002.

103. Souza, L. K. H.; Fernandes, O. F. L.; Kobayashi, C. C. B. A.; Passos, X. S.; Costa, C. R.; Lemos, J. A.; Souza-Júnior, A. H.; Silva, M. R. R. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47: 253-256, 2005.

104. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion Document 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2003. *In press*.

105. Sugizaki, M. F., Rhoden, C. R.; Bombonatti, D. M.; Montelli, A. C.; Martinson, M. E.; Magalhães Lopes C. A. de. Prevalencia y sensibilidad antifúngica *in vitro* de cepas de *Candida* spp. aisladas de muestras clinicas em São Paulo, Brasil. *Rev Iberoam. Micol.*, 15: 16-18, 1998.

106. Vale-Silva, L. A.; Buchta, V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses* 49: 261-273, 2006.

107. Van den Sande, W.; Luijendijk, A.; Ahmed, A. O. A.; Bakker-Woudenberg, I. A. J.; Belkum, A. van. Testing of the in vitro susceptibilities of *Madura mycetomatis* to six antifungal agents by using the Sensititre system in comparison with a viability-based 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) assay and a modified NCCLS method. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 49: 1364-1368, 2005.

108. Viudes, A.; Cantón, E.; Pemán, J.; López-Ribot, J. L.; Gobernado, M. Correlación entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis y criptococosis. *Rev. Esp. Quimioter.*, 15: 32-42, 2002.

109. Voss, A.; Koeleman, J. G.; Spanjaard, L.; Vandembroucke-Grauls, C. M. J. E.; Verbrugh, H. A.; Voss, M. C.; Weersink, A. Y. L.; Hoogkamp-Korstanje, J. A. A.; Meis, J. F. G. M. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 15: 909-912, 1996.

110. Wanger, A.; Mills, K.; Nelson, P. W.; Rex, J. H. Comparison of Etest and national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2520-2522, 1995.

111. Witt, M. D., Lewis, R. J., Larsen R. A.; Milefchik, E. N.; Leal, M. A. E.; Haubrich, R. H.; Richie, J. A.; Edwards, J. E. Jr.; Ghannoum, M. A. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. *Clin. Infect. Dis.*, 22: 322-328, 1996.

# PROF. DR. LUIZ RACHID TRABULSI



**Marina Baquerizo Martinez**  
Sociedade Brasileira de Microbiologia- Presidente

**Tânia T. Gomes do Amaral**  
UNIFESP-SP

**Bernadette G. Franco**  
FCF-USP

Luiz Rachid Trabulsi, maranhense, médico formado pela Universidade Federal da Bahia em 1953, Doutor em Medicina, pela Universitäts Klinik, Alemanha em 1957 e Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) em 1959. Realizou seu Pós-Doutorado no Centers for Disease Control and Prevention nos Estados Unidos.

Em 1962, iniciou sua carreira docente no Departamento de Microbiologia e Imunologia, da FM-USP como Professor Assistente Doutor e em 1964 obteve o título de Livre-docente. Em 1970 transferiu-se para a então Escola Paulista de Medicina, hoje UNIFESP. Junto com Prof. Dr. Erney P. Cargano e Prof. Dr. Nelson F. Mendes criou o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da UNIFESP, até hoje uma referência para programas de Pós-graduação em Microbiologia. Permaneceu na UNIFESP até 1992, quando se aposentou e reiniciou nova atividade docente no Instituto de Ciências Biomédicas da USP, onde permaneceu até 1997. Em seguida, transferiu-se para o Instituto Butantã, onde fundou e foi Diretor do Laboratório Especial de Microbiologia. Na USP, foi homenageado com o título de Professor Emérito do Instituto de Ciências Biomédicas.

Sua carreira foi marcada por vários e merecidos prêmios, mas dos que ele mais se orgulhava eram as duas espécies bacterianas que receberam nomes em sua home-

nagem: *Koserella trabulsii* (J. Clin. Microbiol., 21: 31-42, 1985) e *Trabulsiella guamensis* (J. Clin. Microbiol., 29: 1480-1481, 1991).

Foi um dos pesquisadores mais produtivos do Brasil, tendo publicado quase duas centenas de trabalhos científicos nos periódicos mais importantes de sua área de atuação. Merece destaque ainda seu famoso livro "Microbiologia", que se encontra na quarta edição. Este livro é fundamental para a formação de milhares de alunos de cursos da área da saúde em todo o país.

As suas maiores contribuições foram na epidemiologia e no diagnóstico da diarreia infantil e adulta e no estudo da *E. coli* diarreio-gênica. Suas principais contribuições foram no estudo de diferentes aspectos da família Enterobacteriaceae, na epidemiologia da diarreia infantil e na epidemiologia, diagnóstico, virulência, determinantes genéticos e estrutura clonal de *E. coli* diarreio-gênica.

Em 1961, publicou o primeiro estudo sobre o papel de *E. coli* enteropatogênica em diarreia infantil no Brasil (Trabulsi, et al, Diarreias infantis por colibacilos enteropatogênicos: estudos preliminares sobre a ocorrência de certos grupos e tipos sorológicos em São Paulo". Rev Inst Med Trop São Paulo, 1961). Mais dois importantes estudos epidemiológicos foram publicados, onde foram mostrados os fatores de risco e proteção para diarreia provocada por EPEC (Go-

mes TAT et al. J Infect Dis, 1991. e Blake PA et al. J Infect Dis 1993).

Ainda na FM-USP, publicou trabalhos importantes onde relatou o encontro de amostras de *E. coli* isoladas de casos de gastroenterites, que provocavam quadros de disenteria muito semelhantes aos provocados por *Shigella*. Mostrou que essas amostras causavam ceratoconjuntivite em olho de cobaia e foram denominadas de *E. coli* enteroinvasora. O grupo do professor Trabulsi foi responsável pela descrição de cinco novos sorotipos pertencentes a esse grupo de *E. coli* diarreio-gênica (O167:NM; O152:NM; O144:NM; O136:NM; O29:NM). Mostrou, ainda, que todas as amostras de EIEC são incapazes de descarboxilar lisina e que a grande maioria, com exceção do sorotipo O124:H30, são imóveis (Silva RM; Toledo MR; Trabulsi LR. J Clin Microbiol, 1980 e Toledo MR; Trabulsi LR. J Clin Microbiol, 1983). Descreveu um novo sorotipo móvel, O145:H45 (Gomes et al., J Clin Microbiol, 1987). Em 1982, mostrou que um plasmídeo de alta massa molecular determina a capacidade de evocar cerato-conjuntivite (Silva et al, J Infect Dis, 1982) e em 1988, que os plasmídeos de invasão de *Shigella* e EIEC apresentam um *replicon* comum (Silva et al., Infect Immun., 1988).

Várias foram as contribuições do grupo do Prof. Trabulsi em *E. coli* enterotoxigênica. Em 1979, descreveu-se pela primeira vez que o sorogrupo 128ac continha amos-

tras enterotoxigênicas (Reis et al, Infect Immun, 1979). O grupo foi responsável também pela descrição e caracterização de um subtipo de toxina LT (LT-II) em amostras humanas e de alimentos (Guth et al, Infect Immun, 1986).

Seus trabalhos mais conhecidos estão relacionados à EPEC. Ele mostrou que EPEC era responsável por aproximadamente 30% de todos os casos de diarreia no primeiro ano de vida em São Paulo, que a frequência diminuía com o aumento da idade dos pacientes e que os sorotipos predominantes eram O111ab:HNM, O111ab:H2 e O119:H6 (Zuliani et al, 1969; Toledo et al, 1983; Gomes et al, 1989). Sem dúvida, o trabalho de sua autoria mais citado na literatura é o que mostrou a alta correlação entre a expressão de adesão localizada em células HeLa e certos sorotipos de EPEC (Scaletsky et al, 1985).

Em agosto de 1995, em São Paulo-SP, organizou em conjunto com o Dr. James B. Kaper (CVD, Baltimore-USA) o 2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENTEROPATHOGENIC *Escherichia coli*. Quatorze convidados internacionais e oito nacionais revisaram diferentes aspectos das infecções por EPEC: epidemiologia, fatores de virulência, diagnóstico e resposta celular. Pela primeira vez, foi discutida a ocorrência de amostras de EPEC atípicas, onde se detectava o gene *eae*, porém o plasmídeo EAF não estava presente e as amostras não eram produtoras de toxina Shiga (Stx). A definição de EPEC típicas e de EPEC atípicas foi resultado de discussões pelo grupo, habilmente conduzidas pelo Prof. Trabulsi, durante o simpósio (*Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic E. coli* -EPEC, Rev. Microbiol, S. Paulo, 27, suppl. 1996).

Com a colaboração do Dr. Tom Whitham (*The Pennsylvania State University*, USA), Dra. Kinue Irino (IAL-SP) pesquisadores da UNIFESP e alunos de Pós-Graduação, foram identificados os principais tipos clonais associados com diarreia e foi avaliada a variação entre clones com relação a fatores de virulência específicos (Campos et al., Infect. Immun. 1994, Rodrigues et al, Infect Immun, 1996; Gonçalves et al, Infect Immun, 1997, Dalla-Costa, et al, J Med Microbiol, 1998; Pelayo et al, J Med Microbiol, 1999). Em 2002, publicou uma revisão sobre EPEC, onde ficou caracterizado que EPEC típicas e atípicas diferem em reservatórios, características genéticas, sorotipos e propriedades de virulência. EPEC



Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi

atípicas são mais relacionadas com as STEC (EHEC, produtoras de toxina Shiga) e, como as STEC, parecem constituir patógenos emergentes. Como marcadores, mostrou que há sorogrupos comuns, mas os sorotipos são diferentes e que o padrão de adesão em células epiteliais é diferente (Trabulsi et al., EID, 2002).

Ele foi responsável por outros inúmeros trabalhos que contribuíram para um melhor conhecimento sobre *E. coli* diarreio gênica. Contudo, o maior legado deste microbiologista notável foi a sua capacidade de formar e aglutinar pesquisadores. Um pouco antes de ir embora, deixou um presente para seu grupo, um projeto sobre EPEC atípica, mesmo longe continua formando pesquisadores de altíssimo nível, pois deixou uma escola.

A trajetória profissional do Dr. Trabulsi foi brilhante: era, e continuará sendo por muito tempo, o primeiro nome a ser lembrado quando o assunto é *Escherichia coli* diarreio gênica. Formou um enorme contingente de alunos, entre mestres, doutores e pós-doutores, deixando sementes em todos os cantos desse país. Tem 80 orientações de mestrado e doutorado concluídas em seu

currículo, número que se multiplica enormemente se for computados os pós-graduados formados indiretamente, ou seja, por seus ex-orientados, até a quarta ou quinta geração.

Além de sua intensa dedicação ao ensino e pesquisa, o Dr. Trabulsi doou muito do seu tempo e de seu coração para atividades que considerava muito especial: foi um dos fundadores da Sociedade Brasileira de Microbiologia, da qual foi presidente em diversas oportunidades. Presidiu também vários congressos de microbiologia, nacionais e internacionais. Foi o editor da Revista de Microbiologia durante muitos anos.

Tinha um carinho especial com a SBM e um desejo de ter uma revista de divulgação científica publicada pela sociedade. Este texto em memória ao Prof. Trabulsi abre a seção "Homenagens" da **Microbiologia in foco**. Esperamos desta forma, fazer jus à dedicação dele à SBM.

A comunidade de microbiologistas do Brasil, representada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, agradece esse grande líder. Que seus ensinamentos e exemplo de vida permaneçam entre nós para todo o sempre.

## Emprego in Foco

Over the last 10 years a variety of tumor antigens that are recognized by both humoral and cellular immune responses have been identified in human tumors. Some of these antigens are currently being used for the development of immunotherapeutic approaches for cancer treatment. However, the amount of available information about tumor antigens is increasing at an astonishing rate, and the availability of a well-organized and professionally curated database for tumor antigens has become indispensable for scientists in the field.

The Academy of Cancer Immunology, with support from the Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), have setup a Cancer Immunome Database that present through a single point of access information about all of the gene products against which an immune response has been documented in cancer patients.

The National Laboratory for Scientific Computation LNCC/MCT and the James Kerr Programm of the Ludwig Institute are now hiring one annotator to update and enlarge the Cancer Immunome database. The job will require scanning of the literature, interpretation of the results, integration of meaningful information, and ability with bioinformatics tools for a better annotation of the tumor antigens.

The annotator(s) will work in Petrópolis but will have to take frequent trips to the Ludwig Institute in São Paulo - Brazil to discuss progress and future improvements.

The contract will be valid for 1 1/2 (one and a half) year, with possibility of renewal according to the availability of future fundings.

We are looking for a well motivated annotator with the following pre-requisites:

- PhD degree
  - Fluent English
  - Knowledge in genomics
  - Notions of tumor biology and immunology
  - Motivation for teamwork and to work continuously with a computer
  - Synthesis ability
  - Flexibility (trips to São Paulo and occasionally New York)
  - Starting date: immediately
- Please send your CV by email together with a motivation letter in English until 01th June to:

**Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos**  
(a/c Marcia Guglielmi)  
Email: marciag@lncc.br

## Notícias in Foco

A SBM tem a satisfação de comunicar à comunidade científica que o Zoilo Pires de Camargo (UNIFESP-SP) foi homenageado pela Medical Mycology Society for the Americas, Divisão da American Society for Microbiology (ASM), pela sua obra acadêmica. A homenagem foi recebida durante o 107º General Meeting ASM, ocorrido em Toronto, - Canada, de 21 a 25 de maio 2007. (Isso seria uma notícia??)

## Agenda in Foco

# BRASÍLIA É SEDE DO 24º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA

Acontece de 2 a 6 de outubro, no Centro de Convenções Ulysses Guimarães, em Brasília, o 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, que reunirá 3000 profissionais e acadêmicos para o debate da Microbiologia no Brasil e América Latina.

A Comissão organizadora do evento, coordenada pela Profa. Dra. Marina Martinez, Presidente da SBM, informa que as inscrições já estão abertas. Consulte o site - [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br) e veja a programação preliminar e as formas de participação.

Venha a Brasília consolidar o 24º CBM como o maior Congresso da América Latina!!!

## 13th INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY INFECCIOSAS/AIDS

Rio de Janeiro, Brasil 12/08/2007- 17/08/2007 Consulte o site: <http://www.immunorio2007.org.br>

## 47th ICAAC MEETING

Chicago, IL, September 17 - 20, 2007 Consulte o site: [www.asm.org](http://www.asm.org)

## 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HEALTH-RELATED WATER MICROBIOLOGY

Date: 9 - 15 September 2007 Venue: Yayoi-Kodo, The University of Tokyo, JAPAN

## 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA

Entre os dias 12 e 16 de novembro, a Sociedade Brasileira de Micologia (SBMy) realiza o 5º Congresso Brasileiro de Micologia, com o tema central A Micologia no Brasil: o começo, onde estamos e o que almejamos. O evento acontecerá em Recife. Informações no site [www.5micol.com](http://www.5micol.com)

## CURSOS DE ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E MICROBIOLOGIA

Inscrições abertas no site [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)

**Procedimento:**

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

**Valores:**

Estudantes: R\$ 90,00 (Anual)

Profissionais: R\$ 175,00 (Anual)

**Formas de pagamento:**

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

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

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

**FICHA DE ADESÃO**

DATA: \_\_\_\_\_ ANO DE REFERÊNCIA: \_\_\_\_\_

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

Nome completo: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Endereço Res: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

TEL.: \_\_\_\_\_ FAX: \_\_\_\_\_

E-MAIL: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Departamento: \_\_\_\_\_

Cargo que exerce: \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

TEL.: \_\_\_\_\_ FAX: \_\_\_\_\_

E-MAIL: \_\_\_\_\_

Microbiologia Especializada em:

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

Endereço para correspondência: Residencial ( ) Comercial ( )







Para muitos isso é apenas  
um pontinho branco.

#### EVENTOS SIMULTÂNEOS

24° Congresso Brasileiro de Microbiologia  
XII Simpósio Brasileiro de Microbactérias  
II Simpósio de Coleções de Cultura  
IV Encontro de Ensino em Microbiologia

#### EIXOS TEMÁTICOS

- Diversidade
- Ensino
- Risco Microbiológico
- Microrganismo como Agente de Saúde  
(substâncias microbianas promotoras de saúde)
- Resistência Microbiana
- Coleções de Culturas de Microrganismos
- *Quorum Sensing*

#### INSCREVA SEU PÔSTER E PARTICIPE.

Os melhores trabalhos serão premiados e convidados para  
apresentação oral durante o evento.

Para nós: um universo.

