

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia



2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Lorena Prestes
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Faria – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P474	<p>Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-772-7 DOI 10.22533/at.ed.727191111</p> <p>1. Microbiologia – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da.</p> <p style="text-align: right;">CDD 579</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A microbiologia é um vasto campo que inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas. Como uma ciência básica a microbiologia utiliza células microbianas para analisar os processos fundamentais da vida, e como ciência aplicada ela é praticamente a linha de frente de avanços importantes na medicina, agricultura e na indústria.

De forma integrada e colaborativa a nossa proposta apoiada e certificada pela editora Atena é apresentar aqui a obra “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia” contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos institutos do território nacional contendo análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

A microbiologia como ciência iniciou a cerca de 200 anos, entretanto os avanços na área molecular como a descoberta do DNA elevou a um novo nível os estudos desses seres microscópicos, além de abrir novas frentes de pesquisa e estudo, algumas das quais pretendemos demonstrar nesse primeiro volume da obra “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia”. Sabemos na atualidade que os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e a falta de conhecimento que havia antes da invenção do microscópio hoje não é mais um problema no estudo, principalmente das enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

Acreditamos no potencial dessa obra em primeiro lugar pela qualidade dos trabalhos aqui apresentados, e em segundo pelo campo em potencial para futuras novas discussões, haja vista que enfrentamos a questão da resistência dos microrganismos à drogas, identificação de viroses emergentes, ou reemergentes, desenvolvimento de vacinas e principalmente a potencialização do desenvolvimento tecnológico no estudo e aplicações de microrganismos de interesse.

Temas ligados à pesquisa e tecnologia microbiana são, deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Portanto a obra propõe uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos em alguns campos da microbiologia, abrindo perspectivas futuras para os demais pesquisadores de outras subáreas da microbiologia.

Assim desejo a todos uma ótima leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MÁQUINAS E FERRAMENTAS PRESENTES EM UM LABORATÓRIO DE MECÂNICA	
Francisco Angelo Gurgel da Rocha Priscylla Cinthya Alves Gondim Liane Raquel Alves dos Santos Vitoria Fernandes Cabral Dantas	
DOI 10.22533/at.ed.7271911111	
CAPÍTULO 2	14
ANALISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DO ALHO (<i>Allium sativum</i> L.) SOBRE O CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS <i>Staphylococcus aureus</i> E <i>Escherichia coli</i>	
Karine Ferreira Lopes Dayane Nair Rocha de Souza Débora Luiz de Barros Estefânia Isabel Pereira Ana Paula Gonçalves Coelho Glaysen Martins de Oliveira Suzanne Ramos Mota Andrea Amélia Silva Vieira	
DOI 10.22533/at.ed.7271911112	
CAPÍTULO 3	22
CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM A CEPA 66985 DO VÍRUS DA DENGUE PELA VIA INTRAVENOSA EXIBE DANO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	
Natália Gedeão Salomão Kíssila Rabelo Tiago Fajardo Póvoa Ada Maria de Barcelos Alves Simone Moraes da Costa Antonio José da Silva Gonçalves Juliana Fernandes Amorim da Silva Adriana de Souza Azevedo Priscilla Conrado Guerra Nunes Carlos Alberto Basílio-de-Oliveira Rodrigo Panno Basílio-de-Oliveira Luiz Henrique Medeiros Geraldo Celina Garcia Fonseca Flávia Regina Souza Lima Ronaldo Mohana-Borges Emiliana Mandarano Silva Flávia Barreto dos Santos Edson Roberto Alves Oliveira Marciano Viana Paes	
DOI 10.22533/at.ed.7271911113	
CAPÍTULO 4	44
CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO ANTAGONISTA PRODUZIDO POR <i>Bacteroides fragilis</i> ISOLADO DE PÁCIENTE COM INFECÇÃO INTRA-ABDOMINAL	
Marcela Nascimento Pinheiro Braga Natália Rocha Guimarães Jamil Silvano Oliveira Simone Gonçalves dos Santos	

Marcelo Porto Bemquerer
Paula Prazeres Magalhães
Luiz de Macêdo Farias

DOI 10.22533/at.ed.7271911114

CAPÍTULO 5 55

DESENHO VACINAL PARA O ZIKA VÍRUS COM O USO DA IMUNOINFORMÁTICA

Esther Santos Santana
Fabiano Ricardo Fontes Santos
Daniela Droppa-Almeida

DOI 10.22533/at.ed.7271911115

CAPÍTULO 6 68

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE CANDIDEMIA EM PACIENTES SUBMETIDOS À INTERNAÇÃO NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS EM GOIÂNIA - GO

Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira
Maria do Rosário Rodrigues Silva
Benedito Rodrigues da Silva Neto

DOI 10.22533/at.ed.7271911116

CAPÍTULO 7 82

ENTEROCOCCUS SP ISOLATED FROM AQUATIC ENVIRONMENT : RESISTANCE TO TOXIC METALS

Luciana Furlaneto-Maia
Gabriela Batista Gomes Bravo
Sharise Beatriz Roberto
Naiara de Oliveira Batista
Alex Kiyomassa Watanabe
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.7271911117

CAPÍTULO 8 98

ESTUDO DA COMUNIDADE LIQUÊNICA DA UEMG – IBIRITÉ: ANÁLISE MORFOLÓGICA E ECOLÓGICA COMO CARACTERIZAÇÃO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Letícia Maria Soares Azevedo
Camila Mara dos Reis
Daniela de Oliveira Costa
Reisila Simone Migliorini Mendes
Marisa Cristina da Fonseca Casteluber

DOI 10.22533/at.ed.7271911118

CAPÍTULO 9 108

KLEBSIELLA PNEUMONIAE: A NOVA AMEAÇA RESISTENTE

Luana Marcela Andrade de Santana
Nathalia Santos Silva
Karla Bárbara Calú Barreto
Dayane dos Santos
Daniel Guimarães Ribeiro
Isana Carla Leal Souza

DOI 10.22533/at.ed.7271911119

CAPÍTULO 10 112

OCORRÊNCIA DE *FASCIOLA HEPATICA* NA REGIÃO DA CAMPANHA GAUCHA/RS

Brenda Luciana Alves da Silva
Mikalele Simas Santos
Marcele Ribeiro Corrêa
Fernanda Lucero Rodrigues
Gustavo Freitas Lopes
Lourdes Caruccio Hirschmann
Anelise Afonso Martins

DOI 10.22533/at.ed.72719111110

CAPÍTULO 11 117

PROPRIEDADES RELACIONADAS À SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL

Jéssica Lee de Freitas
Bianca Aguiar Alves
Celso Tadeu Barbosa dos Santos
Alessandra Barbosa Ferreira-Machado
Aline Dias Paiva

DOI 10.22533/at.ed.72719111111

CAPÍTULO 12 126

Staphylococcus aureus: UMA VISÃO GERAL DOS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

Glauciane Vieira Damasceno
Elane Rodrigues Oliveira
Patrícia Vieira de Oliveira
Bruno Luis Lima Soares
Gabrielle Damasceno Evangelista Costa
Adrielle Zagmignan
Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo
Rita de Cássia M. de Miranda
Luís Cláudio Nascimento da Silva

DOI 10.22533/at.ed.72719111112

CAPÍTULO 13 140

ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) EM COPROCULTURA DE PACIENTES AMBULATORIAIS

Daniela Cristiane da Cruz Rocha
Érica Kássia Sousa Vidal
Karina Lúcia Silva da Silva
Débora de Castro Costa
Anderson Nonato do Rosario Marinho

DOI 10.22533/at.ed.72719111113

CAPÍTULO 14 153

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE UMA CEPA DE *Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE A ANTIBIÓTICOS, ISOLADA DO LAGO ÁGUA PRETA, BELÉM, PARÁ

Ícaro Rainyer Rodrigues de Castro
Jorianne Thyessa Castro Alves
Alyne Cristina Sodré Lima
Vitória Almeida Gonçalves de Moura
Carla Thais Moreira Paixão
Wana Lailan Oliveira da Costa
Adriedson Jameson Chaves de Alcântara
Carlos Leonardo de Aragão Araújo

Larissa Maranhão Dias
Artur Luiz da Costa da Silva
Adriana Ribeiro Carneiro Folador
DOI 10.22533/at.ed.72719111114

CAPÍTULO 15 168

DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE *PSEUDOCOWPOXVIRUS* – PCPV EM BOVINOS

Érica Eustáquia de Freitas Passos
Giliane de Souza Trindade
Antônio Augusto Fonseca Júnior

DOI 10.22533/at.ed.72719111115

CAPÍTULO 16 180

VERIFICAÇÃO DA TEMPERATURA DE DISTRIBUIÇÃO DE REFEIÇÕES QUENTES OFERTADAS EM UMA INSTITUIÇÃO DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS E A CORRELAÇÃO COM O CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO

Eliane Costa Souza
Déborah Maria Tenório Braga Cavalcante Pinto
Ismaell Avelino de Sousa Sobrinho
Andressa Lima dos Santos
Julia Dayane de Miranda Vasconcelos Cardoso
Mirelly Raylla dos Santos
Mateus Oliveira Santana

DOI 10.22533/at.ed.72719111116

CAPÍTULO 17 188

A DIVERSIDADE DA CLASSIFICAÇÃO DE RNAS NÃO-CODIFICADORES EM BACTÉRIAS

Amanda Carvalho Garcia

DOI 10.22533/at.ed.72719111117

CAPÍTULO 18 202

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTAS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE

Rosimeire Oenning da Silva
Sinésio de Novaes Junior
Meirielelem do Nascimento Serpa
Italo Andrey Souza Inácio Lima
Raquel Aparecida Loss

DOI 10.22533/at.ed.72719111118

SOBRE O ORGANIZADOR..... 214

ÍNDICE REMISSIVO 215

ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE MÁQUINAS E FERRAMENTAS PRESENTES EM UM LABORATÓRIO DE MECÂNICA

Francisco Angelo Gurgel da Rocha

Instituto Federal do Rio Grande do Norte – IFRN
Mossoró/RN

Priscylla Cinthya Alves Gondim

Instituto Federal do Rio Grande do Norte – IFRN
Mossoró/RN

Liane Raquel Alves dos Santos

Instituto Federal do Rio Grande do Norte – IFRN
Mossoró/RN

Vitoria Fernandes Cabral Dantas

Instituto Federal do Rio Grande do Norte – IFRN
Mossoró/RN

RESUMO: Os microrganismos são parte intrínseca da Biosfera. No ambiente escolar, a presença de espécies patogênicas é frequente. Sob condições adequadas, os patógenos podem contaminar, colonizar, proliferar e formar biofilmes em objetos inanimados (fômites), favorecendo a contaminação cruzada e o consequente risco à saúde humana. A área estudada compreendeu os Laboratórios de Usinagem e de Máquinas Térmicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte - Campus Mossoró. Objetivou-se quantificar as populações de microrganismos indicadores de risco biológico presentes em máquinas e ferramentas manipuladas com alta frequência por docentes

e discentes, bem como propor, medidas preventivas e corretivas na área da segurança do trabalho. Com uso de *swab* foi coletado um total de 24 amostras (torno mecânico: 06, fresadora: 06, alicate de pressão: 06, chave de boca 25/28: 06). Foram quantificadas as populações de bactérias aeróbias mesófilas (Plate Count Agar, $36\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$), coliformes totais e *Escherichia coli* (Fluorocult® LMX Broth, $36\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 2\text{h}$). Constatou-se que as máquinas e ferramentas estudadas podem atuar como fômites eficientes, contribuindo para a disseminação de doenças infectocontagiosas entre a comunidade acadêmica. A partir dos dados obtidos, realizou-se o mapeamento das áreas de risco bem como o estabelecimento de rotinas de higienização nas máquinas e equipamentos disponíveis nos laboratórios estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Laboratórios. Microrganismos patogênicos. Contaminação biológica. Rotinas de Higienização.

ANALYSIS OF THE MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF MACHINES AND TOOLS PRESENT IN A MECHANICAL LABORATORY

ABSTRACT: Microorganisms are an intrinsic part of the Biosphere. In the school environment,

the presence of pathogenic species is frequent. Under suitable conditions, pathogens can contaminate, colonize, proliferate and form biofilms in inanimate objects (fomites), favoring cross contamination and the consequent risk to human health. The studied area included the Machining and Thermal Machine Laboratories of the Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Norte - Mossoró Campus. The aim of this study was to quantify the populations of biological risk indicators present in machines and tools manipulated with high frequency by teachers and students, as well to propose preventive and corrective measures in the area of work safety. With the use of swab a total of 24 samples were collected (mechanical lathe: 06, milling machine: 06, pressure pliers: 06, spanner 25/25: 06). The populations of aerobic mesophylic bacteria (Plate Count Agar, 36 ± 1 ° C / 24 ± 2 h), total coliforms and *Escherichia coli* (Fluorocult® LMX Broth, 36 ± 1 ° C / 24 ± 2 h) were quantified. It was verified that the machines and tools studied can act as efficient fomites, contributing to the dissemination of infecto-contagious diseases among the academic community. From the data obtained, the mapping of the risk areas was carried out as well as the establishment of hygiene routines in the machines and equipment available in the laboratories studied.

KEYWORDS: Laboratories. Pathogenic microorganisms. Hygiene routines.

1 | INTRODUÇÃO

Os microrganismos são parte intrínseca da Biosfera, podendo estar presentes no solo, água, atmosfera e até mesmo lixo radioativo (GONTIJO et al., 1985; KRAMER et al., 2006).

Muitas das espécies microbianas dispersas no meio ambiente são patogênicas, representando risco à saúde humana, em especial nos casos em que ocorram condições de imunossupressão (MAHMOUDI, H. et al. 2017). Tais espécies podem contaminar, colonizar, proliferar e até mesmo formar de biofilmes em superfícies inanimadas (SOSAN, KINAL, 2011; SHARMA, ANAND, 2002; HOOD, ZOTOLA, 1997).

Os vetores mecânicos inanimados são genericamente denominados fômites. Tais vetores representam o principal mecanismo de disseminação de agentes patogênicos, atuando na contaminação indireta e, desse modo, favorecem a disseminação de patógenos. Dentre as principais doenças veiculadas pelos fômites, destacam-se a difteria, tracoma, gastroenterites, coqueluche e diarreias (SHARMA, A; DHANASHREE, B., 2011).

Através dos mecanismos de contaminação direta ou cruzada, a microbiota presente nos fômites pode ser transmitida às mãos e mucosas dos diversos usuários, configurando um risco à Saúde humana, se considerarmos a presença potencial de microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2007).

No panorama urbano atual, teclados de computador, superfícies de trabalho, botões de elevadores e corrimões de escada e moeda circulante são exemplos de

superfícies inanimadas que atuam como eficientes fômites na disseminação de doenças. (CHAIRMAN et al., 2011; RUSIN, 2002).

Os humanos, caracteristicamente, desenvolvem grande parte do seu ciclo vital em ambientes fechados, manipulando fômites diversos, muitos deles objetos de intensa manipulação por outros indivíduos presentes em seu contexto social. Como consequência, ocorrem alterações significativas na composição do microbioma individual, incluindo-se nestas, a introdução de espécies patogênicas e a sua subsequente transferência para outros objetos, o que pode resultar no desenvolvimento de processos patológicos (GRICE, 2011; RINTALA et al., 2008).

O ambiente escolar, por agregar indivíduos de diferentes classes sociais e hábitos de higiene, bem como pela diversidade de fômites presentes, é reconhecidamente ideal para a disseminação de patógenos (INCHLEY et al., 2017; CAPRISTO et al., 2015).

Apesar da relevância deste tema para a saúde da comunidade acadêmica e para a saúde pública em geral, não foram encontrados na bibliografia pertinente, dados relacionados à avaliação da microbiota presente em oficinas mecânicas de Escolas Técnicas e Universidades. Em tal contexto, considerou-se relevante a avaliação do risco biológico representado pelos fômites presentes nos Laboratórios de Usinagem e de Máquinas Térmicas, ambos voltados ao desenvolvimento de ações de Ensino e Pesquisa no âmbito do IFRN *Campus* Mossoró.

O presente estudo teve como objetivo geral determinar as populações de microrganismos indicadores de risco biológico presentes em máquinas e ferramentas manipuladas com alta frequência por docentes e discentes. Como objetivo específico, elencou-se a determinação das medidas preventivas e corretivas necessárias à mitigação do risco biológico presente nas áreas estudadas.

2 | DESENVOLVIMENTO

2.1 Caracterização da área estudada

O estudo foi desenvolvido no *Campus* Mossoró do IFRN, situado sob coordenadas 6°15'39" Sul, 36°31'04", mesorregião Central Potiguar, Estado do Rio Grande do Norte. Os espaços didáticos elencados para o presente estudo são o Laboratório de Usinagem e o Laboratório de Máquinas Térmicas.

Ambos caracterizam-se por possuírem piso cimentado, paredes em alvenaria, circulação de ar natural e artificial através de ventiladores, atendendo uma população de sessenta alunos, oito docentes e dois monitores. Dentre os equipamentos presentes em suas instalações estão o torno mecânico, fresadora, furadeira de bancada, poliacorte, elevacar, serra, bancada de ajustagem além de vários tipos de chaves e alicates.

2.2 Pontos de coleta e número de amostras

Com base em dados coletados junto aos monitores lotados em cada um dos espaços didáticos estudados, foram estabelecidos os pontos com maior frequência de manipulação por parte de discentes e docentes, sendo estes torno mecânico e a fresadora (Laboratório de Usinagem), o alicate de pressão e a chave de boca 25/28 (Laboratório de Máquinas Térmicas). A partir de cada um dos pontos descritos, procedeu-se à coleta de amostras microbiológicas, conforme descrito na Tabela 1.

LOCALIZAÇÃO	MÁQUINA/FERRAMENTA	CODIFICAÇÃO	PONTO DE COLETA	AMOSTRAS
Laboratório de usinagem	Torno mecânico	M1	Manivela, botões e alavancas dos painéis de controle	06
	Fresadora	M2		06
Laboratório de máquinas térmicas	Alicate de pressão	F1	Cabo	06
	Chave de boca 25/28	F2	Toda a ferramenta	06
TOTAL				24

Tabela 1 - Distribuição dos pontos de amostragem para a coleta com uso de *swab*.

Legenda: M1 = torno mecânica; M2 = fresadora; AM = Bactérias aeróbias mesófilas; CT = coliformes totais; EC = *E. coli*; UFC = Unidades Formadoras de Colônias; NMP = Número Mais Provável.

As amostras foram coletadas com uso de *swab* embebidos em solução salina peptonada estéril. A coleta foi realizada através de movimentos circulares e longitudinais, executados nos pontos de manipulação dos equipamentos e ferramentas. Os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 10 mL de solução salina peptonada estéril. Os tubos contendo as amostras foram encaminhados ao laboratório de Biologia do IFRN *Campus* Mossoró, onde foram imediatamente submetidos aos procedimentos analíticos.

2.3 Bioindicadores Pesquisados

Foram pesquisadas as densidades populacionais dos seguintes microrganismos: bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e *Escherichia coli*. A detecção de tais bioindicadores nas amostras pode denunciar a existência de condições gerais de higiene inadequadas, bem como a presença potencial de espécies patogênicas para humanos.

2.4 Análise microbiológica

A partir das coletas, realizou-se Diluições Decimais Seriadas, de 10^{-1} a 10^{-3} (SILVA et al., 2007, p.35). Para a quantificação de coliformes totais e *E. coli*, a partir de cada uma das diluições foram inoculadas triplicatas de tubos de ensaio identificados, contendo Fluorocult® LMX Broth. Os tubos foram posteriormente

incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$ em estufa bacteriológica. Após o período de incubação, foram considerados positivos para a presença de coliformes totais os tubos que apresentaram cor verde ou azul. Para a presença de *E. coli*, foram considerados positivos os tubos que apresentaram fluorescência sob luz ultravioleta 366 nm (FRANCO et al., 2007, p.203).

O quantitativo de tubos por diluição, foram comparados à tabela do Número Mais Provável, para séries de 3 tubos, com inoculações correspondentes a 0,1 – 0,01 – 0,001 mL. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável por centímetro quadrado (NMP/cm²),

Para a quantificação de bactérias aeróbias mesófilas, a alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em duplicatas de placas de petri contendo 16 mL de Plate Count Agar (PCA) incubadas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$ (SILVA et al., 2007, p. 15) na estufa.

Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram quantificadas com uso de um contador de colônias, sendo os resultados calculados e expressos em Unidades Formadoras de Colônias por centímetro quadrado (UFC/cm²).

2.5 Riscos Ambientais e suas medidas preventivas

O objetivo da Segurança do Trabalho é a prevenção de riscos ambientais, evitando assim acidentes e doenças. Prevenir quer dizer ver antecipadamente; chegar antes do acidente; tomar todas as providências para que o acidente não tenha possibilidade de ocorrer.

Todo e qualquer trabalho a ser desenvolvido dentro de um laboratório apresenta riscos ambientais, seja pelo manuseio de produtos e equipamentos, arranjo físico inadequado, falta de organização/limpeza ou imprudência do próprio usuário, que podem resultar em acidentes do trabalho, estes podem acontecer quando menos se espera. (BEZERRA, 2015)

O laboratório de mecânica é indispensável para os alunos do Instituto, os mesmos com auxílio e orientação dos professores e monitores realizam aulas práticas e desenvolvem trabalhos e projetos. O aluno, professor ou monitor quando exposto a riscos em geral, podem sofrer danos que afetam o desempenho, podendo ter repercussões negativas para a sua saúde. Conforme Alevato e Araújo (2009) as consequências provocadas por esses riscos pode repercutir não só em sua vida acadêmica, mais, em seu estado de humor, em suas relações com os colegas, em sua vida familiar, gerando sobrecarga para os demais indivíduos ao seu redor, que também já se encontram pressionados e inseridos no mesmo processo.

Assim, para eliminar ou neutralizar estes riscos ambientais devemos implementar medidas preventivas de segurança do trabalho. A forma mais eficaz de medida preventiva para o risco biológico é organização do ambiente, rotinas de higienização, elaboração de mapa de riscos ambientais e utilização de Equipamentos de Proteção Individual.

2.6 Organização do ambiente e Rotinas de Higienização

Como os microrganismos se adaptam melhor e se reproduzem mais em ambientes sujos e desorganizados, as medidas preventivas a tomar terão de ser relacionadas com:

- organização do ambiente de trabalho
- higiene de locais de trabalho,
- a rigorosa higiene de corpo e das roupas;
- uso de equipamentos individuais para evitar contato direto com os microrganismos;
- ventilação permanente e adequada;
- controle médico constante, com vacinação sempre que possível.

2.7 Mapa de risco ambiental

O Mapa de Riscos é uma das modalidades mais simples de avaliação qualitativa dos riscos ambientais existentes nos locais de trabalho. Serve de forma simples como um instrumento de levantamento preliminar de riscos, de informação para os demais usuários do local e possíveis visitantes, e de planejamento para as ações preventivas que serão adotadas pela empresa.

É um instrumento participativo, elaborado pelos usuários do local e de conformidade com as suas sensibilidades. O Mapa de Riscos está baseado no conceito filosófico de que quem faz o trabalho é quem conhece o trabalho, ninguém conhece melhor a máquina do que o seu operador.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Densidades microbianas observadas

Os resultados obtidos a partir das 12 análises de amostras coletadas no Laboratório de Usinagem estão descritos na tabela 2.

AMOSTRA	PONTO DE COLETA	AM		CT (NNP/cm ²)	EC (NNP/cm ²) UFC/cm ²
		UFC/c m ²	Log (UFRC/cm ²)		
1	M1	8,5x10 ¹	1,92	<3,0	<3,0
2	M1	1,9x10 ³	3,27	<3,0	<3,0
3	M1	2,7x10 ³	3,43	3,6	<3,0
4	M1	1,6x10 ⁴	4,20	3,6	<3,0
5	M1	4,1x10 ³	3,61	<3,0	<3,0
6	M1	1,1x10 ³	3,04	<3,0	<3,0
Média Parcial M1		4,4x10³	3,24	-	-

7	M2	1,5x10 ³	3,17	3,6	<3,0
8	M2	1,4x10 ³	3,14	<3,0	<3,0
9	M2	1,2x10 ⁴	4,07	<3,0	<3,0
10	M2	1,5x10 ²	2,17	<3,0	<3,0
11	M2	2,7x10 ³	3,43	<3,0	<3,0
12	M2	2,0x10 ³	3,30	<3,0	<3,0
Média Parcial M2		3,3x10³	3,21	-	-
Média Geral		3,8x10³	3,23	-	-

Tabela 2 - Densidade populacionais dos bioindicadores testados, observadas nos pontos de coleta situados no laboratório de Usinagem do IFRN/Campus Mossoró.

Legenda: M1 = Torno mecânico; M2 = Fresadora; AM = Bactérias Aeróbicas Mesófilas; CT = Coliformes Totais; EC = *E. coli*; UFC= Unidades Formadoras de Colônias; NMP = Número Mais Provável.

Conforme observado, Bactérias Aeróbicas Mesófilas foram detectadas em todas as amostras, com Densidade Populacional Média correspondente a 3,8x10³ UFC/cm². Os limites inferior e superior equivaleram, respectivamente, a 8,5x10¹ UFC/cm² (amostra 1) e 1,6x10⁴ UFC/cm² (amostra 4), ambas provenientes do Torno Mecânico.

Em relação aos coliformes totais, 9 amostras (75,0%) apresentaram Densidade Populacional Estimada inferior a 3,0 NMP/mL. Nas 3 amostras restantes (25%), os níveis detectados para o bioindicador foi equivalente a 3,6 NMP/mL. Em 100% dos casos, as Densidades observadas de *E.coli* foram inferiores a 3,0 NMP por mL (Tabela 2).

3.2 Laboratório de Máquinas Térmicas

Os resultados obtidos a partir das 12 análises de amostras coletadas no Laboratório de Máquinas Térmicas estão descritos na tabela 2.

AMOSTRA	PONTO DE COLETA	AM		CT (NMP/cm ²)	EC (NMP/cm ²)
		UFC/cm ²	Log (UFC/cm ²)		
1	F1	3,0x10 ²	2,47	<3,0	<3,0
2	F1	2,4x10 ³	3,38	<3,0	<3,0
3	F1	1,5x10 ³	3,17	7,4	<3,0
4	F1	8,0x10 ¹	1,90	<3,0	<3,0
5	F1	3,0x10 ³	3,47	<3,0	<3,0
6	F1	3,1x10 ⁴	4,49	<3,0	<3,0
Média Parcial F1		1,7x10³	3,15	-	-
7	F2	2,2x10 ³	3,34	3,6	<3,0
8	F2	1,7x10 ³	3,23	<3,0	<3,0
9	F2	9,5x10 ³	3,97	<3,0	<3,0
10	F2	1,1x10 ²	2,04	<3,0	<3,0
11	F2	3,7x10 ³	3,56	<3,0	<3,0
12	F2	1,3x10 ³	3,12	<3,0	<3,0
Média Parcial F2		3,1x10³	3,21	-	-

MÉDIA GERAL	4,7x10 ³	3,18	-	-
-------------	---------------------	------	---	---

Tabela 3 - Densidades populacionais dos microrganismos testados, observadas nos pontos de coleta situados no laboratório de Máquinas Térmicas do IFRN/Campus Mossoró.

Legenda: F1= Alicata de pressão; F2 = Chave de boca 25/28; AM= Bactérias Aeróbias Mesófilas; CT= Coliformes Totais; EC= *E. coli*. ; UFC= Unidades Formadoras de Colônias; NMP= Número Mais Provável

Conforme observado, detectou-se bactérias aeróbias mesófilas em 100% dos casos, com Densidade Populacional Média de 4,7x10³ UFC/mL. Os limites inferior e superior para o bioindicador equivaleram, respectivamente, a 8,0x10¹ UFC/cm² (amostra 4) e 3,1x10⁴ UFC/cm² (amostra 6). Ambas as amostras foram obtidas a partir da chave de boca 25/28 (Tabela 3).

Em relação aos coliformes totais, 10 amostras (83,3%) apresentaram densidades estimadas inferiores a 3,0 NMP/mL. Nas 2 amostras restantes (16,7%), as densidades inferiores e superiores estimadas foram, respectivamente, 3,6 NMP/mL (amostra 7) e 7,4 NMP/mL (amostra 3). As amostras foram obtidas a partir da chave de boca 25/28 e do alicate de pressão. Em 100% das amostras, as densidades observadas do indicador de contaminação fecal, *E. coli* foram inferiores a 3,0 NMP por mL (Tabela 2 e 3).

As densidades populacionais de bactérias aeróbias mesófilas observadas são consistentes com o relato de Hassam e Rahman (2014), atestando o fato de que a carga microbiana presente em um fômite é proporcional ao número de usuários que o manipule.

A densidade populacional de bactérias aeróbias mesófilas é um útil indicador das condições gerais de higiene presentes em um dado ambiente (SILVA, et al. 2007). Adicionalmente, a presença de microrganismos mesófilos viáveis em um dado fômite indica que nestes, existem as condições mínimas para a sobrevivência de espécies patogênicas para humanos. Como exemplo deste fato, Anderson e May (1992) relatam a detecção de *Escherichia coli*, *Vibrio spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella typhi*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Burkholderia spp.*, *Micrococcus spp.* e *Alcaligenes spp.*

Apesar dos relatos da presença de *E. coli* e de espécies contidas no grupo dos coliformes totais em fômites (TAGOE et al., 2011, p.32; HASSAM & RAHMAN, 2014, p.21), no presente estudo, suas frequências de detecção nas amostras foram baixas. As baixas densidades observadas de tais indicadores, pode ter sido influenciada pela presença de filme de óleo recobrando os pontos de coleta. Diante de tal especificidade, inexistente na bibliografia pertinente, pode-se hipotetizar que a presença da cobertura hidrofóbica resultante da manipulação dos equipamentos pelos usuários, possa exercer ação inibitória sobre os microrganismos citados,

seja através de uma possível ação antimicrobiana (bactericida, bacteriostática ou bacteriolítica), quanto por dificultar o acesso dos microrganismos aos nutrientes e umidade necessários ao seu metabolismo. Portanto, isso demonstra que a utilização de óleo pode funcionar, também, como uma medida preventiva.

Em relação aos mecanismos pelos quais os microrganismos foram introduzidos nas máquinas estudadas, constata-se que o contato direto, em sua maioria, por alunos e monitores com os elementos das máquinas e com as próprias ferramentas, sob condições de higiene inadequadas, se mostra um provável meio de contaminação. A inexistência de rotinas de higienização de mãos antes e após a manipulação dos pontos de coleta é, de forma indiscutível, um eficiente mecanismo de introdução da microbiota contaminante, e isso deve ser alterado imediatamente após a compilação dos dados dessa pesquisa.

3.3 Riscos Ambientais Medidas Preventivas

Diante dos tais resultados observados e da comprovação da existência de microrganismos indicadores de risco biológico nas máquinas e ferramentas testadas nos Laboratórios de Usinagem e de Máquinas Térmicas, foram realizadas intervenções higiênicas, como a limpeza das ferramentas com Álcool 70° GL, a organização do armário e das bancadas, assim como a renovação de alguns EPI's. A Figura 1 demonstra o ambiente desorganizado e na Figura 02 após a organização e higiene do local.

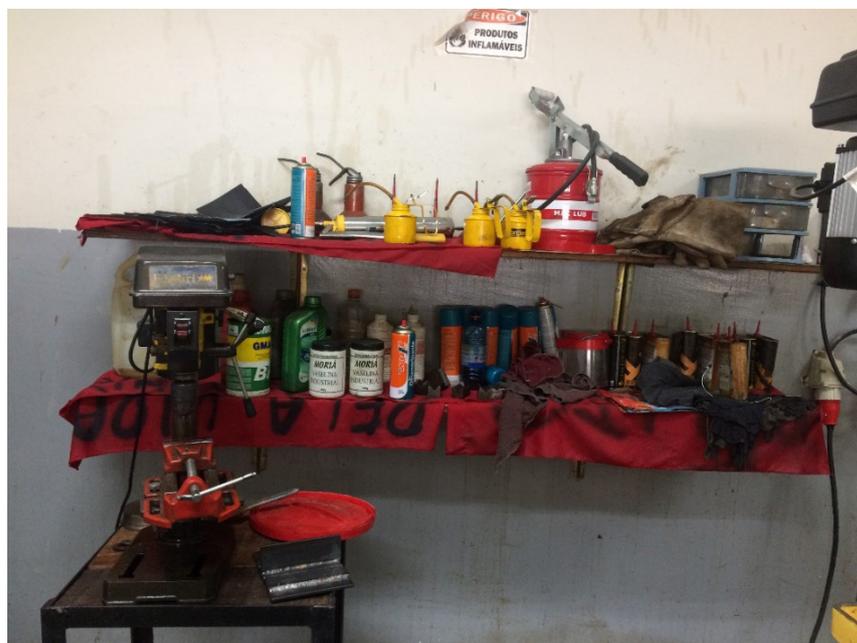


Figura 1 – Prateleira antes da limpeza e organização.



Figura 2 – Prateleira após a limpeza e organização.

Em seguida, foram elaborados Mapas de Risco Ambiental para cada um dos espaços estudados, como demonstra as Figuras 3 e 4.

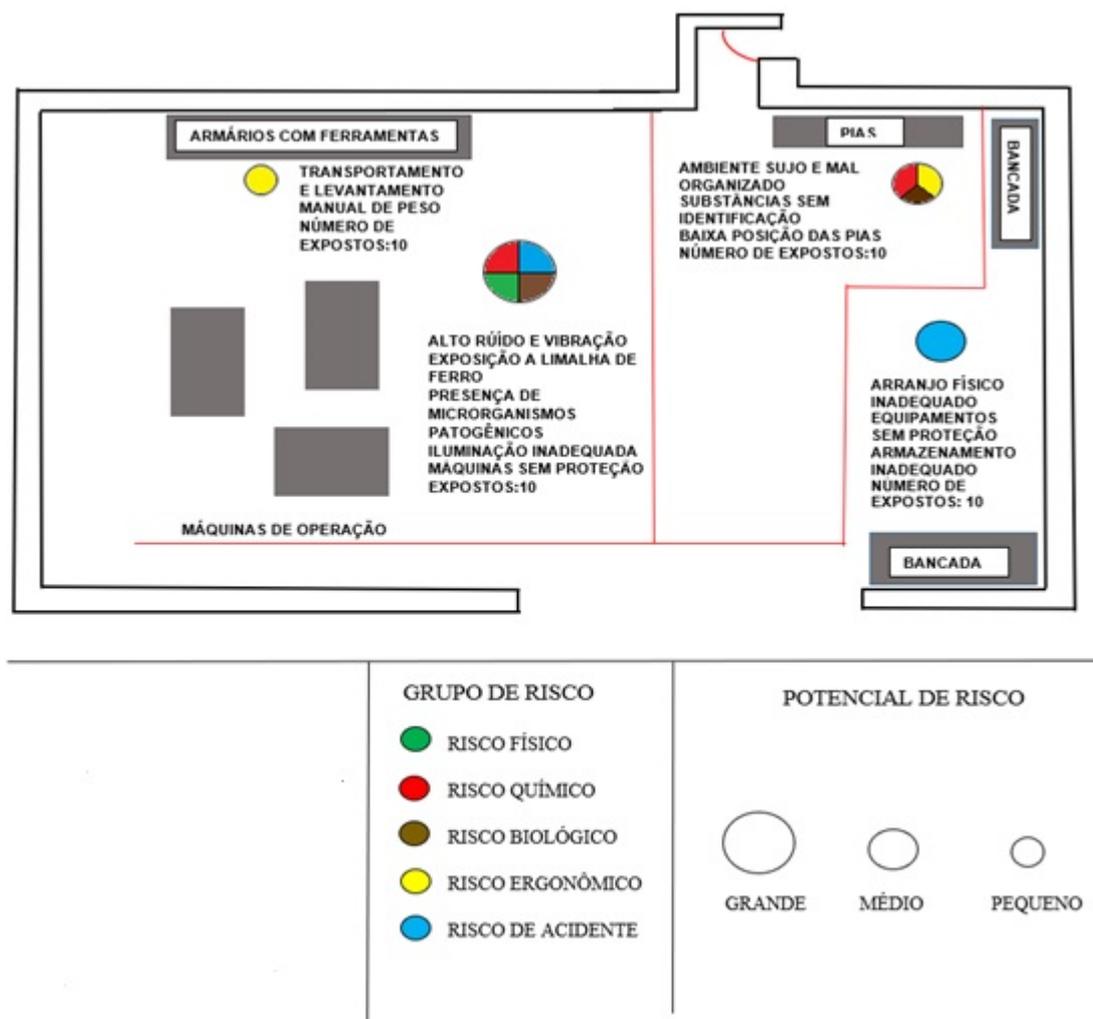


Figura 3 - Mapa de Risco do Laboratório de Máquinas Usinagem.

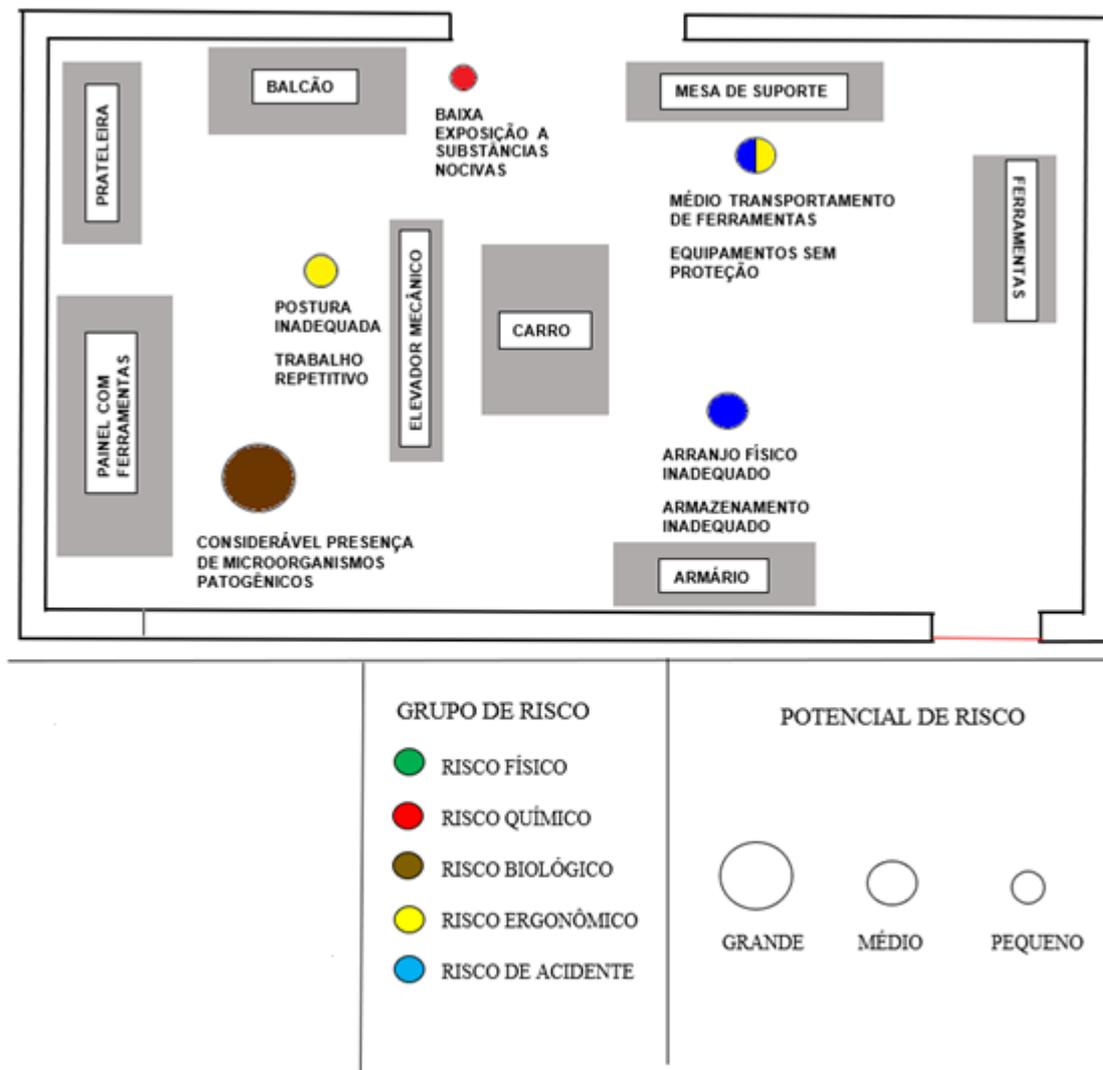


Figura 2 - Mapa de Risco do Laboratório de Máquinas Térmicas.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos no estudo, concluiu-se que os equipamentos e ferramentas testados no Laboratório de Usinagem (Torno Mecânico e Fresadora) e no Laboratório de Máquinas Térmicas (Alicate de Pressão e Chave de Boca 25/28) podem atuar como eficientes transmissores de microrganismos patogênicos na comunidade acadêmica.

Em virtude do exposto, foi reforçada a necessidade do uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) e rotinas de higienização dos equipamentos e mãos com uso de antimicrobianos adequados a cada caso (detergentes, desinfetantes, álcool 70° GL). Igualmente, recomendou-se a adequação das instalações físicas dos laboratórios estudados, com a instalação de pias e aparato exclusivamente dedicado à higienização das mãos dos operadores.

Os dados obtidos mostram a necessidade do desenvolvimento de treinamentos, por meio de palestras com especialistas na área de Segurança do Trabalho, visando

à implantação de rotinas de higienização junto aos discentes, terceirizados, técnicos e docentes que utilizem e/ou frequentem os ambientes avaliados, a fim de preservar a integridade de cada um desses indivíduos.

Se faz necessário à implementação de educação continuada e permanente, visando fornecer conhecimento e orientação a fim de conscientizar os profissionais quanto aos riscos os quais estão expostos e os recursos disponíveis para evitá-los, faz-se necessário também uma rigorosa fiscalização quanto à disponibilidade e conservação dos equipamentos de proteção individual a fim de atender todos os profissionais expostos aos riscos biológicos.

Para a completa caracterização do risco biológico, sugeriu-se que sejam desenvolvidos estudos mais aprofundados, de modo a abranger o maior número possível de equipamentos/ferramentas. Tais estudos devem também contemplar a identificação dos microrganismos patogênicos presentes e os seus possíveis padrões de resistência.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. R.; MAY, M. R., 1991. **Infectious Disease of Humans: Dynamics and Control**. OUP Oxford, 1992.

BEZERRA R. B. et al. Avaliação dos riscos ambientais através de uma análise qualitativa em um laboratório de mecânica. XXXV Encontro Nacional de Engenharia da Produção. Fortaleza, CE, Brasil, 13 a 16 de outubro de 2015.

CHAIRMAN K, MATHEW KE, PADMALATHA C, RANJIT AJ. Beware of pathogenic microbes in public utility devices. **J Microbiol Biotechnol Res**. v.1, n.3, 2011, p. 85-90.

FRANCO, R. M. et al. Enumeração de *Escherichia coli* em carne bovina e de aves através de metodologia miniaturizada utilizando-se “*ependorf*” e caldo fluorogênico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 103, p. 201-07, 2008.

GONTIJO FILHO, P. P.; STUMPF, M.; CARDOSO, C. L. Survival of gram-negative and gram-positive bacteria artificially applied on the hands. **J Clin Microbiol**. v. 2, n.4, 1985, p.652-3.

HASSAM, R.; RAHMAN, A. Bacterial contamination of computer keyboards and mouse. **Tikrit Journal of Pure Science**. v. 19, n.5, p. 18-22, 2014.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **Int J Food Microbiol**. v. 22, n. 37, 1997, p.145-53.

INCHLEY, C. S.; BERG, A. S.; VAHDANI, B. A.; BENAM, A.; KVISSEL, A. K.; LEEGAARD, T. M.; NAKSTAD, B. *Mycoplasma Pneumoniae*: A Cross-sectional Population-based Comparison of Disease Severity in Preschool and School-age Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 10, 2017, p. 930-936.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect Dis**. v.6, n.130, 2006.

MAHMOUDI, H. et al. Antibigram of bacteria isolated from automated teller machines in Hamadan, West Iran. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 12, 2017.

RUSIN, P.; MAXWELL, S.; GERBA, C. Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. **J Appl Microbiol**, v. 93, n.4, 2002, p.585-92.

SHARMA, A.; DHANASHREE, B. Screening of currency in circulation for bacterial contamination. **Current Science**, v.100, n. 6, 2011.

SILVA, et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3 ed. São Paulo.** Varela, 2007.

SOSAN, A.; KINAL, D. Food pathogens for potential automatic tius machines. Bull. **Appl Res Sci**, v.1, n. 2, 2011, p.14-8.

TAGOE, D. N. et al. Bacterial Contamination of mobile phones: when your mobile phone could transmit more than just a call. **Webmed Central MICROBIOLOGY**. v. 2, n.10, p. 31-35, 2011.

ANALISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO AQUOSO DO ALHO (*Allium sativum* L.) SOBRE O CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*

Karine Ferreira Lopes

Universidade Federal de Minas Gerais –
Departamento de Parasitologia
Belo Horizonte – Minas Gerais

Dayane Nair Rocha de Souza

Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

Débora Luiz de Barros

Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

Estefânia Isabel Pereira

Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

Ana Paula Gonçalves Coelho

Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

Glaysen Martins de Oliveira

Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

Suzanne Ramos Mota

Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

Andrea Amélia Silva Vieira

Coordenadora do curso de Ciências Biológicas -
Centro Universitário UNA
Belo Horizonte – Minas Gerais

pois seu uso constante contribui para o aumento da resistência bacteriana e interfere no tratamento de infecções. A utilização de vegetais com propriedades medicinais se mostra uma alternativa eficaz na busca de agentes microbianos que inibem o crescimento de infecções causadas por patógenos multirresistentes. As qualidades terapêuticas encontradas no alho (*Allium sativum* L.) e seu amplo espectro bacteriano foram selecionados com o propósito de analisar a influência da atividade do extrato aquoso frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Através da preparação do extrato aquoso com bulbilhos do alho, realizou-se a aplicação de cultura bacteriana em placas de Petri com dois discos contendo o extrato aquoso de *A. sativum* e um disco com o antibiótico Cloranfenicol, utilizado para fins de comparação com os halos formados pelo extrato. Realizaram-se medições dos halos formados no entorno dos discos e cálculo de média dos halos formados pelo extrato. Os resultados mostram formação de halo de inibição do crescimento bacteriano em ambas as espécies de bactérias e que esse crescimento foi maior em *S. aureus*, indicando assim um possível agente natural a ser aprofundado em estudos com patógenos resistentes a antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Allium sativum*,
Cloranfenicol, *Staphylococcus aureus*,

RESUMO: O uso indiscriminado de fármacos se tornou um problema de saúde pública,

ANTI-MICROBIAL ANALYSIS OF THE AQUEOUS EXTRACT OF GARLIC (*Allium sativum* L.) ON THE GROWTH OF BACTERIA *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*.

ABSTRACT: Indiscriminate drug use has become a public health problem due to its constant use, which contributes to the increase of bacterial resistance that interferes in the treatment of infections. The use of vegetables with medicinal properties is an effective alternative in the search for microbial agents that inhibit the growth of infections caused by multiresistant pathogens. The therapeutic qualities found in garlic (*Allium sativum* L.) and its broad bacterial spectrum were selected in order to analyze the influence of aqueous extract activity against the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterias. By preparing the aqueous extract with garlic bulbs, bacterial culture were applied to two-disc Petri dishes containing the aqueous extract of *A. sativum* and a disc with the chloramphenicol antibiotic, used in comparison to the halos formed by the extract. Measurements of the halos formed around the discs were made and the halos formed by the extract were averaged. The results show that bacterial growth inhibition halo was formed in both bacterial species and that their growth was higher in *S. aureus*, therefore it indicates a possible natural agent to be deepened in studies with antibiotic resistant pathogens.

KEYWORDS: *Allium sativum*, Chloramphenicol, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Antimicrobial resistance.

1 | INTRODUÇÃO

A utilização da fitoterapia vem sendo difundida desde os antepassados. Estima-se que a utilização de plantas para fins medicinais se iniciou há mais de 60 mil anos (REZENDE *et al.* 2002). No Brasil, os índios iniciaram a técnica, que logo fez junção ao conhecimento dos escravos nativos africanos e dos colonizadores europeus (ARAÚJO, 1979). A fitoterapia pode utilizar todas as partes das plantas desde as folhas até as raízes e sementes, dependendo de onde se encontra o princípio ativo da mesma (REZENDE *et al.* 2002).

A aplicação do uso popular nos dias atuais vem crescendo devido à industrialização, que teve o seu processo alavancado em torno das décadas de 40 e 50 (BRUNING *et al.* 2012). No Brasil, por exemplo, a indústria farmacêutica obtém um apreciável lucro com a venda de produtos derivados de vegetais e a tendência desse número é crescer ainda mais (FERREIRA *et al.* 2014).

Devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos em uso, as plantas medicinais têm sido intensamente estudadas como agentes alternativos para prevenção de doenças e tratamento de infecções em seres humanos, e com o

passar dos anos, inúmeras pesquisas foram realizadas mostrando a eficiência e a confiabilidade das plantas (BADKE *et al.* 2011; FEITOSA *et al.* 2011).

O uso inapropriado de medicamentos antibióticos compromete o tratamento do indivíduo devido ao fator de resistência ocasionada por disfunções fisiológicas (MONROE & POLK, 2000), sendo necessária a busca de novas alternativas de inibição do crescimento de infecções causadas por patógenos multirresistentes (CAREY *et al.* 2007). O controle de determinadas patologias é realizado através da administração de fármacos sintetizados em laboratórios, sendo assim, de extrema importância estudos que buscam um agente antimicrobiano ideal, com alto potencial de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Com o crescimento desordenado de bactérias antibiótico-resistentes, os olhares se voltaram para a tentativa da potencialização através de extratos naturais, conhecidos também como terapias complementares (GENTIL *et al.*, 2010). Existe um número muito grande de espécies vegetais consideradas medicinais (LIMA *et al.*, 2006), e dentre tantas, o alho (*Allium sativum* L.) é uma delas. Conforme Almeida *et al.* (2013), o alho é uma das espécies da flora medicinal amplamente estudada devido as suas atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiprotozoária, podendo-se destacar um amplo espectro antibacteriano do mesmo em uma variedade de “cepas” gram-positivas e gram-negativas patogênicas. Segundo Deresse (2010), a alicina, principal fitoquímico presente no alho, possui atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus*, altamente resistente a tratamentos antibióticos, encontrada principalmente em ambiente hospitalar.

Como exemplo de micro-organismos multirresistentes pode-se citar a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* encontrada na pele e fossas nasais e a gram-negativa *Escherichia coli*, geralmente encontrada no trato intestinal. O *S. aureus* é um micro-organismo procarionte pertencente ao grupo dos cocos, esférica, aeróbia ou anaeróbia facultativa, comumente encontrada na microbiota humana, já que são bactérias mesófilas (LEITE, 2008). Já a *E. coli* é uma bactéria bacilar, medindo cerca de 1,1 a 1,5 μm , também encontrada na microbiota humana e de aves, principalmente na microbiota intestinal (GAHERWAL *et al.*, 2014).

Dentre os inúmeros antibióticos existentes, pode-se destacar o Cloranfenicol, que atua na parede celular e tem amplo espectro de ação. Em menor escala pode inibir a atividade da peptidil-transferase, pois, o RNA ribossômico bacteriano 50s assemelha-se bastante com o RNA ribossômico 60s das células eucarióticas. O antimicrobiano Cloranfenicol penetra na bactéria por difusão facilitada, atua ao nível da subunidade 50s do ribossomo de forma reversível (BAPTISTA, 2013) e inibe o movimento ribossômico ao longo do mRNA (GUIMARÃES *et al.* 2010).

Assim, considerando as propriedades antibacterianas do *A. sativum*, o presente estudo tem como propósito analisar a influência da atividade do extrato aquoso de alho frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção do extrato aquoso de *A. sativum*

Primeiramente, 150g de bulbilhos de alho foram pesados em uma balança semi-analítica e, em seguida, foram descascados, lavados em água corrente e triturados com o auxílio de um processador. Os bulbilhos triturados foram transferidos para um béquer e foram adicionados 150 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada, filtrada em um funil de vidro com algodão e armazenada em um tubo Falcon de 50 mL. A solução foi mantida ao abrigo da luz, a 4°C, até o momento de uso.

2.2 Inoculação do extrato nas culturas de bactérias

Com o auxílio de alça bacteriológica, quatro colônias das cepas de *E. coli* (ATCC 11775) e *S. aureus* (ATCC 12600) foram inoculadas em 4 mL de solução fisiológica a 0,9%, comparando o inóculo com a escala 1,0 de McFarland (3x10⁸ UFC/mL). Com o uso de um swab, cada suspensão bacteriana foi semeada em duas placas contendo meio ágar Mueller Hinton, uma para o controle positivo e outra para o controle negativo.

Com uma pinça estéril, um disco de antibiótico Cloranfenicol foi depositado no centro superior da placa, sendo levemente pressionado para que ficasse bem aderido ao meio. Após, foram depositados dois discos de papel filtro nas extremidades laterais da placa. Esta etapa foi realizada apenas nas placas de controle positivo.

Com uma micropipeta, foram coletados 20 µL do extrato da planta e este foi aplicado em cada disco de papel filtro. As placas foram incubadas em estufa, a 36°C, por 24 horas. Após, o tamanho dos halos formados foi medido com o auxílio de um paquímetro e a média aritmética dos halos obtidos foi calculada.

3 | RESULTADOS

Após 24 horas, constatou-se que houve crescimento bacteriano em massa em ambos os controles bacterianos, conforme Figura 1. No que se refere ao antibiótico Cloranfenicol, utilizado como controle positivo deste experimento, para a bactéria *E. coli* (ATCC 11775) o halo de inibição foi de 30,32 mm, sendo esta, segundo dados da tabela padrão para interpretação de halos de inibição considerada sensível. Já para a bactéria *S. aureus* (ATCC 12600), o Cloranfenicol desenvolveu um halo de 23,55 mm, também sendo classificada como sensível.

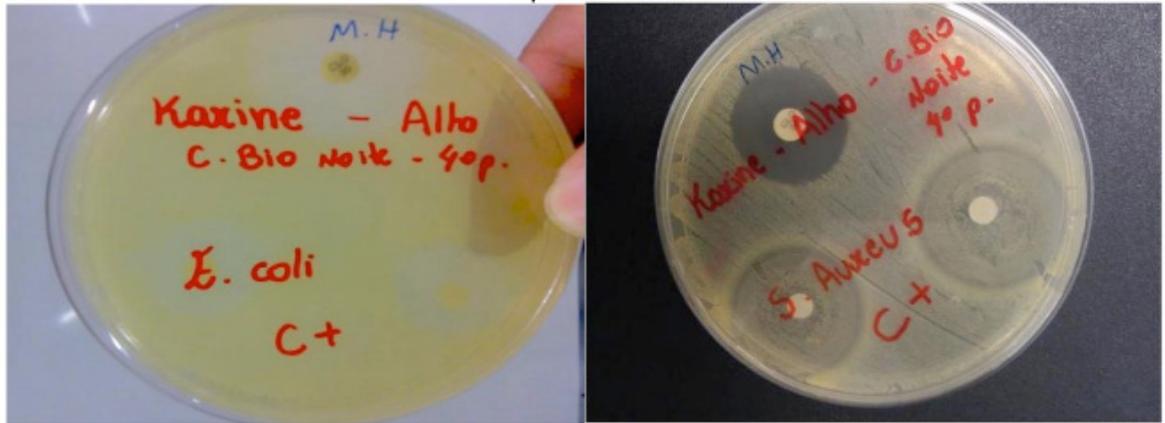


Figura 1 – Crescimento das bactérias e halos de inibição obtidos pelo extrato do alho e cloranfenicol para *E.coli* e *S. aureus*

Fonte: Arquivo pessoal, 2016

Já os resultados obtidos para o extrato aquoso de alho na bactéria *E. Coli* demonstram que seu 1º halo apresentou 18,70 mm e o 2º, 18,50 mm (média de 18,60 mm), sugerindo assim uma atividade antimicrobiana.

Para *S. aureus*, o 1º halo de inibição apresentou 27,31 mm e o 2º 27,40 (média de 27,35 mm), demonstrando também efeito antimicrobiano, porém maior do que o ocorrido na bactéria *E. coli* (Tabela 1).

Bactéria	Extrato halo direito	Extrato Halo esquerdo	Média extrato
<i>S. aureus</i>	27,31	27,40	27,35
<i>E. coli</i>	18,70	18,50	18,60

TABELA 1. Medida dos halos de inibição (em mm) formados pelo extrato vegetal

Fonte: Arquivo pessoal, 2015.

4 | DISCUSSÃO

O Cloranfenicol é um antibiótico antigo de amplo espectro que atua na inibição da síntese proteica bacteriana. Apesar de sua larga utilização, suas aplicações médicas e veterinárias são repletas de prós e contras e um dos motivos para tal fato, é a resistência bacteriana frequentemente relatada (DINOS *et al.*, 2016). Diante disso, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos ou medidas alternativas de tratamento para os diversos patógenos.

O alho tem sido utilizado como tratamento de diversas doenças desde a antiguidade e estudos mais recentes encontraram resultados satisfatórios de sua ação frente a bactérias, fungos, vírus, protozoários e, até mesmo, helmintos (ALLI *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2011; MANTAWY, ALI & RIZK, 2011; SHOJAI *et al.*, 2016; KRSTIN *et al.*, 2018). Os resultados obtidos no presente trabalho trazem evidências

de que o alho apresenta efeito inibitório sob o desenvolvimento microbiano, o que sugere que o alho pode ser considerado uma alternativa para o tratamento de infecções bacterianas.

Grosso e Lima (2013), desenvolveram estudos acerca do extrato hidroalcoólico de *A. sativum* em ambas as culturas bacterianas. Em relação à *S. aureus*, o extrato inibiu o crescimento bacteriano nas concentrações de 40 mg/ml, 1,25 mg/ml e 10 mg/ml. Em relação a *E. coli*, o extrato nas concentrações de 40mg/ml, 20 mg/ml, 1,25 mg/ml e 0,625 mg/ml, apresentou inibição do crescimento bacteriano em quantidades significativas. Abubakar (2009) constatou que o efeito antimicrobiano do extrato aquoso é maior do que extratos orgânicos, como o óleo essencial por exemplo. Foi avaliada a inibição do crescimento bacteriano em quatro espécies de bactérias, sendo *S. aureus* a mais sensível ao extrato, seguida por *S. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os resultados obtidos por Abiy e Berhe (2016) corroboram com o presente estudo, já que ficou evidenciado que *S. aureus* é mais sensível ao extrato de *A. sativum* do que *E. coli*. Isso pode ser devido à bicamada lipídica presente nas bactérias gram-negativas, que apresenta pouca permeabilidade para solutos hidrofílicos (NIKAIDO, 2003). A explicação que reforça esse resultado é a maior efetividade do extrato alcoólico se comparado ao extrato bruto no cultivo de *E. coli* (GAHERWAL et al., 2014).

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir destes estudos, sugere-se que o extrato aquoso de *A. sativum* possui efeito antibacteriano, por apresentar halos de inibição para as duas bactérias, e assim, uma possível solução para se evitar o uso excessivo de antibióticos que aumentam a resistência aos antimicrobianos.

Desta forma, se faz necessário a continuação de estudos que ampliem o conhecimento sobre o assunto, e o aperfeiçoamento de novas metodologias sobre o uso de plantas com potencial para inibição de micro-organismos considerados patogênicos a saúde humana.

REFERÊNCIAS

ABIY, E., BERHE, A. Anti-Bacterial Effect of Garlic (*Allium sativum*) against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from Patients Attending Hawassa Referral Hospital, Ethiopia. **Journal of Infectious Diseases and Treatment**, v. 2, n. 2, 2016.

ABUBAKAR M.E. Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Plant Res**. 2009;3(4):179-85.

ALLI, J. A., BOBOYE, B. E., OKONKO, I. O., KOLADE, A. F., NWANZE, J. C. In-vitro assessments

of the effects of garlic (*Allium sativum*) extract on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Appl. Sci. Res**, v. 2, n. 4, p. 25-36, 2011.

ALMEIDA, G.D., GODOI, E.P., SANTOS, C.E., LIMA, L.R.P., OLIVEIRA, M.E. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v.34, ed.4, p.487-492, Viçosa, Minas Gerais, 2013.

ARAÚJO, A.A. **Medicina rústica**, ed. 3, São Paulo: Brasiliense; 1979.

BAPTISTA, M.G.F.M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 2013.

BRUNING, M.C.R., MOSEGUI, G.B.G., VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades de saúde pública nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, n.17, ed.10, p.2675-2685, Paraná, 2012.

CAREY, R.B., et.al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in The United States. **JAMA**. n.298, v.15, p.1763-71, 2007.

DERESSE, D. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study. **Assian Journal of Medical Sciences**. Awassa Ethiopia, v. 2, n. 2, p. 62-65, mar. 2010.

DINOS, G., ATHANASSOPOULOS, C., MISSIRI, D., GIANNOPOULOU, P., VLACHOGIANNIS, I., PAPAPOPOULOS, G., PAPAIOANNOU, D., KALPAXIS, D. Chloramphenicol derivatives as antibacterial and anticancer agents: historic problems and current solutions. **Antibiotics**, v. 5, n. 2, p. 20, 2016.

FEITOSA, C.M., FREITAS, RM., LUZ, N.N,N., BEZERRA, M.Z.B., TREVISAN M.T.S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.3, p.783-9, 2011.

FERREIRA, T.S., MOREIRA, C.Z., CÁRIA, N. Z., VICTORIANO, G., SILVA Jr, W.F., MAGALHÃES, J.C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.290-298, Campinas, 2014.

GAHERWAL, S., JOHAR, F., WAST, N., PRAKASH, M. M. Anti-bacterial activities of *Allium sativum* against *Escherichia coli*, *Salmonella Ser. Typhi* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 1, p. 19-22, 2014.

GENTIL, L.B., ROBLES, A.C.C., GROSSEMAN, S. **Uso de terapias complementares por mães em seus filhos: estudo em um hospital universitário**. Revista de Ciência & Saúde Coletiva, p.1293-1299, 2010.

GROSSO, E. S. B., LIMA, A. P. L. Efeito antimicrobiano do alho (*Allium sativum*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um Hospital escola do sul de Minas. 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica. **Anais do Conic- Semesp**. Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. v.1, 2013.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

KRSTIN, S., SOBEH, M., BRAUN, M., WINK, M. Anti-parasitic activities of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania tarentolae*. **Medicines**, v. 5, n. 2, p. 37, 2018.

LEITE, G.B. Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília. **Universidade de Brasília**. p.20-23, Brasília, 2008.

LIMA, C. M. B. L., FREITAS, F. I. D. S., MORAIS, L. C. S. L. D., CAVALCANTI, M. G. D. S., SILVA, L. F. D., PADILHA, R. J. R., BARBOSA, C.G.S., SANTOS, F.A.B., ALVES, L.C., DINIZ, M. D. F. F. M. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to allicin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 327-330, 2011.

LIMA, M.R.F., EULÁLIA C.P., AZEVEDO, X., LUNA, S.J., GOULART, A.E. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n.3, p.300-6, 2006.

MANTAWY, M. M., ALI, H. F., RIZK, M. Z. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. **Revista do instituto de medicina tropical de são paulo**, v. 53, n. 3, p. 155-163, 2011.

MONROE S, POLK R. Antimicrobial use and bacterial resistance. **Curr Opin Microbiol**. 2000;3(5):496-501.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C., SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-56, 2000.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

REZENDE, H.A., COCCO, M.I.M. A Utilização de Fitoterapia no Cotidiano de uma População Rural. **Revista da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2002.

SHOJAI, T. M., LANGEROUDI, A. G., KARIMI, V., BARIN, A., SADRI, N. The effect of *Allium sativum* (Garlic) extract on infectious bronchitis virus in specific pathogen free embryonic egg. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 458, 2016.

CAPÍTULO 3

CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM A CEPA 66985 DO VÍRUS DA DENGUE PELA VIA INTRAVENOSA EXIBE DANO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Natália Gedeão Salomão

Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório
Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
Rio de Janeiro - RJ

Kíssila Rabelo

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
– Departamento de Histologia e Embriologia -
Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual
Rio de Janeiro - RJ

Tiago Fajardo Póvoa

Instituto de Criminalística
Tocantins - TO

Ada Maria de Barcelos Alves

Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório de
Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais
Rio de Janeiro - RJ

Simone Moraes da Costa

Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório de
Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais
Rio de Janeiro - RJ

Antonio José da Silva Gonçalves

Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório
Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
Rio de Janeiro - RJ

Juliana Fernandes Amorim da Silva

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos –
Laboratório de Tecnologia Viroológica
Rio de Janeiro – RJ

Adriana de Souza Azevedo

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos –
Laboratório de Tecnologia Viroológica

Rio de Janeiro – RJ

Priscilla Conrado Guerra Nunes

Instituto Oswaldo Cruz – Laboratório de
Imunologia Viral
Rio de Janeiro - RJ

Carlos Alberto Basílio-de-Oliveira

Hospital Gaffrée e Guinle – Departamento de
Anatomia Patológica
Rio de Janeiro – RJ

Rodrigo Panno Basílio-de-Oliveira

Hospital Gaffrée e Guinle – Anatomia Patológica
Rio de Janeiro – RJ

Luiz Henrique Medeiros Geraldo

Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade
Federal do Rio de Janeiro - Laboratório de
Biologia das Células Gliais
Rio de Janeiro - RJ

Celina Garcia Fonseca

Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade
Federal do Rio de Janeiro - Laboratório de
Biologia das Células Gliais
Rio de Janeiro - RJ

Flávia Regina Souza Lima

Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade
Federal do Rio de Janeiro - Laboratório de
Biologia das Células Gliais
Rio de Janeiro - RJ

Ronaldo Mohana-Borges

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho -
Universidade Federal do Rio de
Janeiro - Laboratório de Genômica Estrutural
Rio de Janeiro - RJ

Emiliana Mandarano Silva

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Laboratório de Genômica Estrutural
Rio de Janeiro - RJ

Flávia Barreto dos Santos

Instituto Oswaldo Cruz – Laboratório de Imunologia Viral
Rio de Janeiro - RJ

Edson Roberto Alves Oliveira

Instituto de Química Orgânica - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Laboratório de Modelagem Molecular
Rio de Janeiro - RJ

Marciano Viana Paes

Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
Rio de Janeiro - RJ

RESUMO: A dengue é uma doença arboviral leve, semelhante à gripe, causada pelo vírus da dengue (DENV), que ocorre em países tropicais e subtropicais. Um número crescente de relatos vem indicando que a dengue também está associada a manifestações neurológicas, contudo, pouco se conhece sobre a neuropatogênese da doença. Aqui, usando um modelo experimental em que camundongos BALB/ c são infectados por via intravenosa com o vírus, demonstramos que o DENV é capaz de invadir e causar danos ao sistema nervoso central (SNC) do hospedeiro. Cérebro e cerebelo de animais infectados revelaram alterações histológicas como a presença de infiltrados inflamatórios, espessamento da pia-mater e desorganização da substância branca. Além disso, também foi observado que a infecção leva à alteração de morfologia das células neurogliais e morte celular por apoptose. Tais observações destacaram possíveis alterações que o DENV pode promover no SNC do hospedeiro durante uma infecção natural, ajudando a entender melhor o componente neuropatológico da doença.

PALAVRAS-CHAVE: dengue, sistema nervoso central; modelo murino.

BALB/C MICE INFECTED WITH DENV-2 STRAIN 66985 BY THE INTRAVENOUS ROUTE DISPLAY INJURY IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

ABSTRACT: Dengue is a mild flu-like arboviral illness caused by dengue virus (DENV) that occurs in tropical and subtropical countries. An increasing number of reports have been indicating that dengue is also associated to neurological manifestations, however, little is known regarding the neuropathogenesis of the disease. Here, using an experimental model in which BALB/c mice are intravenously infected with the virus, we demonstrated that DENV is capable of invading and damaging the host's central nervous system (CNS). Brain and cerebellum of infected animals revealed histological

alterations such as the presence of inflammatory infiltrates, thickening of pia matter and disorganization of white matter. Additionally, it was also seen that infection lead to altered morphology of neuroglial cells and apoptotic cell death. Such observations highlighted possible alterations that DENV may promote in the host's CNS during a natural infection, hence, helping us to better understand the neuropathological component of the disease.

KEYWORDS: dengue; central nervous system; mice model

1 | INTRODUCTION

Dengue is a mosquito-borne disease that represents a major health problem especially in tropical and subtropical regions worldwide. The disease is caused by dengue virus (DENV), which comprises four antigenically different serotypes (DENV-1 to DENV-4) belonging to the *Flaviviridae* family. Dengue burden has been expanding since 1960s as it grew side by side with the world's population. Nowadays, around 390 million people are infected every year, of which about 25% are of clinical relevance¹. Symptoms of dengue are usually similar to the regular flu, however, a small fraction of cases may evolve to a severe hemorrhagic form that is eventually responsible for about 20,000 deaths in an annual basis^{2,3}.

An intriguing fact that has drawn attention in dengue is the involvement of the host's central nervous system (CNS) in the course of infection. CNS-related symptoms of dengue were first reported as an acute encephalopathy in 1976⁴ and, classically, these manifestations have been treated as rare phenomena in humans^{5,6}. Back in 1998, Ramos and coworkers suggested that DENV neurotropism was based on opportunism⁷. However, a growing number of reports showing the presence of the virus in the host's CNS⁸⁻¹² supported the idea that the neurotropic property would be an intrinsic characteristic of the virus. After being vastly reported in 25 countries spread across different continents¹³⁻²², neurological signs in dengue were grouped into 3 sub-classifications: (i) encephalopathy; (ii) neuromuscular complications; and (iii) neuro-ophthalmic involvements. The incidence rate of such symptoms varied from 0.5 to 20% among patients admitted to hospitals²³. Additionally, neurological signs of subjective nature and of difficult characterization, such as restlessness, irritability, dizziness, drowsiness and stupor, were also associated to the disease²⁴. Considering the increased frequency of CNS-related symptoms in patients with dengue, neurological manifestations were officially recognized by the World Health Organization (WHO) and listed as part of the differential diagnosis for severe dengue in 2009²⁵. Despite this official recognizance, information regarding the neuropathological basis of the disease is still scarce and demanding of research.

In an attempt to describe the impact of DENV infection in the host's CNS, we used a dengue mouse model in which BALB/c mice were infected with patient-isolated DENV-2 by the intravenous (i.v.) route. Despite the absence of apparent symptoms, mice responded to the infection with antigen presenting cell (APC) induction and TCD8 cell

activation. Histological analyses of the infected animals' brain and cerebellum revealed pathological alterations such as presence of inflammatory infiltrates, thickening of pia matter and disorganization of white matter in the brain; and altered Purkinje neurons, hemorrhage and demyelination in the cerebellum. Analysis of microglia (IBA-1⁺) and astrocytes (GFAP⁺) in the brain showed that these subpopulations were morphologically altered in infected mice. Electron microscopy analyses of brain and cerebellum from DENV-infected mice revealed cellular impairments that suggested apoptotic induction. We also found that DENV was able to reach the host's CNS upon i.v. inoculation, as detected by DENV-NS3 staining, supporting the natural neurotropic behavior of the virus and suggesting that the observed effects were due to direct viral infection in the CNS. Such findings highlighted possible brain alterations that could yield CNS-related symptoms in dengue and helped us to better understand the neuropathological component of the disease.

2 | RESULTS

DENV infection in BALB/c mice induces TCD8-mediated cellular immunity.

In the animal model considered here, BALB/c mice were infected with patient-isolated DENV-2 by the intravenous (i.v.) route. It was previously demonstrated that although the infection is not capable of producing symptoms, it can induce hepatic injury in the subjects and virus can be detected in different cell types such as hepatocytes, Kupffer cells and endothelium²⁶. Given the influence that the cellular immunity may have towards the neurological involvement in dengue^{17,19,27}, our initial step here was to address the immunological status of these mice upon the i.v. infection.

Spleen and blood samples of infected animals were evaluated by flow cytometry two and seven days post infection (d.p.i.). When analyzing the spleen of infected mice, we observed relevant increments in the percentages of CD86⁺CD11c⁺ cells (which we considered as the antigen presenting cell subset - APC) on the 2nd and on the 7th d.p.i., in comparison to controls. Of note, on the 7th d.p.i. the percentage of CD86⁺CD11c⁺ cells reached approximately 2 times higher than the observed in the mock-infected group (Fig1a). This finding suggested that the i.v. infection induced activation and migration of APCs to the lymphoid organ in order to trigger specific immunity. Under this line of thinking, we next checked the levels of activated lymphocytes present in the circulation of the infected mice. Flow cytometry data revealed that on the 7th d.p.i. the percentage of CD8⁺CD45RB^{low} (considered as the activated TCD8 cells) consistently increased when compared to mock or to the 2nd d.p.i. groups (Fig1b). No statistically relevant variations were seen in the percentages of circulating CD4⁺CD45RB^{low} cells considering all the analyzed groups. These data indicated that, upon infection, the animals were able to trigger specific immunity to DENV-2 with the

activation of TCD8 lymphocytes.

BALB/c mice present damage in the CNS after DENV infection by the i.v route

In the previous evaluation, the occurrence of activated lymphocytes in the circulation of infected mice draw our attention for a possible targeting of T-cell migration to host's tissues. To address the involvement of infection and a possible impact of the cellular immunity in the CNS we proceeded with histological studies considering the brain and the cerebellum tissues. Four major areas were taken into account for investigation: (i) the cerebral cortex, which comprises the sensory and motor areas of the brain; (ii) the hippocampus, which consists of an internal area of the brain related to memory; (iii) the cerebral white matter, a region of myelinated nerve fibers that is critical for the axonal signaling and flux; and (iv) the cerebellum, a structure that plays a crucial role in motor control²⁸. Considering the samples from infected mice, histopathological analyses showed damage in the brain and cerebellum tissues. On the 2nd d.p.i., the cerebral cortex showed thickening of the pia mater with an increased cellularity (Fig2b) and focal perivascular inflammatory infiltrate consisting mainly of lymphocytes and glial cells (Fig2c). On the 7th d.p.i., the inflammatory infiltrates were more diffuse by the parenchyma with predominance of microglial cells (Fig2d). As expected, brain of non-infected mice showed pia mater, molecular layer, granular layer, pyramidal neurons layer and white matter with regular structures (Fig2a). When analyzing the white matter from infected mice we found that this region was structurally disorganized. On the 2nd d.p.i. this area was marked by microglial cell infiltrates within the parenchyma (Fig2f), while later on the 7th d.p.i. the cell infiltrates were more characterized around blood vessels (Fig2g). Regarding the hippocampus area, while non-infected mice exhibited regular structures (Fig2h and i), infected animals showed presence of neuroglial cells infiltrates within this region. In this case, on the 2nd d.p.i. infiltrates were seen in the CA1 (Cornu Ammonis 1) region (Fig2j), while on the 7th d.p.i. this manifestation occurred mainly in the CA3 (Cornu Ammonis 3) (Fig2k). Analyses of the cerebellum tissue collected from infected animals revealed inflammatory infiltrates in the pia mater. Purkinje neurons were also characterized by altered morphology on the 2nd d.p.i. (Fig2m). On the 7th d.p.i., it was observed an extensive area of demyelination with presence of microglial cells in the white matter (Fig2n) and circulatory damage such as hemorrhage in the cerebellar parenchyma (Fig2o). Control mice showed cerebellum structures with regular aspects (Fig2l).

Infected animals reveal morphological alterations of microglial cells and astrocytes

After characterizing tissue alterations in the brain and cerebellum of DENV-infected animals, we considered investigating the brain cellular components responsible for tissue homeostasis. For this, we analyzed in more detail the neuroglial cells, in particular microglial cells and astrocytes, since they are known to play critical roles in maintaining CNS' homeostasis, supporting and protecting neurons from injury^{29,30}. In samples collected from non-infected mice, microglial cells (IBA-1+ cells) were detected in the cortex and white matter. This cell population was found exhibiting scarce cytoplasm, long/thin extensions (Fig3a) and assuming a ramified morphology, which is known to be typical of their surveillant and homeostatic state. In the samples from infected animals, these cells were characterized by ameboid morphology with retracted extensions and increased cytoplasm located in the cortex (Fig3b) as well as in the white matter close to the capillaries (Fig3c). This morphological characterization, which is typical from their activated state, was observed mainly on the 2nd d.p.i. Based on morphology, later at the 7th d.p.i. these cells seemed to return to their regular activity/processes (as seen by their ramified appearance) both in the cortex (Fig3d) and in the white matter (Fig3e). Astrocytes (GFAP+ cells) in non-infected mice showed thin appearance in the cortex (Fig3f) and in the white matter (Fig3g). In the samples from infected mice, GFAP+ cells were found under a degenerative process with atrophy of their cytoplasmic extensions on the 2nd d.p.i. (Fig3h). On the 7th d.p.i., astrocytes assumed large and thick shapes with thicker cytoplasmic extensions either in the cerebral cortex or in the white matter (Fig3i and j). In order to identify whether the CNS was committed by reactive microgliosis or astrogliosis, we proceeded with the quantification of both IBA-1+ and GFAP+ cells within the cerebral cortex and white matter. As shown in the Fig3panels k and l, both cell types statistically increased in number on the 7th d.p.i., when compared to controls. This finding confirmed the occurrence of reactive microgliosis and astrogliosis upon infection with DENV by the i.v. route.

Ultrastructural aspects of brain and cerebellum from DENV-infected mice

To obtain a better description of the cellular changes in the CNS originated upon infection with DENV, ultrastructural evaluations were performed using electron microscopy. Brain and cerebellum tissues from infected mice showed degenerated pyramidal and Purkinje neurons with irregular nuclear membrane and mitochondria swelling (Fig4b and Fig5b). In the same analyzed sites, microglial cells exhibited

increased nucleus and loss of integrity of mitochondrial ridges (Fig4d and Fig5d). Brain astrocytes showed a deposition of heterochromatin in a cell pole (Fig4f). In the cerebellum, there was disorganization of the myelin fiber pattern suggesting a process of demyelinating neuropathy (Fig5f), which corroborated with the findings from the histopathological analyses. Samples collected from control mice exhibited regular structures of pyramidal and Purkinje neurons (Fig4a and Fig5a), microglial cells (Fig4c and Fig5c), astrocytes (Fig4e) and myelin fibers (Fig5e).

Viral detection in the SNC of DENV-infected mice

To address the viral presence and its ongoing replicative process in the CNS we performed immunostaining of DENV-NS3 protein, since this viral antigen is only expressed upon viral replication. DENV-NS3 protein was found in endothelial cells of the cerebral cortex and hippocampus (Fig6b and f), microglial cells of the hippocampus and cerebellum (Fig6e and j) and in Purkinje neurons on the 2nd d.p.i. (Fig6i). On the 7th d.p.i., DENV-NS3 was present in microglial cells of the cerebral cortex (Fig6c), granular cells of the hippocampus (Fig6g), neurons and endothelial cells in the cerebellum (Fig6k and l).

3 | DISCUSSION

In this work, using a dengue mouse model in which BALB/c animals were inoculated with DENV-2 by the i.v. route, we characterized several alterations in the CNS of infected mice which could be correlated with the neurological component of the disease. We identified that brain and cerebellum tissues extracted from DENV-infected animals presented cellular damage, tissue disorganization, morphological alterations of microglia and astrocytes (cells that provide support and homeostatic balance to neurons) and ultrastructural cellular impairments that suggested apoptotic induction. We also found that DENV was able to reach the brain and cerebellum tissues of mice upon i.v. inoculation, an observation that supported the natural neurotropic behavior of the virus.

Although the infected animals presented these CNS alterations, an intriguing observation that must be taken into account is that the animals were not phenotypically influenced by the infection until the 7th d.p.i. We consider that the absence of clinical effects in infected mice, such as altered motor coordination for example, did not exclude the possibility of other existing effects affecting the CNS. A study that corroborates with this line of thinking is from Huy and colleagues that by means of a meta-analytical study identified that clinical manifestations, such as, restlessness, irritability, dizziness, drowsiness and stupor have been associated to the disease²⁴. Given the empirical nature in assessing these clinical parameters in

animal models, it becomes difficult to categorically affirm whether infected mice are experiencing neurological symptoms at this peculiar level or not. Another fact that may have contributed to the absence of apparent CNS-related effects in our model is that immunocompetent animals are naturally resistant to DENV infection. It was seen that DENV is not able to subvert the IFN- α/β antiviral response in mice^{31–33} as it happens in humans^{34–42}. Despite this resistance, immunocompetent mice can still be infected as evidenced in other mouse models of dengue^{26,43–46}. However, these animal models do not reproduce the full specter of symptoms as characterized in humans. In our model, even considering this phenotypic peculiarity, we could observe signs of host response to the infection, such as APC induction and TCD8 cell activation. Additionally, by an unrecognized mechanism, viruses were able to cause blood-brain barrier dysfunction and infect brain and cerebellum cells. One hypothesis to explain this scenario is that the immune-privileged characteristic of the brain may be related to increased permissiveness of viral replication in this site. Among the tissue alterations found in the infected mice, we observed inflammatory infiltrates, thickening of pia matter, increased number of activated neuroglial cells and DENV-NS3 expression in brain and cerebellum cells. Such alterations were in accordance with the study from Amaral and coworkers, in which after infecting C57BL/6 mice intracerebrally with DENV-3, the following changes were observed: (i) increased leukocyte rolling and adhesion in brain microvasculature; (ii) tissue evidences of meningoencephalitis, such as perivascular hemorrhages and infiltration of mononuclear cells in brain and cerebellum; (iii) reactive gliosis; and (iv) immunoreactive cells for anti-NS3 in several brain areas⁴⁷. While these observations were essentially in congruence to our study, the phenotype of infected C57BL/6 mice diverged from our model. In Amaral and coworkers' model, animals showed symptoms of apathy, stereotyped behavior, seizures and died at the 8th d.p.i., suggesting the induction of an intense encephalitis by the viral infection. The effectiveness of this referred model in promoting such a drastic neurological manifestation may be involved with the following reasons: (i) infection was administered by the intracranial route that obviously resulted in a massive viral load in the host's CNS; (ii) animals were infected with DENV-3 genotype I and its level of virulence in comparison to the strain we used is unknown; and (iii) divergences of mouse strain susceptibility to DENV (C57BL/6 versus BALB/c) is also unknown. Based on the above reasons, we consider that the histological alterations found in our model resembles the scenario of encephalitis, however in a much more limited fashion that is not able to yield detectable motor alterations or death. Yet, this controlled and relatively slow process by which the virus invades the CNS, spread and promote the specific changes found in our model can provide us hints about how the neurological manifestations of dengue take place. Neurogliosis found in the brain of infected animals may represent a key finding in dengue neuropathogenesis. Due to morphological changes and increased cell numbers, it became clear that microglial cells (IBA-1⁺) and astrocytes (GFAP⁺) were involved in activation processes. Microglial

cells are the resident macrophages of the brain and are known to be susceptible to flavivirus infection⁴⁸. Once activated, microglial cells are thought to act as the first line of defense in the brain tissue as these cells promote antiviral responses to prevent the progression of encephalitis⁴⁹. In their non-activated physiological state, microglial cells display a ramified surface that is suitable for the constant surveillance of the local environment⁵⁰. On the other hand, in pathological conditions these cells become activated and proliferate, assuming an amoeboid form that is usually characterized as a spherical-shaped cell that carries several phagocytic vacuoles into its cytoplasm⁵¹. Activated microglia release many factors that contribute to inflammation and tissue repair^{52,53}, however, exacerbated reactions of these cells are implicated with massive production and release of IFN- γ , TNF- α and nitric oxide, which can be toxic to neurons. In fact, it represents a mechanistic arm that influences several CNS pathologies, such as multiple sclerosis^{54,55}, Alzheimer's disease⁵⁶ and Parkinson's disease⁵⁷. In our model, it is also likely that microglial cells can function as a "double-edged sword" either by acting protectively when promoting the initial antiviral response, or by mediating local damage or dysfunction in cases of signaling exacerbation. Reactive gliosis was also characterized in our model of infection by the presence of clusters of astrocytes (GFAP⁺ cells). Astrocytes are the most abundant cells in the CNS and act cooperatively with microglia to stimulate T-cell responses⁵⁸. Divergences in morphology, when we compared infected to non-infected samples, also suggested activation of this cell subpopulation upon DENV infection. However, in spite of limitations considering the used cell marker⁵⁹ and the controversial behavior typical of astrocytes in promoting/inhibiting inflammation⁶⁰, more investigation is needed to better characterize the contribution of these cells in the considered scenario. Other findings that were implicated with the establishment of neuropathological processes were resultant from the ultrastructural analyses. We observed that neurons, microglia and astrocytes in the brain/cerebellum areas of infected mice exhibited cellular alterations (mainly mitochondria swelling) that indicated processes of apoptotic cell death. The induction of apoptosis by DENV in susceptible cells is well reported in the literature⁶¹⁻⁶⁴. Particularly, mitochondria swelling in response to DENV was previously characterized under other circumstances such as in peripheral organs of dengue fatal cases⁶⁵ and in human hepatoma cell line (Hep-G2)⁶⁶. Similarly to other viral diseases, DENV proteins could also interact with mitochondria and somehow result in the modulation of apoptotic processes^{67,68}. Given the central role of the brain in receiving information from the body, interpreting and then guiding the body's response to it, the elimination of brain cells by apoptotic processes could be critical depending on the affected areas. As these target cells, neurons and neuroglial cells, are located within the cerebral cortex and white matter, respectively, it is reasonable to suggest that DENV infection could potentially impact the host's sensory and/or motor functions. An additional effect that could also potentially commit the motor functions is the demyelination found in the cerebellar tissue. Previous studies suggested that there

is a connection between the disruption of the myelin sheath and the activation of microglia⁶⁹, nonetheless, in dengue this phenomenon is still unknown.

In conclusion, we observed that DENV-2 isolated from the patient and subsequently administered by the i.v. route in mice was able to cause dysfunction in the blood-brain barrier and to replicate in endothelial cells of the brain. This occurred in association with tissue damage / disorganization of CNS structures, reactive gliosis and induction of apoptotic cell death. The current model of infection reaffirmed the neurotropic nature of DENV in mice and shed light into possible existing CNS changes that may justify neurological manifestations in dengue disease.

4 | METHODS

Virus

The virus used in our experiments was a DENV-2 strain originally isolated from patient serum during an outbreak in the state of Rio de Janeiro by 1990 and 1991⁷⁰. Viruses were propagated in *Aedes albopictus* mosquito cell line (C6/36) using L-15 medium (Sigma, USA) supplemented with 1% non-essential amino acids, 10% tryptose phosphate broth solution and 10% fetal bovine serum. Infected cells were cultured at 28 °C for 15 days. Viruses were isolated and identified by indirect immunofluorescence technique using 3H5 monoclonal antibody which is type-specific for DENV-2⁷⁰. Finally, the progeny viruses were titrated in C6/36 cells according to Reed and Muench method⁷¹.

Ethics in experimental procedures and mice infection

All experiments with mice were conducted in compliance with Ethical Principles in Animal Experimentation stated in the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Institute's Animal Use Ethical Committee (acceptance protocol P-12/11-3). Mice were grouped with n = 12.

Adult male BALB/c mice, 2 months old, received 20 μ l of DENV-2 at a concentration of 100 TCID₅₀ intravenously by the caudal vein. After 2 or 7 days after infection (d.p.i.), animals were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine⁷², sacrificed and then brain and cerebellum tissues were collected for further analysis (optical and electron microscopy). Brains and cerebellums used as controls (mock) were collected from mice that received cell culture (C6/36) supernatants only by the same route and sacrificed at the 7th d.p.i.

Flow cytometry

For flow cytometry analysis, leukocytes were isolated from blood and spleen. Spleens were dissociated in wire mesh screens using RPMI medium. Spleen macerates and total blood samples were treated with BD FACS Lysing for red blood cell lysis and fixation according to manufacturer's instructions (BD Biosciences, USA). Cells were spun down, washed and suspended in PBS/BSA 1%. Approximately 10^6 cells were stained on ice for 20 min in the dark with the following mab combinations: (i) CD11c-PE and CD86-FITC; or (ii) CD4-PE, CD8-PerCP and CD45RB-FITC. All mabs used in this work were obtained from BD Biosciences and background-staining controls were performed using isotypes recommended by the manufacturer. Samples were read in a BD Accuri C6 flow cytometer and analyzed offline with C6 software (BD Biosciences).

Histopathological analysis

Histological analyses were carried out based as previously described by Paes and colleagues²⁶. Briefly, fragments of brain and cerebellum collected from mice were fixed in 10% buffered formalin, cleaved into smaller fragments, dehydrated in ethanol, clarified in xylene and blocked in paraffin resin. In sequence, samples were sectioned in 5- μm thick units, deparaffinized in xylene and rehydrated with alcohol. Samples were stained with hematoxylin and eosin (H.E.) and visualized under a light microscopy (Olympus BX 53F, Japan). Digital images were rendered using Image Pro Plus software version 4.5.

Ultrastructural analysis

For electron microscopy, fragments of brain and cerebellum were post fixed with 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.2), dehydrated in acetone, post fixed with 1% buffered osmium tetroxide, embedded in EPON and polymerized at 60 oC for three days. Semi-thin sections (0.5 μm thick) were obtained using a diamond knife (Diatome, Switzerland) adapted to a Reichert-Jung Ultracut E microtome (Markham, Canada) and stained with methylene blue. Ultra-thin sections (60-90 nm) were contrasted with uranyl acetate⁷³ and lead citrate⁷⁴ and observed under a JEOL-JEM-1011 transmission electron microscope.

Immunohistochemistry

Staining protocol

For immunohistochemical studies, the paraffin-embedded tissues were cut (5 μm thick), incubated at 60 °C for one hour, deparaffinized in xylene and rehydrated with alcohol. Antigen retrieval was performed by heating the tissue in the presence of citrate buffer. Next, tissues were blocked for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxidase in methanol for 10 minutes and rinsed in tris-HCl (pH 7.4). To reduce non-specific binding, sections were incubated in Protein Blocker solution (Spring Bioscience, USA) for 10 min at room temperature. Afterwards, samples were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: (i) anti-IBA1 antibody (1:200, Wako) to recognize microglia cells; or (ii) anti-GFAP antibody (1:300, Sigma) for astrocyte staining; or (iii) anti-NS3 antibody (diluted 1:100, to detect the DENV-infected cells). In the next day, sections were incubated with secondary complement (REVEAL complement - Spring Bioscience) for 10 minutes and with a rabbit anti-mouse IgG-HRP conjugate (REVEAL polyvalent HRP - Spring Bioscience) for 15 minutes at room temperature. Reactions were revealed with diaminobenzidine (Spring Bioscience) as a chromogen and then sections were counterstained with Meyer's hematoxylin (Dako). Finally, samples were analyzed under an Olympus BX 53 microscope and frames were acquired using a coupled Olympus DP72 camera.

Quantification of positive cells

For each specific staining (IBA-1 and GFAP) 50 images were randomly captured at 1000x magnification using Image Pro software version 4.5. Positive cells were quantified in each of the 50 images and the median of positive cell number was determined. All analyzes were accomplished in a blind test without prior knowledge of the studied groups. After quantification, frames exhibited in figures were selected as to be more informative according to specific areas in the analyzed tissues.

Immunofluorescence assay

The paraffin-embedded tissues were cut (5 μm thick), incubated at 60 °C for one hour, deparaffinized in xylene and rehydrated with alcohol. Antigen retrieval was performed by heating the tissue in the presence of citrate buffer. The sections were permeabilized for 10 minutes with 0.5% Triton X-100, and incubated for 30 minutes with 2% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal goat serum (NGS) for blocking, at room temperature. In sequence, slides were co-stained overnight

at 4 oC with anti-F4/80 (eBioscience) and anti-NS3⁶⁵ (in-house produced antibody) antibodies diluted at 1:200 and 1:100, respectively. Sections were washed in PBS and incubated with Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Thermo Scientific) or with Alexa 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific, USA). Samples were analyzed under a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope (Zeiss, Germany).

Statistical Analysis

Data obtained from the quantification of positive cells in the immunohistochemistry were analyzed with GraphPad prism software v5.1 (La Jolla, USA) using non-parametric statistical tests. Significant differences between analyzed groups (mock, 2nd d.p.i. and 7th d.p.i.) were determined using Mann-Whitney test with * $p < 0.05$.

Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian foundation FAPERJ for the financial support (grant number: E-26/110.511/2014) and Geraldo C. Wagner from Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) for the help with slides production. We also acknowledge the Laboratory of Flaviviruses, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, for kindly providing us the DENV-2 samples isolated from patient.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

M.V.P., E.R.A.O., and N.G.S. conceptualized the work; M.V.P., E.R.A.O. and N.G.S. performed the formal analyses; N.G.S., M.V.P. and E.R.A.O. participated directly in the investigation; N.G.S., K.R., M.V.P., T.F.P., E.R.A.O., A.M.B.A., S.M.C., A.J.S.G., J.F.A., A.S.A., P.C.G.N., C.A.B., R.P.B., C.G.F. and L.H.M.G. performed the experiments; M.V.P., R.M.B., E.M.S., C.A.B., R.P.B, F.B.S. and P.C.G.N. provided resources; N.G.S., M.V.P. and E.R.A.O. supervised the results; M.V.P. provided funding acquisition and administrated the project; N.G.S. and E.R.A.O. wrote the original draft of the paper; M.V.P., E.R.A.O., L.H.M.G., F.R.S.L., and K.R. reviewed and edited the paper.

REFERENCES

- Bhatt, S. *et al.* **The global distribution and burden of dengue.** *Nature* 496, 504–507, 2013.
- Katzelnick, L., Coloma, J. & Harris, E. **Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities.** *Lancet Infect Dis* 17, e88–e100, 2017.
- Gluber, D. **The economic burden of dengue.** *Am J Trop Med Hyg* 86, 743–744, 2012.
- Sanguanserm Sri, T., Poneprasert, B. & Phornphutkul, B. **Acute encephalopathy associated with dengue infection.** *SEAMEO TROP MED*, 10–11, 1976.
- Patey, O., Ollivaud, L., Breuil, J. & Lafaix, C. **Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection.** *Am J Trop Med Hyg* 48, 793–802, 1993.
- Puccioni-Sohler, M. *et al.* **Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response.** *Neurology* 73, 1413–1417, 2009.
- Ramos, C. *et al.* **Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever.** *J Neurovirol* 4, 465–468, 1998.
- Miagostovich, M. P. *et al.* **Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 595–599, 1997.
- Miagostovich, M. P. *et al.* **Retrospective study on dengue fatal cases.** *Clin Neuropathol* 16, 204–208, 1997.
- Angibaud, G., Luaute, J., Laille, M. & Gaultier, C. **Brain involvement in dengue fever.** *J Clin Neurosci* 8, 63–65, 2001.
- Araújo, F. *et al.* **Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay.** *J Virol Methods* 177, 128–131, 2011.
- Lima, D. M. *et al.* **A DNA vaccine candidate encoding the structural prM/e proteins elicits a strong immune response and protects mice against dengue-4 virus infection.** *Vaccine* 29, 831–838, 2011.
- Murthy, J. M. K. **Neurological complication of dengue infection.** *Neurol India* 58, 581, 2010.
- Mamdouh, K., Mroog, K., Hani, N. & Nabil, E. **Atypical dengue meningitis in makkah, saudi arabia with slow resolving, prominent migraine like headache, phobia, and arrhythmia.** *J Glob Infect Dis* 5, 183, 2012.
- Sahu, R. *et al.* **Neurologic complications in dengue virus infection: A prospective cohort study.** *Neurology* 83, 1601–1609, 2014.
- Saini, L. *et al.* **Dengue fever triggering hemiconvulsion hemiplegia epilepsy in a child.** *Neurol India* 65, 636, 2017.
- Solomon, T. *et al.* **Neurological manifestations of dengue infection.** *Lancet* 355, 1053–1059, 2000.
- Domingues, R. *et al.* **Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection.** *J Neurol Sci* (1-2), 36–40, 2008.

- Cam, B. *et al.* **Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever.** *Am J Trop Med Hyg* 65, 848–851, 2001.
- Pancharoen, C. & Thisyakorn, U. **Neurological manifestations in dengue patients.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32, 341–345, 2001.
- Thisyakorn, U. & Thisyakorn, C. **Dengue infection with unusual manifestations.** *J Med Assoc Thai* 77, 410–413, 1994.
- Thisyakorn, U., Thisyakorn, C., Limpitikul, W. & Nisalak, A. **Dengue infection with central nervous system manifestations.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30, 504–506, 1999.
- Carod-Artal, F. J., Wichmann, O., Farrar, J. & Gascoń, J. **Neurological complications of dengue virus infection.** *Lancet Neurol* 12, 906–919, 2013.
- Huy, N. *et al.* **Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis.** *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2412, 2013.
- WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - new edition.** *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland*, 2009.
- Paes, M. V. *et al.* **Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of balb/c mice.** *Lab Invest* 89, 1140–1151, 2009.
- Garcia-Rivera, E. J. & Rigau-Peńrez, J. G. **Dengue virus infection increases microglial cell migration.** *Lancet* 360, 261, 2002.
- Garman, R. H. **Histology of the central nervous system.** *Toxicol Pathol* 39, 22–35, 2011.
- Newman, E. A. **New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission.** *Trends Neurosci* 26, 536–542, 2003.
- Jessen, K. R. & Mirsky, R. **The origin and development of glial cells in peripheral nerves.** *Nat Rev Neurosci* 6, 671–682, 2005.
- Ashour, J. *et al.* **Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication.** *Cell Host Microbe* 8, 410–421, 2010.
- Aguirre, S. *et al.* **DENV inhibits type I IFN production in infected cells by leaving human STING.** *PLoS Pathog* 8, e1002934, 2012.
- Yu, C.-Y. *et al.* **Dengue virus targets the adaptor protein MIRA to subvert host innate immunity.** *PLoS Pathog* 8, e1002780, 2012.
- Diamond, M. S. & Harris, E. **Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism.** *Virology* 289, 297–311, 2001.
- Diamond, M. S. *et al.* **Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons.** *J Virol* 74, 4957–4966, 2000.
- Munoz-Jordan, J. L., Sanchez-Burgos, G. G., Laurent-Rolle, M. & Garcia-Sastre, A. **Inhibition of interferon signaling by dengue virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14333–14338, 2003.
- Jones, M. *et al.* **Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression.** *J Virol* 79, 5414–5420, 2005.

- Munoz-Jordan, J. L. *et al.* **Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4b protein of flaviviruses.** *J Virol* 79, 8004–8013, 2005.
- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P.-Y. & Garcia-Sastre, A. **NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation.** *J Virol* 83, 5408–5418, 2009.
- Mazzon, M., Jones, M., Davidson, A., Chain, B. & Jacobs, M. **Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation.** *J Infect Dis* 200, 1261–1270, 2009.
- Morrison, J., Aguirre, S. & Fernandez-Sesma, A. **Innate immunity evasion by dengue virus.** *Viruses* 4, 397–413, 2012.
- Morrison, J. *et al.* **Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling.** *PLoS Pathog* 9, e1003265, 2013.
- Chen, H.-C., Hofman, F. M., Kung, J. T., Lin, Y.-D. & Wu-Hsieh, B. A. **Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage.** *J Virol* 81, 5518–5526, 2007.
- Chen, H.-C. *et al.* **Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus.** *J Med Virol* 73, 419–431, 2004.
- Oliveira, E. *et al.* **Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route.** *Virology* 489, 95–107, 2016.
- Paes, M. *et al.* **Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus.** *Virology* 338, 236–246, 2005.
- Amaral, D. C. *et al.* **Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice.** *J Neuroinflammation* 8, 23, 2011.
- Thongtan, T. *et al.* **Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells.** *J Med Virol* 84, 615–623, 2012.
- Tsai, T. T. *et al.* **Microglia retard dengue virus-induced acute viral encephalitis.** *Sci Rep* 6, 27670, 2016.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. & Verkhratsky, A. **Physiology of microglia.** *Physiol Rev* 91, 461–553, 2011.
- Boche, D., Perry, V. H. & Nicoll, J. A. R. **Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 3–18, 2013.
- Mitchell-Robinson, M. A. *et al.* **Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair.** *Brain* 138, 1138–1159, 2015.
- Nayak, D., Roth, T. L. & McGavern, D. B. **Microglia development and function.** *Annu Rev Immunol* 32, 367–402, 2014.
- Giovannoni, G., Heales, S. J., Land, J. M. & Thompson, E. J. **The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis.** *Mult Scler* 4, 212–216, 1998.
- Hofman, F. M., Hinton, D. R., Johnson, K. & Merrill. **Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain.** *J Exp Med* 170, 607–612, 1989.

- Rogers, J., Lubner-Narod, J., Styren, S. D. & Civin, W. H. **Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 9, 339–349, 1988.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Akiyama, H. & McGeer, E. G. **Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process.** *Ann Neurol* 24, 574–576, 1988.
- Jensen, C. J., Massie, A. & Keyser, J. D. **Immune players in the CNS: The astrocyte.** *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 824–839, 2013.
- Sofroniew, M. V. **Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation.** *Trends Neurosci* 32, 638–647, 2009.
- Sofroniew, M. V. **Reactive astrocytes in neural repair and protection.** *Neuroscientist* 11, 400–407, 2005.
- Torrentes-Carvalho, A. *et al.* **Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1091–1099, 2009.
- Liu, Y., Liu, H., Zou, J., Zhang, B. & Yuan, Z. **Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the bcl-2-mediated PI3k/akt signaling pathway.** *Virology* 448, 15–25, 2014.
- Courageot, M. P., Catteau, A. & Despre's, P. **Mechanisms of dengue virus-induced cell death.** *Adv Virus Res* 60, 157–816, 2003.
- Castellanos, J. E., Neissa, J. I. & Camacho, S. J. **La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5y.** *Biomedica* 36, 156, 2016.
- Póvoa, T. F. *et al.* **The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication.** *PLoS ONE* 9, e83386, 2014.
- El-Bacha, T. *et al.* **Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus.** *Biochim Biophys Acta* 1772, 1158–1166, 2007.
- Everett, H. & McFadden, G. **Viruses and apoptosis: Meddling with mitochondria.** *Virology* 288, 1–7, 2001.
- Piccoli, C. *et al.* **Mitochondrial dysfunction in hepatitis c virus infection.** *Biochim Biophys Acta* 1757, 1429–1437, 2006.
- Chatterjee, D., Biswas, K., Nag, S., Ramachandra, S. G. & Sarma, J. D. **Microglia play a major role in direct viral-induced demyelination.** *Clin Dev Immunol* 2013, 1–12, 2013.
- Nogueira, R. M. *et al.* **Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes.** *Epidemiol Infect* 111, 163–170, 1993.
- Reed, L. J. & Muench, H. **A simple method of estimating fifty per cent endpoints.** *Am J Hyg* 27, 493–497, 1938.
- Erhardt, W., Hebestedt, A., Aschenbrenner, G., Pichotka, B. & Blumel, G. **A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone ketamine-xylazine carfentanyl-etomidate).** *Res Exp Med* 184, 159–169, 1984.
- Watson, M. L. **Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.** *J Biophys Biochem Cytol* 4, 475–478, 1958.

ADDITIONAL INFORMATION

The authors declare that they have no competing interests or other interests that might be perceived to influence the results and/or discussion reported in this article.

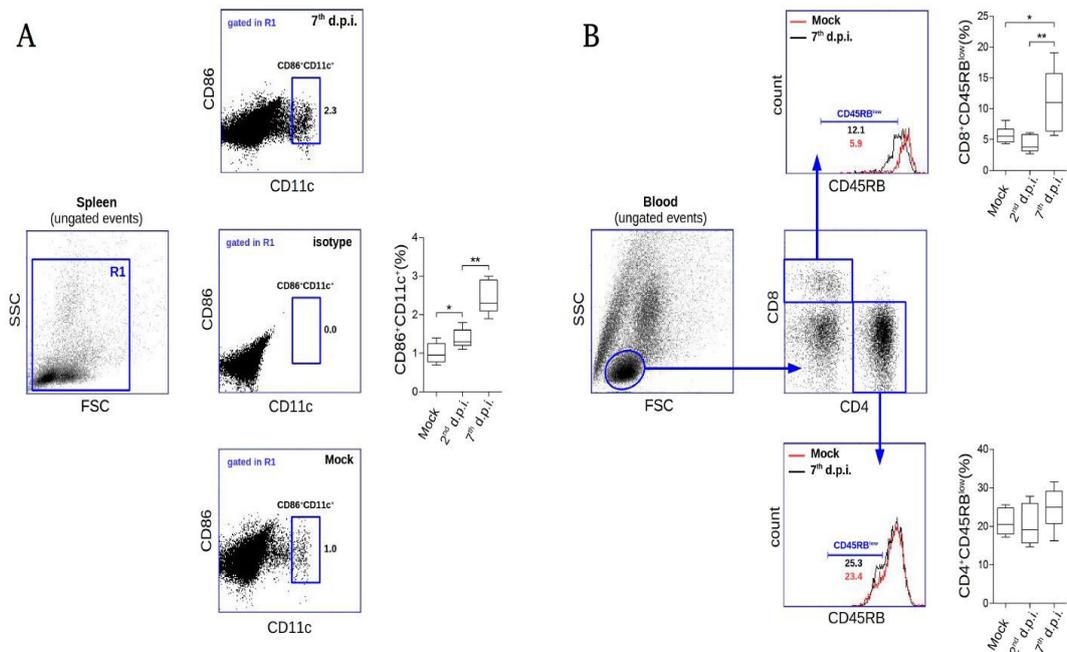


Figure 1. Flow cytometry analysis of spleen and blood samples from DENV-infected mice.

Groups of BALB/c mice ($n=6$ each), mock, 2nd and 7th days post infection (d.p.i.) were considered for flow cytometry evaluation using individual spleen and blood samples. **(A)** Isolated splenocytes were stained with anti-CD86-FITC and anti-CD11c-PE and read into a BD Accuri C6 flow cytometer. Only events clustered into the R1 region in the forward and side light scattering representation (FSC x SSC) were taken into account for this analysis (left). Based on the isotype control, a CD86⁺CD11c⁺ region (considered as the antigen presenting cell subset) was defined (center). Representative flow cytometry dotplots regarding mock and infected samples, as well as the quantitative analysis between groups are shown (bottom, top, and right, respectively). **(B)** Flow cytometry analysis showing leukocytes isolated from blood stained with anti-CD8-PerCP, anti-CD4-PE and anti-CD45RB-FITC. A region of lymphocytes in the FSC x SSC representation was defined (left) for subsequent specification of CD4⁺ and CD8⁺ regions (center). Expression of CD45RB was investigated within the CD4⁺ and CD8⁺ regions considering non-infected and infected groups (bottom and top, respectively). Statistical analyses are shown for each evaluation (top right and bottom right). Statistical differences were evaluated using Mann–Whitney test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$).

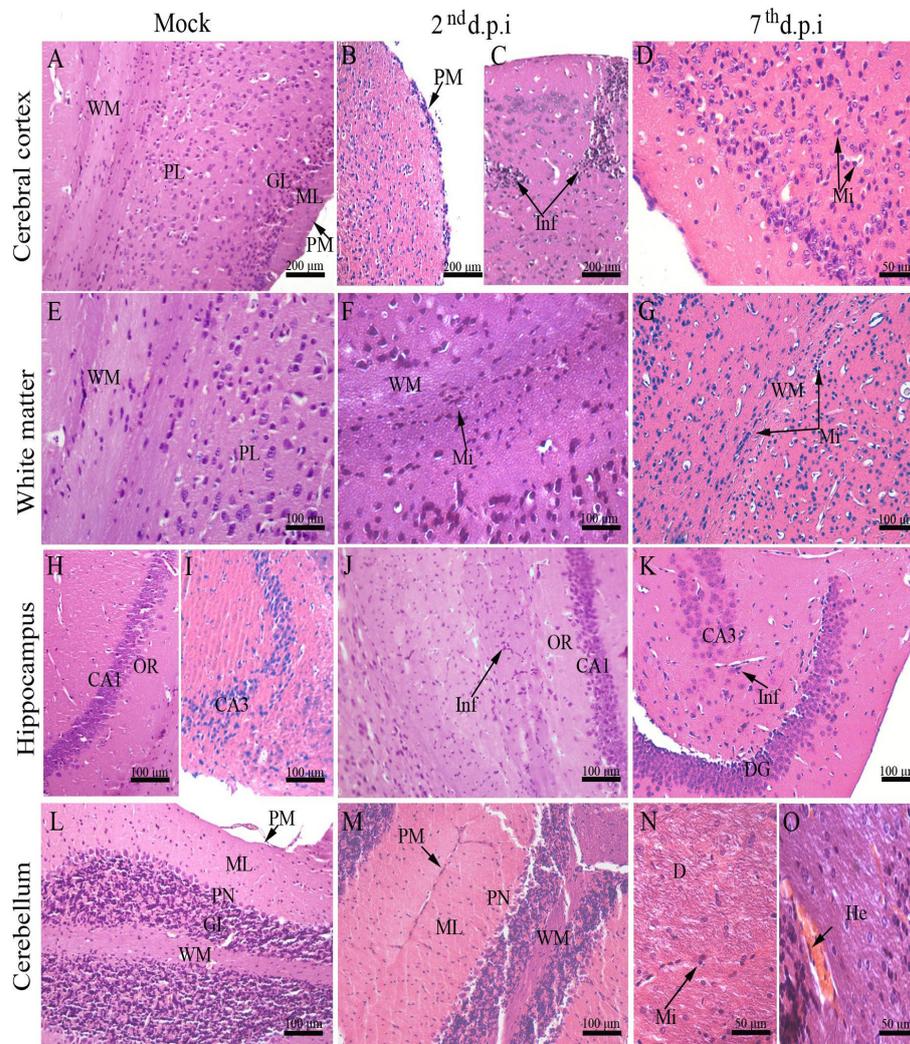


Figure 2. Histopathological aspects of the brain and cerebellum tissues of DENV-infected mice. **(A)** Cerebral cortex of a mock-inoculated mouse exhibiting normal aspects; **(B)** Mouse infected with DENV-2 showing pia mater with inflammatory infiltrate; **(C)** focal perivascular inflammatory infiltrate on the 2nd d.p.i and **(D)** diffuse inflammatory infiltrate on the 7th d.p.i. **(E)** Normal white matter from a mock-inoculated mouse. **(F)** White matter committed with inflammatory infiltrate on the 2nd d.p.i and **(G)** on the 7th d.p.i. **(H)** CA1 and **(I)** CA3 hippocampal regions from a mock-inoculated mouse. **(J)** Microglial cell infiltrate in CA1 on the 2nd d.p.i and **(K)** in CA3 on the 7th d.p.i. **(L)** Cerebellum region with normal aspects extracted from a control mouse. **(M)** Degenerated Purkinje neuronal layer on the 2nd d.p.i. **(N)** Demyelination with microglial cell infiltrate and **(O)** hemorrhage on the 7th d.p.i. CA1 – *Cornu ammonis* 1 region; CA3 – *Cornu ammonis* 3 region; D – demyelination; DG – dentate gyrus; GL – granular layer; H – hippocampus; He – hemorrhage; ML – molecular layer; OR – orien; PL – pyramidal layer; PM – pia mater; Inf – Inflammatory infiltrate; PN – Purkinje neuron; Mi – Microglia; WM – white matter; d.p.i. - days post infection.

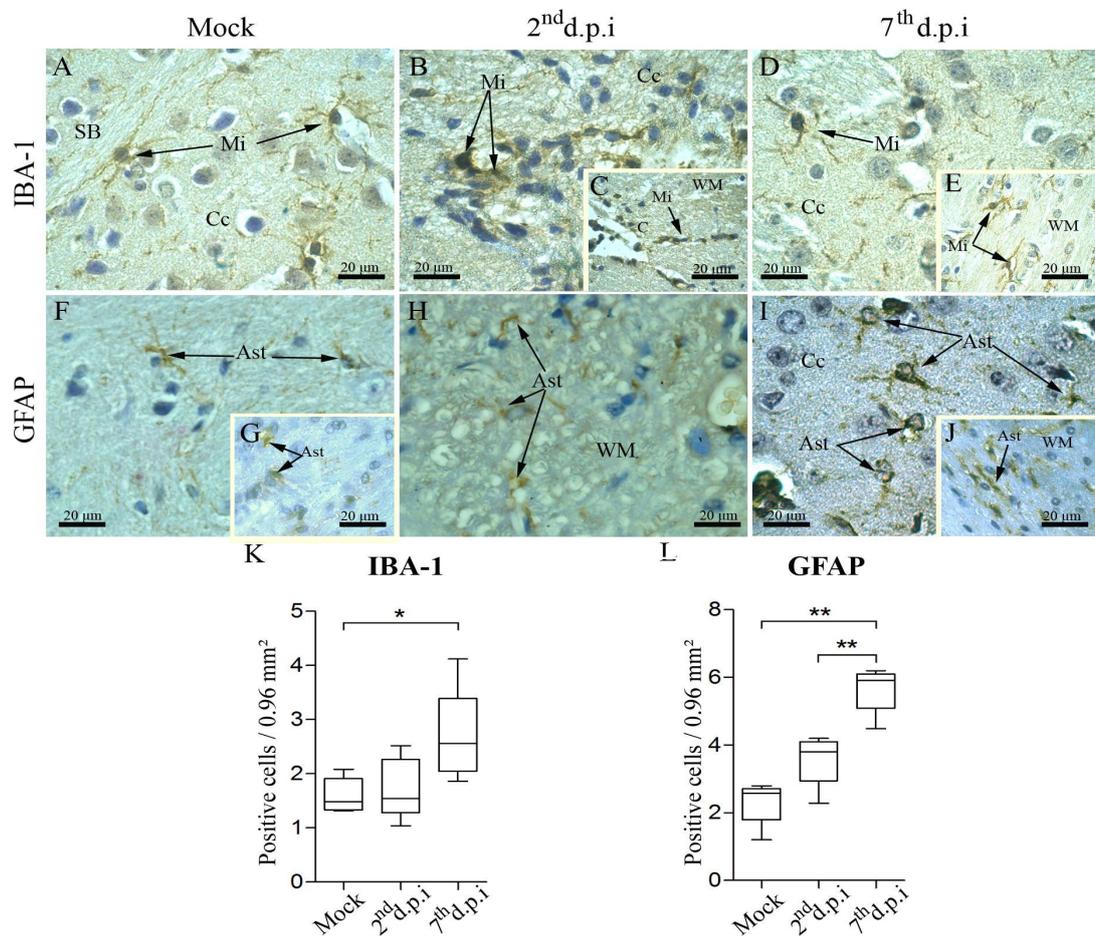


Figure 3. Aspects of microglia and astrocytes in brain tissues of infected mice. Detection of microglia (IBA-1⁺ cells) in samples of the cerebral cortex and white matter from **(A)** non-infected, **(B/C)** 2nd d.p.i and **(D/E)** 7th d.p.i. **(F/G)** Detection of astrocytes (GFAP⁺ cells) in the cerebral cortex and white matter in samples from control animals. **(H)** Staining of astrocytes in the white matter of samples from infected mice on the 2nd d.p.i. **(I/J)** Staining of astrocytes in the cortex and in the white matter on the 7th d.p.i. Quantification of **(K)** IBA-1⁺ and **(L)** GFAP⁺ cells. Ast - astrocyte; C - capillary; Cc - cerebral cortex; Mi - microglia; WM - white matter; d.p.i. - days post infection. Statistical differences were evaluated using Mann–Whitney test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

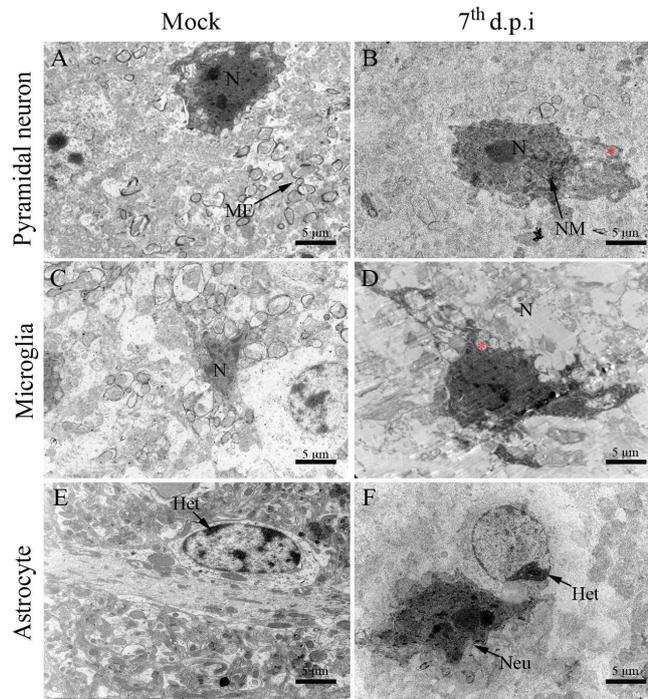


Figure 4. Ultrastructural aspects of the brain tissue of BALB/c mice infected with DENV-2. **(A)** Pyramidal neurons, **(C)** microglial cells and **(E)** astrocyte of non-infected mice showing regular aspects. **(B)** Pyramidal neuron exhibiting increased nucleus, swollen mitochondria and irregular nuclear membrane. **(D)** Microglial cell with increased nucleus and swollen mitochondria. **(F)** Astrocyte with heterochromatin deposition. Samples from infected mice were considered on the 7th d.p.i. Het - heterochromatin; (Red asterisk) - mitochondria; MF - myelin fibers; N - nucleus; NM - nuclear membrane; d.p.i. - days post infection.

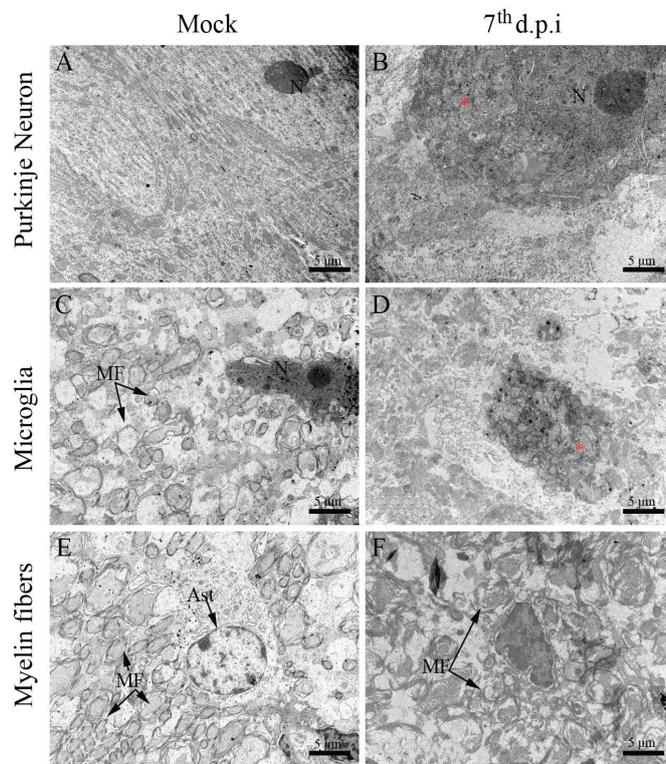


Figure 5. Ultrastructural aspects of the cerebellum tissue of BALB/c mice infected with DENV-2. **(A)** Pyramidal neurons, **(C)** microglial cells and **(E)** organized myelin fibers in samples from non-infected mice. Samples from infected mice showing **(B)** Purkinje neuron with increased nucleus and swollen mitochondria, **(D)** microglial cell with swollen mitochondria and **(F)** disorganized myelin fibers. Samples from infected mice were considered on the 7th d.p.i. M - mitochondria; MF - myelin fibers; N - nucleus; d.p.i. - days post infection.

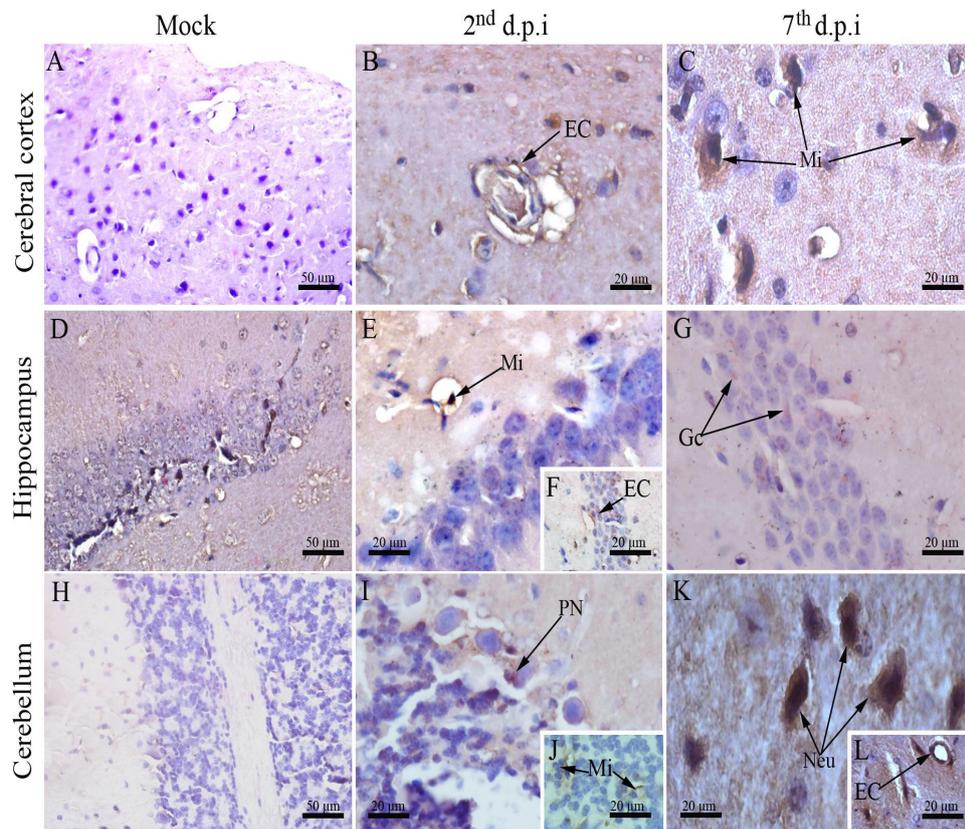


Figure 6. Detection of DENV-NS3 protein in brain and cerebellum tissues. DENV-NS3 protein was detected using immunohistochemistry on brain and cerebellum cuts. Regions of **(A)** cerebral cortex, **(D)** hippocampus and **(H)** cerebellum from samples of control mice showing negative staining reaction for DENV-NS3. Samples from infected animals showing detection of DENV-NS3 in: **(B)** endothelial and **(C)** microglial cells located at the cerebral cortex on the 2nd and 7th d.p.i., respectively; **(E/F)** microglial/endothelial cells and **(G)** granular cells of the hippocampus on the 2nd and 7th d.p.i., respectively; **(I/J)** Purkinje neurons/microglial cells and **(K/L)** neurons/endothelial cells on the 2nd and 7th d.p.i., respectively. EC - endothelial cell; Mi - microglial cells; Gc - granular cells; PN - Purkinje neurons; Neu - neurons; d.p.i. - days post infection.

CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO ANTAGONISTA PRODUZIDO POR *Bacteroides fragilis* ISOLADO DE PACIENTE COM INFECÇÃO INTRA-ABDOMINAL

Marcela Nascimento Pinheiro Braga

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Natália Rocha Guimarães

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Jamil Silvano Oliveira

Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Simone Gonçalves dos Santos

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Marcelo Porto Bemquerer

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil

Paula Prazeres Magalhães

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Luiz de Macêdo Farias

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Bacteroides, cujos membros são bastonetes Gram-negativos, estão associados a infecções intra-abdominais. *Bacteroides* podem sintetizar substâncias antagonistas, dando uma vantagem competitiva às amostras produtoras. O objetivo deste estudo foi avaliar a síntese de substâncias antagonistas por *Bacteroides* e *Parabacteroides* isolados de pacientes com infecções intra-abdominais. *Bacteroides fragilis* foi utilizado para extração, purificação e caracterização da substância antagonista. A atividade do extrato intracelular foi detectada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas concentrações de 30% (C30) e 50% (C50). C30 e C50 foram inativados por proteases e altas temperaturas. O extrato C50 foi submetido à cromatografia de troca iônica e as frações 1 a 4 apresentaram atividade antagônica. As frações foram aplicadas em cromatografia de gel filtração. As frações 2 e 3 foram capazes de inibir a amostra reveladora. Estas frações foram submetidas à cromatografia de fase reversa e a fração 2C permaneceu ativa. A espectrometria de massas da fração 2C apresentou íons de 1300,00 Da. Os peptídeos e proteínas sequenciados descritos na base de dados BLASTP resultaram em 100% de identidade com uma proteína de secreção do tipo VII. A busca por similaridade no BANCO DE DADOS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS resultou em 42% de identidade com uma microcina. Os resultados indicam a produção de substâncias

RESUMO: A microbiota intestinal indígena dos seres humanos é rica e diversificada. Como constituinte desta microbiota, o gênero

antagonistas por *B. fragilis*. É plausível supor que eles desempenham um papel relevante nas relações interbacterianas em um ambiente complexo, como de uma infecção intra-abdominal.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, substância antagonista, infecção intra-abdominal.

CHARACTERIZATION OF AN ANTAGONIST PEPTIDE PRODUCED BY A *Bacteroides fragilis* ISOLATE OBTAINED FROM A PATIENT WITH INTRA- ABDOMINAL INFECTION

ABSTRACT: The indigenous intestinal microbiota of humans is rich and diverse. As a constituent of this microbiota, genus *Bacteroides*, whose members are Gram negative rods, obligate anaerobes and associated to intra-abdominal infections. *Bacteroides* can synthesize antagonistic substances, giving a competitive advantage to the producing samples. The objective of this study was to evaluate the synthesis of antagonistic substances by *Bacteroides* and *Parabacteroides* isolated from patients with intra-abdominal infections. *Bacteroides fragilis* was used for extraction, purification and characterization of the antagonistic substance. The activity of the intracellular extract was detected with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in concentrations of 30% (C30) and 50% (C50). C30 and C50 were inactivated by proteases and high temperatures. The C50 extract was subjected to ion exchange chromatography, and fractions 1 to 4 presented antagonistic activity. Fractions were applied in gel filtration chromatography. Fractions 2 and 3 were able to inhibit the developing sample. These fractions were submitted to reverse phase chromatography and fraction 2C, remained active. Mass spectrometry, from fraction 2C, presented ions of 1300.00 Da. The sequenced peptides and proteins described in the BLASTP database, resulted in 100% identity between two peptides. One of the sequenced peptides showed 100% identity to a type VII secretion protein. The search by similarity in the ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE resulted in 42% identity with a microcine. The results indicate the production of antagonistic substances by the *B. fragilis* strain. It is plausible to assume that they play a relevant role in interbacterial relationships in a complex environment such as intra-abdominal infection.

KEYWORDS: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, antagonistic substance, intra-abdominal infection.

1 | INTRODUCTION

Bacteroides and *Parabacteroides* are two important genera that are part of the indigenous microflora of humans and other animals. This collection of microorganisms inhabiting the human body consists of complex microbial communities such as that present in the digestive tract, particularly in the oral cavity and intestines. As members of the gut microflora, *Bacteroides* and *Parabacteroides* offer several advantages to the

host, assisting in physiology and normal function of the gastrointestinal tract, helping in digesting complex polysaccharides, and also using nutritional resources, which aids in the intestinal colonization resistance by bacteria potentially harmful (Ishikawa *et al.*, 2013). The various species that make up the microbial communities are involved in all forms of competition, whether by nutritional resources or space. To overcome their adversaries, microorganisms use all their resources, including secondary metabolites, enzymes and antibiotics. The competitions between bacteria, archaea, fungi and protozoa are often solved by the use of antimicrobial peptides (Wilson *et al.*, 2015). Among the diseases associated with *Bacteroides* and *Parabacteroides*, there is intra-abdominal infection, its severity and high prevalence. After disruption of the intestinal wall, which may occur for different reasons (surgical wound, malignancies, appendicitis or trauma), the indigenous microbiota infect the peritoneal cavity normally sterile site. During the acute phase of infection (approximately 20 h), facultative anaerobes, especially *Escherichia coli* are established, promoting the fall of the redox potential of the environment. The atmosphere now low in oxygen, then allows bacteria obligate anaerobic, as representatives of *Bacteroides* and *Parabacteroides*, colonize and reproduce, passing to prevail during the chronic phase of infection (Wexler, 2016; Nicoletti *et al.*, 2008). *Bacteroides* and *Parabacteroides*, especially the *B. fragilis*, can express a wide variety of virulence skills such as synthetic enzymes, toxins secretion and production of antimicrobial substances, known as bacteriocins, which favors microorganism success in colonizing the host and aggression (Diniz *et al.*, 2000; Wexler, 2007; Papaparaskevas *et al.*, 2011). With reference to antagonistic substances produced by anaerobic bacteria, in 1965, Beerens & Baron described for the first time, a bacteriocin synthesized by *Bacteroides*, but more detailed studies have not been conducted. Until 1983, only a few papers have been published, such as Booth *et al.* (1977) who described a bacteriocin having a molecular mass greater than 300,000 Da, produced by *Bacteroides*, and the Mossie *et al.* (1979) have purified a bacteriocin produced by *B. fragilis* molecular weight between 13,000 and 19,000 Da. In 1981, Mossie *et al.* described the purification and characterization of another bacteriocin produced by *B. fragilis* and demonstrated in their ability to interfere bacterial RNA synthesis by inhibiting RNA polymerase activity. In 1992, Farias *et al.* reported the ability of producing bacteriocin-like substances for group *B. fragilis* isolates the oral cavity and marmosets intestine. Farias *et al.* (1994) showed the production of proteins with one or more bacteriocin-like activity for samples *B. fragilis* recovered primate species *Callithrix*. The extracellular extracts (S70) and intracellular (C70) showed activity against isolates of *B. fragilis* from callitrichids gut and against *Streptococcus sanguis* reference samples and *Streptococcus pyogenes*. The study of the cell surface molecules produced by *B. fragilis* has deserved prominence because they probably play an important role in colonization, persistence and communication with other microorganisms. To investigate the expression of antagonistic activity and characterize the substances involved in the phenomenon provide a better

understanding of microbial ecological relations, as well as the emergence of new perspectives regarding the use of bacteria producing antagonistic substances

2 | METODOLOGY

30 samples test of *Bacteroides* strains (11 *B. fragilis*, 5 *B. ovatus*, 1 *B. thetaiotaomicron*, 3 *B. uniformis*, 1 *B. vulgatus*, 6 *B. caccae*, 2 *B. capillosus*, 1 *B. eggherthii*) and 10 *Parabacteroides distasonis* strains isolated from patients with intra-abdominal infections (called test samples). As revealing, were used, in addition to the test samples, a panel of reference samples of bacteria with different types respiratory. Initially, the test samples were inoculated into brain heart infusion, pH 7.2, supplemented with 0.5% hemin, 0.1% menadione and 0.5% yeast extract (BHI-S). The cultivation was performed in the anaerobic chamber with 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂ at 37°C. After 48 hours, the samples were inoculated into Brain Heart Infusion Agar (BHIA) supplemented with 0.5% hemin, 0.1% menadione and 0.5% levedura extract (BHIA-S). The revealing samples were cultivated in liquid medium and then a 0.2 mL aliquot of the culture was inoculated into 3.5 ml of semisolid medium (0.7% agar). After incubation at 37°C, the reading is performed by checking the presence of inhibition halos. To evaluate the presence of bacteriophages, fragment revealing the multiplication zone of inhibition was aseptically removed and it was macerated in saline solution pH 7.2 and then centrifuged at 23,400 g for 20 min. An aliquot of the supernatant was transferred to 3 ml of culture revealing sample. After incubation an aliquot was added to 3.5 mL of semisolid agar for revealing specific sample selected. The material was incubated and the presence of lysis zones is indicative of the presence of bacteriophages. The evaluation of the possible inhibition of fatty acids was carried out using S-BHIA with and without addition of 1% soluble starch. After the test, the zone of inhibition of proliferation of revealing sample was measured. (Apolonio *et al.*, 2008). To evaluate interference of chloroform, the producer sample was inoculated in the spot on the surface of BHIA-S and, after incubation the revealing sample was inoculated around the producer sample spot, cross-shaped, without that the growth of producer sample was touched. The material was incubated and then evaluated the presence of inhibition halo. (Farias *et al*, 1992). The production H₂O₂ was investigated by incorporation of catalase 0.03% w / v in BHI-S. The presence of the revealing sample multiplication inhibition zone only in medium without addition of catalase was considered indicative that the antagonist activity is due to the presence of H₂O₂ (Hamada & Ooshima, 1975).

EXTRACTION OF INTRACELLULAR FRACTION- The cell pellet was washed twice with 0.01M Tris-HCl buffer, pH 8.0, by centrifugation at 16,200 g for 30 min. After this procedure, the pellet was sonicated at 50 W in an ice bath for 30 cycles of 40 s each, at 40 s intervals. The resulting sonicated fraction was again centrifuged

and the supernatant was collected, subjected to ammonium sulfate precipitation and dialysed to obtain the intracellular fractions, called C-30, C-50 and C-80.

CHARACTERIZATION OF ACTIVE FRACTIONS- pH- The extracts were diluted 1: 1 (v / v) in the universal buffer and the solution was then incubated at 37 ° C at 15 and 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h intervals , 1, 2, 3, 6, 10, 20 and 30 days. As a control, the activity of the buffer and the diluted fraction in 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, at the ratio of 1: 1 (v / v), incubated in the same condition as the test tubes was checked. **TEMPERATURE-** Aliquots of fractions were subjected to heat treatments: -86 ° C (freezer), -20 ° C (freezer), 4 ° C (Refrigerator), 25 ° C (room temperature), 37 ° C (oven), 50 ° C, 60 ° C, 80 ° C and 100 ° C (water bath) and 121 ° C (autoclave) , 1, 2, 4 and 8 h, 1, 2, 8, 20, 30 days, 6 and 12 months. As a control, the diluted extract was used without any heat treatment. **PROTEOLYTIC ENZYMES-** Protein K, α -chymotrypsin, trypsin, papain, and pepsin were used. The tests were performed by diluting aliquots of the active protein extracts in the enzyme solutions in a ratio of 1: 1 (v / v). The material was incubated, then, the preservation of the antagonistic activity was evaluated and the results expressed in UA / mL. As a control, the enzymatic solutions and extracts diluted 1: 1 (v / v) were used. **ORGANIC SOLVENTS-** The solvents used were acetone, acetonitrile, iso-propyl alcohol, butanol, ethanol, hexane and methanol 10% aqueous solutions and 50% of the organic solvents were prepared and then sterilized by filtration. The extracts were diluted 1: 1 (v / v) in these solutions and then incubated at 25 ° C for 1 h. Controls were performed using the aqueous solutions of the organic solvents and the extract diluted 1: 1 (v / v).

PURIFICATION OF ACTIVE FRACTIONS BY CHROMATOGRAPHY- Initially, fast protein liquid chromatography (FPLC) was used on Mono-Q [™] 5/50 GL Tricorn [™] column in a linear gradient of 0-100%. Fractions from ion exchange chromatography with antagonistic activity were subjected to gel filtration on a Superose 12 HR 10/30 column. The active fractions obtained from the above purification step were subjected to high performance liquid chromatography (HPLC on C8 column (4.6 mm in diameter x 25 cm in length). The eluted fractions were monitored using wavelength 280 and 220 nm, concentrated by lyophilization and diluted in sterile Milli-Q® water.

SDS-PAGE- One part of the gel was stained by silver and the other was washed to remove SDS and possible microbial contaminants and then routed to reveal in situ activity. The reading was performed by observing the presence of lines inhibiting the multiplication of the developing sample. The molecular mass of each active band was estimated by comparison with pre-stained protein standard (Farias *et al.*, 1994)

TRIPTIC DIGESTION- The gel was rehydrated with trypsin solution for 40 min in an ice bath. The extraction was carried out with 5% formic acid and 50% acetonitrile. The sample was concentrated to about 10 μ L and sent for analysis in mass spectrometry. As a negative control, a sample-free gel fragment and as a positive control, bovine serum albumin solution (1 mg / mL) were used, both of which were treated in parallel with the sample.

MASS SPECTROMETRY- The fractions and the material were lyophilized and dissolved in α -CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic) and super DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) matrix, at the ratio of 1:1 (v/v). The molecular mass was determined using MALDI-TOF / TOF Autoflex™ III. For data analysis, the Flex Analysis 2.4 program was used.

DETERMINATION OF PRIMARY SEQUENCE OF ANTAGONIST SUBSTANCE- The identity of the peptides was verified by Autoflex™ III MALDI-TOF / TOF Homology analysis between the primary sequence obtained and those of other substances was carried out using the Basic Local Alignment Search Tool - National Center for Biotechnology Information NCBI-BLAST

3 | RESULTS

Considering *Bacteroides* samples, heterantagonism was detected in 18 (60.0%) of the 30 samples tested, five (16.7%) of which, all *B. fragilis*, also expressed isoantagonism. The occurrence of autoantagonism was not detected. It was observed heteroantagonism expression by 29 (72.5%) and isoantagonism 5 (12.5%) of the 40 samples tested. Antagonist activity was observed only against phylogenetically related bacteria. Clinical samples used as indicator, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *B. caccae* and *B. capillosus* showed heteroantagonistic activity to at least three of test samples. The sample *B. fragilis* D 111.4 was the one who expressed antagonism more often exhibited the broadest spectrum of activity and generated more visible.

FACTORS INTERFERENCE- BACTERIOPHAGES- lysis zones due to the presence of bacteriophages were not observed in the test performed. **FATTY-** The addition of starch to the growth medium did not prevent expression of antagonism, indicating that fatty acids and other acids were not responsible for antagonism. **CHLOROFORM-** The results of testing for antagonist activity research with or without addition of chloroform were similar, indicating that this substance is not responsible for the inhibition of revealing sample. **HYDROGEN PEROXIDE-** The addition of catalase to the culture medium did not inhibit the antagonism of expression, showing that the production of H₂O₂ is not responsible for the activity.

PROTEIN EXTRACTION - ANTAGONIST ACTIVITY TEST OF THE FRACTIONS OBTAINED- The intracellular protein fractions obtained from the sample *B. fragilis* D 111.4, precipitated with 30% (NH₄)₂SO₄ (C30) and 50% (C50) showed antagonistic activity against *B. caccae* D 79.3 and *B. ovatus* D 54.1. Thus, C30 and C50 were selected for subsequent steps in the study.

PURIFICATION OF C30 AND C50 FRACTIONS- The application of the extract C30 in ion exchange chromatography did not generate active fractions. With regard to the C50 extract, 50 fractions were generated, among which fractions 1 to 4, referring to a single peak and presented antagonistic activity. Fractions 1 and 4,

from ion exchange chromatography, constituted pool 1, which, applied in gel filtration chromatography, generated 26 fractions. Of these, fractions 2 and 3 were able to inhibit the sample. The chromatogram resulting from the gel filtration chromatography is shown in Figure 4. Pool 2, consisting of fractions 2 and 3 from the gel filtration chromatography, was subjected to reverse phase chromatography. Fifty fractions were generated, the fraction 2C being active against the developer sample.

SDS PAGE- Inhibition of the developmental microorganism *B. ovatus* D 54.1 was verified by all the extracts tested, in a region corresponding to the band with molecular mass <10 kDa.

MOLECULAR MASS OF ANTAGONIST SUBSTANCE- In the fraction analyzed by chromatography reverse phase, the ions of approximately 1300 Da generated a more intense signal. In the fraction analyzed by trypsin digestion, the fragments were analyzed and sequenced. Trypsin digestion allowed good fragmentation of the peptide.

ANALYSIS OF AMINO ACID SEQUENCES- The search performed by similarity in the BLASTP database showed 100% identity with a type VII secretory protein. The sequence was VTANRNQWG. The search performed by similarity between the sequenced fragments and proteins described in the Antimicrobial Peptide Database, from fragmentation obtained with trypsin digestion, resulted in 42% identity with a microcine of *Streptomyces*. The sequence found was GMAAFKSIFGGMSWY.

4 | DISCUSSION

The most frequently isolated anaerobic of these infectious processes is *B. fragilis*, involved in the development of the intra-abdominal abscesses that occur in the peritoneal cavity. While intra-abdominal infections are typically polymicrobial and are generally associated with the indigenous microbiota, *B. fragilis* is one of the few bacteria known to be capable of inducing abscess formation as the sole infecting organism in experimental animal models (Cao *et al.*, 2014). In this study, only *Bacteroides* exhibited antagonistic activity under the experimental conditions employed. In the group, 43.33% of the samples tested showed heteroantagonism only and 16.67% expressed heteroantagonism and isoantagonism, exclusively, *B. fragilis*. A similar result was reported by Avelar *et al.* (1999) found that 57% of *B. fragilis* samples, including clinical specimens, were bacteriocin-producing. Autoantigen activity was not observed. Several reports describe that samples producing antagonistic substances synthesize an immunity protein for their protection (Coyne *et al.*, 2016; Lobo *et al.*, 2016). However, in a dense and diversified microbiota environment, the bacteriocin produced not only exerts its antagonistic effect, but can also trigger the production of bacteriocins by neighboring cells, “setting the competitor on the counterattack.” In this study, the researchers observed that bacteriocins induce the

expression of inhibitory substances by neighboring samples and that the potency of a bacteriocin and its induction ability go together. In a competition environment between antagonistic samples, the most “toxic” competitor will prevail (Majeed *et al.*, 2013). Protein extracts C30 and C50 were tested for characterization. Regarding the evaluation of thermotolerance, loss of antibacterial activity was observed by exposure to temperatures above 50 ° C. Similar results were reported by Farias *et al.* (1994), which also characterized a bacteriocin of *B. fragilis* that lost its activity when the extract was treated with temperatures above 60 ° C. The C30 and C50 antagonist activity was preserved at lower temperatures, such as -20 ° C and -86 ° C, for up to 12 months, the last time the test was performed. At 37 ° C and 25 ° C, its activity was maintained for 7 days.

For the purification of the antagonist substance present in the C50 intracellular protein extract, was subjected to ion exchange chromatography. Fractions 1 to 4 exhibited antagonistic activity. Subsequent to ion exchange chromatography, the active fractions were subjected to filtration chromatography. The active fractions originated (2 and 3) were located at a peak at the beginning of the Chromatogram, indicating particles with larger molecular weights. In the next purification step, the reverse phase liquid chromatography on a C8 column (HPLC) was used, and 50 fractions were collected. One of them, fraction 2C, remained active against the revealing sample. The result of the mass spectrometry experiment, from fraction 2C, presented ions of approximately 1300 Da, which generated a more intense signal. An antagonist substance with molecular mass less than 10 kDa was also detected in the in situ development experiment performed after SDS-PAGE. The search performed by similarity between one of the sequenced fragments (VTANRNQWG) and proteins described in the BLASTP database, from fragmentation obtained on reverse phase chromatography, resulted in 100% identity with a type VII secretion protein. The search performed by similarity with proteins described in the Antimicrobial Peptide Database, from fragmentation obtained with trypsin digestion (GMAAFKSIFGGMSWY), resulted in 42% identity with a *Streptomyces* microcine. *Bacteroides* secrete antibacterial proteins (BSAPs), which act on phylogenetically related samples. Bacteria evolved a remarkable variety of sophisticated nanomachines to export various pathogenicity factors through the bacterial cell envelope. Because bacteria use different mechanisms to compete in microbial communities and the intestinal microbiota is an extremely dense ecosystem, cell-cell contact, substances presents as a very prevalent antagonistic mechanism in the gut (Coyne *et al.*, 2016). Relatively little is known about the ecology of the human intestinal microbiota and the combination of factors regulating the composition of an intestinal microbial community. The competition for bacterial interference is beginning to be studied and appreciated as an important contribution to understanding the dynamics of intestinal bacterial populations. In summary, the data demonstrate the need to continue studies on the production of antagonistic proteins by *B. fragilis*, as well as the analysis of extraction

methods that allow the optimization of the purification protocol. Future studies are desirable to allow a better understanding of the influence of these proteins on the ecological relationships that occur in the intestinal tract of humans and their potential of application in the inhibition of samples associated with the etiopathogenesis of intra-abdominal infections.

5 | CONCLUSIONS

The expression of antagonistic activity was detected only for the genus *Bacteroides*. Hetero-antagonistic activity was observed only against phylogenetically related samples and isoantagonistic activity was detected only for *B. fragilis*. No sample expressed self-starvation. The exclusion of factors that could interfere in the interpretation of phenotypic test results reinforces the hypothesis that the expressed antagonism is due to the production of proteinaceous substance (s), possibly bacteriocin (s). Intracellular extract of *B. fragilis* D111.4 sample with 30% (C30) and 50% (C50) saturated ammonium sulfate shows antagonistic activity against *B. ovatus* and *B. caccae*, respectively. C30 and C50 presented low stability when subjected to heat treatments, they were active against different pH values and several organic solvents and their protein nature was confirmed by inactivation by proteases. Data obtained by SDS-PAGE indicates that the C50-detected antagonist substance has molecular mass less than 10 kDa and therefore is a peptide. Analysis by mass spectrometry, from fraction 2C obtained from reversed phase chromatography, revealed ions of approximately 1300 Da, which generated a more intense signal. The search performed by similarity with proteins described in the BLASTP database resulted in 100% identity of a fragment (VTANRNQWG) with a type VII secretion protein. The search performed by protein similarity described in the Antimicrobial Peptide Database resulted in 42% identity of a fragment (GMAAFKSIFGGMSWY) with a microcine of *Streptomyces*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-00941-13), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pro-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG).

REFERENCES

APOLÔNIO, A. C. M.; CARVALHO, M. A. R.; BEMQUERER, M. P.; SANTORO, M. M.; PINTO, S. Q.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, K. V.; FARIAS, L. M. Purification and partial characterization of a bacteriocin produced by *Eikenella corrodens*. Journal of Applied of Microbiology, v. 104, p. 508 - 514, 2008.

AVELAR, K. E. S.; PINTO, L. J. F.; LOBO, L. A.; BASTOS, M. C. F.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, M. C. Production of bacteriocin by *Bacteroides fragilis* and partial characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 264 - 268, 1999.

BEERENS, E. L.; BARON, G. Demonstration of bacteriocins elaborated by anaerobic gram negative bacteria belonging to the *Eggerthella* genus. **Annales Institut Pasteur Paris**, v. 108, p. 255 - 256, 1965.

BOOTH, S. J.; JOHNSON, J. L.; WILKINS, T. D. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, p. 718 - 724, 1977.

CAO, Y.; ROCHA, E. R. ; JEFFREY, C. S. Efficient utilization of complex n-linked glycans is a selective advantage for *Bacteroides fragilis* in extraintestinal infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 12901 - 12906, 2014.

COYNE, M. J.; ROELOFS, K. G.; COMSTOCK, L. E. Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. **BMC Genomics**, v. 17, p. 1 - 21, 2016.

DINIZ, C. G.; CARA, D. C.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R. Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistant *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2419 - 2423, 2000.

FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Bacteriocin-like Activity of *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets. **Research in Microbiology**, v.143, p.151 - 59, 1992.

FARIAS, L. M.; TOTOLA, A. H.; MIRANDA, C. M. S.; CARVALHO, M. A. R.; DAMASCENO, C. A. V.; TAVARES, C. A. P.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, E. C. Extraction, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. **Research in Microbiology**, v. 145, p. 9 - 16, 1994.

HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 20, p. 641 - 648, 1975.

ISHIKAWA, E. ; MATSUKI, T.; KUBOTA, H.; MAKINO, H.; SAKAI, T.; OISHI, K.; KUSHIRO, A.; FUJIMOTO, J.; WATANABE, K.; WATANUKI, M.; TANAKA, R. Ethnic diversity of gut microbiota: species characterization of *Bacteroides fragilis* group and genus *Bifidobacterium* in healthy Belgian adults, and comparison with data from Japanese subjects. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 265 - 270, 2013.

LOBO, L. A.; BENJAMIM, C. F.; OLIVEIRA, A. C. The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, p. 1 - 8, 2016.

MAJEED, H.; LAMPERT, A.; GHAZARYAN, L.; GILLOR, O. The Weak Shall Inherit: Bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations. **PLoS ONE**, v. 8, p. 6383 - 6387, 2013.

MOSSIE, K. G.; JONES, D. T.; ROBB, F. T.; WOODS, D. R. Characterization and mode of action of a bacteriocin produced by a *Bacteroides fragilis* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, p. 724 - 730, 1979.

MOSSIE, K. G.; JONES, D. T.; ROBB, F. T.; WOODS, D. R. Inhibition of ribonucleic acid polymerase by a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 20, p. 437 - 442, 1981.

NICOLETTI, G.; NICOLOSI, D.; ROSSOLINI, G. M. Etiologia, epidemiologia e diagnostic

microbiologica delle infezioni intraddominali. Intra-abdominal infections: etiology, epidemiology, microbiological diagnosis and antibiotic resistance issues. **Journal Le Infezioni in Medicina**, v.1, 2008.

PAPAPARASKEVAS, J.; KATSANDRI, A.; PANTAZATOU, A.; STEFANO, I.; AVLAMIS, A.; LEGASKIS, N. J.; TSAKRIS, A. Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: a prospective observational study. **Anaerobe**, v. 3; p. 113 - 117, 2011.

WEXLER, A. G.; BAO, Y.; WHITNEY, J. C.; BOBAY, L. M.; XAVIER, J. B.; SCHOFIELD, W. B. Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2016.

WILSON, M. M.; ANDERSON, D. E.; BERNSTEIN, H. D. Analysis of the Outer Membrane Proteome and Secretome of *Bacteroides fragilis* Reveals a Multiplicity of Secretion Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

DESENHO VACINAL PARA O ZIKA VÍRUS COM O USO DA IMUNOINFORMÁTICA

Esther Santos Santana

Centro Universitário AGES , graduação em
Ciências Biológicas
Paripiranga-Bahia

Fabiano Ricardo Fontes Santos

Centro Universitário AGES , graduação em
Ciências Biológicas
Paripiranga-Bahia

Daniela Droppa-Almeida

Université de Sherbrooke, Pos-Doc em
Microbiologia
Sherbrooke-Quebec

RESUMO: O vírus da Zika (ZIKV) acomete todo o globo, tendo preferência nas regiões tropicais como o Brasil. Durante o período de 2014 e 2015, o Brasil sofreu um surto de infecções por meio do ZIKV. A transmissão ocorre majoritariamente pelo vetor *Aedes Aegypti*. O principal agravante no ZIKV é a sua associação no desenvolvimento de mutações durante a gravidez gerando Microcefalia e casos de bebês natimortos. Das medidas de combate mais utilizadas, está presente a profilaxia, porém ausente ainda para o ZIKV, com isso a busca de antígenos capazes de formular uma vacina eficaz é recorrente e para isso a bioinformática tem sido um grande aliado na seleção de tais antígenos. Deste modo, o presente trabalho objetivou o desenho vacinal para o Zika

Vírus através da imunoinformática. Para isso, as proteínas que compõem o vírus foram selecionadas e análises como antigenicidade, alergenicidade, busca de epítomos de células T foram feitas, assim como caracterizações físico-químicas. Um total de 10 proteínas foram encontradas no GenPept e destas após as análises, as proteínas C e NS2b foram descartadas como potencial uso em formulação vacinal devido sua baixa antigenicidade, alta instabilidade e alergenicidade. Todas as proteínas apresentaram epítomos dominantes para células T. Com isso, esses resultados são importantes na busca de antígenos vacinais sejam para compor vacinas recombinantes ou vacinas peptídicas.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinformática; epítomos imunodominantes; peptídeos; proteínas recombinantes; Zika Vírus.

VACCINAL DESIGN FOR ZIKA VIRUS WITH THE USE OF IMUNOINFORMATICS

ABSTRACT: Zika virus (ZIKV) affects the entire globe, having a preference in tropical regions such as Brazil. During 2014 and 2015, Brazil experienced an outbreak of infections through ZIKV. Transmission occurs mainly by the *Aedes Aegypti* vector. The major aggravating factor in ZIKV is its association in the development of mutations during pregnancy leading to

Microcephaly and cases of stillbirths. Among the most commonly used combat measures, prophylaxis is present, but still absent for ZIKV, so the search for antigens capable of formulating an effective vaccine is recurrent and for this reason bioinformatics has been a great ally in the selection of such antigens. Thus, the present work aimed at vaccine design for Zika Virus through immunoinformatics. For this, the proteins that make up the virus were selected and analyzes such as antigenicity, allergenicity, T cell epitope search were made, as well as physicochemical characterizations. A total of 10 proteins were found in GenPept and from these after analysis, proteins C and NS2b were discarded as potential use in vaccine formulation due to their low antigenicity, high instability and allergenicity. All proteins had dominant T-cell epitopes. Thus, these results are important in the search for vaccine antigens to either make recombinant vaccines or peptide vaccines.

KEYWORDS: Bioinformatics; Immunodominant epitopes; peptides; recombinant proteins; Zika virus

1 | INTRODUÇÃO

A Zika é uma enfermidade que acomete todo o planeta. Vírus oriundo da floresta de Uganda, seu isolamento ocorreu no ano de 1947 em um macaco do tipo *rhesus*. Sua prevalência é de regiões de climas quentes e úmidos como as regiões tropicais. Nos anos de 2014 e 2015, o Brasil foi acometido por uma epidemia de infecções por meio do ZIKV. Foi no ano de 2015 que Garcia e Duarte (2016), alegam que o país declarou estado de emergência. O estopim dos surtos de infecção ocorreu na região nordeste do país e foi se alastrando para as demais regiões (GARCIA; DUARTE., 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O Zika Vírus caracteriza-se como de RNA positivo e de cadeia simples não segmentada com apenas uma fita de leitura aberta cuja algumas regiões não são codificáveis e um comprimento de 11 kb, responsável pela codificação de uma poliproteína (Faye *et al.*, 2014). Seu RNA possui 807 nucleotídeos e cerca de 3423 aminoácidos. A fita de RNA sofre clivagem gerando 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais.

Sua transmissão é majoritariamente, por meio do vetor que é o mosquito fêmea do *Aedes Aegypti* e o *Aedes Albopictus*. Outros meios de transmissão também foram descobertos como a amamentação, relação sexual, transfusões sanguíneas e gravidez. (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017). A presença do vírus na região cerebral, líquido amniótico e urina também foram relatadas (GOURINAT *et al.*, 2015).

Um fator agregado à infecção pelo ZIKV é a sua associação com anomalias e síndromes como o a síndrome de Guillain-Barré (SGB) e de recém-nascidos com Microcefalia (GOURINAT *et al.*, 2015; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Gebre, Forbes e Gebre (2016) relatam que durante a 18ª semana de

gestação, a Microcefalia é de maior evidência, existindo casos de surgimento de Microcefalia após o nascimento, chamada de Microcefalia secundária. Ao se tratar da SGB, esta vai ser definida por Oliveira *et al.* (2017), pelo ataque do próprio sistema imunológico as células nervosas do indivíduo.

Os sintomas mais comuns quando aparente são febre, dores no corpo, erupções cutâneas entre outros sintomas, pois há também casos assintomáticos. Seus sintomas são considerados parecidos com a Dengue e a Chikugunya, dificultando muitas vezes o diagnóstico correto. Com isso, o diagnóstico mais preciso atualmente é o de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Reação em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR), dos quais vão identificar o RNA viral, responsável pela codificação da poliproteína do ZIKV em um prazo de até 15 dias após a infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A presença do ZIKV no cotidiano é devido à ausência de uma profilaxia a qual o principal grupo alvo de imunização seriam as mulheres gestantes e as que pretendem engravidar, devido a íntima relação entre gravidez e o ZIKV e sua influencia no período gestacional. A ausência de vacinas virais eficazes se da ao alto grau de mutação existente nos vírus em geral. Devido a isso, ensaios *in silico* têm se mostrado uma excelente ferramenta na determinação de potenciais antígenos para compor formulações vacinais (GARG; MEHMETOGLU-GURBUZ; JOSHI, 2018).

Esse desenho vacinal é possível por conta da imunoinformática uma das vertentes da bioinformática, a qual se utiliza de softwares que podem prever a antigenicidade de proteínas, assim como verificar a presença de determinantes antigênicos nessas proteínas, peptídeos capazes de estimular o sistema imune de forma mais eficaz. Os determinantes antigênicos chamados de epítomos imunodominantes são regiões nos antígenos com a capacidade de ligação com receptores imunológicos celulares, em especial os que apresentam a capacidade de ligação com os sítios que são os MHC de classe I e II, dos quais possuem capacidade de ativação dos linfócitos T os ativando e os diferenciando em linfócitos TCD4+ e TCD8+ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DROPPA-ALMEIDA, 2018).

A vacinologia reversa vem sendo aplicada para o desenho de outras vacinas como as vacinas de subunidade, as vacinas de Vírus Purificado Inativado, de Vírus atenuado vivo, com RNA modificado, assim como o desenho vacinal de formulações contendo partículas subvirais e de DNA (LAROCCA *et al* 2017; TO *et al* 2018). Diante disso o objetivo do nosso trabalho foi utilizar as ferramentas de imunoinformática com o objetivo de prever alvos potencialmente antigênicos para compor uma vacina eficaz contra o Zika vírus.

2 | MATERIAL E MÉTODOS:

2.1 Obtenção das sequências proteicas

Para obtenção das proteínas constituintes, foi utilizada a plataforma que corresponde ao Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). Descritas na tabela 1.

Proteínas Constituintes		Código no NCBI	Aminoácidos
Capsídeo C	Estrutural	YP_009227196.1	104
Envelope E	Estrutural	YP_009227198.1	500
Membrana M	Estrutural	YP_009227197.1	168
NS1	Não estrutural	YP_009227199.1	352
NS2a	Não estrutural	YP_009227200.1	226
NS2b	Não estrutural	YP_009227201.1	130
NS3	Não estrutural	YP_009227202.1	622
NS4a	Não estrutural	YP_009227203.1	127
NS4b	Não estrutural	YP_009227204.1	251
NS5	RNA polimerase	YP_009227205.1	903

Tabela 1. Proteínas constituintes do Zika Vírus e seus respectivos códigos no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI).

2.2 Caracterização das proteínas

2.2.1 Alergenicidade

Ocorreu por meio do uso dos programas AlgPred para a verificação da alergenidade das proteínas identificadas. Para que ocorresse a identificação de alergenidade ou não das proteínas, as cadeias peptídicas dos antígenos foram depositadas no software, em que este analisou o grau de alergenidade a partir da capacidade de ativação das imunoglobulinas IgE, que são responsáveis pela ativação da resposta imune (SAHA, RAGHAVA, 2006). O programa prediz a existência de epítopos para o IgE, caso não haja epítopos, o antígeno não apresenta alergenidade. Se houver, é mensurado o nível de alergenidade.

2.2.2 Antigenicidade

VaxiJen30 v2. 0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), na análise e verificação do potencial antigênico. O programa utiliza primeiramente de uma análise das propriedades físico-químicas das proteínas e, posteriormente converte as cordas derivadas utilizadas na predição das propriedades, em vetores uniformes a partir de covariância cruzada e automática. Logo, seleciona as variáveis de maior relevância através do algoritmo genético para assim, classificar como

antígenos protetores ou não (ZAHARLEVA *et al.* ,2017).

2.2.3 Propriedades físico-químicas

O ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>), do qual analisou o ponto isoelétrico (pI), índice de instabilidade, semi-vida *in vitro* e *in vivo*; e o GRAVY, do qual disponibilizou o índice alifático e a hidropaticidade das proteínas. O software em questão, utiliza das sequências proteínas de aminoácidos, para determinar a partir de seus cálculos as propriedades físico-químicas, como o percentual de afinidade com a água, instabilidade e outros, quando feitos os cálculos, a plataforma disponibiliza uma tabela em formato Excel ou um gráfico. O programa utiliza de recursos como o Multi-FASTA para ler as sequências proteicas (GARG *et al.*, 2016).

2.3 Obtenção dos epítomos imunodominantes de células T

Para obter os epítomos das células T, foi utilizada a Base de Dados de Epítomos Imune e Recursos de Análise (IEDB, disponível em <http://www.iedb.org>). Dispondo de três campos, os epítomos são previstos por meio da: ligação ao MHC de classes I e II; predição de epítomos por meio do processamento de peptídeos na célula; e previsão de imunogenicidade, em que é vista a capacidade do complexo peptídico na indução de resposta imune. No programa também é possível prever estruturas para Receptores de Células T (TCR) por meio de modelagem homóloga. Das modalidades ofertadas, utilizou-se da previsão de imunogenicidade e conseqüentemente, da ferramenta de desimunização. Esta ferramenta possibilita a identificação de regiões (epítomos) de determinada proteína, posteriormente sugere a substituição de alguns aminoácidos dos quais permitem o surgimento de versões não imunogênicas da proteína em questão (IEDB, 2019).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das proteínas

O ZIKV é composto por 10 proteínas, as quais estão descritas na tabela 1. Dentre as 10 proteínas, temos a capsídeo (C) responsável pela formação do capsídeo, uma que compõe o envelope (E), outra proteína precursora das glicoproteínas de membrana (M) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – RNA polimerase). (BROGUEIRA; MIRANDA, 2017; DULGHEROFF *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2017). Ao obter a sequência de aminoácidos das proteínas, foi possível verificar o perfil de alergenicidade das proteínas usando o AlgPred, que é uma ferramenta que realiza a previsão com base em seis abordagens diferentes.

Os resultados demonstram se o antígeno possui regiões capazes de interagir

com Imunoglobulinas E (IgE) (SAHA; RAGHAVA, 2006). Assim sendo, ao serem submetidas, as dez proteínas do vírus (Tabela 2), conseguiu-se obter que apenas a proteína NS2B apresentou sítios de interação com imunoglobulinas E sendo classificada dessa forma como alergênica. Neste caso, a proteína NS2B não se apresenta interessante para compor uma formulação vacinal, pois o intuito da vacina contra o ZIKV é desenvolver uma resposta TCD8+ eficaz e que não apresente reações adversas, como seria o caso de um possível processo alérgico.

No intuito de verificar o potencial antigênico o VaxiJen foi usado, o qual mostrou que as proteínas C, NS1, NS3 e NS5 apresentaram potencial antigênico inferior a 0,5, para Doytchinova e Flower (2007), o limiar mínimo de antigenicidade é de 0,4. Em contrapartida, as proteínas E, NS2A e NS4A, possuíram antigenicidade superior a 0,6, o que pode representar uma maior ativação da resposta imunológica (tabela 2).

Antígenos	AlgPred	VaxiJen	PI	Índice de instabilidade	Índice alifático	GRAVY
Capsídeo C	Não alergênica	0,3854	12,02	Instável	116,35	-0,119
Envelope E	Não alergênica	0,6249	6,48	Instável	82,44	-0,163
Membrana M	Não alergênica	0,5498	8,55	Estável	80,90	-0,068
NS1	Não alergênica	0,4366	6,17	Estável	68,86	-0,553
NS2A	Não alergênica	0,6473	10,34	Estável	132,52	0,888
NS2B	Alergênica	0,5670	4,44	Estável	103,54	0,403
NS3	Não alergênica	0,4969	8,22	Instável	79,50	-0,333
NS4A	Não alergênica	0,6159	5,82	Estável	122,91	0,684
NS4B	Não alergênica	0,5569	9,10	Estável	101,95	0,339
NS5	Não alergênica	0,4221	867	Instável	73,81	-0,541

Tabela 2. Caracterização físico-química das proteínas.

Ao submeter às proteínas ao programa ProtParam, este forneceu ponto isoelétrico (pI), é um mecanismo para a predição do pH dos antígenos. O pI se faz presente quando é zerada a carga total dos antígenos devido ao ponto de equilíbrio entre as cargas. Quanto aos resultados obtidos, estes mostraram-se bastante diversificados. As proteínas NS2B, cujo pI foi de 4,44 e conseqüentemente o pH de 4,44, é considerado ácido. Diferentemente da proteína do Capsídeo com o pH de 12,02, considerando-se alcalino. As proteínas NS1, NS3 e NS4A, se assemelharam mais ao pH neutro que é em torno de 7 (tabela 2).

O GRAVY forneceu a hidropaticidade das proteínas, das quais destacam-se as proteínas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b por suas características hidrofóbicas, ou seja, incompatíveis a meios aquosos. Droppa-Almeida, Franceschi, Padilha (2018), aponta que valores positivos, simbolizam hidrofobia e valores negativos representam hidrofília. O ProtParam também indicou que as proteínas C, E, NS3 e NS5 são proteínas instáveis, o que dificulta sua aplicabilidade na construção vacinal com as respectivas

proteínas (Tabela 2). De acordo com o programa, este vai averiguar a capacidade dos antígenos de se manterem estáveis frente a temperaturas diferenciadas. Para o programa, valores superiores a 100, simbolizam uma instabilidade (PROTPARAM, 2019).

O programa ProtParam identificou também o período de semi-vida (Tabela 3) das proteínas *in vitro*, em levedura e em contato com a *Escherichia coli*. Na semi-vida *in vitro*, apenas a proteína C, NS2A, NS4A e NS5 apresentaram um período de cerca de 30 horas, a proteína M apresentou cerca de 20 horas e as demais períodos inferiores a 2 horas. Na levedura a maioria das proteínas apresentaram cerca de 20 horas de semi-vida, sendo que a proteína M apresentou 30 minutos e as proteínas NS1 e NS4B apresentaram 3 minutos apenas. Quando em contato com a *Escherichia coli* apenas a NS2B apresentou um período relevante que foi de 10 horas.

Antígenos	<i>in vitro</i>	Levedura	<i>Escherichia coli</i>
Capsídeo C	30 h	20 h	
Envelope E	4,4 h	20 h	
Membrana M	20 h	30 min	
NS1	1,1 h	3 min	
NS2a	30 h	20h	10 h
NS2b	1.9 h	20h	
NS3	1.9 h	20h	
NS4a	30 h	20h	
NS4B	1,4 h	3 min	
NS5	30 h	20h	

Tabela 3. Avaliação da semi vida de cada proteína pelo ProtParam tool.

3.2 Obtenção dos epítomos imunodominantes

Com a sequência dos aminoácidos das dez proteínas o software IEDB foi utilizado no intuito de obter epítomos imunodominantes de células T. Na tabela 4 está presente a quantidade de epítomos encontrados para cada uma das proteínas no IEDB.

Proteína	Código no NCBI	Epítosos imunodominantes	Mediana percentil >8.5	Mediana percentil <8.5	Total de Epítosos
Capsídeo C	YP_009227196.1	IKKFKKDLAAMLRII LAFLRFTAIPSLGL HGPIRMVLAILAFLR MVLAILAFLRFTAIC EEIRRIRIVNMLKRG IRIVNMLKRGVARVN KDLAAMLRIINARKE GLLLGHGPIRMVLAI PLGGLKRLPAGLLL ALGGVMIFLSTAVSA MSWFSQILIGTLLVW IHQIFGAAFKSLFGG VGRITANPVITEST AAFTFTKVAETLHG GLDFSDLYLTMNNK DLYLTMNNKHWLVH QPENLEYRIMLSVHG QILIGTLLVWLGLNT MDKLRLKGVSYSLCT	5	4	9
Envelope E	YP_009227198.1	VIYLV MILLIAPAYS SQKVIYLV MILLIAP ENWIFRNPGFALVAV KAISFATTLGVNKCH HLIKVENWIFRNPGF	9	1	10
Membrana M	YP_009227197.1	GTGVFIYNDVEAWRD GVFHTSVWLKVREDY KNDTWRLKRAHLEM EDHGFGVFHTSVWLK	3	2	5
NS1	YP_009227199.1	GFALAWLAIRAMAVP KIIMSTSMVLLVMI WLAIRAMAVPRTDNI MVLINGFALAWLAIR AAFKVRPALLVSFIF KLVILMGATFAEMNT LGVLVILLMVQEGLK KRMTTKIIMSTSMV ALPILAAALTPARGT HLALVAAFKVRPALL GGDVAHLALVAAFKV VKKNLPPFVMAALGLTA PRESMLLALASCLLQ	4	0	4
NS2A	YP_009227200.1	RTDNIALPILAALTP SCLLQTAISALEGDL LLALASCLLQTAISA LEGDLMVLINGFALA RPALLVSFIFRANWT MDHFSLGVLVILLMV LGGFMSDLAKLVIL PFVMAALGLTAVRVVD MSDLAKLVILMGATF VSFIFRANWTPRESM LGLTAVRVVDPINVV VRVVDPINVVGLLLL INVVGLLLLTRSGKR LVVMILGGFMSDLA LARGTLLVAWRAGLA	23	5	28

NS2B	YP_009227201.1	EILKVVVLMIAICGMN VVLMAICGMNPIAIP PMAAVGLLIVSYVVS FAAGAWYVYVKTGKR IEMAGPMAAVGLLIV RLRTVILAPTRVVAA LPVWLAYQVASAGIT GVYRVMTRRLLGSTQ NIYLQDGLIASLYRP DGERVILAGPMPVTH RMLLDNIYLQDGLIA VPNYNLNIMDEAHFT MCHATFTSRLLQPIR HWLEARMLLDNIYLQ FHTMWHVTKGAALRS EAIKKRLRTVILAPT FTSRLLQPIRVPNYN QEWDFVITTDISEMG LRGLPVRYMTTAVNV GLSEVQLLAVPPGER AARGYISTRVEMGEA ACVLIVVFLLLVLI VFLLLVVLIPEPEK SAWLMWLSEIEPARI LGIFFVLMRNKGIGK FLLLVVLIPEPEKQR LGTVSLGIFFVLMRN MLLGLLGTVSLGIFF TGSRPYKAAAQLPE FQEIDNLAVLMRAE EPARIACVLIVVFL MGFGMVTLGASAWLM PLTLIVAILLVAHY GQVLLIAVAISSAVL VAIILLVAHYMYLIP PASAWAIYAALTTLI LVAHYMYLIPGLQAA YSQLTPLTLIVAIL IFRGSYLAGASLIYT IAVAISSAVLLRTAW AIYAALTTLITPAVQ LMMGCYSQLTPLTLI GALITAATSTLWEGS DIDLRPASAWAIYAA SYNNYSLMAMATQAG MYLIPGLQAAAARAA SLMAMATQAGVLFGM TSLCNIFRGSYLAGA VEKKMGQVLLIAVAI PNKYWNSSTATSLCN LTTLITPAVQHAVTT YLAGASLIYTVTRNA	5	0	5
NS3	YP_009227202.1	MCHATFTSRLLQPIR HWLEARMLLDNIYLQ FHTMWHVTKGAALRS EAIKKRLRTVILAPT FTSRLLQPIRVPNYN QEWDFVITTDISEMG LRGLPVRYMTTAVNV GLSEVQLLAVPPGER AARGYISTRVEMGEA ACVLIVVFLLLVLI VFLLLVVLIPEPEK SAWLMWLSEIEPARI LGIFFVLMRNKGIGK FLLLVVLIPEPEKQR LGTVSLGIFFVLMRN MLLGLLGTVSLGIFF TGSRPYKAAAQLPE FQEIDNLAVLMRAE EPARIACVLIVVFL MGFGMVTLGASAWLM PLTLIVAILLVAHY GQVLLIAVAISSAVL VAIILLVAHYMYLIP PASAWAIYAALTTLI LVAHYMYLIPGLQAA YSQLTPLTLIVAIL IFRGSYLAGASLIYT IAVAISSAVLLRTAW AIYAALTTLITPAVQ LMMGCYSQLTPLTLI GALITAATSTLWEGS DIDLRPASAWAIYAA SYNNYSLMAMATQAG MYLIPGLQAAAARAA SLMAMATQAGVLFGM TSLCNIFRGSYLAGA VEKKMGQVLLIAVAI PNKYWNSSTATSLCN LTTLITPAVQHAVTT YLAGASLIYTVTRNA	15	1	16
NS4A	YP_009227203.1	LGTVSLGIFFVLMRN MLLGLLGTVSLGIFF TGSRPYKAAAQLPE FQEIDNLAVLMRAE EPARIACVLIVVFL MGFGMVTLGASAWLM PLTLIVAILLVAHY GQVLLIAVAISSAVL VAIILLVAHYMYLIP PASAWAIYAALTTLI LVAHYMYLIPGLQAA YSQLTPLTLIVAIL IFRGSYLAGASLIYT IAVAISSAVLLRTAW AIYAALTTLITPAVQ LMMGCYSQLTPLTLI GALITAATSTLWEGS DIDLRPASAWAIYAA SYNNYSLMAMATQAG MYLIPGLQAAAARAA SLMAMATQAGVLFGM TSLCNIFRGSYLAGA VEKKMGQVLLIAVAI PNKYWNSSTATSLCN LTTLITPAVQHAVTT YLAGASLIYTVTRNA	9	2	11
NS4B	YP_009227204.1	LMMGCYSQLTPLTLI GALITAATSTLWEGS DIDLRPASAWAIYAA SYNNYSLMAMATQAG MYLIPGLQAAAARAA SLMAMATQAGVLFGM TSLCNIFRGSYLAGA VEKKMGQVLLIAVAI PNKYWNSSTATSLCN LTTLITPAVQHAVTT YLAGASLIYTVTRNA	16	4	20

NS5	YP_009227205.1	WYMWLGARFLEFEAL	22	3	25
		VVTYALNTFTNLVVQ			
		NLVVQLIRNMEAEV			
		LNTFTNLVVQLIRNM			
		KYMDYLSTQVRYLGE			
		GSRAIWYMWLGARFL			
		KWKARLNQMSALEFY			
		RRDLRLMANAICSAV			
		TRQVMNIVSSWLWKE			
		GWSYYAATIRKVQEV			
		KSNIKSVSTTSQLL			
		ALAVIKYTYQNKVVK			
		GARFLEFEALGFLNE			
		INKVRSNAALGAIFE			
		IKVLCPYTSTMMETM			
		FAHALRFLNDMGKVR			
		LAKSYAQMWQLLYFH			
		EEPMLVQSYGWNIVR			
		LLYFHRRDLRLMANA			
		LGLQRLGYILEEMNR			
LEMQDLWLLRKPEKV					
AQMWQLLYFHRRDLR					
PIDDRFAHALRFLND					
LNQMSALEFYKKS					
GHRTLALAVIKYTYQ					

Tabela 4. Epítomos imunodominantes de células T preditos pelo IEDB

O IEDB forneceu a quantidade e os epítomos imunodominantes de células T, possibilitando a identificação dos antígenos com maior potencial de ativação da resposta imune adquirida. A maioria das proteínas que compõem o Zika Vírus, apresentaram uma quantidade relevante de epítomos de células T, onde a NS2A apresentou a quantidade mais elevada (28 epítomos). Em contrapartida, temos a NS1 que apresentou apenas 4 epítomos imunodominantes. Na tabela são indicados também a mediana percentil que segundo o programa as medianas acima de 8.5 são as de caráter efetivo, as que apresentam uma mediana inferior a 8.5 que estabelecida de acordo com os bancos de dados do programa, não possui grande efetividade no processo de ativação da resposta imune (IEDB, 2019). Os antígenos NS2A e NS5 se destacaram por terem acima da mediana cerca de 23 e 22 epítomos respectivamente. A NS1 e NS2B também são destacadas por não expressar nenhum epítomo com mediana inferior a 8.5 (Tabela 4).

Os epítomos imunodominantes, e sua identificação se torna importante para utilização como composição vacinal (OLIVA, 2012; SIRSKYJ *et al*, 2011). Esses dados são importantes por trazerem possíveis potenciais imunoprotetores contra a Zika. Diante desses resultados, é possível desenvolver tanto vacinas baseadas em proteínas recombinantes onde pode-se selecionar as que apresentaram maior potencial antigênico e que não foram classificadas como alergênicas.

Ao cruzar os dados com a obtenção de epítomos imunodominantes, pode selecionar as proteínas que apresentaram maior quantidade de regiões que podem ser reconhecidas pelo sistema imunológico. Com os resultados dos epítomos

imunodominantes ainda abre-se a possibilidade de utiliza-los como vacinas peptídicas, as quais vêm apresentando resultados interessantes e promissores em determinados vírus (ADHIKARI; TAYEB; RAHMAN, 2018; CASTELLI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; YASMIN; NABI, 2016).

Vacinas que utilizam proteínas recombinantes já são aplicadas a projetos que estudam aplicação e desenvolvimento vacinais contra determinados vírus como o HVB e o HPV (NACIMENTO; LEITE, 2012; PANAHI *et al.*, 2018). Atualmente vários trabalhos são realizados trazendo a predição *in silico* e análises de bioinformática para epítomos que podem ser utilizados em projetos de possíveis vacinas que sejam eficientes. Pesquisas realizadas com a utilização de análises a partir da bioinformática vêm crescendo continuamente, principalmente em patógenos que apresentam uma alta taxa de variabilidade como os vírus. Dessa maneira, com o uso de ferramentas torna-se possível diminuir o tempo de desenvolvimento, tornando de baixo custo e aumentando as chances de produção agentes profiláticos que sejam eficientes em ativar o sistema imune. Assim sendo a vacinologia reversa permite a identificação de potenciais imunógenos candidatos dentro da sequência genômica dos agentes etiológicos (SIRSKYJ *et al.*, 2011).

4 | CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos até o presente momento, conclui-se que as proteínas C e NS2b podem ser descartadas na utilização visando o desenho vacinal para o Zika Vírus, em decorrência de suas instabilidades e pouco potencial antigênico, assim como alergenicidade. Dentre as 10 proteínas analisadas, destacam-se as proteínas NS1, NS2A, NS4A, NS4B e NS5, como proteínas potenciais para um desenho vacinal eficaz. Ressaltando que demais ensaio *in silico* devem ser realizados para obtenção de mais informações, como por exemplo a localização desses epítomos nas proteínas e a interação dos mesmos com receptores imunológicos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, **Imunologia celular e molecular**. Brasil: Elsevier, 2015.

ADHIKARI, U. K.; TAYEB, M.; RAHMAN, M. M. Immunoinformatics Approach for Epitope-Based Peptide Vaccine Design and Active Site Prediction against Polyprotein of Emerging Oropouche Virus. **Journal of Immunology Research**. v. 2018, 2018.

Base de Dados de Epítomos Imune e Recursos de Análise (IEDB). Disponível em: <http://www.iedb.org>. Acessado em 11 de jun. de 2019.

BROGUEIRA, P.; MIRANDA, A. C.. Vírus Zika: Emergência de um Velho Conhecido. **Medicina Interna**, v.24, n.2, abr/jun.2017.

CASTELLI, M.; CAPPELLETTI, F.; DIOTTI, R. A.; SAUTTO, G.; CRISCUOLO, E.; PERARO, M. D. et

- al. Peptide-Based Vaccinology: Experimental and Computational Approaches to Target Hypervariable Viruses through the Fine Characterization of Protective Epitopes Recognized by Monoclonal Antibodies and the Identification of T-Cell-Activating Peptides. **Journal of Immunology Research**, v. 2013, 2013.
- DIKHIT, M. R.; KUMAR, A.; DAS, S.; DEHURY, B.; ROUT, A. K.; JAMAL, F.; SAHOO, G, C.; TOPNO, R. K.; PANDEY, K.; DAS, V. R.; BIMAL, S.; DAS, P. Identification of potential Class-II-Restricted Epitopes Derived from *Leishmania donovan* Antigens by Reverse Vaccinology and Evaluation of Their CD4+T-Cell Responsiveness against Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v.8, Dez. 2017.
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server of prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC informatics**, 2007.
- DROPPA-ALMEIDA, D. **Desenho vacinas peptídicas e recombinantes contra Linfadenite Caseosa**. 2018. 236 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)-Universidade Tiradentes, Aracaju.
- DROPPA-ALMEIDA, D.;FRANCESCHI, E.; PADILHA F. F. Biotechnological Potential Of The Use Of Synthetic Peptides In Vaccine Formulations Against Caseous Lymphadenitis, **Rev. Geintec**, V.8, N.4, 2018.
- DULGHEROFF, A. C. B.; VIEIRA, L. C.; COSTA, L. T. F.; CAVALCANTE, Y. A. Zika Vírus: O estado da arte. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.9, n.2, agosto, 2016.
- GARCIA; L. P.; DUARTE, E. Evidências da vigilância epidemiológica para o avanço do conhecimento sobre a epidemia do vírus Zika. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 25, n.4, p. 679-681, out-dez. 2016.
- GARG, V. K.; AVASHTHI, H.; TIWARI, A.; JAIN, P. A.; RAMKETE, P. W.; KAYASTHA, A. M.; SINGH, V.K. MFPPi- Multi FASTA ProtParam Interface, **Bioinformatics**, 2016.
- GEBRE, Y.; FORBES, N.; GEBRE, T. Zika virus infection, transmission, associated neurological disorders and birth abnormalities: A review of progress in research, priorities and knowledge gaps. **Asian Pac J Trop Biomed**, v.10, n.6, p. 815–824, 2016.
- GOURINAT, A. C.; CONNOR, O. O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C.; ROUZEYROL, M. D.. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, Jan. 2015.
- HAN, J.; QIU, Y.; YU, J.; WANG, H.; DENG, Y. Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. **Scientific Reports**, p. 3–8, March. 2017.
- IFNepitope. Disponível em: <http://osddlinux.osdd.net/raghava/ifnepitope/index.php>. Acessado em: 27 de junho de 2019.
- LAROCCA, R. A. et al. Vaccine Protection Against Zika Virus from Brazil. **Nature**, Author manuscript, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 2017.
- LEE, Y ; WOOLLEY, M.; YUN, S.; SONG, B. Zika virus : History , epidemiology , transmission , and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, 2017.
- LI, W.; JOSHI, M. D.; SINGHANIA, S.; RAMSEY, K. H.; MURTHY, A. K. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515–536, 2014.
- NASCIMENTO I. P.; LEITE L. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 45, p. 1102–1111, 2012.

National Center for Biotechnology information – NCBI. Disponível em: NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessado em: 20 de março de 2019.

OLIVA, Cíntia Bittar. **Evolução das quasiespécies da proteína NS5A do vírus da hepatite C genótipo 3a**. 2012. 65 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Microcefalia e vírus Zika. **Jornal de Pediatria**, v.9, n.22, p.103-105, 2016.

OLIVEIRA, F. V. B.; VERAS, L. B. S.; LIMA, M. A. Zika vírus: characteristic of the disease and diagnostic methods. **ReonFacema**, v.3, n.4, p. 754-759, 2017.

PANAHI, H. A. et al. A comprehensive *in silico* analysis for identification of therapeutic epitopes in HPV16, 18, 31 and 45 oncoproteins. **Plos**, v. 13, n. 10, 2018.

SAHA, S.; RAGHAVA, GPS. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Acids Res**, 2006.

SIRSKYJ, D. et al. Innovative bioinformatics approaches for developing peptide-based vaccines against hypervariable viruses. **Immunology & Cell Biology**, v. 89, p. 81-89, 2011.

TO, ALBERT; A LIANA O. MEDINA, A KENJI O. MFUH, A MICHAEL M. LIEBERMAN, A TERI ANN S. WONG, A MADHURI NAMEKAR, A, B EILEEN NAKANO, A, B CHIH-YUN LAI, A MUKESH KUMAR, A, B VIVEK R. NERURKAR, A, B AXEL T. LEHRERA, B. Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. **mSphere**, v.3, jan/fev. 2018.

YASMIN, T.; NABI, A. N. B and T Cell Epitope-Based Peptides Predicted from Evolutionarily Conserved and Whole Protein Sequences of Ebola Virus as Vaccine Targets. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, p. 321-337, 2016.

ZAHARLEVA, N.; DIMITRINOV, I.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. Immunogenicity Prediction by VaxiJen: A Ten Year Overview, **J. Proteomics Bioinformatics**, v. 10, n. 11, p. 298-310, 2017.

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE CANDIDEMIA EM PACIENTES SUBMETIDOS À INTERNAÇÃO NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS EM GOIÂNIA - GO

Lucas Daniel Quinteiro de Oliveira

Programa de Residência Multiprofissional em Saúde, Especialização em Urgência e Emergência, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Maria do Rosário Rodrigues Silva

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Benedito Rodrigues da Silva Neto

Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia – GO, Brasil.

Autor para contato: dr.neto@ufg.br

RESUMO: A candidemia é considerada umas das infecções mais graves ocorrente em ambiente hospitalar, causada por um fungo do gênero *Candida sp.*, comumente é encontrado na microbiota humana, porém apresenta ação oportunista que propicia acometimentos em pacientes imunocomprometidos. Atualmente está infecção é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade, representando 80% das infecções nosocomiais. Sendo que o tratamento apresenta algumas dificuldades, especificamente ao relacionar a manutenção do paciente no hospital, os custos farmacológicos e nos casos onde apresenta resistência

antifúngica, tornando a terapia ainda mais difícil e comprometendo a qualidade de vida devido a toxicidade dos fármacos utilizado no mercado. Foi realizada a análise epidemiológica das espécies de *Candida sp.* em amostras de pacientes suspeitos de candidemia. A análise epidemiológica durante o ano de 2014 a 2018 mostrou que durante esse período foram identificadas 68 hemoculturas positivas para o fungo do gênero *Candida*. Os dados mostraram que 42% dos pacientes eram idosos com mais de 60 anos e 8,8% eram recém-nascidos. Além disso algumas clínicas foram destaque sendo os locais com maior ocorrência de pacientes com candidemia, a clínica médica e pronto socorro com 51% e 14%, respectivamente. Nossos resultados iniciais demonstram que há variação nos resultados positivos de acordo o ano. Além disso, observa-se que a faixa etária idosa com mais de 60 anos foi a mais susceptível a infecções sanguínea e sistêmica, sugerindo que esse acontecimento seja devido a fatores como a deficiência imunológica e uso de imunossupressores que propiciam o processo de infecção fúngica.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida*, candidemia, epidemiologia.

EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF
CANDIDEMIA IN HOSPITALIZED PATIENTS

ABSTRACT: Candidaemia is considered one of the most serious infections occurring in the hospital environment, caused by a fungus of the genus *Candida* sp., Commonly found in human microbiota, but presents opportunistic action that provides involvement in immunocompromised patients. Currently this infection is responsible for high morbidity and mortality rates, representing 80% of nosocomial infections. Since the treatment presents some difficulties, specifically relating the maintenance of the patient in the hospital, pharmacological costs and cases where it has antifungal resistance, making therapy even more difficult and compromising the quality of life due to the toxicity of drugs used in the market. The epidemiological analysis of *Candida* sp. in samples from patients suspected of candidemia. The epidemiological analysis from 2014 to 2018 showed that during this period 68 positive blood cultures were identified for the *Candida* genus. The data showed that 42% of the patients were older than 60 years and 8.8% were newborns. In addition, some clinics were highlighted as the places with the highest occurrence of patients with candidemia, the medical clinic and emergency room with 51% and 14%, respectively. Our initial results show that there is variation in positive results by year. In addition, it is observed that the older age group over 60 years was the most susceptible to blood and systemic infections, suggesting that this event is due to factors such as immune deficiency and use of immunosuppressants that promote the process of fungal infection.

KEYWORDS: *Candida*, candidemia, epidemiology.

1 | INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são uma realidade comum no serviço hospitalar, especialmente as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*. Nesse contexto a identificação dos patógenos de todas as espécies clínicas destinadas ao laboratório apresenta relevância para esclarecer a desconfiança do clínico (PANWAR & FAUJDAR., 2016).

Segundo Colombo et al., (2013), as infecções causadas pelo gênero *Candida*, são denominadas de candidíases, e cogitadas como de interesse médico, pois apresentam alta frequência nas infecções causadas em hospedeiros humanos. A ação dessas leveduras é responsável por 80% das infeções relacionadas ao ambiente hospitalar e casualmente acometem a via sanguínea, trato urinário e sítios cirúrgicos.

As infecções encontradas no ambiente hospitalar podem ocorrer a partir de fonte endógena onde os pacientes adquirem o microrganismo no ambiente extra-hospitalar, via colonização própria ou através de procedimentos terapêuticos, onde profissionais de saúde veiculam esses patógenos (SANCHES et al., 1993; ASMUNSDÓTTIR et al., 2008). Na rotina hospitalar são encontrados diversos fatores que estão associados com a mortalidade, incluindo a presença de mecanismos

de ventilação mecânica, admissão em unidade de terapia intensiva, procedimentos cirúrgicos, terapia de hemodiálise, cateter intravascular, terapia corticosteroide e uso de fármacos tipo a anfotericina B (wang et al. 2016). Destaca-se que as infecções fúngicas estão diretamente relacionadas aos pacientes que apresentam imunodepressão e ou imunossupressão (CHUN-FANG & MA et al., 2013; PANWAR & FAUJDAR., 2016).

Alguns fatores contribuem para a patogênese da infecção, como a alta temperatura, o pH, a osmolaridade, a presença de oxigênio e o fornecimento de nutrientes, além disso alguns genes atuam a favor da virulência desta levedura e sobrevivência no ambiente (HUBE 2004; LEACH & COWEN 2013; POLVI et al., 2015).

Entre as espécies que tem apresentado destaque no ambiente hospitalar, a *C. auris* tem sendo sido encontrada colonizando diversos sítios do hospedeiro, encontrada no sangue, região nasal, biopsia de jejuno, secreção ocular, fluido biliar, cefalorraquidiano, peritoneal, pleural, urinária, vaginal, fragmento ósseo e em regiões da pele de pacientes assintomáticos (Lee et al. 2011; Chowdhary et al. 2013; Borman et al. 2016; Vallabhaneni et al. 2017).

Diante a atividade invasiva e capacidade de causar infecção sistêmica, as unidades de saúde tem utilizado de com maior frequência no tratamento das candidemias e diante disso esse fungo tem apresentado resistência diante das três classes de antifúngicos (Borman et al. 2016; Forsberg et al. 2018).

Alguns estudos tem relatado casos de resistência envolvendo os EUA e India, observando dados de 90% de isolados resistentes ao fluconazol, 30% para anfotericina B e 5% em equinocandinas (Chowdhary et al. 2018; Forsberg et al. 2018).

As Candidas são fungos comensais, com característica oportunista, apresenta-se em forma de leveduras, podendo possuir brotamentos e pseudohifas, devido ao dimorfismo observado principalmente na espécie *Candida albicans* (Sardi et al 2013). Essa habilidade mostra um dos fatores de favorece a virulência das leveduras, sendo que a forma unicelular é mais encontrada quando a leveduras está em atividade comensal e as hifas juntamente com as pseudo-hifas são relacionadas a capacidade invasiva (Thompson et al. 2011).

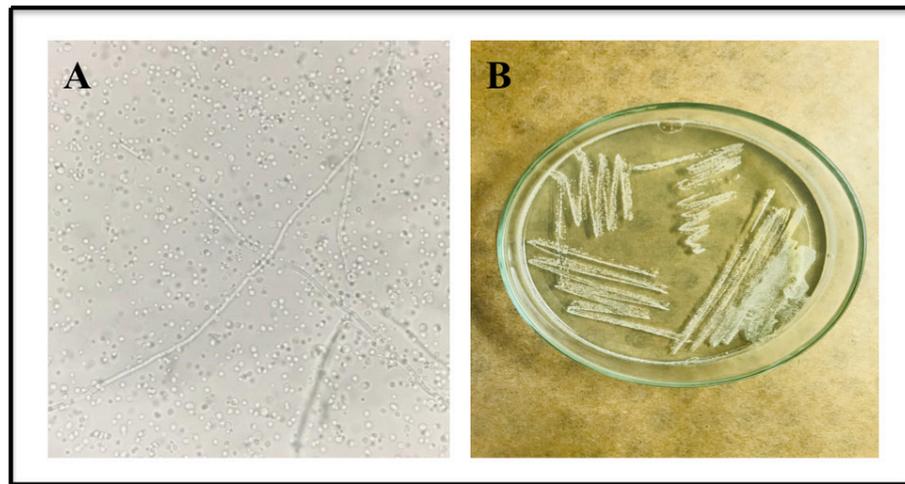


Figura 1 - Microscopia mostrando leveduras e pseudohifas (A) e Colônias brancas característica do gênero *Candida* (B) (Aumento 400x).

A patogenicidade das leveduras do gênero *Candida* tem sido relacionada a alguns fatores de virulência que contribuem para atividade invasiva, destacando a produção de enzimas hidrolíticas (proteinase, fosfolipase e hemolisinas), além disso esse fungo possui a capacidade de aderência com as células do hospedeiro e sofrer alterações morfológicas causadas por mudanças fenotípicas proveniente do efeito *switching* (LIM *et al.*, 2012).

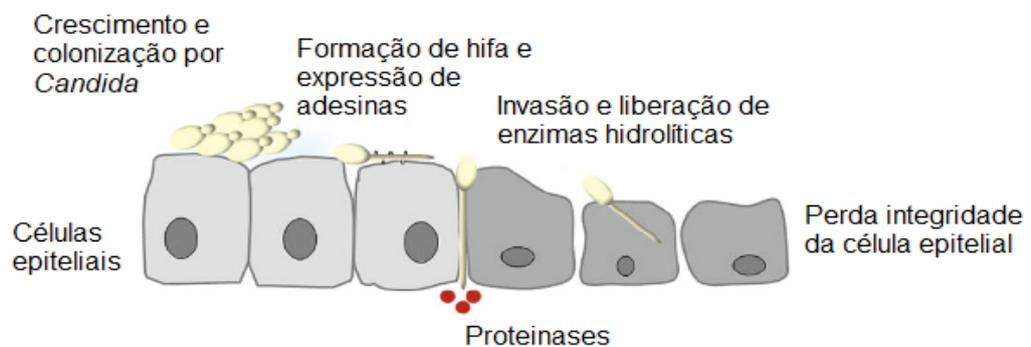


Figura 2 - Etapas da patogênese do gênero *Candida* sp.

Fonte: (Adaptado de HOFS *et al.* 2016).

A capacidade das leveduras formar biofilme está envolvida no estabelecimento da infecção, sendo que o biofilme são aglomerados microbianos organizados em uma matriz polissacarídica, responsável por contribuir para resistência antifúngica, devido a limitação da interação fármaco com fungo e sobrevivência em ambiente hostil para as leveduras (MARTINEZ & FRIES 2010; FINKEL & MITCHELL 2011; SENEVIRATNE *et al.* 2016).

O gênero *Candida* também utiliza as enzimas hidrolíticas para desempenhar atividade de lesão tecidual, favorecendo a manutenção da candidíase e sobrevivência do fungo. Diante disso as enzimas a exemplo da fosfolipase atua sobre moléculas

de fosfolípidos contidos na membrana plasmática das células do hospedeiro, a proteinase apresenta atividade lítica em ligações peptídicas das proteínas principalmente da superfície celular e assim favorecendo a patogênese fúngica (SILVA *et al.* 2011).

As hemolisinas são fundamentais para a instalação dos sintomas, sendo que possui capacidade de causar a lise das hemácias, conseqüentemente ocorre a liberação de ferro que é um elemento essencial para a implementação da infecção (KUMAR *et al.* 2009).

As manifestações clínicas do paciente acometido pela infecção causada pela levedura são inespecíficas, a partir da relação com outros microrganismos, porém são observados sintomas observados em pacientes hospitalizados a manifestação de febre, hipotensão, taquicardia, calafrios, endocardite, endoftalmite, peritonite, lesões cutâneas em diversos locais do corpo (COLOMBO *et al.*, 2006; GOMEZ *et al.*, 2010).

O diagnóstico precoce das infecções invasivas é fundamental para um tratamento eficiente, sendo que 50% dos casos de candidemias não são detectados, mas apresentam suspeitas clínicas. Essas infecções têm apresentado destaque devido as altas taxas de morbidade e mortalidade no ambiente hospitalar (EGGIMANN *et al.*, 2003; NOVAK & PLESKO 2016).

O método para diagnóstico é a detecção da *Candida* na corrente sanguínea é a hemocultura, sendo que este isolamento apresenta 100% de especificidade (CAREY *et al.*, 2008). Existe outros testes que auxiliam na identificação do microrganismo, neste caso os métodos moleculares como a PCR possuem a sensibilidade de 100% e especificidade 97% sendo que no período de 24 a 48 horas é possível obter um resultado conclusivo (ÇERIKÇIOĞLU *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2012).

Alternativas como a detecção das moléculas de β -D-glucana que está constituída na parede celular das leveduras, podendo ser identificadas no soro do paciente em momentos de infecção ascendente (POSTERARO *et al.*, 2011).

No entanto os testes sorológicos tipo a pesquisa de antígeno manana e anti-manana possuem maior agilidade no diagnóstico pois apresentam menor tempo de identificação, sendo que o tempo é fundamental para a eficácia da terapêutica e sobrevivência do paciente (MIKULSKA *et al.*, 2010; TAUR *et al.*, 2010).

Atualmente o serviço de saúde utiliza três tipos de medicamentos antifúngicos para o tratamento das infecções causadas pelo gênero *Candida*, entre esses os derivados azólicos é o mais utilizado, seguido dos poliênicos e equinocandinas (DELATTIN *et al.*, 2014).

O grupo dos derivados azólicos é formado por alguns antifúngicos como o fluconazol (FLC), itraconazol de primeira geração e voriconazol, pozaconazol representando a segunda geração, além de vários outros, cujo mecanismo de ação é alteração da biossíntese do ergosterol, componente estrutural da membrana celular da *Candida*. Através de uma ação fungistática, que inibe a enzima lanosterol

14- α -demetilase ocorre o comprometimento da formação desta estrutura devido ao acúmulo de lanosterol e redução do ergosterol, resultando em uma membrana celular incompleta e ineficiente (GIAVINI & MENEGOLA 2010; FERREIRA *et al.*, 2013).

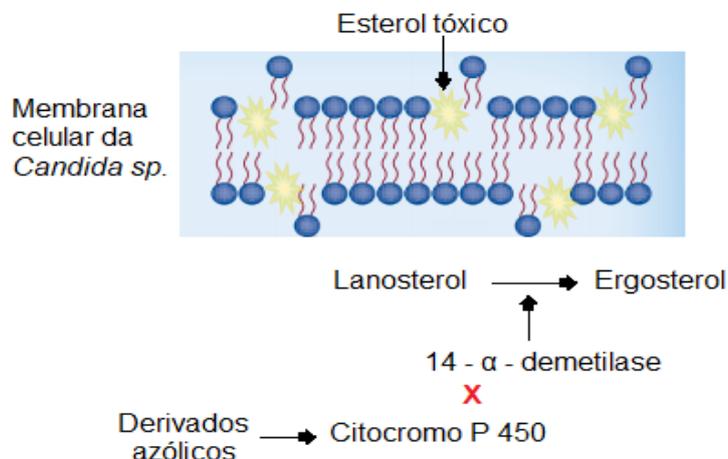


Figura 3 - Mecanismo de ação dos derivados azólicos na enzima 14- α -demetilase, inibindo a demetilação do lanosterol em ergosterol e formando esteróis tóxicos na membrana.

Fonte: (Adaptado Xie et al, 2014).

Os agentes poliênicos são representados pelos fármacos anfotericina B (AmB) e nistatina, essa classe possui mecanismo de ação direto na permeabilidade da membrana plasmática fúngica, causando a formação de poros através da ação no ergosterol, que é um esteroide constituinte da membrana celular. Esta alteração causa um comprometimento estrutural da célula, devido o escape de nutrientes como íons e metabolitos, resultando na morte da levedura (BRAJTBURG *et al.*, 1990). Além disso a ação deste antifúngico pode causar em estresse oxidativo, através da formação de espécies reativas de oxigênio como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que favorecem a oxidação da membrana lipídica do fungo (LAMY-FREUND *et al.*, 1985).

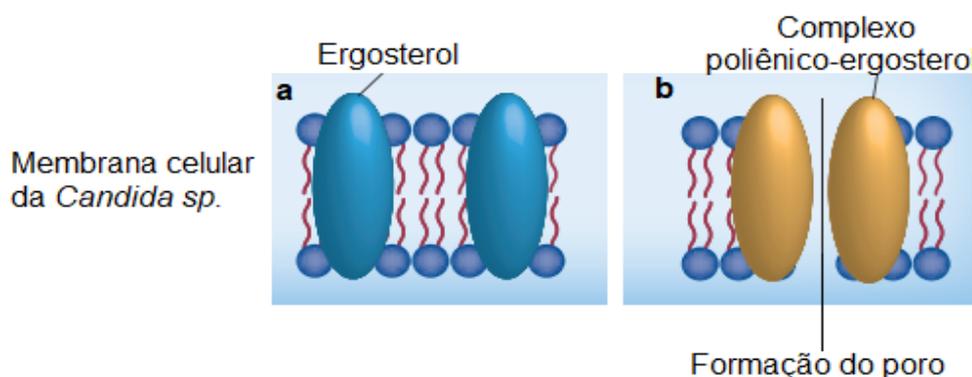


Figura 4 - Mecanismo de ação dos poliênicos, mostrando membrana celular íntegra (a) e a formação do poro após interação com o ergosterol, resultando no desequilíbrio da permeabilidade celular (b).

Fonte: (Adaptado Xie et al, 2014).

Os fármacos representantes das equinocandinas, as caspofungina, micafungina e anidulafungina, são medicamentos exclusivos para administração parenteral e possuem mecanismo de ação como inibidores da parede celular (NUCCI *et al.*, 2013). A ação desta classe está diretamente relacionada a interação com a proteína FKS que resulta na inibição da sua atividade, causando mudanças funcionais nos genes FKS1, FKS2 e FKS3 que estão envolvidos na síntese da enzima 1,3- β -D-glucana sintases que auxilia na formação do polissacarídeo 1,3- β -D-glucana, constituinte da parede celular do fungo (KATIVAR *et al.*, 2006).

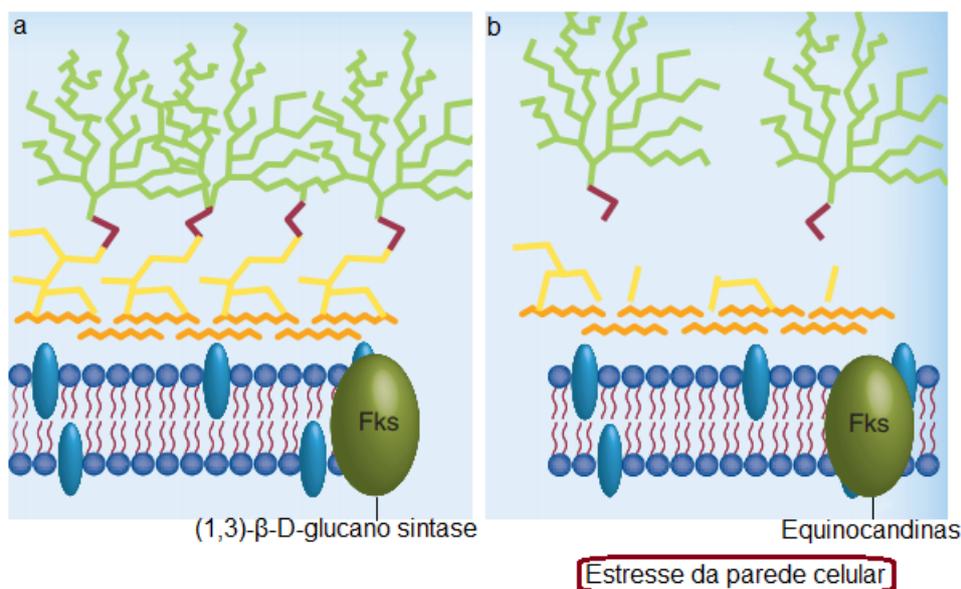


Figura 5 - Mecanismo de ação das equinocandinas na enzima 1,3 – β D – glucano sintase, causando a destruição da parede celular.

Fonte: Adaptado de (Xie et al. 2014).

Mesmo com o avanço das terapias e diversidade dos antifúngicos existentes, são as altas taxas de mortalidade relacionadas as infecções fúngicas invasivas, atingindo índices maiores que 50% dos casos que elevam a importância da necessidade de buscar alternativas para solucionar este problema (BROWN *et al.*, 2012).

Os casos de candidíase têm evidenciado mudanças no perfil dos casos de infecções relacionadas a leveduras do gênero *Candida*, sendo que tem demonstrado que a espécie como *Candida albicans* está mais relacionada a candidemia, além disso apresentam resistência a fármacos, como fluconazol, equinocandinas e anfotericina B (QUINDÓS 2014). Na América Latina, especialmente no Brasil, os estudos demonstram que em cada 1000 internações realizadas em hospitais 1,38 dos casos estão relacionados a candidemia, além disso as infecções podem ser causadas pela ação de espécies como: *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida Glabrata*, (NUCCI *et al.*, 2013).

Devido a diversidade de patógenos causadores de infecções nosocomiais, os microbiologistas devem familiarizar em prol da identificação correta de cada espécie,

a fim de propiciar um prognóstico e terapia eficaz (PFALLER & DIEKEMAA 2010).

Neste estudo os dados sociodemográficos determinantes para caracterizar a presença de infecções por *Candida* no hospital, foram analisadas estatisticamente com intuito de esclarecer a presença de candidemias e candidíase sistêmica em cada clínica analisada e esclarecer a relevância deste quadro infeccioso para a rotina hospitalar.

No Brasil os hospitais demonstram números expressivos, quando relacionada a candidemia com risco de óbito, principalmente se a infecção estiver associada com outras doenças de base, por isso é relevante destacar a execução correta e rápida na identificação das espécies para auxiliar o tratamento adequado. Deste modo analisamos aqui a prevalência das espécies de *Candida* em pacientes diagnosticados com candidemia em cada clínica do hospital.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo

Este trabalho representa um estudo epidemiológico quantitativo de caráter descritivo.

2.2 Local do estudo

Pacientes adultos atendidos no Hospital das Clínicas em Goiânia, estando submetidos a internação nas clínicas médica, cirúrgica, ortopédica, maternidade, pronto socorro adulto, tropical, unidade de terapia intensiva médica e cirúrgica, no período de janeiro a novembro de 2019.

2.3 Desenvolvimento do estudo e coleta de dados

Serão analisados todos os dados de pacientes internados em todas as clínicas que obtiveram solicitação médica para coleta de hemocultura e com suspeita de infecção por leveduras do gênero *Candia sp.* via corrente sanguínea.

2.4 Desenvolvimento do estudo e coleta de dados

A pesquisa e aquisição dos dados epidemiológicos relacionados a hemoculturas dos anos de 2014 e 2015 foi realizada a partir do sistema de informatização laboratorial o software Laudos (Brasil), esse sistema contém armazenado todos os dados relacionados a coleta, amostras, dados do paciente e resultados. Também foi utilizado o software SCIH (Brasil) para localização a origem do paciente que utiliza o sistema internação do hospital das clínicas da UFG.

2.5 Análise estatística

Também será utilizado o software Graph Prism versão 5.01 (San Diego, CA, EUA), expressos em média e desvio padrão. Os valores obtidos em cada grupo serão analisados pelos testes de análise de variância ANOVA (dados paramétricos), Mann-Whitney (não paramétricos) e pós teste o Tukey. As análises considerarão como parâmetro de resultados significativos o $p < 0,05$.

2.6 Aspectos éticos

Os resultados aqui apresentados fazem parte de um projeto guarda-chuva o qual foi submetido na Plataforma Brasil para avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG, CEP/HC/UFG, a fim de avaliar aspectos éticos do estudo envolvendo humanos. O parecer favorável possui número 3.420.627, CAAE: 06071919.9.0000.5078.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos foram adquiridos no sistema informatizado Laudos localizado no laboratório de análises clínicas do HC, onde são depositadas todas as informações sobre a identificação microbiológica da seção de microbiologia, além disso são anexados alguns dados sobre a internação dos pacientes.

Neste contexto, esse trabalho analisa as diversas espécies do gênero *Candida*, suspeitas de candidemia ou candidíase sistêmica identificadas por metodologias da rotina laboratorial como: as técnicas de cultura, fenotipagem, microscopia e sistema de automatização.

3.1 Hemoculturas positivas em 2014

Os dados para o ano 2014 mostraram que houve identificação de 11 amostras de hemoculturas contendo o fungo do gênero *Candida*, sendo que a espécie mais encontrada foi a *C. albicans* correspondendo a 72,7% dos achados.

Além disso quanto a faixa etária dos pacientes que apresentaram infecção pelo gênero *Candida* observamos que em recém-nascidos abaixo de 1 ano foi de 45,4%, enquanto que para idosos acima de 60 anos foi de 36,3% das amostras positivas (Tabela 1).

n°	Sexo	Idade	Espécies	Coleta	Local de internação	Cidade	Bairro
1	F	19	<i>C. albicans</i>	21/02/2014	Pronto socorro	Itumbiara-Go	Bairro Social
2	M	20	<i>C. krusei</i>	06/04/2014	Hemodiálise	Aparecida de Goiânia-Go	Vera Cruz
3	M	63	<i>C. albicans</i>	15/04/2014	UTI médica	Aparecida de Goiânia-Go	Vera Cruz
4	F	61	<i>C. albicans</i>	26/05/2014	Clínica médica	Jataí-Go	Santa Maria
5	F	< 1	<i>C. albicans</i>	28/05/2014	Pronto socorro	São Miguel do Araguaia-Go	Vila Martins
6	F	61	<i>C. albicans</i>	01/06/2014	Clínica médica	Jataí-Go	Santa Maria
7	F	61	<i>C. albicans</i>	04/06/2014	Clínica médica	Jataí-Go	Santa Maria
8	F	< 1	<i>C. krusei</i>	18/06/2014	Pronto socorro	Goiânia-Go	Vila Concordia
9	F	< 1	<i>C. albicans</i>	22/06/2014	Pronto socorro	Trindade-Go	Vila Boa
10	F	< 1	<i>C. albicans</i>	25/06/2014	Pronto socorro	Trindade-Go	Vila Boa
11	F	< 1	<i>C. krusei</i>	25/06/2014	Pronto socorro	Goiânia-Go	Vila Concordia

Tabela 1: Dados relacionados a identificação das leveduras do gênero *Candida* no ano de 2014 no Hospital das Clínicas.

Estudos realizados por Corcione et al. 2019, durante 2013 a 2016 demonstraram que casos de candidemia presente em 17,2% dos casos nosocomiais, além disso pode estar relacionada a infecções conjuntas especialmente com *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* e *klebiesa Pneumeumoniae*. Destacando que a espécie mais evidente foi a *C. albicans* com 54% dos isolados.

Os resultados do ano de 2014 indicaram casos de hemocultura positiva de internados residentes no estado de Goiás, sendo que 27% dos resultados positivos eram de pacientes da cidade de Jataí - GO. Além disso foi observado que 81% dos pacientes eram do sexo feminino.

Diante das informações analisadas, as amostras positivas foram encontradas em diversas clínicas, entre essas a mais evidente foi o pronto socorro com 55% apresentavam o fungo (Figura 6).

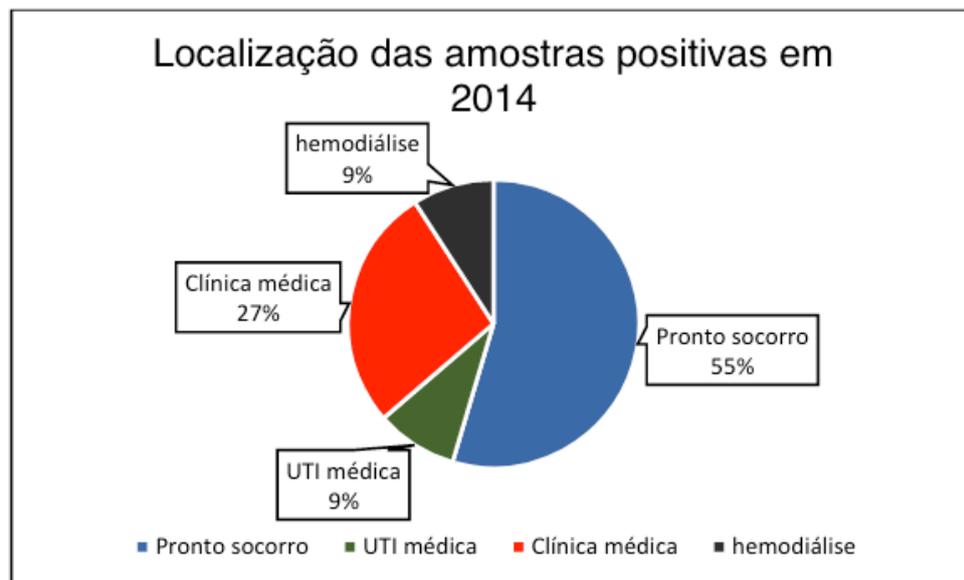


Figura 6 - Perfil das amostras coletadas no Hospital das Clínicas de Goiânia – GO, contendo o fungo do gênero *Candida* em 2014.

Sriphannam et al. 2019 também analisaram um total de 84 isolados do gênero *Candida* a partir de hemoculturas proveniente de infecção nosocomial, identificando 44.1% para *C. albicans*, *C. tropicalis* (35.7%), *C. parapsilosis* (9,5%), *C. glabrata* (7.1%) e *C. guilhermondii* (3,6%), também constataram que *C. albicans* foi 100% susceptível aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

Estudos realizados em um hospital português entre 2016 e 2017 relatam 117 casos de candidíase relacionada a infecção via corrente sanguínea associada a gravidades que ao paciente, as neoplasias, imunossupressão e procedimentos com utilização de cateter endovenoso. Diante disso as análises laboratoriais identificaram algumas espécies de leveduras relacionada as espécies *C. albicans* (51,3%), *C. glabrata* (22,2%), *C. parapsilosis* (15,4%), *C. tropicalis* 4,3%) e *C. lusitaniae* (2,6%) (Pinto-Magalhães et al. 2019).

3.2 Hemoculturas positivas em 2015

Em 2015 ocorreu uma redução no número de amostras positivas (6), porém os achados para *C. albicans* ainda prevaleceu como o mais encontrado, correspondendo a 66,6% das amostras. Diante disso, 83,3% dos pacientes com infecção via corrente sanguínea pelo fungo tinha idade superior a 60 anos (Tabela 2).

n°	Sexo	Idade	Espécies	Coleta	Local de internação	Cidade	Bairro
1	F	70	<i>C. albicans</i>	05/02/2015	UTI médica	Goiânia-go	Leste Universitário
2	F	70	<i>C. albicans</i>	05/02/2015	UTI médica	Goiânia-go	Leste Universitário
3	M	4	<i>C. parapsilosis</i>	25/02/2015	Pediatria	Goiânia-go	Nova América
4	M	77	<i>C. albicans</i>	17/03/2015	Clínica médica	São Miguel Araguaia-Go	Meia Ponte
5	M	66	<i>C. glabrata</i>	18/03/2015	Clínica médica	Goiânia-go	Jardim da Luz
6	M	76	<i>C. albicans</i>	08/10/2015	UTI médica	Senador Canedo-Go	Rio Araguaia

Tabela 2: Dados relacionados a identificação das leveduras do gênero *Candida* no ano de 2015 no Hospital das Clínicas.

De acordo com os dados levantados, os internados com hemocultura positiva eram do estado de Goiás, além disso, 66% dos pedidos desse exame foi dos pacientes de Goiânia. Também foi mostrado que 67% das amostras contendo o fungo era proveniente de pacientes do sexo masculino.

Lin et al. 2018 mostraram, em seu estudo com 166 pacientes submetidos a internação hospitalar e alguns (42,8%) diagnosticados com câncer, a presença do fungos na corrente sanguínea, onde identificaram a presença da espécie *C. albicans* em 42,8% das amostras, acompanhada da *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (22,8%) e *C. glabrata* em (14,5%).

Os dados encontrados em 2015 mostram que as amostras positivas encontradas em pacientes internados nas UTI médica e clínica médica corresponderam a 33% para cada clínica (Figura 7).

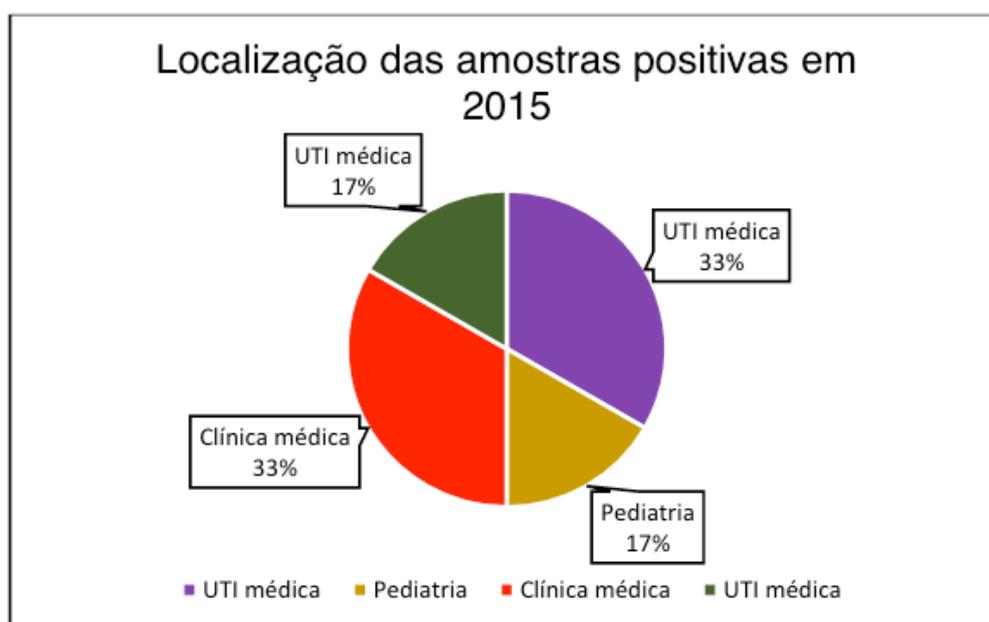


Figura 7 - Perfil das amostras coletadas no Hospital das Clínicas de Goiânia – GO, contendo o fungo do gênero *Candida* em 2015.

Análises realizadas em amostras (169) de hemocultura em pacientes diagnosticados com candidemia e caracterizando na maioria dos resultados, identificação da espécie *C. albicans* com 50,9% como uma das responsáveis pela mortalidade da infecção pelas leveduras do gênero *Candida*, outras espécies também foram encontradas a *C. tropicalis* (19,6%), *C. parapsilosis* (17,2%) e *C. glabrata* (9,2%) (Wang et al. 2016).

4 | CONCLUSÕES

A análise epidemiológica durante o período identificou 17 hemoculturas positivas para o fungo do gênero *Candida*. Os dados mostraram houve maior prevalência em idosos com mais de 60 anos e recém-nascidos. Algumas clínicas foram destaque para pacientes com cultura positiva para candidemia, dentre elas a clínica médica e pronto socorro.

A prestação do serviço de saúde para os pacientes do estado de Goiás foi o mais observado, especialmente para cidade de Goiânia que se destacou como a origem da maioria dos exames de hemocultura positiva.

Durante esse período o laboratório de análises clínicas identificou diversas espécies de *Candida*, destacando-se a *C. albicans*, seguido pela *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Outras espécies também foram encontradas, porém os valores são pouco expressivos.

O trabalho demonstra a importância de estudos minuciosos relacionados às micoses oportunistas. Novos estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa tem sido realizados no intuito de esclarecer ainda mais a epidemiologia das micoses nos anos mais recentes e na identificação/ análise de resistência das espécies isoladas no Hospital das Clínicas de Goiânia – GO.

REFERENCIAS

ÁSMUNDSDÓTTIR, L. R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; HARALDSSON, G.; GUO, H; XU, J.; GOTTFREDSSON, M. Molecular Epidemiology of Candidemia: Evidence of Clusters of Smoldering Nosocomial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. e17–e24, 2008.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.

CORCIONE S.; SEGALA F. V.; CASTIGLIONE A.; LUPIA T.; ANGILLETTA R.; CAVALLO R.; CICCONE G.; ROSA, F. G. Enteropathogenetic nosocomial infections: predisposing clinical characteristics and risk of recurrent infections. **Journal of Chemotherapy**. 1-7, 2019.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A.; MORETTI, M. L.; MORETTI, M. L. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: **Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.

HUBE, B. From commensal to pathogen: Stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 336–341, 2004.

LEACH, M. D.; COWEN, L. E. Surviving the Heat of the Moment: A Fungal Pathogens Perspective. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 1–4, 2013.

LIM, C. S. Y.; ROSLI, R.; SEOW, H.F.; CHONG, P. P. *Candida* and invasive candidiasis: Back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21–31, 2012.

LIN, S.; CHEN, R.; ZHU, S.; WANG, H.; WANG, L. ZOU, J.; YAN, J.; ZHANG, X.; FARMAKIOTIS, D.; TAN, X.; Mylonakis, E. Candidemia in Adults at a Tertiary Hospital in China: Clinical Characteristics, Species Distribution, Resistance, and Outcomes. **Mycopathologia**, 2018.

POLVI, E. J.; LI, T.; O'MEARA, T. R.; LEACH, M. D.; COWEN, L. E. Opportunistic yeast pathogens: Reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 12, p. 2261–2287, 2015.

GÓMEZ, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOSA, C.; RUIZ, J. Candidemias nosocomiales: Nuevos retos de un problema emergente. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 158–168, 2010.

PANWAR, S.; FAUJDAR, S. S. Prevalence , Distribution , Risk factors and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida* species in a Tertiary Care Hospital. **International Journal of Current Microbiology and a Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 329–337, 2016.

PINTO-MAGALHÃES S.; MARTINS A.; LACERDA S.; FILIPE R.; PRISTA-LEAO B.; PINHEIRO D.; SILVA-PINTO A.; SANTOS L. Candidemia in a Portuguese tertiary care hospital: Analysis of a 2-year period. **Journal de Mycologie Médicale**, 5, 2019.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

SANCHEZ, J.A. VAZQUEZ, D.B. JONES, L. DEMBRY, J.D. SOBEL, M. J. Z. Nosocomial Acquisition of. **The American Journal of Medicine**, v. 94, n. June, p. 577–582, 1993

SRIPHANNAM,C; NUANMUANG,N.; SAENGSAWANG,K.; AMORNTHIPAYAWONG,D.; KUMMASOOK, A. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. Isolated from blood cultures. **Journal de Mycologie Médicale**, 6, 2019.

WANG, T.Y.; HUNG, C.Y.; SHIE, S.S.; CHOU, P.C.; KUO, C.H.; CHUNG, F.T.; LO, Y.L.; LIN, S.M. The clinical outcomes and predictive factors for in-hospital mortality in non-neutropenic patients with candidemia. **Medicine**, 95:23, 2016.

ENTEROCOCCUS SP ISOLATED FROM AQUATIC ENVIRONMENT : RESISTANCE TO TOXIC METALS

Luciana Furlaneto-Maia

Docente do Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Londrina.

Gabriela Batista Gomes Bravo

Discente Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.

Sharise Beatriz Roberto

Discente Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.

Naiara de Oliveira Batista

Discente Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.

Alex Kiyomassa Watanabe

Discente Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.

Márcia Cristina Furlaneto

Docente do Programa de Pós-graduação em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT: Environmental pollution by toxic metals began due to the accelerated development of industrial activities through the irregular disposal of waste generated by activities such as mining, metallurgical processes, chemical industries, agriculture and also by

contaminated effluents. This pollution can affect human and other animal health through the accumulation of toxic metals in water, sediment and soil. Microorganism bioremediation stands out as a tool for the decontamination of toxic metal environments. The use of biosorption or bioaccumulating bacteria has gained much attention from researchers because of their potential to provide an effective and cost-effective means for the remediation of toxic metals. Therefore, the use of bacteria with proven remediation potential and survivability in the contaminated environment is of utmost importance for successful bioremediation. The objective of this project is to identify the biosorption capacity of toxic metals by bacteria of the genus *Enterococcus* sp isolated from the aquatic environment, by the analysis of toxic metal resistance by the Gradient Plate technique, following the maximum concentrations required by CONAMA Resolution 357/2005. The results showed that 93% of the isolates showed growth for zinc metal; 97.2% for copper and 98.6% for lead. These results reveal that the *Enterococcus* bacteria analyzed have resistance to the tested toxic metals characterizing a potential for bioremediation, considering that many bacteria found naturally in the environment may be closely related to the bioremediation process reducing the toxicity of the metals.

INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Enterococcus* are Gram-positive cocci that are arranged in pairs or short chains. They are facultative anaerobes and their growth can occur at different temperatures (10 to 45°C) and in high salt concentrations. They are often found in the gastrointestinal tract of humans in high concentrations in human and animal feces. They are opportunistic pathogens that cause thousands of infections, which pose great risks to human health. (AHMED et al, 2012; BOEHM, SASSOUBRE, 2014).

Kimiran-Erdem et al. (2006) described that a characteristic of these microorganisms is their resistance to physical and chemical stress, such as the presence of antibiotics and toxic metals, unlike other fecal bacteria that are found in the environment. Microorganisms have developed metal resistance and detoxification mechanisms for their survival due to the presence of toxic metals in the environment. Microbial resistance to metals can be divided into three categories: intrinsic resistance mechanisms (which do not require metal stress, resistance mechanisms that require metal stress, and resistance mechanisms that depend on the type of metal and its activation. Resistance determinants are encoded on the chromosome, but some can be encoded on mobile genetic elements such as plasmids and transposons (ROANE, et al., 2009).

Anthropogenic activities involving mining, improper waste disposal, effluents containing metals, application of pesticides and fertilizers in abundance, industries (metallurgical, batteries, chemicals, etc.) are the main causes of environmental pollution by toxic metals. Although metals are natural constituents of the earth and some of them are essential to the life of organisms, excess can have harmful effects on human health (Table 1) (KANG et al., 2016; KAR et al., 2008; MORAIS et al. , 2012; NAIK, DUBEY, 2013).

Conventional methods for removing toxic metals from the environment include precipitation, flocculation and filter membranes, but are costly processes. New technologies have been developed to reduce or recover environmental contamination by toxic metals, such as bioremediation by microorganisms. This process includes the degradation of the pollutant by biochemical reactions (HALTTUNEN, et al., 2006; PEREIRA and FREITAS, 2006).

Heavy Metals	Main polluting sources	Harm to human health
Copper (Cu)	Mining, Pesticide Production, Chemical Industries, Pipe Corrosion, Household Sewage, Algaecides, Fungicides and Metal Refining.	Anemia, Stomach and intestinal irritation, Liver and kidney damage and Poisoning.
Lead (Pb)	Pesticides, fumes, automotive emissions, mining, coal burning, painting, industrial effluents and tobacco.	Mental retardation in children, Encephalopathy, Congenital paralysis, Neuronal deafness, Nervous system damage, Gastrointestinal, liver and kidney damage, and Epilepsy.
Chrome (Cr)	Industrial Effluents, Aluminum & Steel Production, Inks, Explosive Pigments and Photography.	Allergies, Cancer and Poisoning.
Zinc (Zn)	Refineries, Mining, Waste Incineration and Metal Coatings.	Respiratory, Gastric and Cardiac Changes

Table 1: Heavy metals, their main polluting sources and their effect on human health.

adapted from Singh et al. (2011), Nies (1999) e Biondo (2008)

Bacteria are capable of remediating metal contaminated environments, including aquatic environments, sediment and soil. In soils and sediments such remediation may occur in situ or ex situ through metal oxidation or leaching, such as acid and sulfate production and volatilization. Bacteria utilize immobilization strategies including metal sequestration due to the ability of some intracellular or extracellular complex metal bacteria. Another way of immobilization is to create an anaerobic reduction or condition in the environment that results in the reduction or precipitation of the metal. In aquatic environments, the most common way of toxic metal bioremediation may be by the formation of microbial biofilm (ROANE, et al., 2009).

Bacteria adapt to toxic metals through a variety of resistance systems, mediated by chromosomes, transposon and plasmids. Some mechanisms of bacterial resistance to metals are: permeable barrier exclusion, intra- and extracellular sequestration, active transport or efflux pumps, and reduced sensitivity of cellular targets to metallic ions (Figure 1) (BRUINS, et.al, 2000).

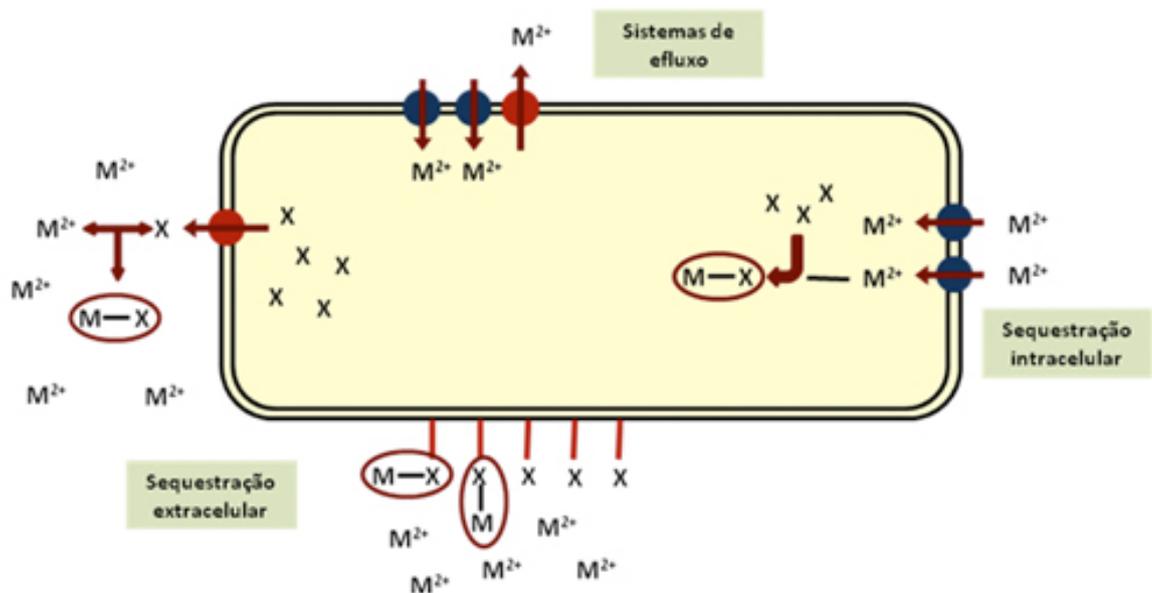


Figure 1 - Representative scheme of the main mechanisms of tolerance in bacteria; M⁺: toxic metal; X: Cell constituents that interact with metals.

Adapted from www.esb.ucp.pt/en/projects.

The exclusion mechanism impermeable barrier associated with changes in the cell wall and membrane. This mechanism is characterized as an attempt by the body to protect essential cellular components that are sensitive to metals (BRUINS, et.al, 2000).

Biosorption is a type of toxic metal bioremediation that can occur through the physicochemical interaction between the metal and the constituents of the membrane or cell wall of microorganisms, providing an alternative for treatment and recovery of contaminated areas (OISHI, 2014).

Some factors influence the biosorption mechanism of metals, such as biomass (living cells or non-living cells), types of biomaterials, chemical properties of metal solutions and environmental conditions such as pH and temperature. The metals biosorption process in living cells occurs into two procedures. The first is through the adsorption of metal ions on the surface of cells, before the metal ions adhere to the cell membrane or the cytoplasm adhere to cell wall containing a variety of polysaccharides and proteins which provide local assets that make ionic bonds. The second step, the metal ions penetrate the cell membrane and enter into the cells. The mechanisms involved in biosorption are coordination, complexation, ion exchange, physical adsorption and microprecipitation inorganic (Das et al., 2007).

The use of bacteria with proven remediation potential and survivability in the contaminated environment provides an alternative for treatment and recovery of contaminated areas. The present study aims to analyze the possible ability of *Enterococcus* bacteria to carry out biosorption of toxic metals, due to their survival characteristics in extreme environments.

OBJECTIVE OF PROJECT

This work aims to evaluate the resistance of *Enterococcus* sp. isolated from the aquatic environment to toxic metals (lead, copper, chrome and zinc) with potential for bioremediation.

METHODOLOGY

Study area

The municipality of Apucarana is located in the north central region of the state of Paraná. According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (2014), this municipality has an area of 558,389 km², BORDERING the municipalities of Arapongas, California, Cambira, Londrina, Mandaguari, Marilândia do Sul, Novo Itacolomi, Rio Bom and Sabáudia. The municipality still covers in its territory the districts of Correia de Freitas, Pirapó, São Pedro and Vila Reis.

The region has several rivers, streams and lakes used by the population for leisure and supply system (Figure 2). The studies concentrated on the Ivaí rivers (Corrego do Jaboti); Pirapó and Rio Bom (Ribeirão Biguaçu), because they cover the urban and rural areas.

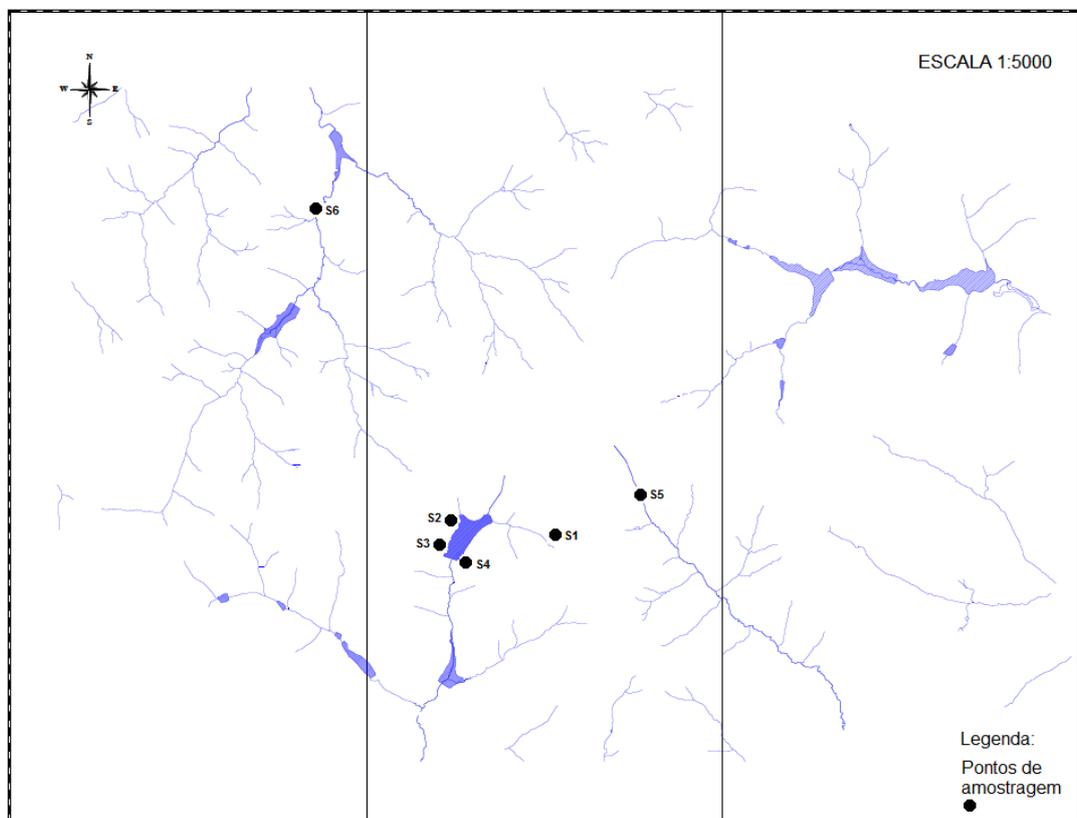


Figure 2 - Hydrographic map of the municipality of Apucarana / Paraná - Brazil. Source: Portal of the Apucarana City Hall, 2015

CHARACTERIZATION OF COLLECTION PLACES

Córrego Jaboti - Santo Expedito Echologic Park

The Jaboti stream (Santo Expedito Ecological Park) rises near the Cristo Rei Cemetery, leading to Jaboti Lake. At the stream site, Apucarana City Hall installed Parque Santo Expedito, which is characterized by religious tourism. Jaboti stream follows a valley bordered on its left bank by an agricultural area, and a partially urbanized area on its right bank.

The park has a playground, square, ecumenical chapel, stage, grotto with the image of Santo Expedito, gazebo with the image of Jesus Christ, sand soccer field, parking, water spout approximately 5m from the source of the stream. Jaboti, one of the spouts being the point of study (Figure 3); and due to this short distance it is considered as spring. The park also has natural water pools (PORTAL OF APUCARANA MUNICIPAL PREFECTURE, 2015).

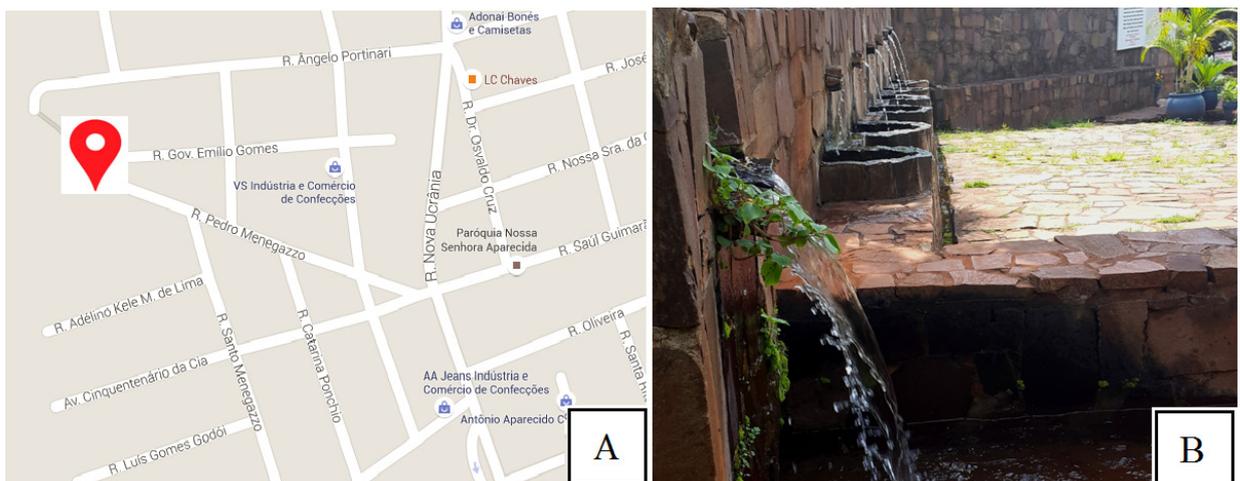


Figure 3 - Location of the collection point (Jaboti stream) (A) and stream overview (B). The red dot indicates the location of the Jaboti stream at the coordinates $23^{\circ}34'3.83''\text{S}$ / $51^{\circ}27'46.7''\text{W}$; altitude 773m.

Source: Google Earth.

Jaboti Lake

Three points were chosen for collection in Lake Jaboti, named points A, B and C (Figure 4). The Jaboti Park has afforestation and infrastructure, as well as a playground, outdoor gym, events room, toilets, snack bars, hiking trail, bike path, public telephone, watercraft, known as “pedal boat”, and fishing is allowed in this area. local, all to attract visitors to the area; in addition to the Apucarana Cultural and Sports Association (ACEA), this entire area being limited by Avenida Jaboti. A barragem para formação do lago foi construída na bacia do ribeirão Barra Nova, com

altura de 23m, comprimento de crista de 16m e largura da base de 155m. O local de vazão da barragem está situado na porção sul do lago (PORTAL DA PREFEITURA MUNICIPAL DE APUCARANA, 2015).

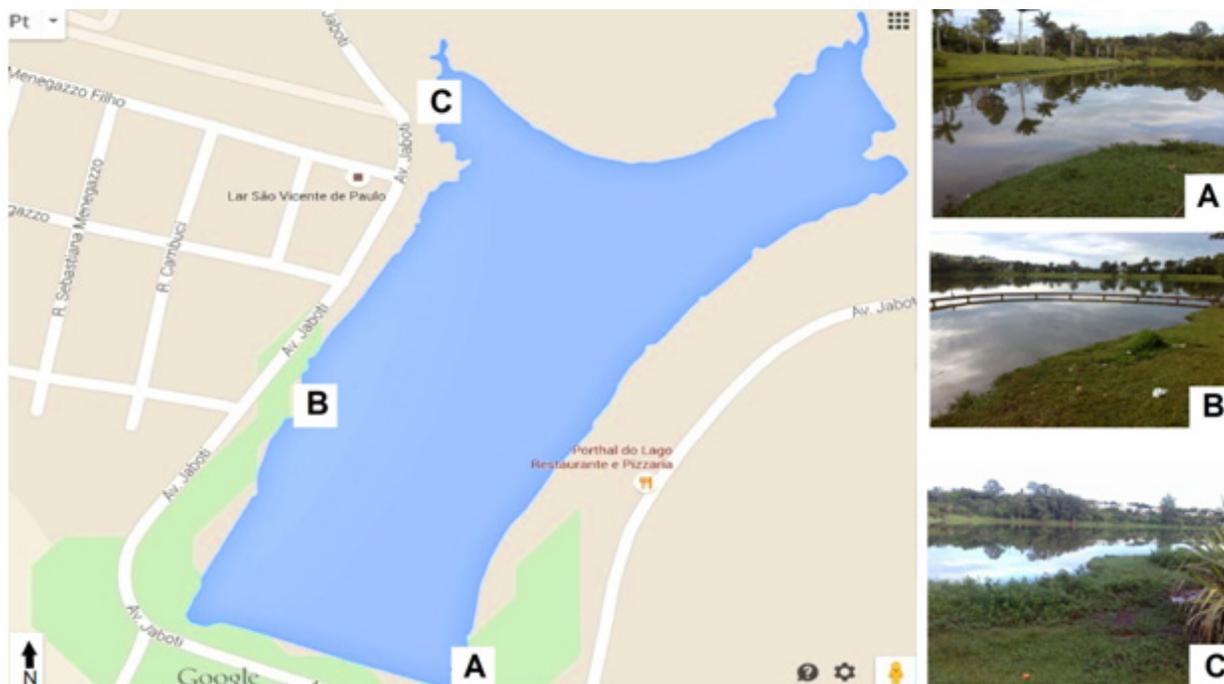


Figure 4 - Location and overview of collection points on Jaboti Lake. (A) at coordinates $23^{\circ}34'9.95''$ (S) / $51^{\circ}28'25.54''$ W; altitude 742m. (B) at coordinates $23^{\circ}34'2.36''$ S / $51^{\circ}28'31.2''$ W; altitude 742m. (C) at coordinates $23^{\circ}33'52.92''$ S / $51^{\circ}28'25.81''$ W; altitude 742m.

Source: Google Earth Adaptation.

Barreiro dam - redemption park

The supply of Apucarana is made through the Pirapó River, and surface springs, such as Caviúna stream, as well as Serra Geral aquifer wells. Redemption Park (Figure 5) is a religious theme park; The same is the revitalization of the degraded permanent preservation area on the banks of the Barreiro dam, belonging to the Pirapó river basin, which supplies Apucarana as previously mentioned, as well as the region. The park was established with the objective of revitalizing the surroundings of the old “dump” of the study city, as well as the recovery of the upper course of the Pirapó River.

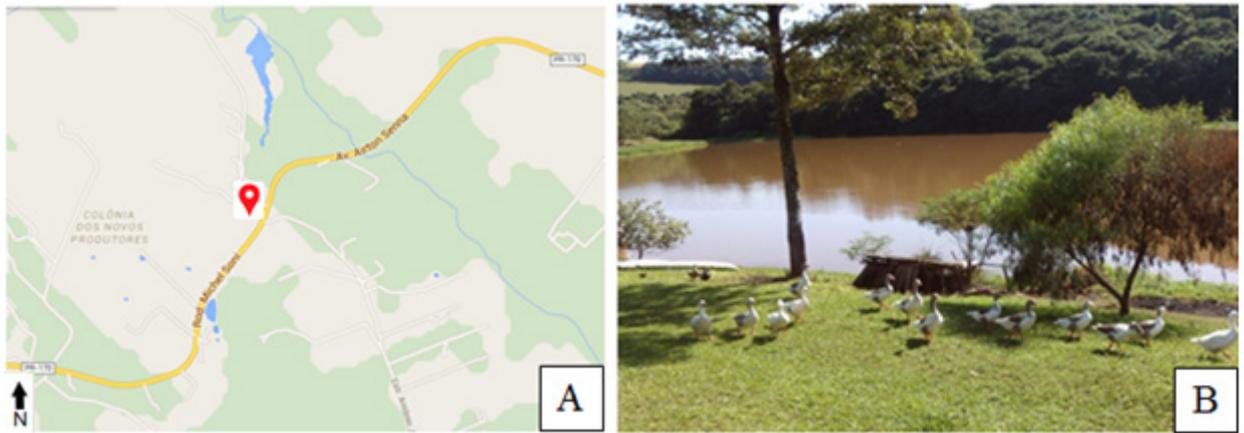


Figure 5 - Location of the collection point (Barreiro dam) (A) and overview of the repression (B). The red dot indicates the location of the dam at coordinates 23°31'13.97"S / 51°29'22.32"W; altitude 631m.

Source: Google Earth Adaptation.

Ribeirão biguaçu - park of the bible

Ribeirão Biguaçu (Bible Park) is another collection point (Figure 6), and it is one of the tourist elements of Apucarana that attracts people from other cities to visit it, not only being restricted to the local population (TORRES, 2013). According to Faria and Faria (2006), the Biguaçu river basin belonging entirely to the municipality of Apucarana - PR, being one of the tributaries of the Bom river.

The Biguaçu Valley was channeled through the erosion control program, as one of the streets that give access to the current Park (João Antonio Braga Cortes Street), on the outskirts of the "Country Club", was taken by a huge erosion; and this situation caused great inconvenience to the residents of the region, because people had to change the route until they reached the other side of the city (FERREIRA, 2006).

In the surroundings of the Biguaçu stream there is a region that is divided into two parks, the São Francisco de Assis Park and the Bible Park. These are religious themed environmental parks and have urban afforestation and landscaping, a fountain, trash cans, a hiking trail, a water mirror, benches, lamps and a locker room.



Figure 6 - Location of the collection point (Biguaçu stream) (A) and general view of the stream (B). The red dot indicates the location of the stream at the coordinates 23°33'31.54"S /

SAMPLE COLLECTION

One hundred twenty water samples were collected in the months of October and November 2014 and February and March 2015, predetermined in the previous items, according to occupation and use by the population. Water collection was carried out in polyethylene terephthalate bottles pretreated with 0.1% Tween 80 solution. After collection, the samples were packed in an isothermal box containing ice and sent to the UTFPR Microbiology Laboratory - Londrina campus.

QUANTIFICATION AND IDENTIFICATION OF *ENTEROCOCCUS SP.*

The densities of *Enterococcus sp.* were determined based on the filter membrane technique. To this end, 100 mL of water was filtered through a nitrocellulose membrane with 0.45 μm porosity and 47mm diameter (SARTORIUS STEDIM BIOTECH®). The membranes were deposited on the surface of the kanamycin esculin azide agar (KEA) culture medium (HIMEDIA) and incubated at 37 ° C for 24 / 48h.

The bacterial isolates were submitted to phenotypic identification tests: observation of the morphotintorial characteristics by Gram staining and catalase enzyme production, following protocol described by Facklam et al. (1999). Catalase enzyme production was verified by depositing a drop of hydrogen peroxide (3% v / v H_2O_2) on the bacterial suspension. The absence of bubble formation is indicative of negative reaction, characteristic of *Enterococcus sp.*

TOXIC METAL CONCENTRATIONS

Metal concentrations were defined according to CONAMA Resolution 357 of March 17, 2015, in its Art. 5 which classifies the bodies of water used for recreation and leisure between classes III and IV. Table 2 below shows the concentrations allowed by CONAMA Resolution 357/2005.

The solutions were prepared with sterile ultrapure water and filtered with 0.22 μm porosity disposable membranes and stored under refrigeration.

Toxic metal	Lead ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	Cooper (CuSO_4)	Zinc (ZnSO_4)	Chrome ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
concentrations (mg/L)	0,033	0,013	5	0,05

Table 2 - Toxic metal concentrations allowed by CONAMA Resolution 357/2005

GRADIENT PLATE TECHNIQUE

The gradient plate technique was used for initial tests to verify the possible resistance of the isolates to metals. According to Szybalski and Bryson (1952), this method evaluates the reduction in the amount of metals required for the experiment.

To assemble the plate, two layers of agar medium were used. The first lower layer is composed of 10 mL of Muller Hilton agar medium and is slanted gel (Figure 7A). The upper layer was composed of 20 mL of Muller Hilton agar plus metal solutions with the minimum concentrations required by the legislation described in Table 1, thus forming a metal concentration gradient (Figure 7B).

After mounting the plate, the isolates were inoculated in horizontal lines from the least concentrated to the most concentrated (Figure 7C).

Subsequently, bacterial isolates that presented resistance were inoculated in concentrations 10 to 40 thousand times higher than recommended by Conama.

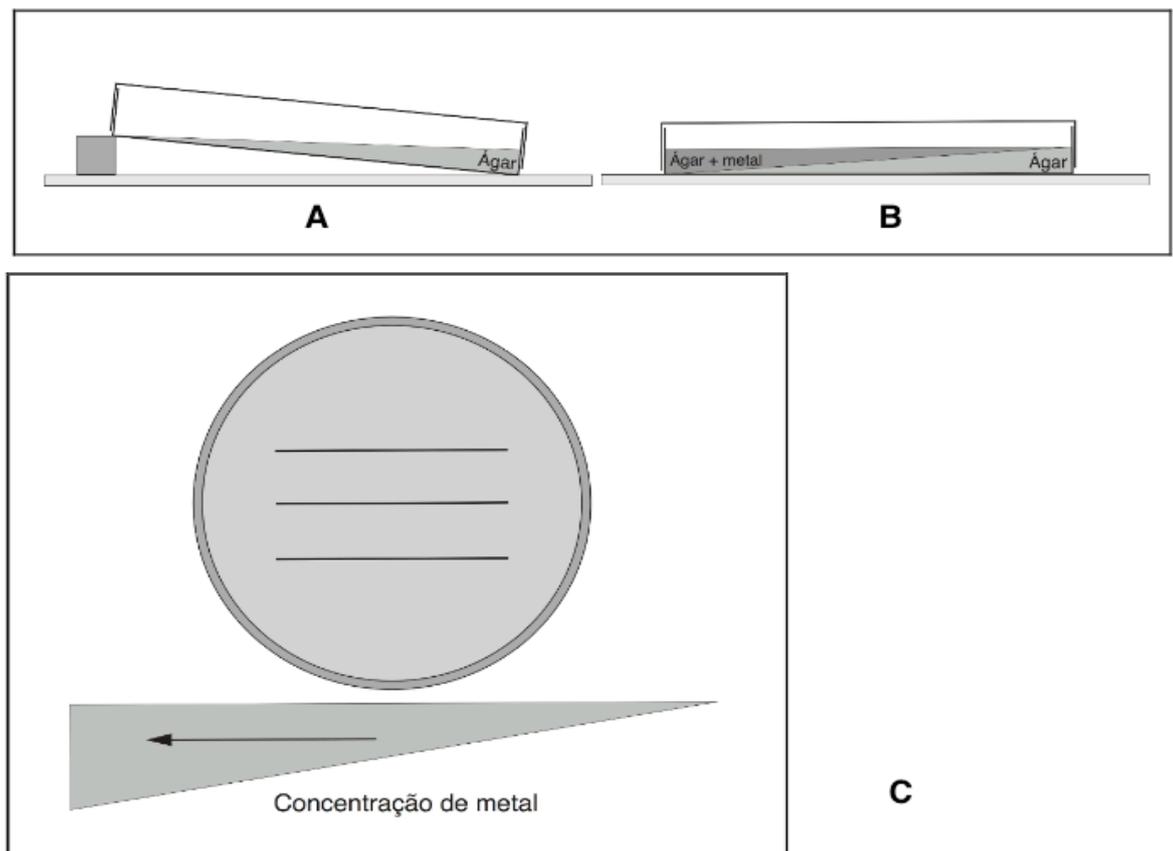


Figure 7 - Toxic metal gradient plate (A and B); C Representation of the inoculum lines on the gradient plate

RESULTS AND DISCUSSION

Characteristic colonies of *Enterococcus* sp. on KEA agar, they are black in color due to the hydrolysis of esculin in dextrose and esculetin, which reacts with ferric citrate producing a brownish black precipitate (Figure 8A). A total of 327 presumptive

Enterococcus sp. were obtained from the 120 water samples analyzed. Seventy-six (23.24%) isolates had phenotypic characteristics of Gram staining and *Enterococcus* sp. Catalase test (Figure 8).

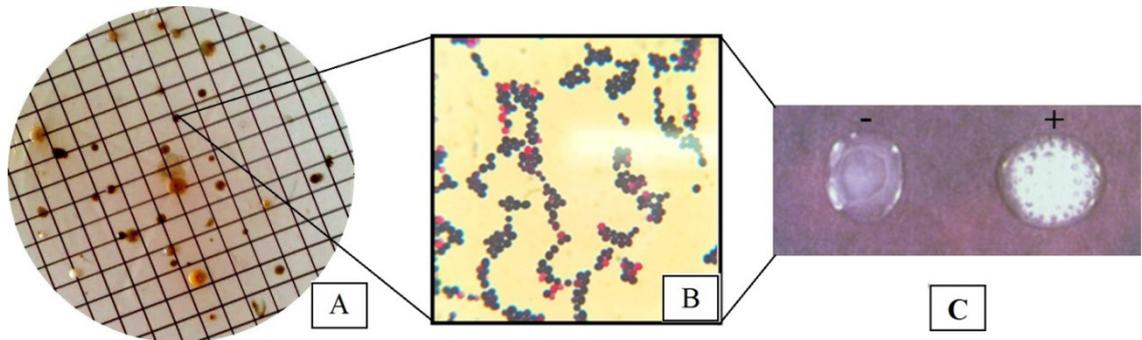


Figure 8 - Characteristic colonies of *Enterococcus* sp. using KEA culture medium (A); followed by Gram staining (Gram positive cocci) (B) and catalase test (C).

Several studies show that there is prevalence of *E. faecalis* and *E. faecium* in water samples (FERGUSON et al., 2013; YAMANAKA, 2011). However, in the present study, these were not the prevalent species, showing the genetic diversity among the isolates in the environment, depending on the geographical location.

The presence of enterococci in environmental samples has been considered an indicator of recent fecal contamination (a few days or weeks) complementary to thermotolerant coliforms. This microorganism originates from both animal feces and human fecal origin, and the main counts of enterococci are the quality assessments of water sources and bodies (FALAVINHA; DEGENHARDT, 2014).

Due to the fact that enterococci do not survive in polluted environments, the probable source of contamination of these environments is generally related to anthropogenic activities that occurred at the time of sampling or earlier days, or another probable contamination by animals living in the collection sites (HASMAN et al., 2006).

The main applications of *Enterococcus* counting are assessments of the quality of springs and water bodies, and the quality of treated water and the evaluation and monitoring of the hygienic conditions of industrial systems (SILVA et al., 2000).

In this study, 72 bacterial isolates from water bodies were tested. The results revealed that 97.2% showed continuous growth in the gradient plate with the tested metals (Figure 9).

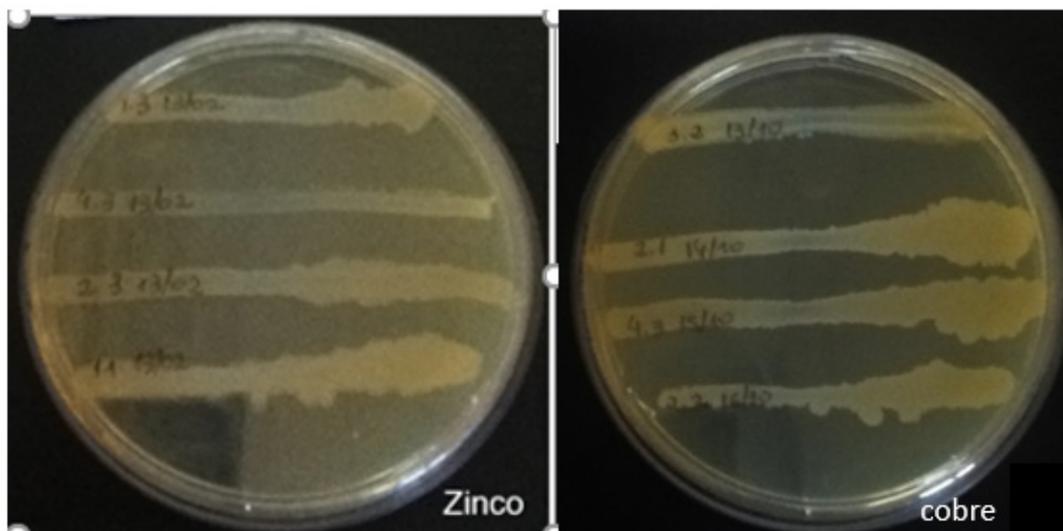


Figure 9 - Representative photo of growth on the gradient agar plate; Isolates of the genus *Enterococcus* growing in various concentrations of zinc and copper metal present in the culture medium. Arrow represents higher and lower concentration of metal in the gradient plate.

The figure 10 shows the growth of bacteria exposed to the maximum concentration allowed by CONAMA Resolution 357/2005. It can be observed that all isolates showed microbial development, with different intensities.

Figure 11 represents the growth of *Enterococcus* sp. at concentrations 40,000 times as permitted by legislation for chrome, lead and copper, and at concentrations 10,000 times for zinc metal. The results show that there was still growth for lead and copper at very high concentrations, which may characterize a bacterial resistance to these metals.

Environmental pollution by toxic metals has been growing rapidly along with industrialization as many companies still release their contaminated effluent directly into the environment. According to Banerjee et al. (2015), toxic metals accumulated in bacteria may be a more viable and cheaper alternative for wastewater treatment. Based on the preliminary results presented in this work, it is possible to identify bacteria with resistance to high concentrations of metals, which makes them a great potential for bioremediation.

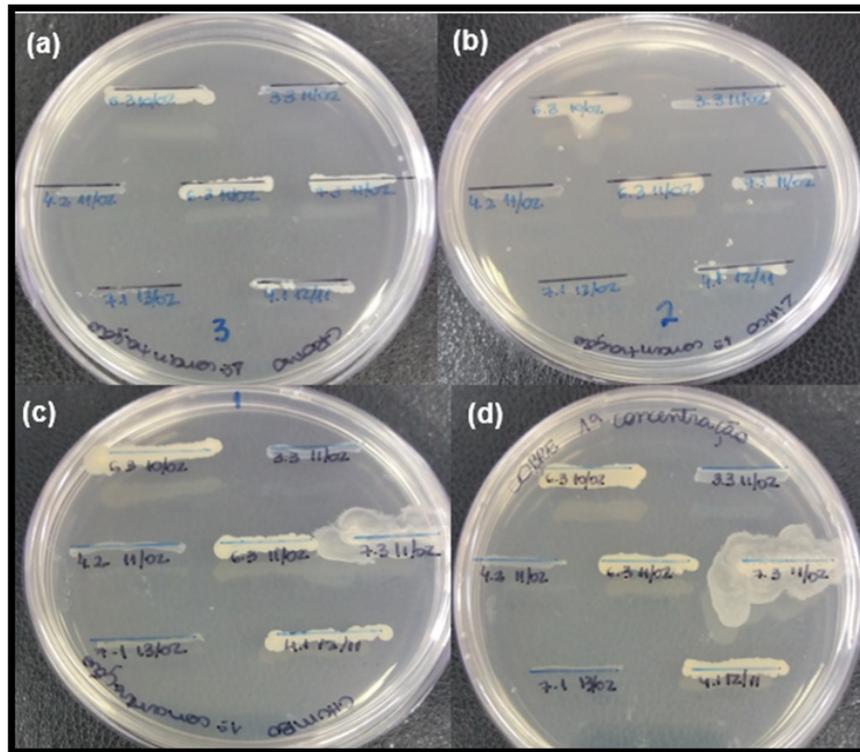


Figure 10 - Growth in plate with the concentration allowed in CONAMA Resolution 357/2005. (a) Chrome metal growth plate, (b) Zinc metal growth plate, (c) Lead metal growth plate and (d) Copper metal growth plate.

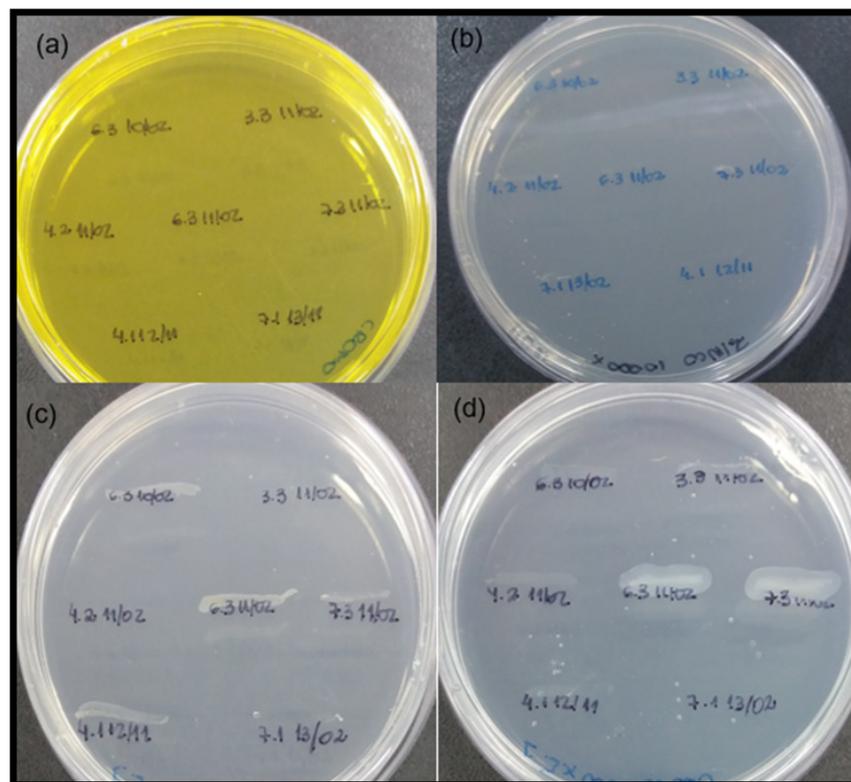


Figure 11 - Growth in plate with concentration allowed in CONAMA Resolution 357/2007. (a) 40,000 times concentrated chrome metal growth plate, (b) 10,000 times concentrated zinc metal growth plate, (c) 40,000 times concentrated metal growth plate and (d) metal growth plate covers 40 thousand times concentrated.

Bacterial resistance to toxic metals is an important factor to be considered in the study of remediation of contaminated areas, as this resistance is directly related

to the survivability and bacterial growth at high concentrations of toxic metals (KANG et al., 2016).

Environmental pollution by toxic metals has been growing rapidly along with industrialization as many companies still release their contaminated effluent directly into the environment. According to Banerjee et al. (2015), bioremediation of toxic metals by bacteria may be a more viable and cheaper alternative for wastewater treatment.

CONCLUSION

Based on the results presented in this work, bacteria with resistance to high concentrations of metals can be identified, which makes them a great potential for bioremediation. The ability of bacteria to survive extreme environments such as the presence of toxic metals clearly shows the importance of studying the resistance to these pollutants, as they can be used in the natural bioremediation process of these environments.

ACKNOWLEDGMENT

Moralez, A. T. P. for the suggestions of the experimental part of this work, as a requirement of the postdoctoral.

REFERENCES

AHMED, W.; HODGERS, L.; SIDHU, J.P.S.; TOZE, S. Fecal Indicators and Zoonotic Pathogens in Household Drinking Water Taps Fed from Rainwater Tanks in Southeast Queensland, Australia. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78. jan. 2012.

BANERJEE, Goutam; PANDEY, Shubhant; RAY, Arun Kumar; KUMAR, Ravi. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. **Water Air Soil Pollut.** v.266: 91, 2015.

BIONDO, Ronaldo. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BOEHM, Alexandria B.; SASSOUBRE, Lauren M. **Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection: Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination**. Boston, MA, p. 73-88, 2014.

CONAMA BRASIL. Resolução 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 23 de fev.2017.

DAS, Nilanjana; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals – an overview. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 7, p. 159-169, 2007.

FACKLAM, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. **Enterococcus**. Manual of Clinical Microbiology, v. 7, pg. 297–305, 1999.

FALAVINHA, G.; DEGENHARDT, R. Qualidade microbiológica da água de nascentes e poços da comunidade de Barro Branco, Capinzal, SC. **Unoesc & Ciência – ACBS**, v. 5, nº2, 2014.

FERGUSON, D. M.; GRIFFITH, J. F.; MCGREE, C. D.; WEISBERG, S. B.; HAGEDORN, C. Comparison of *Enterococcus* Species Diversity in Marine Water and Wastewater Using Enterolert and EPA Method 1600. **Journal of Environmental and Public Health**, 2013.

FERREIRA, J. M. **Parque Biguaçu: uma proposta de educação ambiental na escola de tempo integral, Apucarana – PR**. 2006. 72f. Monografia (Bacharel em Geografia) – Universidade Estadual de Londrina, departamento de Geociências, Londrina, 2006.

HALTTUNEN, T.; SALMINIEN, S.; TAHVONEN, R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 114, p. 30-35, 2007.

HASMAN, Herik; KEMPF, Isabelle, CHIDAINE, Berangere; CARIOLET, Roland, ERSBOLL, Annette Kjaer; HOUE, Hans; HANSEN, Hans Christian Bruun; AARESTRUP, Frank Moller. Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gen. is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. **Applied and environmental microbiology**. v. 72, p. 5784-5789, 2006.

KANG, C.-H.; KWON, Y.-J.; SO, J.-S. Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. **Ecological Engineering**, v. 89, p. 64–69, 2016.

KAR, D. et al. Assessment of heavy metal pollution in surface water. **International Journal of Environmental Science and Technology**. v. 5, n. 1, p. 119–124, 2008.

KIMIRAN - ERDEM, Ayten; ARSLAN, Elif Ozlem; YURUDU, Nazmiye Ozlem Sanli; ZEYBEK, Zuhai; DOGRUOZ. Nihal; COTUK, Aysin. Isolation and Identification of Enterococci from Seawater Samples: Assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. **Environmental Monitoring Assesss**, v. 125, p.219-228, 2006.

MORAIS, Simone; GARCIA E COSTA, Fernando; PEREIRA, Maria de Lourdes. Heavy metals and human health. **Environmental Health - Emerging Issues and Practice**. p. 227–246, 2012.

NAIK, Milind Mohan; DUBEY, Santoh Kumar. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 98, p. 1-7, 2013.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 730-750, 1999.

OISHI, Bruno Oliva. **Estudo da capacidade de sorção de cobre por *Pseudomonas putida* sp. em reator**. 2014. 126 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PEREIRA, Aline Ramalho Brandão; FREITAS, Diego Antonio França. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 6, p. 975-1006, 2012.

ROANE, Timberley M.; RESING, Christopher; PEPPER, Ian L. MAIER, Raina M. Microorganisms and Metal Pollutants. **Environmental Microbiology**. p. 421-441, 2009.

SINGH, R. et al. Heavy metals and living systems: An overview. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 246–253, 2011.

SZYBALSKI, Waclaw; BRYSON, Vernon. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. **Microbial cross resistance to toxic agentes**. v. 64, p. 489-499, 1952.

TORRES, E. C. Um território em busca de suas paisagens: O córrego do Biguaçu em Arapongas – PR – Brasil. ENCUESTRO DE GEÓGRAFOS DE AMÉRICA LATINA, 14, 2013, **Anais Eletrônicos...**Perú, 2013.

YAMANAKA, E. H. Incidência, Fatores de Virulência e Resistência a Antibióticos de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. Isolados como Indicadores de Contaminação Fecal em Água de Consumo de Fontes Alternativas de Curitiba e Região Metropolitana. 2011. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ESTUDO DA COMUNIDADE LIQUÊNICA DA UEMG – IBIRITÉ: ANÁLISE MORFOLÓGICA E ECOLÓGICA COMO CARACTERIZAÇÃO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Letícia Maria Soares Azevedo

Universidade do Estado de Minas Gerais –
Unidade Ibirité
Ibirité – MG

Camila Mara dos Reis

Universidade do Estado de Minas Gerais –
Unidade Ibirité
Ibirité – MG

Daniela de Oliveira Costa

Universidade do Estado de Minas Gerais –
Unidade Ibirité
Ibirité – MG

Reisila Simone Migliorini Mendes

Universidade do Estado de Minas Gerais –
Unidade Ibirité
Ibirité – MG

Marisa Cristina da Fonseca Casteluber

Universidade do Estado de Minas Gerais –
Unidade Ibirité
Ibirité – MG

RESUMO: Os líquens são uma associação simbiótica entre fungos e algas ou cianobactérias. Como não possuem estruturas excretoras, eles podem acumular grandes quantidades de compostos tóxicos em sua estrutura, por esse motivo são ótimos organismos bioindicadores ambientais. Este estudo teve como objetivo analisar e identificar a presença e a distribuição de famílias liquênicas e relacioná-las com as

quatro diferentes áreas subdivididas da área total, localizada em Ibirité, na Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Ibirité. As áreas foram delimitadas de acordo com suas características sendo a Área 1 a mais próxima da avenida e a Área 3 a mais distante. Em cada área foi feito o levantamento aproximado da quantidade de árvores existentes e quais dessas apresentam quantidade significativa de líquens. Foram identificadas quatro famílias de fungos liquênicos, sendo elas: Parmeliaceae (38,24%), Collemataceae (25%), Chrysothricaceae (5,88%) e Pertusariaceae (30,88%). A família mais abundante na região da UEMG – Ibirité é a Parmeliaceae (38,24%), tratando-se que essa família ocorre com bastante frequência em regiões de cerrado e de áreas urbanas. Considerando que os líquens são seres capazes de oferecer uma interpretação sobre as condições atmosféricas e ambientais de uma região, é possível concluir a partir desse estudo que é necessário além da observação das condições atmosféricas (poluentes) locais, é preciso que se tenha também uma análise das condições ecológicas tais como: disposição de luz, corrente de ar e umidade de uma área para assim associar a presença liquênica à poluição atmosférica.

PALAVRAS-CHAVE: Líquen, Bioindicador, Análise, Poluição.

STUDY OF THE LIQUENIC COMMUNITY OF UEMG - IBIRITÉ: MORPHOLOGICAL AND ECOLOGICAL ANALYSIS AS A CHARACTERIZATION OF ATMOSPHERIC POLLUTION

ABSTRACT: Lichens are a symbiotic association between fungi and algae or cyanobacteria. Because they do not have excretory structures, they can accumulate large amounts of toxic compounds in their structure, which is why they are great environmental bioindicator organisms. The objective of this study was to analyze and identify the presence and distribution of lichen families and to relate them to the four different subdivided areas of the total area, located in Ibirité, State University of Minas Gerais - Ibirité Unit. The areas were delimited according to their characteristics being Area 1 closest to the avenue and Area 3 the farthest. In each area an approximate survey was made of the number of existing trees and which of these have a significant amount of lichens. Four families of lichen fungi were identified: Parmeliaceae (38.24%), Collemataceae (25%), Chrysothricaceae (5.88%) and Pertusariaceae (30.88%). The most abundant family in the region of UEMG - Ibirité is Parmeliaceae (38.24%), being that this family occurs quite frequently in regions of cerrado and urban areas. Considering that lichens are capable of providing an interpretation on the atmospheric and environmental conditions of a region, it is possible to conclude from this study that it is necessary besides observing the local atmospheric (pollutant) conditions, it is necessary to have an analysis of the ecological conditions such as: light arrangement, air current and humidity of an area to associate the presence of lichen to atmospheric pollution.

KEYWORDS: Lichen, Bioindicator, Pollution, Analysis.

1 | INTRODUÇÃO

O biomonitoramento consiste em um método de análise indireta, que tem como seu principal mecanismo, a utilização de organismos vivos, ou seja, bioindicadores para verificar o estado de poluição de determinado ambiente. Para essa análise, podem ser utilizadas plantas, peixes, invertebrados e fungos, pois esses são organismos sensíveis a grande variedade de contaminantes atmosféricos e aquáticos (Teixeira; Barbério, 2012).

Os líquens são uma associação simbiótica entre um micobionte (fungo) e um fotobionte (algas ou cianobactérias). Essa associação mutualística consiste em uma transferência de nutrientes pela alga proveniente de sua fotossíntese para nutrir e garantir o metabolismo do fungo, que requer altos teores de açúcares, elaborados fotossinteticamente pela alga, para derivar biotroficamente seus carboidratos (Silva, 2002). O fungo garante a proteção das algas, entre suas hifas, protegendo-as das intempéries e de sua possível morte, já que sua parede celular é mais propensa a perder carboidratos quando o fotobionte estabelece esse tipo de relação (Lijteroff *et*

al, 2009).

A associação entre fotobionte e micobionte, permite uma grande variabilidade de estruturas como líquens crostosos, foliosos e fruticosos (Estrada; Najera, 2011). Os líquens crostosos, são extremamente aderidos ao substrato (rochas, troncos, folhas), formando crostas geralmente achatadas; os foliosos apresentam talos crostosos menos aderidos ao substrato, parecidos com folhas; e os fruticosos são formados por ramos podendo ser simples, divididos, cilíndricos ou achatados, e com talos eretos, pendentes ou prostrados, prendendo-se ao substrato (Spielmann, 2016).

Os fungos liquenizados não possuem estruturas que lhes permitem a produção de seu próprio alimento, assim sendo, a obtenção da matéria prima vem diretamente da atmosfera, fazendo com que os deixem expostos a diversos tipos de poluentes, por esse motivo, são considerados bioindicadores da qualidade do ar (Estrada; Najera, 2011).

Quando uma espécie é sensível a um determinado poluente, ela acaba perdendo seu habitat para espécies mais resistentes a poluição. Os poluentes podem ocasionar no líquen dificuldades no desenvolvimento e crescimento do talo além de acarretar mudanças morfológicas e no seu metabolismo (Martins *et al*, 2008).

Sendo uma metodologia de identificação de poluentes de baixo custo e eficaz, os bioindicadores permitem de forma clara e precisa a averiguação da real situação do local estudado, resultando em um conhecimento mais preciso dos níveis de toxicidade suportado em um ambiente (Andrade *et al*, 2010).

A Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Ibirité (UEMG – Ibirité) localiza-se em uma região em processo de desenvolvimento populacional e empresarial, porém há a ocorrência de ampla área verde, que conserva alguns fragmentos de mata nativa. Devido a isso, este estudo teve como objetivo identificar e analisar a frequência e a disposição de famílias liquênicas e relacioná-las com as diferentes áreas selecionadas, considerando as características ecológicas e atmosféricas de cada região estudada.

2 | METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada durante o ano de 2017 no espaço da UEMG – Ibirité, situada no município de Ibirité, nas coordenadas “20° 01’ 19” S “44° 03’ 32” O, localizado na Zona Metalúrgica e na região metropolitana de Belo Horizonte. O município possui elevado grau de urbanização, relevo bastante acidentado e encontra-se na bacia do Paraopeba (Prefeitura de Ibirité, 2017). Sua rica vegetação é caracterizada pela transição entre Mata Atlântica e Cerrado.

A região da UEMG – Ibirité foi delimitada e dividida em quatro áreas, denominadas: Área 1, Área 2, Área 3 e Área 4 (Figura 1).



Figura 1: Delimitação da UEMG – Ibirité e divisão das áreas de estudo.

A Área 1 está localizada na entrada da Universidade, na margem da Avenida São Paulo, em uma das bordas da área total, portanto é a área mais exposta à poluição veicular. Possui uma fileira com aproximadamente 65 árvores, com copas altas e caule com superfície áspera. O local é propenso a bastante luminosidade e corrente de ar. A Área 2 está localizada entre o prédio da Escola de Educação Física e o prédio Novo. É a área mais distante da Avenida São Paulo. Possui uma fileira com aproximadamente 25 árvores, com copas altas e troncos crostosos. O local é dotado de bastante luminosidade e corrente de ar. A Área 3 está localizada em frente à entrada da Universidade, no jardim principal. É próximo à Avenida São Paulo, mas com pouca passagem de veículos e possui aproximadamente 55 árvores com copas altas e caule com superfície áspera, distribuídas aleatoriamente ao longo do espaço. O local tem uma quantidade maior de sombra devido à posição em que as árvores se encontram, porém, é bem iluminado e com bastante corrente de ar. A Área 4 está localizada logo ao lado do auditório da Universidade, na margem do Ribeirão Ibirité. Possui aproximadamente 45 árvores com copas altas, caule com superfície áspera e/ou lisa, distribuídas próximas umas das outras ao longo do espaço. É caracterizada por mata fechada e úmida.

Em cada área foi feito o levantamento da quantidade de árvores existentes e quantas dessas apresentam quantidade significativa de líquens, utilizando como parâmetro aquelas árvores que contêm fungos liquenizados em mais de dois pontos do tronco e que cujo seu diâmetro é igual ou superior a dois centímetros, mensurados com auxílio de uma régua. As árvores foram divididas em duas zonas, sendo elas: tronco e galhos.

Para a coleta e identificação, foram selecionadas quatro árvores de cada área. Em cada árvore foi observado o tamanho, quantidade de espécies e de espécimes, bem como as condições de sobrevivência, como disponibilidade de nutrientes,

luminosidade, umidade, corrente de ar e tipo de solo. Foi realizado registro fotográfico das espécies encontradas com câmera Sony Cyber-shot DSC-HX200V - 18.2 Mpx, além de anotações a cerca do tipo de líquen, tamanho, zona da árvore em que foi encontrado e condições de clima, umidade e nutrição.

Foram realizadas coletas de amostras de líquens de cada área para análise morfológica. Essas foram selecionadas considerando a abrangência de cada uma por árvore. Pelo menos uma amostra foi retirada de cada árvore amostral. Os líquens foram coletados com auxílio de pinça e bisturi em pontos superiores a um metro de altura do chão e acondicionadas em envelope de papel e armazenadas em freezer até a utilização (Aguiar *et al*, 2007). As coletas foram feitas durante os meses de maio a agosto, no período entre 11:00 horas e 13:00 horas da tarde.

No Laboratório de Microbiologia Aplicada, as amostras foram limpas com o auxílio de pinça e pincel, retirando qualquer resíduo preso ao líquen. Após esse procedimento, as amostras coletadas foram lavadas em água destilada e deixadas de molho por cerca de cinco minutos.

Com auxílio de lupa de mão e dos registros fotográficos, os líquens foram analisados macroscopicamente e a partir das características morfológicas.

Com os líquens previamente lavados, foram feitas lâminas para observação microscópica. Com bisturi e pinça, foram feitos pequenos cortes à mão livre das amostras, sendo colocados em lâmina com uma gota de água e pressionadas com a lamínula. O material foi levado ao microscópio óptico com aumento de 400X e analisadas. Para esse procedimento foi utilizada amostra de um líquen folioso, pois as demais não apresentaram amostras suficientes para o procedimento e/ou não foi possível obter uma lâmina satisfatória devido à espessura do líquen. Após esses procedimentos foram inferidas as famílias liquênicas existentes no local de estudo.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas quatro famílias de fungos liquênicos, sendo elas: Parmeliaceae (38,24%), Collemataceae (25%), Chrysothricaceae (5,88%) e Pertusariaceae (30,88%) (Tabela 1). A família Parmeliaceae (38,24%) é a mais abundante na região da UEMG – Ibirité. Segundo Vaz (2012), essa família ocorre com bastante frequência em regiões de cerrado e de áreas urbanas.

Famílias	Áreas				Tipo de Talo
	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	
Parmeliaceae	5,76%	53,87%	30,76%	9,61%	Folioso
Collemataceae	14,70%	50%	29,42%	5,88%	Folioso
Chrysothricaceae	12,50%	62,50%	12,50%	12,50%	Crostoso
Pertusariaceae	2,38%	28,57%	21,42%	47,63%	Crostoso

Tabela 1: Percentual de ocorrência de cada família liquênica nas áreas descritas.

A família Parmeliaceae apresenta características de tolerância à poluição atmosférica. São geralmente epífitas, com ampla distribuição geográfica e que necessita de luminosidade e umidade para o desenvolvimento, suas características são compatíveis às condições do local estudado (Mitra Nature, 2017). Isso permite inferir que a presença de espécies dessa família em determinado local indica que há poluição atmosférica de forma parcialmente agressiva que influencia em fatores ambientais e de biodiversidade. Quanto à morfologia, são líquens de talos foliosos com lobos geralmente largos e com ápices arredondados. O talo é aderido ao substrato e podem ou não apresentar estruturas reprodutivas visíveis (Benatti, 2014).

Todas as áreas apresentaram exemplares dessa família, porém foi encontrada com maior abundância na Área 2 e na Área 3, sendo bastante frequente nas árvores amostrais e com maior número de espécimes. A Área 4 apresentou algumas amostras de líquens dessa família, mas em pouca abundância quando comparado aos líquens crostosos nessa mesma área.

A Área 1 apresentou exemplares satisfatórios das famílias Chrysothricaceae e Collemataceae oferecendo amostras satisfatórias e passíveis de estudo.

A família Collemataceae foi encontrada com maior abundância na Área 2 e Área 3. Apresenta talos foliosos, geralmente acinzentados. Essa família apresenta espécies pouco tolerantes à eutrofização e à poluição atmosférica, mas necessitam de umidade e luminosidade para desenvolvimento (Kitaura, 2012). Foi reconhecida com maior frequência em áreas com grande intensidade luminosa. Destaca-se a presença desses líquens nas outras áreas, porém com baixa frequência.

A família Chrysothricaceae apresentou maior quantidade de exemplares na Área 2. São líquens crostosos de coloração amarelo vivo, epífitos que vivem nos troncos das árvores, tipicamente em regiões tropicais. São bastante tolerantes à eutrofização e à poluição atmosférica e são comuns em regiões urbanas (Mitra Nature, 2017).

Essa família foi predominantemente encontrada nas partes mais altas das árvores da Área 2. Embora essa área apresente luminosidade alta, muita umidade e menor exposição à poluição atmosférica do que em outras áreas estudadas, foi a única área a apresentar amostras viáveis para estudo da Chrysothricaceae, contradizendo as características comuns desses líquens, já que no presente estudo, eles foram identificados principalmente na área menos exposta à poluição.

A família de líquens crostosos Pertusariaceae, foi encontrada em todas as áreas. É a mais abundante na Área 4, onde a luminosidade é baixa e a exposição à poluição atmosférica é menor. As espécies dessa família são moderadamente tolerantes à eutrofização e à poluição atmosférica, mas necessitam de características ambientais específicas para sobrevivência.

Quanto ao tipo de talo liquênico, das famílias encontradas 63,24% são foliosos, 36,76% são crostosos e não foram encontrados líquens fruticosos. Segundo Silva *et al* (2014), os líquens foliosos e fruticosos são menos resistentes à poluição do

que os líquens crostosos. Esses não sofrem grandes danos com a poluição e são característicos de áreas urbanas como espécies da família Pertusariaceae.

Algumas espécies da família Parmeliaceae também são características de zonas urbanas. Na área total estudada, não foram encontradas famílias de líquens fruticosos, o que confirma a ausência desses em regiões onde a atividade humana e industrial é intensa, sendo eles os primeiros a desaparecerem em áreas muito poluídas (Martins Mazzitelli *et al*, 2006).

No entanto os líquens foliosos são os mais abundantes, apresentando diferentes espécies dentre as famílias encontradas. Isso ocorre devido às condições ambientais da área, indicando que além das taxas de poluição é necessário identificar a inter-relação das atividades humanas com o ambiente e desses com a presença de determinada espécie líquênica (Santos *et al*, 2016).

Os fatores ambientais influenciam diretamente na distribuição de líquens nos troncos das árvores. A luz e a umidade são as principais características que determinam a presença desses seres vivos. Outras características como casca da árvore, textura do tronco, disponibilidade de nutrientes, retenção de água e pH também são determinantes para a sobrevivência de líquens em certa região (Marcelli, 1987).

Foi observado que, quanto à espécie líquênica presente nas áreas estudadas, as condições ambientais do local são preponderantes para determinar a presença e ausência de uma família quando relacionado a exposição à poluição atmosférica. Dessa forma, a ecologia do local permite encontrar com maior frequência famílias de líquens foliosos, Parmeliaceae (38,24%) e Collemataceae (25%), que são mais influenciados pela luminosidade e umidade. Esses fatores causam alterações na diversidade e biomassa líquênica de cada região e por isso líquens crostosos apresentam maior dificuldade de coleta, localização e identificação no local (Martins *et al*, 2012).

A partir desses dados, é possível inferir que a poluição atmosférica na região age principalmente na prevalência dos líquens que cada área apresenta, mesmo esse não sendo o único fator determinante.

Assim sendo, a Área 1 apresenta maior índice de poluição atmosférica, por apresentar menor quantidade de líquens em relação às outras áreas. As condições dessa área permitem que algumas espécies se instalem nos troncos das árvores, porém não permite que essas se expandam ou que se desenvolvam de modo que haja muitos espécimes no local. A Área 4 também apresenta pouca quantidade de líquens em relação ao número de árvores, porém a ausência líquênica nessa área se deve as condições ambientais, de luminosidade e umidade. Como é uma área de mata fechada e escura, a ecologia do local não permite um bom desenvolvimento de espécimes líquênicas (Martins *et al*, 2008).

As análises morfológicas das amostras coletadas mostraram que os líquens foliosos da família Parmeliaceae e crostosos da família Pertusariaceae da Área 3 apresentam tons de verde mais intenso. Já as outras áreas apresentam diversos

tons, sendo os líquens da Área 2 variando de cinza à verde e os da Área 1 em tons acinzentados principalmente.

De acordo com Rodrigues e Carregaro (2013), a coloração variada dos talos líquênicos se deve à proteção contra a alta intensidade luminosa ou/e pelo acúmulo de poluentes e metais. O acúmulo de poluentes nos tecidos dos líquens degrada a clorofila do fotobionte e reduz o nível de fotossíntese, podendo causar a morte de algumas células e gerando manchas nos talos (Martins *et al*, 2008). Essa característica foi encontrada nas amostras da Área 1 e Área 3 principalmente. Isso confirma o fato da Área 1 ser a mais exposta à poluentes, sendo a que apresenta piores condições atmosféricas. A Área 3 também apresenta líquens com variações na estrutura, pois sofre influência antrópica moderada (Figura 2).

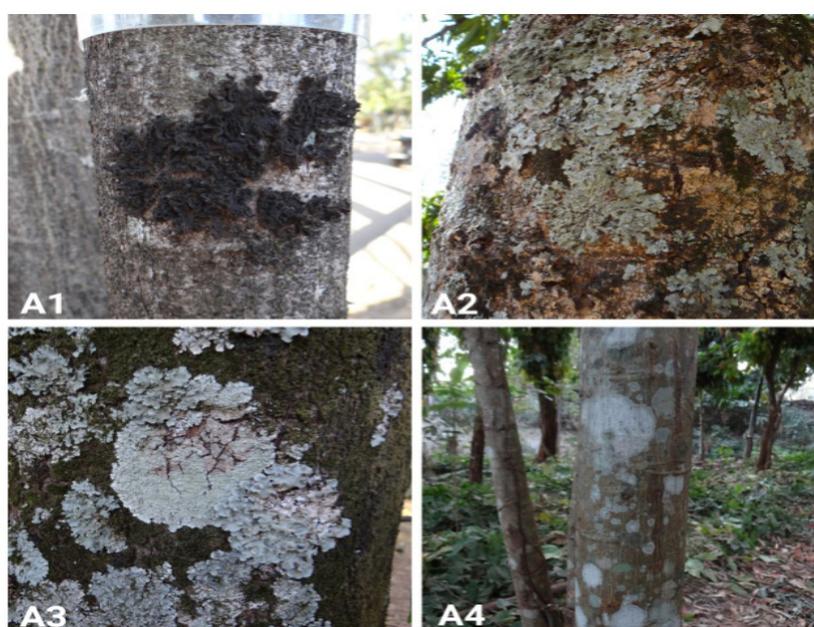


Figura 2: Famílias Líquênicas encontradas na UEMG – Ibirité. A1: Líquens da família Collemataceae; A2: Líquens da família Parmeliaceae e Chrysothricaceae; A3: Líquens da família Parmeliaceae; A4: Líquens da família Pertusariaceae.

A análise microscópica permitiu reconhecer os componentes de um talo líquênico, sendo eles o fotobionte, representando principalmente por algas verdes nos líquens analisados, e o micobionte, representados por fungos filamentosos.

4 | CONCLUSÃO

Os líquens são seres capazes de acumular poluentes e com isso oferecer uma interpretação sobre as condições atmosféricas e ambientais de uma região. A partir dessa informação é possível inferir que é necessária a observação das condições ecológicas de uma área para associar a presença líquênica e sua relação com a poluição atmosférica.

Nas áreas analisadas da UEMG – Ibirité, a presença de líquens se distribuiu por toda sua extensão de forma desigual. Em alguns pontos as condições ambientais e ecológicas são predominantes em relação à poluição atmosférica. Isso foi observado, pois as famílias liquênicas encontradas são em sua maioria parcialmente tolerantes a poluentes e foram encontrados poucos espécimes consideradas “urbanas” nas regiões mais expostas à poluição. A presença de determinada família liquênica nessa região se deve principalmente pelas condições de luminosidade e umidade do ambiente. Esses fatores mostraram-se tão determinantes no desenvolvimento dos espécimes quanto a poluição atmosférica. Foi observado que quanto à ecologia de cada família, a Área 2 e a Área 3 são as mais eficazes para o desenvolvimento liquênico.

Quanto à quantidade de líquens por área, Área 1 é a área com piores condições atmosféricas, onde o acúmulo de poluentes, possivelmente é maior. Os líquens dessa área são poucos e com tamanho reduzido. Em relação às outras áreas, a quantidade é inferior e os líquens estão morfologicamente mais acometidos, apresentando tamanho menor e superfície com manchas que se distinguem da coloração normal. Essas alterações ocorrem na morfologia do talo devido ao acúmulo de poluentes. Todas as áreas apresentam líquens com essas alterações, porém pela quantidade e estado em que se encontram, os líquens da Área 1 são aqueles mais acometidos pela poluição.

A Área 4 não apresentou grande quantidade de líquens, devido à ecologia da área que apresenta mata fechada e úmida. A área com melhor qualidade atmosférica e ecológica para o desenvolvimento liquênico é a Área 2, seguida da Área 3.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.R; ALVES, E.R; SAIKI, M. **Procedimento Para Preparação De Amostras De Líquens Para Análise Por Ativação Com Nêutrons**. INAC, Santos, SP, Brasil, 2007.

ANDRADE, Hélio Pinheiro de; et.al. **Análise cienciométrica global em bioindicadores – um panorama das tendências estabelecidas entre os anos 1998 a 2007**. Vita et Sanitas, Trindade-Go, n.04, jan-dez./2010.

BENATTI, Michel Navarro. **Espécies de Parmotrema (Parmeliaceae, Ascomycota) no Parque Estadual da Cantareira, Estado de São Paulo, Brasil, II. As espécies emaculadas ou com máculas irregulares**. Hoehnea 41(1): 81-102, 14 fig., 2014.

ESTRADA, Víctor Hugo Méndez; NÁJERA, Julián Monge. **El uso de líquenes como biomonitores para evaluar el estado de la contaminación atmosférica a nivel mundial**. Biocenosis. Vol. 25 (1-2) 2011.

KITAURA, Marcos Junji. **ESTUDO TAXONÔMICO DE LEPTOGIUM (ACH.) S.F. GRAY (COLLEMATACEAE, FUNGOS LIQUENIZADOS)**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Botucatu: [s.n.], 2012.

LIJTEROFF, R., LIMA, L.; PRIERI, B. **Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina**. Rev. Int. Contam. Ambient. Volume 25, pag. 111-

120, 2009.

MARCELLI, M. P. **Ecologia dos Líquens dos manguezais da Região S-SE do Brasil, com Especial Atenção ao de Itanhaém (SP)**. 1987. 656 p. Tese Doutorado - Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1987.

MARTINS- MAZZITELLI, S. M. A., MOTA FILHO, F. O., PEREIRA, E. C., & FIGUEIRA, R. **Utilização de líquens no biomonitoramento da qualidade do ar**. In **Biologia de Líquens** (L. Xavier Filho, ME Legaz, CV Córdoba & Pereira, EC eds.). Âmbito Cultural, Rio de Janeiro, p. 101-133, 2006.

MARTINS, D.S; SOUZA, M.G.M. **Fungos Liquenizados (Líquens) da Fazenda água Limpa, distrito Federal, Brasília**. Heringeriana, Brasília, v.6, n°1, p.62-65, agosto de 2012.

MARTINS, S.M.A; KÄFFER, M.I; LEMOS, A. **Líquens como bioindicadores da qualidade do ar numa área de termoeletrica, Rio Grande do Sul, Brasil**. Hoehnea 35(3): 425-433, 2 tab., 2 fig., 2008.

Mitra Nature. Disponível em:< <http://www.mitra-nature.uevora.pt/>>. Acesso em 11 de novembro de 2017.

PREFEITURA DE IBIRITÉ. Disponível em: < <http://www.ibirite.mg.gov.br/>>. Acesso em 10 de novembro de 2017.

RODRIGUES, Luana da Cunha; CARREGARO, Juliano Bonfim. **Análise Morfológica de Líquens Cortículas em duas Fitofisionomias do Cerrado em Cristalina – GO**. Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde. v.17, n.6, p 17-25, 2013.

SANTOS, T.T.T; DINIZ, E.S; ARAÚJO, G.C.N; PEREIRA, M.J.T.; SILVA, G.P.M; ALVES, A.O. **Líquens como bioindicadores da qualidade do ar na Avenida Conde da Boa Vista e Praça Oswaldo Cruz, Recife-PE**. Revista Arrueda. v. 1, n. 2 (2016).

SILVA, R.A. **Cladonia verticillaris (Líquén), como bioindicador padrão da qualidade do ar no distrito de Jaboatão – PE**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2002.

SILVA, A. K. de O. et al. **Líquens utilizados como biomonitores da qualidade do ar no Parque da Jaqueira – Recife – Pernambuco**. Geo. UERJ: Rio de Janeiro – ano 16, n. 25, v. 1. 2014.

SPIELMANN; Adriano Afonso. **Fungos Liquenizados (Líquens). 2006. Relatório de Estágio. Seção de Micologia e Liquenologia. Instituto de Botânica - IBt**. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente. São Paulo, 2016.

TEIXEIRA, M. C. V.; BARBÉRIO, A. **Biomonitoramento do ar com Tradescantia pallida (Rose) D. R. Hunt var purpurea Boom (Commelinaceae)**. Ambi-Agua, Taubaté, v. 7, n. 3, p. 279-292, 2012.

VAZ, Raissa Pieroni. **Levantamento preliminar de líquens epifíticos comumente utilizados como bioindicadores da qualidade do ar na estação ecológica da UFMG, Brasil: gêneros Carmotrema e Canoparmelia**. Belo Horizonte, 2012. 62p. Monografia (Especialização em Microbiologia). Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

KLEBSIELLA PNEUMONIAE: A NOVA AMEAÇA RESISTENTE

Luana Marcela Andrade de Santana

Universidade Tiradentes, Biomedicina, Aracaju - SE

Nathalia Santos Silva

Universidade Tiradentes, Biomedicina, Aracaju - SE

Karla Bárbara Calú Barreto

Universidade Tiradentes, Biomedicina, Aracaju - SE

Dayane dos Santos

Universidade Tiradentes, Biomedicina, Aracaju - SE

Daniel Guimarães Ribeiro

Universidade Tiradentes, Biomedicina, Aracaju - SE

Isana Carla Leal Souza

Universidade Tiradentes, Biomedicina, Aracaju - SE

RESUMO: As bactérias são seres que existem muito antes dos seres humanos, umas benéficas, outras nem tanto. São dotadas de mecanismo natural que garantem sua evolução e sobrevivência, o problema é quando elas infectam os seres humanos, levando-o ao adoecimento, mas para isso Alexandre Fleming desenvolveu a penicilina, o primeiro antibiótico, que revolucionou a medicina. Contudo a felicidade durou pouco e já naquela época a resistência das drogas teve início. Hoje nos

hospitais são travadas verdadeiras batalhas contra esses genes super-resistentes, aqui no Brasil, a *Klebsiella* com capacidade de inativar os carbapenêmicos, uma classe de última geração de antimicrobianos, trouxe preocupação e fez o país repensar no assunto.

PALAVRAS-CHAVE: Carbapenêmicos, Antibióticos, Infecção.

1 | INTRODUÇÃO

Um dos assuntos mais debatidos e preocupantes dentro da área de saúde são as “superbactérias”. Uma em especial está preocupada todos os profissionais de saúde no Brasil, a *Klebsiella pneumoniae*. É uma bactéria da família Enterobacteriaceae que é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias gram-negativas (essa designação, que empresta o nome de um cientista dinamarquês do século 19, indica superficialmente a reação a uma técnica de coloração que ilumina a membrana celular), mais famosa do momento, devido ao seu grau de resistência aos carbapenemas. A primeira detecção do KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) não provocou esse tipo de alvoroço, ele chegou discretamente em 1996, em uma entre centenas de amostras bacterianas colhidas em hospitais de 18

estados americanos. O projeto que as solicitou, chamado Icare (Project Int Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology), realizado com através da união dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, na sigla em inglês) e da vizinha Emory University, ambos sediados em Atlanta, na Geórgia.

2 | REVISÃO LITERÁRIA

A importância clínica deste patógeno no ambiente hospitalar foi demonstrada pela ocorrência de surtos causados, sobretudo por *K. pneumoniae* produtora de ESBL que ocorreram inicialmente na Europa, nos EUA, na Ásia e na América do Sul. Os surtos causados por este microrganismo produtor de ESBL geralmente decorrem de transferências de pacientes entre unidades de internação e/ou entre hospitais ou podem estar associados ao uso abusivo de β -lactâmicos que poderão exercer pressão seletiva favorecendo o crescimento de cepas produtoras de ESBL (Heritage et al, 1999; Paterson et al, 2003).

Essa resistência é conferida pela ação de um tipo de enzima carbapenemase, nomeada de KPC capaz de provocar a hidrólise de grande variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos, a mutação da sequência genética do gene original que induz a produção de enzimas KPC fez surgir diversas variantes identificadas em diferentes espécies de bactérias e localidades. A enzima já foi identificada em *Citrobacter freundii* e *Klebsiella oxytoca* *Enterobacter spp*, *Salmonella spp* e *Escherichia coli*, além de notificações em Israel, China, Grécia e França.

As carbapenemases pertencem às classes moleculares de Ambler, denominadas A, B e D. As do grupo A incluem membros designados SME, IMI, NMC, GES e a família das KPCs. Destes, as KPCs são as mais prevalentes encontradas em plasmídeos de *Klebsiella pneumoniae*. A enzima KPC já foi documentada em diferentes bactérias por meio de estudos moleculares e diferenciada em KPC-1 a 4(10), com a seguinte descrição: KPC-1 em isolados de *Klebsiella pneumoniae*; KPC-2 em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter sp.*; KPC-3 em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. Para KPC-4, não foram encontrados microrganismos relacionados. (DIENSTMANN et al.; 2010).

3 | RESULTADO E DISCUSSÕES

Com base nos artigos percebe-se que esse gene se espalhou por quase todo o mundo, no Brasil em 2005 foram documentadas os primeiros casos com ocorrência em diversos locais como: Recife, Rio de Janeiro São Paulo e Distrito Federal (sítio com o maior número de casos de pacientes infectados e de óbitos no país).

Mecanismo de ação dos carbapenêmicos:

As enzimas carbapenemases estão localizadas em plasmídeos transferíveis (estrutura genética móvel) das *Klebsiellas*. Elas conferem resistência mediada pela ação das enzimas acelerando reações e com poder catalítico. O mecanismo catalítico, também conhecido como complexo de Michaelis (ou enzima substrato ES) ocorre em duas etapas: A primeira etapa corresponde a uma ligação não covalente, particularmente estável, entre o catalisador (carbapenemase) e o substrato (carbapenêmico). A inativação do antibiótico ocorre na segunda etapa por meio da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico. A hidrólise faz com que a enzima seja liberada ainda ativa, podendo realizar novamente a reação com outras moléculas do antibiótico. Bactérias como a *Klebsiella* são promíscuas: elas intercombinem facilmente filamentos de DNA, de modo que um gene de resistência que surge nelas pode migrar rapidamente para a *E. coli*, *Acinetobacter*, por exemplo, e outras espécies gram-negativas. A bactéria ainda não possui resistência para os antibióticos: colistina, tigeciclina e poliximina B, porém seus efeitos adversos e seus níveis de toxicidade são bastante elevados, diminuindo assim a margem de segurança para o paciente, mas segundo os pesquisadores é só uma questão de tempo para que ela fique imune a tais fármacos, não restando assim, outras opções de tratamento, o que é extremamente preocupante.

4 | CONCLUSÃO

O cenário traz uma preocupação global, a era dos antibióticos parece realmente ter chegado, apesar de não ser uma preocupação recente, o modo como esses genes têm-se desenvolvido é assustador e a indústria farmacêutica não trabalha na mesma proporção no desenvolvimento de novas drogas, devido à dificuldade de se criar um fármaco novo e a altura dessas verdadeiras “superbactérias”.

REFERÊNCIAS

Centro de informação sobre medicamentos- HJUM (Hospital universitário Júlio Muller. Entenda mais sobre a KPC. 24 Jan. 2011. Disponível em: <http://www.ufmt.br/hujm/arquivos/90a1fa1519ea5fab695df6978aeec758.pdf>. Acesso em: 21 Jan. 2016

COTRIM, E. R.; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. F. R. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* - KPC em enterobacteriaceae: o desafio das bactérias multirresistentes. Pós em revista do centro universitário Newton Paiva. 5: 268-75, 2012.

FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. *Klebsiella pneumoniae carbapenemomoniae*: Um problema sem solução? Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR. 9(1): 45-8, 2015.

GUIMARÃES, P. D. C.; VIEIRA, F. O. A *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC): Bactérias multirresistentes. 2016. Disponível em: <http://docplayer.com.br/19894762-A-Klebsiella-pneumoniae-carbapenemase-Kpc-bactérias-multirresistentes-guimaraes-p-d-c-1-vieira-f-o-2.html>. Acesso em: 16 Jan. 2016.

RIBEIRO, A. D. A; et al. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC) e sua importância no ambiente hospitalar – Revisão de literatura. Revista de ciências. 6(2), 2015.

SANTOS, D. F. D. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. Fev. 2007. Disponível em: <http://docplayer.com.br/4744026-Characterísticas-microbiológicas-de-Klebsiella-pneumoniae-isoladas-no-meio-ambiente-hospitalar-de-pacientes-com-infeccao-nosocomial.html>. Acesso em: 19 Jan. 2016.

OCORRÊNCIA DE *FASCIOLA HEPATICA* NA REGIÃO DA CAMPANHA GAUCHA/RS

Brenda Luciana Alves da Silva

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

Mikalele Simas Santos

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

Marcele Ribeiro Corrêa

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

Fernanda Lucero Rodrigues

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

Gustavo Freitas Lopes

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

Lourdes Caruccio Hirschmann

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

Anelise Afonso Martins

Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – Rio Grande do Sul

RESUMO: A *Fasciola hepatica* é um parasito trematódeo, que infecta vários mamíferos e ocasionalmente, o ser humano. As perdas econômicas são significativas devido às condenações de fígados nos abatedouros, perda de peso dos animais e diminuição na produção. Sendo assim, o estudo objetivou

verificar a presença de ovos de *Fasciola hepatica* em fezes de bovinos de corte na região da campanha do Rio Grande do Sul. No período de agosto de 2018 a agosto de 2019, foram recebidas 181 amostras de fezes, provenientes de bovinos, machos e fêmeas, com idades entre um e quatro anos. Nas amostras de fezes para detecção de ovos de *Fasciola hepatica* foram realizadas à técnica de quatro tamises. Identificou-se a presença de ovos do parasita em 38,1% das amostras avaliadas, deste total, 72,5% dos casos positivos, foram observados no município de Dom Pedrito, seguido pelos municípios de Bagé com 20,3% e Santana do Livramento com 7,2%. Considerando o sexo dos animais foi verificado que as fêmeas apresentaram maior contaminação 69,5%, quando comparadas aos machos 30,5%. Foi possível verificar a presença do parasita nas regiões estudadas demonstrando a necessidade de medidas de controle, uma vez que, a enfermidade em bovinos acarreta importantes perdas na produção.

PALAVRAS-CHAVE: bovinos, fasciolose, quatro tamises

FASCIOLA HEPATICA OCCURRENCE IN
THE REGION OF THE RIO GRANDE DO SUL

ABSTRACT: *Fasciola hepatica*, parasitic trematode, which infests several mammals and, occasionally, humans. It causes significant economic losses due to the condemnation of livers in slaughterhouses, loss of animal weight and decrease of production. The objective of this study was to verify the presence of *Fasciola hepatica* eggs in bovine feces in the region of the Rio Grande do Sul (RS) campaign. From august 2018 to august 2019, a total of 181 samples of bovine feces were collected, both male and female. Samples of feces to detect eggs of the parasite were submitted to the technique of four sieves. The presence of eggs was identified in 38,1% of the samples, of which 72,5% of the positive cases were observed in the county of Dom Pedrito, followed by the county of Bagé with 20,3% And Santana do Livramento With 7,2%. Considering the sex, it was verified that the females had a greater contamination 69,5%, than the males 30,5%. It was possible to verify the presence of the parasite in the studied regions, demonstrating the need for control measures, since the disease in cattle causes significant losses in production.

KEYWORDS: bovine, fasciolose, foursieves

1 | INTRODUÇÃO

A *Fasciola hepatica* é um parasito trematódeo, que infesta o fígado e vias biliares de vários mamíferos ruminantes, monogástricos, mamíferos silvestres e, ocasionalmente, o ser humano. O parasita necessita de hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Lymnaea*, os quais vivem em ambientes alagadiços. Os ovos da *Fasciola hepatica* são eliminados nas fezes na fase crônica da enfermidade, são sensíveis à ação solar e baixas temperaturas e eclodem apenas em condições adequadas de umidade e temperatura (RAPSCH et al., 2008).

O diagnóstico da fasciolose é realizado através da sintomatologia dos animais, histórico na propriedade, identificação de caramujos e técnicas parasitológicas, em que o método de quatro tamises, segundo Girão e Ueno (1999) é o mais indicado, devido a sua especificidade em detectar os ovos (ECHEVARRIA, 2004).

Nos ruminantes, a enfermidade geralmente ocorre de forma subclínica, podendo ocorrer lesões graves como fibrose e trauma severo, devido à migração das formas jovens e pela presença das formas adultas no parênquima hepático. As perdas econômicas são significativas devido às condenações de fígados nos abatedouros, perda de peso e diminuição na produção de carne e leite (ECHEVARRIA, 2004). Sendo assim, o estudo objetivou verificar a presença de ovos de *Fasciola hepatica* em fezes de bovinos de corte na região da campanha do RS.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto de 2018 a agosto de 2019, no Laboratório de Parasitologia

da Universidade Federal do Pampa, Campus Dom Pedrito/RS, foram recebidas 181 amostras de fezes, provenientes de bovinos de corte, machos e fêmeas, com idades entre um e quatro anos, pertencentes a propriedades particulares de Dom Pedrito e região. Os animais eram criados em sistema extensivo com alimentação em campo nativo, pastagem cultivada e com água *ad libitum*.

As amostras de fezes para análises coproparasitológicas de detecção de ovos de *Fasciola hepatica* foram coletados individualmente, direto da ampola retal dos bovinos, identificadas, acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao Laboratório.

Posteriormente foram submetidas à técnica de quatro tamises, onde utilizou-se telas metálicas de 100, 180, 200 e 250 malhas/polegada, com aberturas de 174, 96,87 e 65 μm , respectivamente e examinadas com o auxílio de estereomicroscópio. Os dados climáticos dos municípios referentes ao período em que o estudo foi realizado foram obtidos através de consulta ao Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Após as análises os dados foram tabulados com o auxílio do programa Excel do pacote Microsoft Office 2016.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Do total de amostras recebidas de bovinos para análises parasitológicas, 39,2% (71/181) eram de machos e 60,8% (110/181) de fêmeas com idades entre um a quatro anos. Em relação aos municípios 63,6% (115/181) das amostras eram provenientes de Dom Pedrito, 28,1% (51/181) de Bagé e 8,3% (15/181) de Santana do Livramento.

O clima da região segundo a Köppen e Geiger é classificado como cfa, subtropical úmido, com temperatura média anual de 18.5°C e pluviosidade acumulada de 1313mm, consideradas condições climáticas adequadas para o desenvolvimento do parasita no ambiente (Silva et al., 2011).

Identificou-se a presença de ovos de *Fasciola hepatica* em 38,1% (69/181) das amostras avaliadas, deste total, 72,5% dos casos positivos, foram observados no município de Dom Pedrito (50/69), seguido pelos municípios de Bagé com 20,3% (14/69) e Santana do Livramento com 7,2% (5/69). Essa frequência encontrada neste estudo pode ser maior ainda, uma vez que, mesmo a técnica de quatro tamises sendo preconizada e considerada a mais sensível para o diagnóstico em condições de campo, ela é recomendada apenas para a fase crônica da doença onde há eliminação de ovos nas fezes pelos parasitas adultos, com isso, infecções iniciais não são detectadas (KLEIMAN et al., 2005). Considerando o total de amostras enviadas para análise dos três municípios avaliados há uma alteração no percentual de positivas (Tabela 1).

Municípios	Amostras recebidas	Amostras positivas	Frequência (%)
Bagé	51	14	27,4
Dom Pedrito	115	50	43,4
Santana do livramento	15	5	33,3

Tabela 1. Frequência de amostras de fezes avaliadas e positivas para presença de ovos de *Fasciola hepatica* pertencentes aos municípios de Bagé, Dom Pedrito e Santana do Livramento, no período de agosto de 2018 a agosto de 2019.

Fonte: Autor, 2019

Observou-se que o município de Dom Pedrito apresentou um maior número de amostras positivas, seguido de Santana do Livramento e Bagé respectivamente. A frequência encontrada mesmo sendo considerada elevada, foi superada por outros autores, onde em estudo realizado por Mattos e colaboradores (2008), também no Rio Grande do Sul encontraram uma frequência de infecção superior a 76%, na espécie ovina.

É de suma importância conhecer a frequência na região, pois a enfermidade causada pelo parasita tem distribuição mundial, porém mais frequente na América Central e do Sul e é considerada uma zoonose em ascensão (ECHEVARRIA, 2004).

Considerando o sexo dos animais, nas amostras positivas para presença de ovos do parasita foi possível verificar que as fêmeas apresentaram maior contaminação, quando comparadas aos machos (Tabela 2).

Sexo	Amostras recebidas	Total de amostras positivas	Animais Positivos	Frequência (%)
Fêmeas	110	69	48	69,5
Machos	71		21	30,5

Tabela 2. Frequência de amostras de fezes avaliadas e positivas para presença de ovos de *Fasciola hepatica* em relação ao sexo dos animais.

Fonte: Autor, 2019

As fêmeas apresentam diferentes estágios fisiológicos durante a sua vida, em alguns momentos necessitando de maior ingestão de água o que pode facilitar a contaminação, da mesma forma, possuem um tempo de permanência maior nas propriedades o que também favorece a maior exposição ao parasita (YILDIRIM et al. 2007).

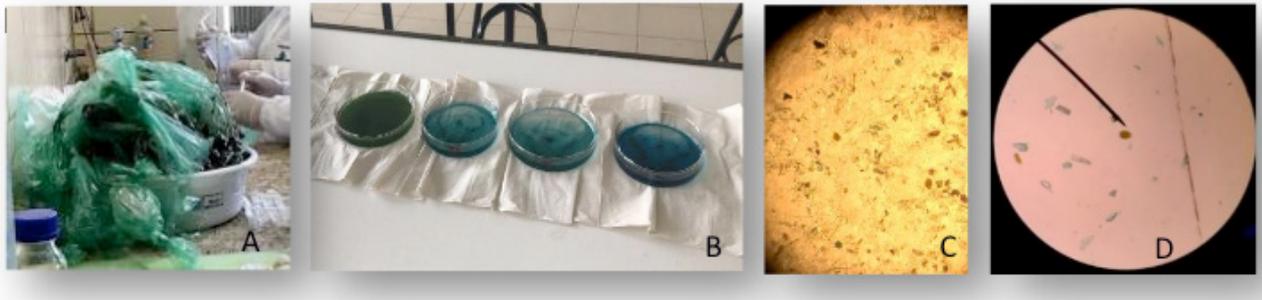


Figura 1- Análise parasitológica para verificação de ovos de *Fasciola hepatica*

Fonte: Autor, 2019 – (A) material fecal de bovinos enviado para análise; (B) material retido nos tamises de 250 malhas/polegadas (C e D) Ovos de *Fasciola hepatica* encontrado nas fezes de bovinos durante as análises parasitológicas pela técnica de quatro tamises.

4 | CONCLUSÃO

Com o estudo foi possível verificar a presença do parasita nas regiões estudadas demonstrando a necessidade de medidas de controle, uma vez que, a enfermidade em bovinos acarreta importantes perdas na produção.

REFERÊNCIAS

Echevarria, F. Fasciolose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13, supl. 1. 2004.

Kleiman, F.; Pietrokovsky, S.; GIL, S. e Wisnivesky-Colli, C. **Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis of fasciolosis**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 57:181-185. 2005.

Mattos, M.J.; Cunha, F. e Marques, S.T. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana** 16:105-112. 2009.

Rapsch, C.; Dahinden, T.; Heinzmann, D.; Torgerson, R. e Braun U. **An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland**. Veterinary Parasitology 154: 242-249. 2008.

Silva, A.E.P.; Freitas, C.C.; Dutra, L.V. e Molento, M.B. **Distribuição da *Fasciola hepatica* bovina em Santa Catarina, Brasil**. Anais XV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto-SBSR, Curitiba, PR, Brasil, 30 de abril a 05 de maio. p.8358. 2011

Yildirim, A.; Ica, A.; Duzlu, O. e Inci, A. Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. **Revue de Médecine Vétérinaire**, 158: 613-17. 2007.

PROPRIEDADES RELACIONADAS À SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE LINHAGENS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL

Jéssica Lee de Freitas

Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Uberaba - MG

Bianca Aguiar Alves

Mestre em Ciências Fisiológicas Área de Concentração II - Parasitologia, Imunologia e Microbiologia pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)
Uberaba - MG

Celso Tadeu Barbosa dos Santos

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia/ Departamento de Microbiologia/Técnico em Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Uberaba - MG

Alessandra Barbosa Ferreira-Machado

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/Disciplina de Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas e Naturais/ UFTM
Uberaba - MG

Aline Dias Paiva

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/Disciplina de Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas e Naturais/ UFTM
Uberaba - MG

RESUMO: Alguns membros do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota normal de seres humanos e animais, enquanto

outros atuam como patógenos. O leite bovino pode ser contaminado com *Staphylococcus aureus* durante a ordenha, pela presença de mastite no animal ou pelo próprio manipulador. O objetivo deste trabalho foi isolar *Staphylococcus aureus* a partir de queijos artesanais e avaliar a presença de fatores de virulência. Amostras dos queijos, diluídas em água peptonada estéril, foram inoculadas em ágar Manitol, em duplicata, e incubadas em aerobiose, a 37°C, por até 48h. As colônias selecionadas foram analisadas por meio da coloração de Gram e os cocos Gram-positivos foram submetidos aos testes de catalase, coagulase e DNase. O antibiograma foi realizado utilizando o método de disco difusão. A atividade antagonista foi avaliada pelo método de sobrecamada, utilizando diferentes micro-organismos indicadores. A habilidade de formação de biofilmes foi avaliada em placas de poliestireno, utilizando metodologia de cristal violeta. Foram isolados 47 cocos Gram-positivos, sendo 41 catalase positivos, 20 produtores de coagulase e 23 de DNase. Somente os isolados 5.1 e 5.10 apresentaram atividade antibacteriana, inibindo *Enterococcus gallinarum* ATCC 12359. Todos os isolados avaliados no antibiograma (n=5) foram sensíveis a amicacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina e vancomicina, sendo todos resistentes à rifampicina; os isolados 5.1, 5.6 e 5.12 foram resistentes a duas ou

mais drogas. Somente o isolado 5.18 produziu biofilme *in vitro*, embora tenha sido classificado como fraco produtor.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus aureus*; biofilme; antibiograma.

PROPERTIES RELATED TO MICROBIOLOGICAL SAFETY OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM ARTISANAL CHEESE

ABSTRACT: Some members of the genus *Staphylococcus* are part of the normal microbiota of humans and animals, while others can act as pathogens. The bovine milk can be contaminated with *Staphylococcus aureus* during the milking, by the presence of mastitis in the animal or by the manipulator. The aim of this study was to isolate *Staphylococcus aureus* from artisanal cheeses and to evaluate the presence of virulence factors. Samples of the cheeses, diluted in peptone water, were incubated in Mannitol agar, in duplicate, and incubated in aerobiose, at 37 ° C, for up to 48 hours. The selected colonies were analyzed by Gram staining and Gram-positive cocci were submitted to the testes of catalase, coagulase and DNase. The antibiogram was performed using the disc diffusion method. The antagonistic activity was evaluated by the overlay method, using different indicator microorganisms. The biofilm formation was evaluated in polystyrene plates using the violet crystal method. A total of 47 Gram-positive cocci were recovered, being 41 catalase positive, 20 coagulase producers and 23 Dnase positive. Only the isolates 5.1 and 5.10 showed antibacterial activity, inhibiting *Enterococcus gallinarum* ATCC 12359. All the isolates evaluated in the antibiogram (n=5) were susceptible to amikacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin and vancomycin, and all of them were resistant to rifampicin; the isolates 5.1, 5.6 and 5.12 were resistant to two or more antimicrobial drugs. Only the isolate 5.11 produced biofilm *in vitro*, although it has been classified as a weak producer.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*; biofilm; antibiogram.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e engloba bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, anaeróbias facultativas, mesófilas, que não apresentam motilidade nem formam endósporos. São bactérias catalase positivas e possuem representantes que são membros da microbiota ou patógenos em seres humanos e animais. Os estafilococos são muito resistentes, podendo crescer em altas concentrações salinas. Baseado na produção da enzima coagulase, o gênero *Staphylococcus* é subdividido em membros coagulase positiva, sendo o *S. aureus* o principal representante, e coagulase negativa, que engloba as demais espécies do gênero (VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

Embora façam parte da microbiota de boa parte da população, especialmente na região nasal, os *Staphylococcus aureus* podem causar infecções que vão de

leves a graves, podendo causar lesões superficiais, infecções sistêmicas, além de doenças mediadas por toxinas, como a síndrome do choque tóxico e a intoxicação alimentar (VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

Determinadas condições, como manuseio inadequado e armazenamento em temperatura permissiva para o crescimento microbiano, podem possibilitar a contaminação ou proliferação de *S. aureus* em um alimento, mesmo naqueles alimentos com maiores teores de sal. Alguns surtos de intoxicação alimentar causados por *S. aureus* revelaram o envolvimento de produtos à base de carne e leite, sendo o leite não pasteurizado um importante veículo para patógenos como o *S. aureus* (GIANNATALE *et al.*, 2011).

A contaminação do leite geralmente ocorre durante o processo de ordenha, seja pela presença de mastite (clínica ou subclínica) no animal, seja pelo próprio manipulador, que pode contaminar o leite com o manuseio incorreto e pelo uso de utensílios não higienizados corretamente. A mastite é causada por diversos microorganismos, dentre eles o *S. aureus*, e o tratamento é geralmente realizado com o uso de antibióticos ou outros agentes antimicrobianos, o que acaba levando à seleção de linhagens bacterianas resistentes a drogas antimicrobianas (ATEBA, 2010).

A resistência a antimicrobianos é um importante fator de virulência para *S. aureus* e linhagens resistentes já foram isoladas em vários países. Uma explicação é o uso inadequado de drogas antimicrobianas para tratamento e profilaxia na medicina humana e animal, bem como seu uso como promotores de crescimento em animais de produção, o que cria uma pressão seletiva, contribuindo para a emergência, persistência e disseminação de determinantes genéticos de resistência (MARINO *et al.*, 2010).

Bactérias multirresistentes têm sido detectadas em diferentes ambientes, inclusive em alimentos, como resultado da contaminação ao longo da cadeia de produção, seja por contato, direto ou indireto, com material fecal contaminado, seja pela disseminação a partir do ambiente clínico hospitalar. No estado de Minas Gerais é comum a produção de alimentos com leite cru ou de embutidos cárneos utilizando métodos tradicionais, considerados artesanais. Entretanto, não existem muitas informações a respeito de bactérias multirresistentes em tais alimentos. Em função do risco de transmissão de bactérias, patogênicas ou não, que veiculem determinantes de resistência a antimicrobianos, é necessária a avaliação da segurança de alimentos artesanais, especialmente quando bactérias são usadas como culturas *starter* ou tem um papel relevante na fermentação e/ou maturação desses alimentos.

O objetivo do presente trabalho foi isolar *Staphylococcus aureus* a partir de queijos artesanais e avaliar a presença de fatores de virulência.

MATERIAL E MÉTODOS

Os queijos Minas artesanais, produzidos com leite não pasteurizado, foram adquiridos no comércio local de Uberaba, Minas Gerais, no período de fevereiro a agosto de 2017. Os alimentos, mantidos na própria embalagem de venda, foram imediatamente transportados em caixas de isopor até o Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

Isolamento de micro-organismos a partir de queijo artesanal

As amostras de queijo foram diluídas (25 g em 225 mL de água peptonada estéril) e inoculadas em placas de Petri contendo ágar Manitol. As placas foram incubadas tanto em aerobiose como em microaerofilia, a 37 °C, por 48h. Posteriormente, colônias foram selecionadas e transferidas para meio BHI líquido, incubadas nas mesmas condições de atmosfera e temperatura. Após 18h de cultivo, as bactérias foram novamente cultivadas em ágar BHI, sendo selecionadas oito a dez colônias para análise das características morfo-tintoriais, por meio da coloração de Gram. Bactérias em formato de cocos e Gram-positivas foram selecionadas para as análises subsequentes, sendo armazenadas em meio BHI contendo glicerol (20 %), em freezer a -20 °C.

Produção das enzimas catalase, coagulase e DNase

Para avaliar a capacidade de produção da enzima catalase foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio (30 %).

Os isolados catalase-positivos foram avaliados em função da produção das enzimas coagulase e DNase. Culturas em fase estacionária, cultivadas em caldo BHI, foram transferidas para tubos de ensaio contendo plasma e incubadas por 4 horas, em aerobiose, a 37 °C; foi considerado positivo a formação de um coágulo no fundo do tubo de ensaio.

Para avaliar a produção de DNase, culturas em fase estacionária foram inoculadas em ágar DNase, incubadas em aerobiose, a 37 °C; após 18h de incubação, 1 mL de HCl (1N) foi adicionado às placas, sendo considerado positivo a presença de halo ao redor das colônias bacterianas.

Atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antagonista foi avaliada pelo método de sobrecamada (BOOTH *et al.*, 1977), utilizando como micro-organismo indicador bactérias de referência e isolados clínicos. Os isolados de *Staphylococcus* obtidos foram pré-cultivados em meio BHI, em aerobiose, a 37 °C; colônias obtidas foram pontualmente transferidas para outra

placa contendo meio BHI. Após incubação e desenvolvimento das colônias foram vertidos 5 mL de meio BHI semi-sólido (0,75 % de ágar), previamente inoculado com o micro-organismo indicador. As placas foram incubadas em aerobiose, a 37 °C, por até 48 h. A atividade antimicrobiana foi determinada pela presença de halos de inibição (> 6 mm de diâmetro) do crescimento do micro-organismo indicador em torno das colônias dos isolados avaliados.

Susceptibilidade a drogas antimicrobianas

O antibiograma foi realizado utilizando o método de disco difusão, conforme recomendado pelo CLSI (2015).

Os isolados foram cultivados em ágar BHI, em aerobiose, a 37 °C, durante 24 horas. Em seguida, colônias foram transferidas, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, para tubos com 3,5 mL de salina estéril (0,85 %), para obtenção de concentração correspondente a 0,5 na escala *Mc Farland* (10^8 UFC/mL); utilizando *swab*, as amostras foram inoculadas sobre a superfície de placas de Petri, contendo ágar Mueller Hinton. Os discos contendo as drogas antimicrobianas a serem testadas foram distribuídos sobre a placa, em pontos equidistantes, sob leve pressão, com o auxílio de uma pinça estéril. Foram avaliadas as seguintes drogas: eritromicina (15 µg), meticilina (5 µg), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg) e penicilina G (10 IU).

Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram incubadas em aerobiose, a 37 °C; após 18 h de incubação foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição ao redor do disco de antimicrobiano (em milímetros). Os resultados foram expressos quantitativamente, para a classificação dos micro-organismos em sensível, resistência intermediária ou resistente às drogas antimicrobianas testadas. Os pontos de corte utilizados foram aqueles descritos pelo CLSI (2015).

Formação de biofilmes em placas de poliestireno

A capacidade dos isolados de *Staphylococcus* em formar biofilmes foi avaliada em placas de poliestireno, de fundo chato, com 96 poços, conforme descrito por Stepanovic *et al.* (2000). Culturas de *Staphylococcus* em fase estacionária foram utilizadas para o preparo do inóculo ($DO_{600nm}=0,1-0,2$). Para cada isolado, em quatro poços da placa de microtitulação foram adicionados 200 µL da suspensão bacteriana em BHI; as placas foram incubadas em aerobiose, a 37 °C, por 24 horas, sem agitação. Após incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e cada poço foi lavado três vezes com solução salina estéril (pH 6,5, 150 mM, 250 µL). As bactérias aderidas foram fixadas com metanol, por 15 minutos; o metanol foi removido e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem. Cristal violeta 2% (200 µL/poço) foi adicionado a cada poço da placa e, após 5 minutos, o excesso de

corante foi removido com água. As placas foram mantidas novamente à temperatura ambiente até a secagem e o corante ligado ao biofilme foi solubilizado pela adição de ácido acético glacial (160 μ L/poço). A densidade óptica foi determinada em leitor de microplaca, a 570 nm.

Baseado nos valores de absorbância obtidos, os isolados foram classificados em quatro categorias: não produtor de biofilme ($OD \leq OD_c$), fraco produtora de biofilme ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), moderado produtor de biofilme ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) e forte produtor de biofilme ($4 \times OD_c < OD$). OD_c é o valor de *cut-off*, definido como três desvios padrão acima da média do controle negativo. Cada placa testada teve um valor de OD_c próprio (STEPANOVIC *et al.*, 2000).

Como controle positivo de formação do biofilme foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como controle negativo foi utilizado meio BHI não inoculado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 47 cocos Gram-positivos, sendo 41 isolados catalase positivos (87,23%) e, portanto, pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Desses 41 isolados, 20 produziram coagulase e 23 produziram DNase.

Os isolados que apresentaram resultados positivos em todos os testes anteriores (n=16) foram identificados como *Staphylococcus aureus* e avaliados quanto à produção de compostos antimicrobianos pelo teste de sobrecamada. Somente os isolados 5.1 e 5.10 inibiram o crescimento do micro-organismo indicador *Enterococcus gallinarum* ATCC 12359. Os demais indicadores avaliados, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Escherichia coli*, não foram inibidos por nenhum dos isolados de *S. aureus* obtidos nesse trabalho.

A capacidade de produzir bacteriocinas está relacionada à competitividade em ambientes complexos e também à virulência do micro-organismo, facilitando o processo de colonização do hospedeiro. Segundo Araújo *et al.* (2009), todas as linhagens de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, isoladas de pacientes internados em um Hospital Regional, foram capazes de produzir substâncias antagonistas tipo bacteriocinas, o que evidencia a produção de peptídeos antimicrobianos como uma importante característica de virulência em isolados clínicos.

Linhagens de *S. aureus* envolvidas em mastite bovina na região sudeste do Brasil foram avaliadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas e 46 isolados inibiram *S. epidermidis* (CEOTTO, 2009). Tal resultado é contrastante com os resultados do presente trabalho, em que nenhum dos isolados de *S. aureus* inibiram *S. epidermidis*.

Para o antibiograma e a avaliação da capacidade de formação de biofilmes foram selecionados 5 isolados de *S. aureus*: 5.1, 5.6, 5.10, 5.12 e 5.18. Todos esses

isolados foram sensíveis a amicacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina e vancomicina, sendo todos resistentes à rifampicina. Os isolados 5.10 e 5.18 foram os mais sensíveis às drogas antimicrobianas analisadas (resistência somente à rifampicina), enquanto o isolado 5.12 foi o mais resistente, crescendo na presença de quatro dos dez antimicrobianos avaliados. Os isolados 5.1, 5.6 e 5.12 podem ser considerados multirresistentes (resistência a duas ou mais drogas) (Tabela 1).

Isolado	AMI	AMP	CLI	ERI	GEN	OXA	PEN	RIF	TET	VAN
5.1	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
5.6	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
5.10	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
5.12	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S
5.18	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S

Tabela 1. Sensibilidade de linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas a partir de queijo Minas artesanal a diferentes drogas antimicrobianas. O antibiograma foi realizado pelo teste de disco-difusão.

Legenda: AMI – amicacina; AMP – ampicilina; CLI – clindamicina; ERI – eritromicina; GEN – gentamicina; OXA – oxacilina; PEN – penicilina; RIF – rifampicina; TET- tetraciclina; VAN – vancomicina

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram reportados por Araújo (1998), em trabalho no qual observou que 201 isolados de *S. aureus* provenientes de leite foram sensíveis à vancomicina, sendo a maioria dos isolados também sensível à amicacina, clindamicina, eritromicina e gentamicina. Ainda no mesmo trabalho, 44,8 % dos isolados foram resistentes a ampicilina, 43,8% resistentes à penicilina e 19,9% resistentes à tetraciclina (ARAÚJO, 1998).

Em outro estudo realizado com linhagens de *Staphylococcus* isolados de plantas e laticínios comercializados no Irã, todos os isolados foram resistentes à vancomicina, 40% dos isolados foram resistentes à tetraciclina e 25% resistentes à oxacilina (RAHIMI , 2013).

A frequência com que as bactérias adquirem resistência é mais elevada para determinadas drogas antimicrobianas do que para outras, variando também com o próprio micro-organismo (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

O antibiograma fornece resultados qualitativos quando categoriza os microrganismos em sensível, resistência intermediária e resistente. Ele se baseia no fenótipo de resistência à droga antimicrobiana, orientando a equipe médica na escolha do melhor antimicrobiano a ser utilizado. Além disso, trata-se de uma técnica de baixo custo, fácil de ser executada, que permite analisar vários antimicrobianos ao mesmo tempo. Entretanto, o antibiograma tem como limitação o fato de não distinguir os efeitos bactericidas e bacteriostáticos dos antimicrobianos avaliados (BALOUIRI, 2016).

Em relação à formação de biofilmes, somente o isolado 5.18 foi capaz de

produzir biofilmes, embora tenha sido considerado fraco produtor quando comparado ao controle positivo. Nas condições avaliadas, os demais isolados não produziram biofilmes.

Segundo Chagas (2015), todas as oito linhagens de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite ou de equipamentos de ordenha foram capazes de aderir em placas de poliestireno, sendo classificadas como fortes produtoras de biofilme.

Por outro lado, Sanches (2008), ao avaliar a produção de biofilmes por linhagens de *S. aureus* isoladas de recém-nascidos, reportou que 24% das amostras foram classificadas como fracas produtoras de biofilme e 38% como fortes produtores.

O biofilme pode ser considerado uma importante característica de virulência entre estafilococos, por permitir a sobrevivência das bactérias em condições de estresse, como condições de anaerobiose, presença de acidez, presença de antibióticos, antimicrobianos e proteção contra o próprio sistema imune do hospedeiro (KIRMUSAOĞLU, 2016).

CONCLUSÃO

A presença de linhagens de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo minas artesanal pode estar relacionado à má qualidade da matéria prima e/ou a falhas nas boas práticas de produção do alimento.

A síntese de peptídeos antimicrobianos e a capacidade de produção de biofilme não parecem ser fatores de virulência presentes nos isolados de *S. aureus* obtidos neste trabalho. Entretanto, linhagens multirresistentes a drogas antimicrobianas foram identificadas, confirmando que isolados resistentes podem ser veiculados também através de alimentos.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Roberta Chaves; FERREIRA, Cirlene Dimas; BELLO, Cristina Maria Miranda. **Pesquisa de substâncias antagonistas tipo bacteriocinas produzidas por amostras de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes isoladas de pacientes internados no hospital regional do município de Barbacena, minas gerais.** Med. Minas Gerais, Minas Gerais, p. 300-303, ago.2009.

ARAÚJO, W.P. **Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 35, n. 4, p. 161-165, 1998.

ATEBA, C.N., et al. **Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa.** S Afr J Sci. 2010;106(11/12), Art. #243, 6 pages. DOI: 10.4102/sajs. v106i11/12.243.

BALOUIRI, Mounyr et al. **Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.** Laboratory of Microbial Biotechnology, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 2202 Imouzzer Road, Fez, Morocco. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Morocco, 2016.

BOOTH, S.J.; JOHNSON, J.L.; WILKINNS, T.D. **Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 11, p. 718–724, 1977.

CEOTTO, Hilana. **Produção de bacteriocinas por *S. aureus* envolvidos em mastite bovina na região Sudeste do Brasil.** 2009. p.119. Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de microbiologia prof Paulo de Góes. Rio de Janeiro, ago 2009.

CHAGAS, L. G. S., et al. **Avaliação da formação de biofilme por cepas bacterianas isoladas de amostras de leite de vaca com mastite e equipamentos de ordenha.** Uberlândia, 2015.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S26. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, 26th edition informational supplement; 2015. 256 p.

GIANNATALE, E. D.; PRENCIPE V., TONELLI A., MARFOGLIA C., MARFOGLIA G. **Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption.** *Veterinaria Italiana*, Instituto G. Caporale, Vol. 47 (2), 165-173, 2011.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano Da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** *Quimica Nova*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, fev 2010.

KIRMUSAOĞLU, Sahra. **Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms, Microbial Biofilms** Dharumadurai Dhanasekaran, IntechOpen, DOI: 10.5772/62943. Jul 2016. Available from: <https://www.intechopen.com/books/microbial-biofilms-importance-and-applications/staphylococcal-biofilms-pathogenicity-mechanism-and-regulation-of-biofilm-formation-by-quorum-sensin>

MARINO M., FRIGO F., BARTOLOMEOLI L., MAIFRENI M. **Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments.** Department of Food Science, University of Udine. *Journal of Applied Microbiology*. *Journal of Applied Microbiology* 110, 550–561^a, Udine, Italy. 2010.

RAHIMI, Ebrahim. **Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran.** *Brazilian Journal of Microbiology*. Iran, 2012.

SANCHES, Patrícia. **Detecção da Produção de Biofilme em *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase Negativa isolados de Recém-Nascidos.** Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008.

STEPANOVIC´, S.; VUKOVIC´, D.; DAKIC´, I.; SAVIC´, B.; SVABIC´-VLAHOVIC´, M. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 40, p. 175–179, 2000.

VASCONCELOS N. G., CUNHA M. L. R. S. **Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods.** *Biosciences Institute, UNESP – Univ Estadual Paulista, Department of Microbiology and Immunology, Bacteriology Laboratory, Journal of Public Health and Epidemiology* Vol. 2(3), pp. 29-42, Botucatu-SP, Brazil, 2010.

Staphylococcus aureus: UMA VISÃO GERAL DOS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

Glauciane Vieira Damasceno

Curso de Graduação em Biomedicina,
Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão.

Elane Rodrigues Oliveira

Curso de Graduação em Biomedicina,
Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão.

Patrícia Vieira de Oliveira

Curso de Graduação em Biomedicina,
Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão.

Bruno Luis Lima Soares

Programa de Pós-graduação em Odontologia,
Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão.

Gabrielle Damasceno Evangelista Costa

Programa de Pós-graduação em Biologia
Microbiana, Universidade CEUMA, São Luís,
Maranhão.

Adrielle Zagnignan

Curso de Graduação em Nutrição, Universidade
CEUMA, São Luís, Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade
e Biotecnologia, Universidade CEUMA, São
Luís, Maranhão

Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade
e Biotecnologia, Universidade CEUMA, São Luís,
Maranhão.

Curso de Graduação em Biomedicina,
Universidade CEUMA, Imperatriz, Maranhão.

Rita de Cássia M. de Miranda

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade
e Biotecnologia, Universidade CEUMA, São Luís,
Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Biologia
Microbiana, Universidade CEUMA, São Luís,
Maranhão.

Luís Cláudio Nascimento da Silva

Curso de Graduação em Biomedicina,
Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Odontologia,
Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Biologia
Microbiana, Universidade CEUMA, São Luís,
Maranhão.

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade
e Biotecnologia, Universidade CEUMA, São Luís,
Maranhão.

RESUMO: *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, produtora de coagulase, que se encontra presente na microbiota natural. É um patógeno oportunista associado à colonização assintomática de pele e mucosa, provoca infecção quando essas barreiras fisiológicas são rompidas, permitindo a invasão bacteriana. Essa bactéria se destaca devido à sua capacidade de expressar uma variedade de fatores de virulência o qual facilita a adesão celular, a evasão do sistema imune, danos à célula hospedeira o que leva os sinais e sintomas da doença. Além disso, é visto que cada vez mais uma maior quantidade de linhagens de *S. aureus* tem demonstrado

resistência aos agentes antimicrobianos. Por essa razão, *S. aureus* resistente à meticilina e *S. aureus* multirresistente têm sido reconhecidos como as principais causas de infecções hospitalares. Estes tipos de linhagens geralmente possuem diversos fatores de virulência, os quais são responsáveis por mediar propriedades relacionadas à adesão, toxicidade, resistência à fagocitose e modulação do sistema imunológico do hospedeiro. Muitas das infecções são causadas por produção de biofilme, o qual mostra evidências emergentes que sugerem que o crescimento dessas comunidades microbianas mistas pode levar a alteração dos perfis de tolerância antimicrobiana. A capacidade de linhagens de *S. aureus* adquirem fenótipos de hipervirulência e multirresistência facilita a adaptações em ambientes inóspitos, permitindo a dispersão destes organismos tanto em serviços de saúde como na comunidade.

PALAVRAS – CHAVE: Infecção; Resistência; Oportunista; Biofilme

1 | UMA VISÃO GERAL DO PATÓGENO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

S. aureus é um microrganismo Gram-positivo, produtor de coagulase, pertencente ao grupo das eubactérias, geralmente formam colônias amarelas, acinzentadas ou laranja, em função da grande quantidade de carotenóides localizados na membrana celular, como a estafiloxantina (GOLDMANN; MEDINA, 2018; TIWARI; GATTO; WILKINSON, 2018). Caracterizado como patógeno oportunista associado à colonização assintomática de pele e mucosa, provoca infecção quando essas barreiras fisiológicas são rompidas, permitindo a invasão bacteriana (KRISMER et al., 2017; NGUYEN, A. T.; TALLENT, 2018; YANG et al., 2018).

Essa bactéria tem se destacado devido à capacidade de expressar variedade de fatores de virulência que facilitam a adesão celular, a evasão do sistema imune, danos à célula hospedeira provocando os sinais e sintomas da doença (COPIN; SHOPSIN; TORRES, 2018; GOLDMANN; MEDINA, 2018; SHAHINI SHAMS ABADI et al., 2017). Essa versatilidade está relacionada com o amplo espectro de doenças causadas por este organismo, que englobam desde infecções localizadas nos tecidos moles (impetigo e dermatite) e também complicações sistêmicas (bacteremia, sepse e síndrome do choque tóxico) (HUNTER et al., 2016; PERES et al., 2015; VAN WAMEL, 2017). *S. aureus* podem ser responsáveis por bacteremia associada à pneumonia sendo associada ao cateter venoso central. Além das infecções acima mencionadas, esta bactéria é muitas vezes responsável por doenças mediadas por toxinas, tais como a síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, dentre outras (SEILIE; BUBECK WARDENBURG, 2017).

Um número cada vez maior de linhagens de *S. aureus* tem demonstrado resistência aos agentes antimicrobianos; por esta razão, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *S. aureus* multirresistente (MDRSA) são reconhecidos como as principais causas de infecções hospitalares (FURTADO et al., 2019; HUNTER et al., 2016; NARAYANAN et al., 2019). Linhagens resistentes de *S. aureus* tem

emergido na comunidade e aumentando tanto a frequência quanto à gravidade de infecções causadas por esta bactéria (RICHARDSON et al., 2019). De fato, níveis alarmantes de resistência já são detectados em algumas localizações, e alguns isolados de *S. aureus* possuem resistência para fármacos considerados como de última escolha, como a vancomicina (OLUFUNMISO; TOLULOPE; ROGER, 2017; VANEGAS MUNERA et al., 2017).

Durante a infecção, as funções do organismo são prejudicadas devido aos danos que são causados no tecido do hospedeiro induzidos por vários fatores de virulência liberados após a replicação bacteriana. Certas toxinas bacterianas ativam especificamente o sistema imunológico, resultando na liberação subsequente de citocinas e em lesões nos tecidos (HODILLE et al., 2017). A regulação da virulência envolve uma rede complexa de circuitos reguladores globais, como os sistemas de dois componentes (TCS), que identificam sinais ambientais e/ou do hospedeiro e induzem a ativação de reguladores, que agem sozinhos e em conjunto para modular a expressão gênica (BALASUBRAMANIAN et al., 2017). São exemplos de circuitos os sistemas *agr* (regulador gênico acessório de quorum sensing), *SaeRS* TCS (sistema de expressão de exoproteínas de *S. aureus*), *SrrAB* TCS (regulador respiratório estafilocócico) e a família de proteínas SarA (JENUL; HORSWILL, 2018).

Neste capítulo será discutido o papel de diferentes determinantes de virulência na patogênese de *S. aureus*, além de relacionar a influência de elementos genéticos na patogenicidade.

2 | VARIABILIDADE GENÉTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E A PATOGENICIDADE

Os genes envolvidos em vias de virulência podem ser adquiridos pelas linhagens de *S. aureus* através de conjugação, transdução e mutações *de novo*. A variação genômica em *S. aureus* é descontínua, com subdivisões chamadas complexos clonais. As forças multifatoriais que moldam a estrutura de variação em *S. aureus* provavelmente incluem competição bacteriana e barreiras à troca genética (CHAVES-MORENO et al., 2016; PLANET et al., 2017).

Os clones com elevada resistência aos antibióticos e/ou múltiplos fatores de virulência emergem rapidamente devido à aquisição de genes (por diversas vias) a partir de outras linhagens de *S. aureus* ou mesmo de outros gêneros (HAABER; PENADES; INGMER, 2017). Esta plasticidade permite que *S. aureus* se adapte a diferentes tipos de estresses e sobreviva em diferentes condições (BALASUBRAMANIAN et al., 2017; KRISMER et al., 2014; KRISMER et al., 2017). A variabilidade genética de *S. aureus* é mediada por um conjunto diverso de elementos genéticos móveis (MGEs) que incluem plasmídeos, transposons, integrons, ilhas genômicas, ilhas de patogenicidade de *S. aureus* (SaPIs), elementos conjugativos

integrativos, cassetes de cromossomos estafilocócicos (SCC) e fagos (ALIBAYOV et al., 2014; COPIN; SHOPSIN; TORRES, 2018).

A diversidade dos genomas de *S. aureus* se dá decorrente principalmente da conjugação e transdução, e estima-se que apenas 44% dos genes são compartilhados por diferentes cepas (COPIN; SHOPSIN; TORRES, 2018; HAABER; PENADES; INGMER, 2017). A parte central do genoma está relacionada com funções essenciais como replicação e expressão do material genético (processamento de RNA, estrutura ribossomal e outros processos relacionados à transcrição e tradução) e metabolismo de macromoléculas (sínteses e transporte de aminoácidos, carboidratos e lipídeos). Por outro lado, a parte variável do genoma possui atribuições funcionais amplamente diferentes, incluindo características de virulência e resistência específicas para cada linhagem (BOSI et al., 2016).

A transferência de material genético é elevada durante a colonização do hospedeiro e exposição aos antibióticos em concentrações sub-inibitórias (que pode ocorrer pelo uso inapropriado desta droga (STANCZAK-MROZEK; LAING; LINDSAY, 2017). De fato, a exposição das linhagens aos mais diversos agentes estressores (terapia antimicrobiana, espécies reativas) que provocam dano no DNA de forma direta ou indireta tem sido relacionada com a geração de mutações aleatórias que podem originar novos alelos conferindo resistência e características de virulência (PAINTER et al., 2015; SCHRODER; GOERKE; WOLZ, 2013; THAI et al., 2017). Este fenômeno ocorre através da ativação da resposta SOS de reparo a danos no DNA, estando também relacionadas à mobilização de fagos e plasmídeos (PAINTER et al., 2015; VESTERGAARD; PAULANDER; INGMER, 2015). A seguir são apresentados os principais elementos genéticos móveis de *S. aureus*.

2.1 Plasmídeos de *S. aureus*

Os plasmídeos são a principal forma de disseminação de determinantes de resistência e fatores de virulência (BUKOWSKI et al., 2019), sendo definidas como moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) de fita dupla circular (covalentemente fechadas) com capacidade autorreplicante que geralmente não contêm genes necessários para funções celulares essenciais. Os plasmídeos de *S. aureus* tem tamanho variando entre 1 kb até mais de 100kb, mediano de 20 kb (COPIN; SHOPSIN; TORRES, 2018).

Os pequenos plasmídeos críticos são predominantes e possuem apenas genes de replicação, enquanto os maiores tendem a estar implicados na desintoxicação de metais pesados, na disseminação da resistência a múltiplos fármacos (genes de resistência à vancomicina e macrolídeos) e na produção de proteínas associadas à virulência (genes codificadores de enterotoxinas) (BUKOWSKI et al., 2019; FESSLER et al., 2018; MCCARTHY; LINDSAY, 2012; MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). A grande maioria dos plasmídeos de *S. aureus* necessita de fagos

ou plasmídeos conjugativos maiores para ser transmitidos (COPIN; SHOPSIN; TORRES, 2018).

2.2 Bacteriófagos de *S. aureus*

Outro tipo de MGE importante são os fagos, vírus que podem se integrar ao cromossomo *S. aureus* levando a dispersão de genes de virulência e resistência (MASLANOVA et al., 2013). Estudos recentes que analisaram os genomas depositados de diferentes linhagens de *S. aureus* sugerem a presença de um a quatro bacteriófagos, sendo reconhecidos mais de 80 tipos de sequências desse vírus para esta espécie (COPIN; SHOPSIN; TORRES, 2018). Os fagos podem carrear um ou mais genes relacionados à resistência aos antibióticos (cassete cromossomal de estafilococos *mec* - *SCCmec*; do inglês *staphylococcal cassette chromosome mec*) (CHLEBOWICZ et al., 2014; SCHARN; TENOVER; GOERING, 2013) e fatores de virulência como a toxina leucocidina Panton-Valentine - PVL), enterotoxinas (*sea*, *sek*, *seq*) e toxina esfoliativa (*eta*) (GARBACZ; PIECHOWICZ; MROCZKOWSKA, 2015; HU et al., 2015; KARASARTOVA et al., 2016). Os fagos também mobilizam outros MGEs como plasmídeos e SaPIs, amplificando assim sua relevância para a variabilidade genética microbiana (MARTINEZ-RUBIO et al., 2017).

2.3 Ilhas de Patogenicidade de *S. aureus*

As SaPIs são ilhas cromossômicas que residem quiescentes em locais específicos no cromossomo de *S. aureus* e são induzidas por fagos auxiliares a se replicar e disseminar para outras linhagens e espécies, desempenhando papéis importante na patogenicidade bacteriana (MARTINEZ-RUBIO et al., 2017; NGUYEN, S. V.; MCSHAN, 2014). SaPIs espalham genes codificadores de toxinas entre bactérias (enterotoxinas e toxinas do choque tóxico, estando relacionadas a contaminação alimentar (BOWRING et al., 2017; SATO'O et al., 2013; SUZUKI et al., 2015).

3 | TOXINAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

3.1 Alfa-toxina e β -hemolisina

Alfa-toxina é uma proteína de 33 kDa produzida por isolados clínicos de *S. aureus*, tem sido relatada por neutralizar a resposta imunitária protetora (OLANIYI et al., 2018). A α -toxina se liga à célula-alvo, formando poros na bicamada lipídica para formar um canal transmembrana hidrofílico (SEILIE; BUBECK WARDENBURG, 2017). Demonstrou-se que esta toxina afeta uma ampla gama de tipos de células humanas, incluindo células epiteliais, células endoteliais, células T, monócitos e macrófagos (HILLIARD et al., 2015).

A β -hemolisina é produzida em grandes quantidades em isolados de infecções crônicas da pele humana (KATAYAMA et al., 2013). É tóxica contra queratinócitos humanos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos T e inibe a expressão de interleucina-8 (IL-8) pelas células endoteliais. Estes podem contribuir para a evasão do fagossomo e indução da formação de biofilme (KATAYAMA et al., 2013; TAM; TORRES, 2019).

3.2 Leucocidina Panton-Valentine - PVL

PVL é uma toxina frequentemente codificada por genes presentes MGEs como os bacteriófagos lisogênicos (HU et al., 2015; PRABHAKARA et al., 2013). É uma toxina formadora de poros que possui duas subunidades denominadas de proteínas classe S (LukS-PV) e classe F (LukF-PV). Quando em contato com as membranas celulares do hospedeiro, reduz a resistência imunológica por lise de leucócitos ou apoptose e tem como alvo os receptores de complemento (GOUDARZI et al., 2019). Em vários estudos, os isolados de *S. aureus* portadores da toxina PVL estão ligados a infecções cutâneas, incluindo abscessos, furúnculos e feridas cirúrgicas (CHANGCHIEN et al., 2016; FUNAKI et al., 2019; HARCH et al., 2017; IMMERGLUCK et al., 2017; OLANIYI et al., 2018; SHAHINI SHAMS ABADI et al., 2017; SINA et al., 2013).

Atualmente, tem sido bem documentado que as IPTMs (Infecção da Pele e Tecidos Moles) estão frequentemente associadas a isolados de *S. aureus* portadoras de PVL (OLIVEIRA, D.; BORGES; SIMOES, 2018). Infecções por *S. aureus* adquiridas em hospital que combinam produção da toxina PVL com alta resistência antimicrobiana estão emergindo rapidamente e parece ser impulsionado pelo aumento de infecções cutâneas adquiridas por MRSA. Os genes codificadores de PVL podem ser encontrados em clones altamente diversificados de isolados de *S. aureus* (GOUDARZI et al., 2019). Os isolados de MRSA produtores de toxina PVL podem causar infecções mais graves e complicadas, com maior taxa de mortalidade quando comparadas às cepas que não produzem toxina PVL (ZHANG et al., 2016).

3.3 Modulinas solúveis em fenol (PSMs)

As modulinas solúveis em fenol (PSMs) são outro tipo de fator de virulência em *S. aureus*, codificado no genoma central e subdividem-se em PSM α , PSM β e PSM γ (KAITO et al., 2011; OLIVEIRA, D.; BORGES; SIMOES, 2018). Esses fatores de virulência são uma família de pequenos peptídeos α -helicoidais, anfipáticos, que possuem atividades citolíticas e desempenham um papel importante na patogênese do *S. aureus* (JOO; CHEUNG; OTTO, 2011). No genoma de *S. aureus*, o loco *agr* regula a expressão de vários genes de virulência e o gene *agrA* atua como um regulador positivo para os PSMs (KHORASANI et al., 2019).

Acredita-se que as PSMs se ligam à membrana citoplasmática de maneira não

específica, o que, por sua vez, pode levar à desintegração da membrana. Considerou-se que a composição de fosfolipídios e a carga da membrana são importantes para a suscetibilidade das células às PSMs (OTTO, 2014). A tendência de PSMs de se agregarem em oligômeros, formando poros de curta duração e sua capacidade de facilitar a disseminação em superfícies ou estruturar biofilmes parece ser os principais aspectos na patogênese (PESCHEL; OTTO, 2013).

PSM α desempenha um papel chave na capacidade de MRSA associado à comunidade para causar infecção da pele e bacteremia e os peptídeos PSMs em *S. aureus* têm atividades de estruturação de biofilme, indicando sua influência no desenvolvimento do biofilme através de propriedades físico-químicas compartilhadas (PERIASAMY et al., 2012; WANG et al., 2007). Além disso, acredita-se que a produção de PSMs esteja altamente correlacionada à capacidade das espécies estafilocócicas de causar infecções invasivas, devido à sua capacidade de lisar neutrófilos humanos e estimular respostas inflamatórias (OLIVEIRA, D.; BORGES; SIMOES, 2018).

Foi descrito em literatura linhagens contendo os genes *psm* e *mecA* (*psm-mec*) em clusters *SCCmec* (*SCCmec* tipo II, III e VIII) (KAITO et al., 2011; QUECK et al., 2009). A proteína PSM-mec codificada pelo gene no elemento genético móvel *SCCmec* regulam a virulência de *S. aureus* (KAITO et al., 2011). Esta é a primeira toxina do *S. aureus* que seu gene localiza em um MGE com um gene de resistência a antibióticos (CHATTERJEE et al., 2011). Essas funções podem contribuir para diminuir o dano adicional ao hospedeiro, mas permite a sobrevivência das bactérias no hospedeiro por mais tempo (KHORASANI et al., 2019). Estudos recentes sugerem que as PSMs contribuem com a inflamação cutânea através da indução da produção de IL-17 por células T auxiliares pela via mediada por IL-36R (LIU et al., 2017). Particularmente, as PSMs de *S. aureus* induzem a liberação de IL-1 α e IL-36 α por queratinócitos, levando a produção de IL-17 mediada por IL-1R e IL-36R (NAKAGAWA et al., 2017).

3.4 Toxinas esfoliativas (TEs)

As toxinas esfoliativas (TEs), conhecidas como toxinas epidermolíticas, que são serinas proteases extremamente específicas secretadas por *S. aureus*. Estas proteases reconhecem e hidrolisam as caderinas do desmossomo nas camadas superficiais da pele (KATO et al., 2011). As TEs são exotoxinas associadas à clivagem de junções de queratinócitos e à adesão célula-célula na epiderme do hospedeiro, o que pode induzir o descascamento da pele e a formação de bolhas (MALACHOWA; DELEO, 2010).

As principais TEs são a toxina esfoliativa A/B/C/D (TEA, TEB, TEC, TED). TEA e TEB são mais comumente implicados em danos à pele humana (tais como, impetigo bolhoso e SSSS - Síndrome da Pele Escaldada do Recém-Nascido, respectivamente), enquanto a TEC foi isolada apenas de uma infecção de cavalo e

nenhuma associação com doença humana foi encontrada (BUKOWSKI; WLADYKA; DUBIN, 2010). A TED só foi identificada em 2002 em uma amostra clínica de *S. aureus* (OLIVEIRA, D.; BORGES; SIMOES, 2018).

4 | BIOFILMES DE *S. AUREUS*

Os biofilmes bacterianos são a causa subjacente de muitas infecções crônicas que são difíceis de tratar. A tendência de vida do biofilme confere tolerância de alto nível a antibióticos e anti-sépticos, o qual é refletido pela exigência de concentrações 100 a 1.000 vezes mais altas desses compostos para tratar biofilmes em comparação com seus equivalentes planctônicos (ORAZI; RUOFF; O'TOOLE, 2019). Dessa forma, os biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas envolvidas por uma matriz de polímeros extracelulares aderidas a superfícies. Os microrganismos podem associar-se a resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, caso o processo de higienização seja aplicado incorretamente (GALIE et al., 2018; OLIVEIRA, W. F. et al., 2018).

Esses biofilmes podem estar ligados a superfícies ou outras células que possuem uma matriz extracelular protetora, dessa forma pode promover a colonização por *S. aureus*. A formação de biofilmes por *S. aureus* em implantes médicos e tecidos hospedeiros torna este patógeno uma das principais causas de infecções relacionadas aos dispositivos médicos e hospitalares, as quais resultam em condições clínicas perigosas, crônicas e recorrentes (BALASUBRAMANIAN et al., 2017; OLIVEIRA, W. F. et al., 2018). A síntese de biofilme fornece defesa contra vários mecanismos imunológicos do hospedeiro e da ação dos agentes antimicrobianos. Neste sentido, linhagens com resistência a múltiplas drogas possuem também geralmente elevada capacidade de produzir biofilme, a exemplo das linhagens de MRSA (AZMI; QREI; ABDEEN, 2019; MONTEIRO et al., 2019).

Diversos genes estão envolvidos na produção e manutenção de biofilmes por *S. aureus*. Estudos indicam que a formação do biofilme é mediada pelo operon *icaADBC*, presente na maioria das linhagens de MRSA e MSSA (MONTEIRO et al., 2019; SERRAY et al., 2016). Este *locus* está envolvido com a produção da adesina intercelular polissacarídica (PIA) presente na matriz extracelular de *S. aureus*. A expressão do locus *ica* é afetada pelas condições ambientais e está associada aos mecanismos de *quorum sensing* (QS) em situações onde a dispersão para novos locais de infecção é necessária, os genes *icaADBC* são regulados negativamente (ARCIOLA et al., 2015; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013).

5 | CONCLUSÃO

S. aureus possui múltiplos determinantes de virulência e resistência que garante a adaptabilidade desta espécie aos mais diferentes habitats e influência no sucesso

da colonização nos hospedeiros. Dentre os fatores de virulência mais importantes estão as proteínas de adesão, toxinas citotóxicas e a formação de biofilme. De fato, diversos estudos têm demonstrado que as linhagens envolvidas em surtos (em ambientes hospitalares e nas comunidades) possuem perfis de hipervirulência associados à elevada resistência aos antimicrobianos. Neste sentido, é de suma importância estudos que visam a detecção dos determinantes de virulências de clones circulantes em determinadas regiões para que medidas efetivas de controle e prevenção sejam adotadas.

REFERÊNCIAS

ALIBAYOV, B. et al. Staphylococcus aureus mobile genetic elements. **Mol Biol Rep**, v.41, n.8, p.5005-18, Aug, 2014.

ARCIOLA, C. R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Front Cell Infect Microbiol**, v.5, p.7, 2015.

AZMI, K.;QREI, W.; ABDEEN, Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of Staphylococcus aureus isolated from Palestinian patients. **BMC Genomics**, v.20, n.1, p.578, Jul 12, 2019.

BALASUBRAMANIAN, D. et al. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. **Pathog Dis**, v.75, n.1, Jan 1, 2017.

BOSI, E. et al. Comparative genome-scale modelling of Staphylococcus aureus strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.113, n.26, p.E3801-9, Jun 28, 2016.

BOWRING, J. et al. Pirating conserved phage mechanisms promotes promiscuous staphylococcal pathogenicity island transfer. **Elife**, v.6, Aug 8, 2017.

BUKOWSKI, M. et al. Prevalence of Antibiotic and Heavy Metal Resistance Determinants and Virulence-Related Genetic Elements in Plasmids of Staphylococcus aureus. **Front Microbiol**, v.10, p.805, 2019.

BUKOWSKI, M.;WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. **Toxins (Basel)**, v.2, n.5, p.1148-65, May, 2010.

CHANGCHIEN, C. H. et al. Antibiotic susceptibility and genomic variations in Staphylococcus aureus associated with Skin and Soft Tissue Infection (SSTI) disease groups. **BMC Infect Dis**, v.16, p.276, Jun 10, 2016.

CHATTERJEE, S. S. et al. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulín PSM-mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **PLoS One**, v.6, n.12, p.e28781, 2011.

CHAVES-MORENO, D. et al. Exploring the transcriptome of Staphylococcus aureus in its natural niche. **Sci Rep**, v.6, p.33174, Sep 19, 2016.

CHLEBOWICZ, M. A. et al. The Staphylococcal Cassette Chromosome mec type V from Staphylococcus aureus ST398 is packaged into bacteriophage capsids. **Int J Med Microbiol**, v.304, n.5-6, p.764-74, Jul, 2014.

- COPIN, R.;SHOPSIN, B.; TORRES, V. J. After the deluge: mining *Staphylococcus aureus* genomic data for clinical associations and host-pathogen interactions. **Curr Opin Microbiol**, v.41, p.43-50, Feb, 2018.
- FESSLER, A. et al. Small Antimicrobial Resistance Plasmids in Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398. **Front Microbiol**, v.9, p.2063, 2018.
- FUNAKI, T. et al. SCCmec typing of PVL-positive community-acquired *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) at a Japanese hospital. **Heliyon**, v.5, n.3, p.e01415, Mar, 2019.
- FURTADO, G. H. et al. Early switch/early discharge opportunities for hospitalized patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* complicated skin and soft tissue infections in Brazil. **Braz J Infect Dis**, May 9, 2019.
- GALIE, S. et al. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. **Front Microbiol**, v.9, p.898, 2018.
- GARBACZ, K.;PIECHOWICZ, L.; MROCZKOWSKA, A. Distribution of toxin genes among different spa types and phage types of animal *Staphylococcus aureus*. **Arch Microbiol**, v.197, n.7, p.935-40, Sep, 2015.
- GOLDMANN, O.; MEDINA, E. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. **Int J Med Microbiol**, v.308, n.6, p.625-630, Aug, 2018.
- GOUDARZI, M. et al. Genotype distribution of Pantone-Valentine leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound related infections: A three year multi-center study in Tehran, Iran. **Jpn J Infect Dis**, May 31, 2019.
- HAABER, J.;PENADES, J. R.; INGMER, H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, v.25, n.11, p.893-905, Nov, 2017.
- HARCH, S. A. J. et al. High burden of complicated skin and soft tissue infections in the Indigenous population of Central Australia due to dominant Pantone Valentine leukocidin clones ST93-MRSA and CC121-MSSA. **BMC Infect Dis**, v.17, n.1, p.405, Jun 7, 2017.
- HILLIARD, J. J. et al. Anti-alpha-toxin monoclonal antibody and antibiotic combination therapy improves disease outcome and accelerates healing in a *Staphylococcus aureus* dermonecrosis model. **Antimicrob Agents Chemother**, v.59, n.1, p.299-309, Jan, 2015.
- HODILLE, E. et al. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev**, v.30, n.4, p.887-917, Oct, 2017.
- HU, Q. et al. Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-positive health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates are associated with skin and soft tissue infections and colonized mainly by infective PVL-encoding bacteriophages. **J Clin Microbiol**, v.53, n.1, p.67-72, Jan, 2015.
- HUNTER, C. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Comprehensive Review and a Plastic Surgeon's Approach to the Occult Sites. **Plast Reconstr Surg**, v.138, n.2, p.515-23, Aug, 2016.
- IMMERGLUCK, L. C. et al. Risk of Skin and Soft Tissue Infections among Children Found to be *Staphylococcus aureus* MRSA USA300 Carriers. **West J Emerg Med**, v.18, n.2, p.201-212, Feb, 2017.
- JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiol Spectr**, v.6, n.1, Feb, 2018.

- JOO, H. S.;CHEUNG, G. Y.; OTTO, M. Antimicrobial activity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is caused by phenol-soluble modulins derivatives. **J Biol Chem**, v.286, n.11, p.8933-40, Mar 18, 2011.
- KAITO, C. et al. Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element *SCCmec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence. **PLoS Pathog**, v.7, n.2, p.e1001267, Feb 3, 2011.
- KARASARTOVA, D. et al. Identification of virulence genes carried by bacteriophages obtained from clinically isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v.63, n.4, p.433-447, Dec, 2016.
- KATAYAMA, Y. et al. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v.195, n.6, p.1194-203, Mar, 2013.
- KATO, F. et al. Regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, v.79, n.4, p.1660-70, Apr, 2011.
- KHORASANI, M. R. et al. High prevalence of *SCC mec*-associated Phenol-soluble modulin gene in clinical isolates of methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*. **Ann Ig**, v.31, n.2, p.148-155, Mar-Apr, 2019.
- KRISMER, B. et al. Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* metabolism and niche adaptation in the human nose. **PLoS Pathog**, v.10, n.1, p.e1003862, Jan, 2014.
- KRISMER, B. et al. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v.15, n.11, p.675-687, Oct 12, 2017.
- LAVERTY, G.;GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiol**, v.8, n.4, p.509-24, Apr, 2013.
- LIU, H. et al. *Staphylococcus aureus* Epicutaneous Exposure Drives Skin Inflammation via IL-36-Mediated T Cell Responses. **Cell Host Microbe**, v.22, n.5, p.653-666 e5, Nov 8, 2017.
- MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cell Mol Life Sci**, v.67, n.18, p.3057-71, Sep, 2010.
- MARTINEZ-RUBIO, R. et al. Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. **ISME J**, v.11, n.4, p.1029-1042, Apr, 2017.
- MASLANOVA, I. et al. Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including *SCCmec* with different frequencies. **Environ Microbiol Rep**, v.5, n.1, p.66-73, Feb, 2013.
- MCCARTHY, A. J.; LINDSAY, J. A. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. **BMC Microbiol**, v.12, p.104, Jun 12, 2012.
- MCGUINNESS, W. A.;MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale J Biol Med**, v.90, n.2, p.269-281, Jun, 2017.
- MONTEIRO, A. S. et al. Phylogenetic and Molecular Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bloodstream Infections in Northeast Brazil. **Microorganisms**, v.7, n.7, Jul 22, 2019.
- NAKAGAWA, S. et al. *Staphylococcus aureus* Virulent PSMalpha Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. **Cell Host Microbe**, v.22, n.5,

p.667-677 e5, Nov 8, 2017.

NARAYANAN, N. et al. Evaluation of treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the obese patient. **Infect Drug Resist**, v.12, p.877-891, 2019.

NGUYEN, A. T.; TALLENT, S. M. From Commensal to Consumer: *Staphylococcus aureus* Toxins, Diseases, and Detection Methods. **J AOAC Int**, v.101, n.4, p.1127-1134, Jul 1, 2018.

NGUYEN, S. V.; MCSHAN, W. M. Chromosomal islands of *Streptococcus pyogenes* and related streptococci: molecular switches for survival and virulence. **Front Cell Infect Microbiol**, v.4, p.109, 2014.

OLANIYI, R. O. et al. Deciphering the Pathological Role of Staphylococcal alpha-Toxin and Panton-Valentine Leukocidin Using a Novel Ex Vivo Human Skin Model. **Front Immunol**, v.9, p.951, 2018.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMOES, M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins (Basel)**, v.10, n.6, Jun 19, 2018.

OLIVEIRA, W. F. et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. **J Hosp Infect**, v.98, n.2, p.111-117, Feb, 2018.

OLUFUNMISO, O.; TOLULOPE, I.; ROGER, C. Multidrug and vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different teaching hospitals in Nigeria. **Afr Health Sci**, v.17, n.3, p.797-807, Sep, 2017.

ORAZI, G.; RUOFF, K. L.; O'TOOLE, G. A. *Pseudomonas aeruginosa* Increases the Sensitivity of Biofilm-Grown *Staphylococcus aureus* to Membrane-Targeting Antiseptics and Antibiotics. **MBio**, v.10, n.4, Jul 30, 2019.

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Curr Opin Microbiol**, v.17, p.32-7, Feb, 2014.

PAINTER, K. L. et al. *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H₂O₂-resistant small-colony variants via the SOS response. **Infect Immun**, v.83, n.5, p.1830-44, May, 2015.

PERES, A. G. et al. Uncoupling of pro- and anti-inflammatory properties of *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, v.83, n.4, p.1587-97, Apr, 2015.

PERIASAMY, S. et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, n.4, p.1281-6, Jan 24, 2012.

PESCHEL, A.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. **Nat Rev Microbiol**, v.11, n.10, p.667-73, Oct, 2013.

PLANET, P. J. et al. Architecture of a Species: Phylogenomics of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, v.25, n.2, p.153-166, Feb, 2017.

PRABHAKARA, S. et al. Genome sequencing unveils a novel sea enterotoxin-carrying PVL phage in *Staphylococcus aureus* ST772 from India. **PLoS One**, v.8, n.3, p.e60013, 2013.

QUECK, S. Y. et al. Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. **PLoS Pathog**, v.5, n.7, p.e1000533, Jul, 2009.

RICHARDSON, J. R. et al. PSM Peptides From Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Impair the Adaptive Immune Response via Modulation of Dendritic Cell Subsets in vivo. **Front Immunol**, v.10, p.995, 2019.

- SATO'O, Y. et al. A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. **Microbiol Immunol**, v.57, n.2, p.91-9, Feb, 2013.
- SCHARN, C. R.;TENOVER, F. C.; GOERING, R. V. Transduction of staphylococcal cassette chromosome mec elements between strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.11, p.5233-8, Nov, 2013.
- SCHRODER, W.;GOERKE, C.; WOLZ, C. Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**, v.68, n.3, p.529-38, Mar, 2013.
- SEILIE, E. S.; BUBECK WARDENBURG, J. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. **Semin Cell Dev Biol**, v.72, p.101-116, Dec, 2017.
- SERRAY, B. et al. Genes encoding adhesion factors and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Morocco. **J Infect Dev Ctries**, v.10, n.8, p.863-9, Aug 31, 2016.
- SHAHINI SHAMS ABADI, M. et al. Epidemiology of Panton-Valentine Leukocidin harbouring *Staphylococcus aureus* in cutaneous infections from Iran: a systematic review and meta-analysis. **Infez Med**, v.25, n.3, p.217-223, Sep 1, 2017.
- SINA, H. et al. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. **BMC Microbiol**, v.13, p.188, Aug 8, 2013.
- STANCZAK-MROZEK, K. I.;LAING, K. G.; LINDSAY, J. A. Resistance gene transfer: induction of transducing phage by sub-inhibitory concentrations of antimicrobials is not correlated to induction of lytic phage. **J Antimicrob Chemother**, v.72, n.6, p.1624-1631, Jun 1, 2017.
- SUZUKI, Y. et al. Identification and characterization of novel *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands encoding staphylococcal enterotoxins originating from staphylococcal food poisoning isolates. **J Appl Microbiol**, v.118, n.6, p.1507-20, Jun, 2015.
- TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbiol Spectr**, v.7, n.2, Mar, 2019.
- THAI, V. C. et al. iTRAQ-based proteome analysis of fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Glob Antimicrob Resist**, v.8, p.82-89, Mar, 2017.
- TIWARI, K. B.;GATTO, C.; WILKINSON, B. J. Interrelationships between Fatty Acid Composition, Staphyloxanthin Content, Fluidity, and Carbon Flow in the *Staphylococcus aureus* Membrane. **Molecules**, v.23, n.5, May 17, 2018.
- VAN WAMEL, W. J. B. *Staphylococcus aureus* infections, some second thoughts. **Curr Opin Infect Dis**, v.30, n.3, p.303-308, Jun, 2017.
- VANEGAS MUNERA, J. M. et al. In vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections to vancomycin, daptomycin, linezolid and tedizolid. **Braz J Infect Dis**, v.21, n.5, p.493-499, Sep - Oct, 2017.
- VESTERGAARD, M.;PAULANDER, W.; INGMER, H. Activation of the SOS response increases the frequency of small colony variants. **BMC Res Notes**, v.8, p.749, Dec 8, 2015.
- WANG, R. et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-

associated MRSA. **Nat Med**, v.13, n.12, p.1510-4, Dec, 2007.

YANG, J. J. et al. Commensal *Staphylococcus aureus* Provokes Immunity to Protect against Skin Infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Mol Sci**, v.19, n.5, Apr 25, 2018.

ZHANG, C. et al. Presence of the Panton-Valentine Leukocidin Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Associated with Severity and Clinical Outcome of Hospital-Acquired Pneumonia in a Single Center Study in China. **PLoS One**, v.11, n.6, p.e0156704, 2016.

ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) EM COPROCULTURA DE PACIENTES AMBULATORIAIS

Daniela Cristiane da Cruz Rocha

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Ananindeua, PA, Brasil – danielarocha@iec.gov.br

Érica Kássia Sousa Vidal

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Ananindeua, PA, Brasil

Karina Lúcia Silva da Silva

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Ananindeua, PA, Brasil

Débora de Castro Costa

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Ananindeua, PA, Brasil

Anderson Nonato do Rosario Marinho

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Ananindeua, PA, Brasil

RESUMO: Nos últimos anos tem se observado um rápido aumento na resistência bacteriana no mundo. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de enterobactérias através da determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e pesquisa dos genes *bla*^{CTX-M}, *bla*^{TEM} e *bla*^{SHV}. A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados foi avaliada pelo método de disco

difusão e pelo sistema automatizado VITEK 2. Foram obtidos 176 isolados, distribuídos em *Enterobacter* spp 42,86% (6/14), *Klebsiella* spp. 28,57% (4/14), *Escherichia coli* 14,28% (2/14), *Shigella flexneri* 14,28% (2/14), destes 7,95% (14/176) apresentaram perfil de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, os testes de suscetibilidade demonstrando que 100% das amostras foram resistentes à ampicilina e as cefalosporinas de primeira e segunda geração, 85% foram resistentes à cefalosporina de terceira geração e 9% resistente à cefalosporina de quarta geração. Também foi identificado um isolado de *Escherichia coli* resistente à todas as cefalosporinas, incluindo as de amplo espectro e ao aztreonam e um isolado de *Enterobacter* spp resistente ao ertapenem. A análise genética dos isolados positivos para a produção de ESBL, identificou o gene *bla*^{CTX-M} em 92,85% (13/14) (*Enterobacter* spp, 5; *Klebsiella* spp, 4; *Shigella flexneri*, 2 e *Escherichia coli*, 2), *bla*^{TEM} em 21,43% (3/14) (*Enterobacter* spp, 2 e *Klebsiella* spp., 1) e a combinação dos genes *bla*^{CTX-M} e *bla*^{TEM} foi encontrado em 14,28% (2/14). Os resultados deste estudo demonstram que a avaliação contínua da resistência aos β -lactâmicos é extremamente importante, evidenciando o valor de um monitoramento contínuo e estratégias eficientes para diminuir a propagação destes agentes.

PALAVRAS-CHAVE: β -lactamases, ESBL,

ENTEROBACTERIA PRODUCERS OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE (ESBL) IN AMBULATORY PATIENTS COPRO CULTURE

ABSTRACT: In recent years there has been a rapid increase in bacterial resistance in the world. Thus, the objective of this work was to characterize isolates of enterobacteria by determining the resistance profile to β -lactam antimicrobials and bla^{CTX-M}, bla^{TEM} and bla^{SHV} gene research. The susceptibility to the antimicrobial agents of the isolates was evaluated by disk diffusion method and the VITEK 2 automated system. 176 isolates, distributed in *Enterobacter* spp 42.86% (6/14), *Klebsiella* spp. 28.57% (4/14), *Escherichia coli* 14.28% (2/14), *Shigella flexneri* 14.28% (2/14), 7.95% of these (14/176) presented β -lactams antimicrobial resistance profile, susceptibility testing demonstrating that 100% of the samples were resistant to ampicillin and cephalosporins of first and second generation, 85% were resistant to third generation cephalosporins and 9% resistant to fourth generation cephalosporin. It was also identified a cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolate, including those of broad spectrum and aztreonam and an *Enterobacter* spp isolate resistant to ertapenem. Genetic analysis of positive isolates for the production of ESBL, identified the bla^{CTX-M} gene at 92.85% (13/14) (*Enterobacter* spp, 5; *Klebsiella* spp, 4; *Shigella flexneri*, 2 and *Escherichia coli*, 2), bla^{TEM} at 21.43% (3/14) (*Enterobacter* spp, 2 and *Klebsiella* spp., 1) and the combination of genes bla^{CTX-M} and bla^{TEM} was found at 14.28% (2/14). The results of this study demonstrate that continuous evaluation of β -lactam resistance is extremely important, highlighting the value of continuous monitoring and efficient strategies to slow the spread of these agents.

KEYWORDS: B-lactamase, ESBL, Antimicrobial resistance, Enterobacteria.

1 | INTRODUÇÃO

Enterobactérias produtoras de ESBL, (do inglês, *Extended Spectrum β -lactamases*) são reconhecidas como importantes agentes etiológicos causadoras de infecções do trato urinário, pneumonias, septicemias, meningites entre outras inúmeras infecções (Manyahi et al., 2017). Essas foram capazes de se adaptar às profundas modificações farmacológicas ocorridas nas últimas três décadas, sendo descritas em percentuais endêmicos e epidêmicos em hospitais de todo o mundo (Hizajji et al., 2016).

As ESBLs são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira à quarta geração e o monobactâmico aztreonam, minimizando as opções terapêuticas (Manyahi et al., 2017). A utilização excessiva ou inadequada dos antibióticos em humanos e animais acelerou o aparecimento e a propagação de bactérias resistentes (Chandramohan & Revell 2012). Além disso, os genes que codificam estas enzimas

fazem parte de elementos genéticos móveis como integrons, transposons e plasmídeos que podem ser disseminados horizontalmente entre diferentes bactérias, o que representa um risco epidemiológico (Persoons et al., 2010; Seki et al., 2013). Assim, o rápido reconhecimento de amostras produtoras destas enzimas é importante para a seleção do agente antimicrobiano adequado para o tratamento da infecção.

As β -lactamases são enzimas que conferem resistência através de hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, inibindo a biossíntese da camada do peptidoglicano, principal constituinte da parede celular das bactérias, comprometendo a integridade da parede celular e levando à lise celular (Madigan, 2016). São codificadas por genes chamados *bla*, (*bla*^{TEM}, *bla*^{SHV}, *bla*^{CTX-M}) que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A expressão desses genes pode ser induzida pela presença dos antibióticos β -lactâmicos ou estar continuamente ativada. Assim, as β -lactamases podem estar presentes de forma induzível ou constitutiva (Carattoli, 2013).

A proporção de bactérias produtoras de ESBL ocasionando infecções em todas as regiões do mundo é alta (Hawkey & Jones, 2009). As ESBLs são as principais responsáveis no que diz respeito às infecções nosocomiais e comunitárias por membros da família Enterobacteriaceae (Hizajii et al., 2016). Atualmente, a frequência do aparecimento de cepas multirresistentes que produzem ESBL é cada vez maior, contudo, estas bactérias são menos frequentes na Europa do que na América Latina (Coque et al., 2008). No Brasil, a produção de ESBL em enterobactérias é alarmante, pois já tem sido descritas variantes do tipo *bla*^{CTX-M}, *bla*^{TEM}, *bla*^{SHV}, entre outras (Silva & Lincopan, 2012).

Apesar de existirem muitas pesquisas relatando índices e mecanismos de resistência aos antimicrobianos em enterobactérias em diferentes países e instituições, mostrando as tendências regionais e globais, dados locais são essenciais para poder direcionar as intervenções, a fim de conter os problemas a serem causados por esses microrganismos multirresistentes.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra Populacional Estudada

A amostragem foi constituída de 176 cepas bacterianas, de amostras ambulatoriais, isoladas de coprocultura no período de 2012 a 2016 do Estado do Pará. Com registro do comitê de ética CAAE: 52530916.0.0000.0019.

2.2 Manutenção das amostras

As amostras armazenadas em Ágar estoque (Difco, U.S.A) foram repicadas para o caldo Luria Bertani (LB) (Difco, U.S.A) e incubadas em estufa na temperatura

de 37°C durante 24 horas. Após a turvação do caldo uma alíquota foi semeada em placas de ágar MacConkey (Difco, U.S.A) e incubada a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado através de disco-difusão e por automação no equipamento VITEK® 2 (*BioMérieux*).

2.3 Análise da Suscetibilidade a Agentes Antimicrobianos

A suscetibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados no período de 2012 a 2014 foi avaliada pelo método de disco-difusão de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2012) com os seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico (110 mcg), cefalotina (30 mcg), ceftazidima (30 mcg), cefoxitina (30 mcg), aztreonam (30 mcg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e pelo sistema automatizado VITEK® 2 (*BioMérieux*). Já as amostras bacterianas referentes ao período de 2015 a 2016 foram submetidas ao teste apenas pelo sistema automatizado VITEK® 2 (*BioMérieux*) utilizando o cartão AST-238, onde foram seguidas as instruções do fabricante.

2.4 Controle de qualidade para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

As análises de controle de qualidade para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram utilizadas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC). A *K. pneumoniae* ATCC 700603 produtora de ESBL e a *Escherichia coli* ATCC 25922 não produtora de ESBL, foram utilizadas como controle de qualidade para todos os teste. A interpretação dos resultados foi realizada utilizando os limites preconizados para cada ATCC (CLSI, 2012).

2.5 Extração do DNA bacteriano e PCR para ESBL

Para a extração do DNA bacteriano foi utilizado o kit DNA IQ (*Promega*) seguindo as recomendações do fabricante. Cada reação de amplificação teve um volume final 25µL, contendo 20ng de DNA, 10 Mm Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl, 1,5/µM MgCl₂, 1,25 mM de cada dNTP, 1,25 mM de cada primer e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase *Platinum* (*Invitrogen*). Incubadas em termociclador modelo *Vereti™ 96-Well Thermal Cycler* (*AppliedBiosystems–US*). Após a amplificação para visualização do produto final da PCR, todas as amostras foram aplicadas em gel de agarose (2%) com marcador de peso molecular 1Kb, juntamente com os controles positivo e negativos.

Primer	Sequência (5'→3')	Amplicon	Referência
bla ^{TEM} -R	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1080 pb	Schmitt <i>et al.</i> , 2007.
bla ^{TEM} -F	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
bla ^{SHV} -R	AAAGATCCACTATCGCCAGCAG	231 pb	Naseshi <i>et al.</i> , 2010
bla ^{SHV} -F	ATTCAGTCCGTTTCCCAGCGG		
bla ^{CTX} -R	TTTTTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544 pb	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
bla ^{CTX} -F	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		

Tabela 1: Sequência de primers utilizados para amplificação de genes codificadores de β-lactamases do tipo bla^{CTX-M}, bla^{TEM} e bla^{SHV}.

3 | RESULTADOS

3.1 Gênero/faixa etária

A tabela 2 apresenta o total e o percentual da faixa etária/gênero envolvidos nos casos de pacientes com amostras positivas para bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, transcritas das fichas clínico-epidemiológicas que foram isoladas através de coprocultura durante o período de 2012 a 2016. Do total de amostras analisadas, 57,95% (102/176) são pertencentes ao gênero masculino e 42,04% (74/176) são pertencentes ao sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 0 a 80 anos de idade (Tabela2).

GRUPOS	FAIXA ETÁRIA	MASCULINO		FEMININO		TOTAIS	
		N ^o *	(%)**	N ^o *	(%)**	N ^o *	(%)**
CRIANÇAS	0 a 12	14	7,95%	17	9,65%	31	17,61%
ADOLESCENTES	13 a 18	11	6,25%	-	-	11	6,25%
ADULTOS	19 a 80	67	38,06%	51	28,9%	118	67,04%
	N.I.	10	5,68	6	3,4%	16	9,09%
SUBTOTAIS		102	57,95%	74	42,04%	176	100%

Tabela 2 – Distribuição de faixa etária/gênero de pacientes isolados com enterobactérias no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2016.

*N.I.= Não Informado **Sinal convencional utilizado: - Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

3.2 Locais de Ocorrência

Durante o período de levantamento de dados (janeiro de 2012 a dezembro de 2016), verificou-se a ocorrência de pacientes infectados com enterobactérias patogênicas em 30 municípios (Gráfico 1).

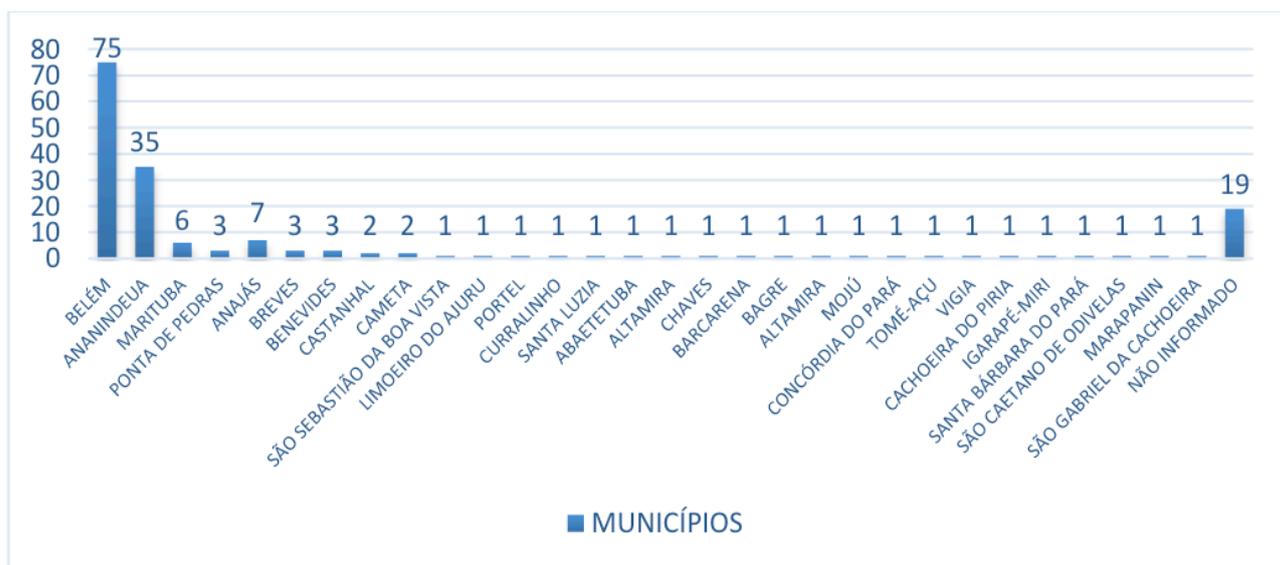


Gráfico 1 – Distribuição de pacientes de acordo com os municípios no período de janeiro de 2012 à dezembro de 2016.

3.3 Cepas Patogênicas Isoladas

Foram analisadas 176 amostras de cepas patogênicas. As amostras estudadas foram distribuídas em 16,4% (29/176) amostras do ano de 2012, 9,6% (17/176) amostras do ano de 2013, 23,8% (42/176) amostras do ano de 2014, 3,4% (6/176) amostras do ano de 2015, e 46,5% (46,5%) amostras do ano de 2016. As enterobactérias isoladas estão descritas na Tabela 3. A *Salmonella Typhi* foi o microrganismo mais isolado (36,9%) seguido *Enterobacter spp* (21,5%) e *Salmonella spp* (14,7%), respectivamente.

Enterobactérias patogênicas isoladas	Nº	(%)
<i>Salmonella Typhi</i>	65	36,9%
<i>Enterobacter spp</i>	38	21,5%
<i>Salmonella spp</i>	26	14,7%
<i>Klebsiella spp.</i>	23	13,0%
<i>Escherichia coli</i>	10	5,6%
<i>Shigella flexneri</i>	6	3,4%
<i>Shigella sonnei</i>	3	1,7%
<i>Proteus mirabilis</i>	3	1,7%
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0,56%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0,56%
TOTAL	176	100%

Tabela 3 – Frequência de microrganismos isolados pertencentes à família Enterobacteriaceae do período de 2012 à 2016.

3.4 Detecção fenotípica de β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Os resultados obtidos do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, a

Escherichia coli foi o único microrganismo que apresentou resistência as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração e o monobactâmico aztreonam (Tabela 4).

Antibióticos	<i>Escherichia coli</i>
Ampicilina (AMP)	R
Ampicilina+Sulbactam (ASB)	R
Piperacilina+Tazobactam (PPT)	S
Cefuroxima (CRX)	R
Cefuroxima axetil (CRXx)	R
Ceftazidima (CAZ)	I
Cefoxitina (CFO)	S
Ceftriaxona (CRO)	R
Cefepime (CPM)	R
Ertapenem (ERT)	S
Imipenem (IPM)	S
Meropenem (MER)	S
Amicacina (AM)	S
Gentamicina (GEN)	R
Ciprofloxacina (CIP)	R
Tigeciclina (TIG)	S
Colistina (COL)	S
Cefalotina (CFL)	R
Aztreonam (ATM)	R
Amoxicilina+Ácido Clavulânico (AMC)	I
Sulfametoxazol+Trimetroprim (SUT)	S
Nitrofurantoína (NIT)	S
Norfloxacin (NOR)	R

Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos do isolado de *Escherichia coli*.

*S=Sensível; R=Resistente; I=Intermediário.

O sistema automatizado VITEK 2 foi utilizado para a triagem das 176 amostras, onde foram observados resultados sugestivos para a produção de ESBL em 7,95% dos isolados (14/176). Na tabela 5, está relacionada a distribuição das espécies isoladas sugestivas de produção de ESBL. Foi observado que dentre os 4 isolados o gênero *Enterobacter* spp (42,85%) foi o microrganismo mais isolado seguido de *Klebsiella* spp (28,57%). Já os isolados de *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* foram os menos detectados com 14,28% de frequência cada uma.

Enterobactérias com fenótipo positivo para produção de ESBL	Nº	(%)
<i>Enterobacter</i> spp	6	42,85%
<i>Klebsiella</i> spp.	4	28,57%
<i>Escherichia coli</i>	2	14,28%
<i>Shigella flexneri</i>	2	14,28%
TOTAL	14	100%

Tabela 5: Distribuição das enterobactérias sugestivas de produção de ESBL.

O gráfico 2 demonstra os resultados obtidos do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado nas 14 amostras positivas na triagem para a produção de ESBL, observou-se que 100% das amostras analisadas foram resistentes à ampicilina e às cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (cefalotina, cefuroxima e cefuroxima axetil), 85% dos isolados demonstraram resistência à cefalosporina de 3ª geração (ceftriaxona). Quanto à cefalosporina de 4ª geração (cefepima) o perfil de resistência foi de 9%.

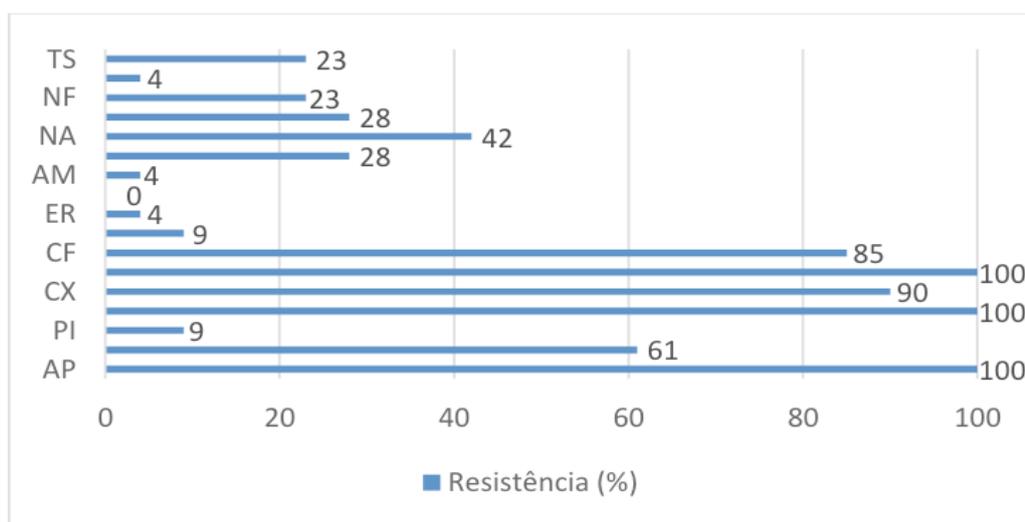


Gráfico 2- Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre amostras pertencentes à família Enterobacteriaceae utilizando o VITEK 2.

*AP=Ampicilina; XL=Amoxicilina/Ácido clavulânico; PI=Piperacilina; CE=Cefalotina; CX= Cefuroxima; CF=Ceftriaxona; CP=Cefepima; ER=Ertapenem; ME=Meropenem; AM= Amicacina; GN=Gentamicina; NA= Ácido Naldíxico; CI=Ciprofloxacino; NF= Norfloxacin; NI= Nitrofurantonoína; TS= Trimetroprim/Sulfametoxazol.

3.5 Detecção genotípica de ESBL

A detecção dos genes de resistência aos β -lactâmicos foi realizada através da técnica de PCR nas 14 amostras (*Enterobacter* spp (n=6), *Klebsiella* spp. (n=4), *Shigella flexneri* (n=2) e *Escherichia coli* (n=2)) que obtiveram um perfil de resistência após triagem fenotípica para detecção de ESBL. Foram pesquisados os genes bla^{CTX-M} , bla^{TEM} e bla^{SHV} . O gene codificador de ESBL do tipo bla^{CTX-M} foi detectado em 13 isolados de *Enterobacter* spp (5), *Klebsiella* spp (4), *Shigella flexneri* (2) e *Escherichia coli* (2). Já o gene codificador de ESBL do tipo bla^{TEM} foi detectado em

isolados de *Enterobacter* spp (n=2) e *Klebsiella* spp. (n=1).

O gene *bla*^{CTX-M} foi o mais encontrado, sendo detectado em 92% (13/14) das amostras analisadas, seguido por *bla*^{TEM} com 21% do total (3/14). Os genes *bla*^{CTX-M} e *bla*^{TEM} foi encontrado em 14% (2/14) dos isolados estudados, respectivamente. O gene *bla*^{SHV} não foi amplificado em nenhuma das amostras.

Espécie/Gênero	GENES CODIFICADORES DE β-LACTAMASES		
	<i>bla</i> ^{CTX-M}	<i>bla</i> ^{TEM}	<i>bla</i> ^{SHV}
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Enterobacter</i> spp (n=6)	5 (83%)	2 (50%)	-
<i>Klebsiella</i> spp. (n=4)	4 (100%)	1 (1%)	-
<i>Shigella flexneri</i> (n=2)	2 (100%)	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	2 (100%)	-	-
TOTAL	13 (92%)	3 (19%)	-

Tabela 5: Distribuição dos genes codificadores de β-lactamases de acordo com a espécie/gênero.

Sinal convencional utilizado: - Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

4 | DISCUSSÃO

O gênero masculino foi mais infectado pelas enterobactérias com 57,95% e 42,05% para o sexo feminino, resultados similares ao encontrado no estudo de Rugini et al., 2015, que estudaram a ocorrência de ESBL em enterobactérias em um hospital no Rio Grande do Sul e obtiveram uma porcentagem de 65,5% para o sexo masculino e 37,5% para o sexo feminino.

A faixa etária em que houve o maior isolamento das enterobactérias produtoras de ESBL, foi acima de 19 anos (67,04%) discordante do estudo realizado por Rugini et al., 2015, no qual a idade média dos pacientes foi acima de 61 anos.

A frequência de isolados produtores de ESBL entre as enterobactérias provenientes de pacientes ambulatoriais neste estudo foi de 7,95%, uma porcentagem menor que o observado por Nogueira et al., 2015 que estudaram a prevalência de ESBL entre enterobactérias em um hospital de grande porte do Paraná, e obteve uma prevalência de 21,3% e Seki et al., 2013 em um estudo com amostras pertencentes à família Enterobacteriaceae de isolados de hemoculturas coletadas de hospitais do Rio de Janeiro que obteve uma porcentagem de 40,2%.

Estudos com bactérias multirresistentes de origem hospitalar, são comuns atualmente, principalmente por ser um ambiente onde a pressão seletiva é grande devido ao uso constante de antimicrobianos. Porém, a pesquisa de bactérias resistentes na comunidade é importante para demonstrar a disseminação de tais bactérias fora do ambiente hospitalar. O que traz à discussão os diversos fatores que

podem contribuir para a resistência bacteriana fora do ambiente hospitalar, como o uso indiscriminado de antibióticos, a descontinuidade do tratamento, esquecimentos durante o tratamento, prescrição médica empírica, entre outros (Abreu et al., 2012; Reis et al., 2013).

Em um dos isolados, a *Escherichia coli* foi identificada como o microrganismo produtor de ESBL, tanto no método de antibiograma automatizado (VITEK 2) como no de disco-difusão, apresentando resistência as cefalosporinas de primeira à quarta geração, penicilina, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, quinolonas e aztreonam. Demonstrando que este isolado detectado possui elevados índices de resistência aos antibióticos atualmente prescritos, levando a escolha terapêutica, os carbapenêmicos. Em um estudo envolvendo 354 isolados clínicos de *Escherichia coli*, de cinco unidades ambulatoriais e hospitalares, no período de outubro de 2002 a maio de 2003, no Rio de Janeiro, foram encontrados 8 isolados produtores de ESBL, ou seja, em 2,2% desses (Del Peloso et al., 2010). Nogueira et al., 2006 estudaram 498 isolados de pacientes de um hospital universitário em Curitiba, no período de 2003 a 2004, e determinaram que 7,2% eram de *Escherichia coli* produtoras de ESBL, ou seja 2,2% desses. No mesmo sentido, Lago et al. 2010 em seu estudo de 838 isolados bacterianos, de pacientes hospitalizados em Passo Fundo, RS no período de julho a dezembro de 2007, foram identificados 96 *Escherichia coli* e 11,4% destas eram ESBL. Flores, et al., 2014 também demonstrou, em seu estudo que de 44 isolados de *Escherichia coli* de culturas provenientes de pacientes de terapia intensiva (UTI), 12% eram de isolados bacterianos produtores de ESBL. Os dados demonstram um aumento na porcentagem de isolamento de *Escherichia coli* produtora de ESBL no Brasil, com o passar dos anos.

A produção de ESBL em enterobactérias é uma importante causa de falha no tratamento da infecção quando há uso de cefalosporinas, analisando os dados obtidos, é possível observar que dois isolados um de *Enterobacter* spp e um de *Escherichia coli* foram resistentes às cefalosporinas de 1^a a 4^a geração. Todas as amostras indicativas de ESBL foram resistentes às cefalosporinas de 1^a geração e 90% das amostras foram resistentes às cefalosporinas de 2^a e 3^a geração. Isso é devido a existência de uma variedade de genótipos para ESBL, derivada das enzimas TEM, SHV e CTX-M, essas enzimas e suas variantes conferem cada uma diferentes afinidades na hidrólise de β -lactâmicos como as penicilinas e as cefalosporinas, podendo refletir no antibiograma com cepas que apresentam sensibilidade a uma cefalosporina de 3^a geração e resistência a uma outra cefalosporina (Flores, et al., 2014; Soares, 2013).

A terapia de infecções ocasionadas por enterobactérias produtoras de ESBL é comumente difícil, uma vez que esses microrganismos podem não ser somente resistentes aos antibióticos β -lactâmicos e o aztreonam, mas são frequentemente associados à resistência a outras classes de antimicrobianos (Sá, 2010), neste estudo as enterobactérias produtoras de ESBL analisadas mostraram-se suscetíveis

a outras classes de antibióticos, como o aminoglicosídeo, a gentamicina obteve 28% de resistência entre as amostras analisadas e entre as quinolonas, o ácido nalidíxico obteve 42% de resistência, norfloxacino com 23% de resistência e ciprofloxacino com 28% de resistência, identificou-se também resistência de 4% ao carbapenêmico ertapenem.

O microrganismo de maior prevalência da enzima ESBL após a triagem fenotípica foi *Enterobacter* spp (42,85%) e *Klebsiella* spp (28,57%) o que difere de outros trabalhos que relatam a *Escherichia coli* como a espécie mais identificada como produtora de ESBL, seguida por *Klebsiella* spp (Schwaber et al., 2005; Gralha et al., 2011). Contudo, o trabalho de Nogueira et al. 2015 corrobora com os resultados do presente estudo em que o gênero *Enterobacter* spp foi o de maior prevalência em produção de ESBL.

Neste estudo, o tipo predominante de ESBL foi o bla^{CTX-M} , presente em 92% das amostras sugestivas de produção de ESBL. Segundo, trabalhos realizados no Brasil, como em São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná (Mana et al., 2012; Tollentino et al., 2011; Nogueira et al., 2015) relatam que o gene CTX-M é o mais frequente encontrado entre as ESBL, principalmente na América do Sul (Tollentino et al., 2011; Wollheim et al., 2011). Celenza et al., 2006 detectaram em seu estudo na Bolívia, genes bla^{CTX-M} em 92% das enterobactérias estudadas, um percentual igual aos valores do presente estudo.

O gene bla^{TEM} foi o segundo gene mais encontrada neste estudo, pois foi encontrada em 19% das amostras indicativas de produção de ESBL. Essa enzima já foi relatada no Brasil, porém é menos comum em relação ao bla^{CTX-M} e bla^{SHV} (Nogueira et al., 2015). É importante ressaltar que os resultados da PCR para os genes bla^{TEM} e bla^{CTX-M} nas amostras estudadas permitiram detectar mais de uma tipo de gene em um mesmo isolado, com frequência de 14,2% para os genes bla^{CTX-M}/bla^{TEM} . Wollheim et al., 2011 através da análise genotípica de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de comunidade e hospitais obteve resultados semelhantes ao do presente estudo, onde foi detectado em 7,8% de seus isolados a combinação dos genes bla^{CTX-M} e bla^{TEM} .

5 | CONCLUSÃO

Nos últimos anos o uso inadequado de antimicrobianos na clínica tem gerado o aumento nos casos de resistência. Os resultados deste estudo demonstram que a avaliação contínua da resistência aos β -lactâmicos em enterobactérias é extremamente importante, pois ficou comprovado a permanência e a disseminação de enterobactérias produtoras de β -lactamases, evidenciando a importância de uma avaliação contínua e estratégias eficientes para diminuir a propagação destes agentes. A produção de ESBL no presente estudo foi evidenciada, tornando-se

preocupante, pois na clínica a produção de ESBL limita a eficácia de antibióticos β -lactâmicos e até outras classes de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ABREU AG, MARQUES SG, MONTEIRO-NETO V, GOLÇALVES AG. Extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae in community-acquired urinary tract infections in São Luís, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2012. v. 44, n. 2, p. 469-471.
- CARATTOLI A. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**. 2013 303:298–304.
- CELENZA G, PELLEGRINI C, CACCAMO M, SEGATORE B, AMICOSANTE G, PERILLI M. Spread blaCTX-M-type and blaPER-2 beta-lactamase gene in clinical isolates from Bolivian hospital. **J Antimicrob Chemother**. 2006; 57: 9975-978.
- CHANDRAMOHAN L, REVELL PA. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a pediatric patient population. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2012. 56:4765–4770.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Document for Antimicrobial Susceptibility testing. **Informational Supplement Document M100 S15. CLSI-** Pennsylvania, USA. 2012.
- COQUE TM, NOVAIS A, CARATTOLI A, POIREL L, PITOUT J, PEIXE L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. **Emerg Infect Dis**. 2008.v. 14, n.2, p. 195-200.
- DEL PELOSO PF, BARROS MFL, SANTOS FA. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **J. Bras. Patol. Med**. 2010. Lab. v. 46, n. 5, p. 365-367.
- FLORES, C. *et al.* Detecção de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em culturas de Vigilância de Unidade de Terapia Intensiva no município do Rio de Janeiro. **in: Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica**, 4, 22-24 out. 2014, João Pessoa.
- GRALHA R. E. F. **Métodos de pesquisa de betalactamases em amostras clínicas – estudo de revisão**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Portugal, 2011.
- HAWKEY, PM; JONES, AM. The changing epidemiology of resistance. **J Antimicrob Chemother**. 2009. v.64, p.3-10.
- HIZAJI SM; FAWZI MA; ALI FM; GALIL AE; Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae in healthy children and associated risk factors. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2016. 15:3.
- LAGO A, FUENTEFRIA SR, FUENTEFRIA DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 2010 vol. 4, n. 4.
- MADIGAN, D. M. **Microbiologia de Brock .14ª Ed.** Editora: Artmed. 2016.
- MANA M, BONASSI N, ROMANELLI S, SVIDZINSK TIE, LEMES RML. Prevalência de *Klebsiella* spp. ESBL isolada em Hospital Escola do Sul de Minas Gerais. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. 2014. v.12, n. 2, p. 497-506.

- MANYAHI J, MOYO, SJ, TELLEVIK, MG, NDUGULILE F, URASSA W, BLOMBERG B et al. Detection of CTX-M-15 beta-lactamases in Enterobacteriaceae causing hospital - and community-acquired urinary tract infections as early as 2004, in Dares Salaam, Tanzania. **BMC Infect Dis**. 2017. 17: 282.
- NOGUEIRA KS, CONTE D, MAIA FV, DALLA-COSTA LM. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2015. 48(2). p. 162-169.
- NOGUEIRA KS, HIGUTI IH, NASCIMENTO AJ, TERASAWA LB, OLIVEIRA S, MATOS AP. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2006. v. 10, n.6, p. 390-5.
- PERSOONS D, HAESEBROUCK F, SMET A, HERMAN L, HEYNDRIKX M, MARTEL A, et al. Risk factors ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. **Epidemiol. Infect**. 2010. p. 1-7.
- REIS HPLC, VIEIRA JB, MAGALHÃES DP, DANÚSIO PS, FONSECA DB, VIANA MD, et al. Avaliação da resistência microbiana em hospitais privados de Fortaleza – Ceará. **Revista Brasileira de Farmácia**. 2013.v. 94, n. 1, p. 83-87.
- RUGINI CL, SOBOTTKA AM, FUENTEFRIA DB. Occurrence and sensitivity profile of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at a tertiary hospital in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2015. 48(6). p. 692-698.
- SÁ, C. M. F. **ESBL em enterobactérias no Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde**. 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, 2010.
- SCHWABER MJ, NAVON-VENEZIA S, SCHWARTZ D, CARMELI Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**. 2005. 49:2137-2139.
- SEKI LM, PEREIRA PS, DE SOUZA CONCEIÇÃO M, SOUZA MJ, MARQUES EA, CARBALLIDO JM, et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: Emergence of CTX-M-15. **Braz J Infect Dis**. 2013 Nov. 17 (6): 640-6.
- SILVA KC, LINCOPAN N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: Impacto clínico e implicações no agronegócio. **J Bras Patol Med Lab**. 2012. v.48. n2. p.91-99.
- SOARES, S. F. **Epidemiologia de estirpes produtoras de ESBL em ITU**. 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal, 2013.
- TOLLENTINO FM, POLOTTO M, NOGUEIRA ML, LINCOPAN N, NEVES P, MAMIZUKA EM, et al. High prevalence of *bla*^{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38} and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microb Drug Resist**. 2011. v. 17, n. 1, p. 7-16.
- WOLLHEIM C, GUERRA IMF, CONTE VD, HOFFMAN SP, SCHREINER FJ, DELAMARE APL, et al. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2011. v. 15.

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE UMA CEPA DE *Escherichia coli* MULTIRRESISTENTE A ANTIBIÓTICOS, ISOLADA DO LAGO ÁGUA PRETA, BELÉM, PARÁ

Ícaro Rainyer Rodrigues de Castro

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA
Belém – Pará

Jorianne Thyeska Castro Alves

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

Alyne Cristina Sodré Lima

Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do
Amapá
Porto Grande – Amapá

Vitória Almeida Gonçalves de Moura

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

Carla Thais Moreira Paixão

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Campinas – São Paulo

Wana Lailan Oliveira da Costa

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

Adriedson Jameson Chaves de Alcântara

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

Carlos Leonardo de Aragão Araújo

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

Larissa Maranhão Dias

Universidade Federal do Pará – UFPA
João Pessoa – Paraíba

Artur Luiz da Costa da Silva

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

Adriana Ribeiro Carneiro Folador

Universidade Federal do Pará – UFPA
Belém – Pará

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil fenotípico e genotípico de uma cepa de bactéria resistente a antibióticos de último recurso, isolada do lago Água Preta, manancial de abastecimento de Belém, Pará. Como métodos de caracterização fenotípica foram utilizados a coloração de Gram, microscopia direta e teste de sensibilidade *in vitro*. E para fins de caracterização genotípica foi realizada a extração do DNA genômico, diferenciação da espécie por meio de PCR Quadruplex e PCR para identificação de genes de resistência. A cepa C40A foi identificada como *Escherichia coli* pertencente ao filogruppo D. A bactéria foi resistente a 87,5% dos antibióticos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas e susceptíveis a apenas 12,5% dos mesmos (Imipenem e Canamicina). Foi identificada a presença do gene *bla*CTX e dos elementos móveis *Int1* e *Int2*, sendo estes componentes genéticos, marcadamente associados a expressão de perfis de resistência a antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: Genética molecular, Microbiologia e Resistência

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC PROFILE OF AN *Escherichia coli* STRAIN
MULTIRESISTENT TO ANTIBIOTICS, ISOLATED FROM ÁGUA PRETA LAKE,
BELÉM, PARÁ

ABSTRACT: The present work aimed to describe the phenotypic and genotypic profile of a bacterium strain resistant to last resort antibiotic, isolated from the Água Preta lake, water supply source in Belém, Pará. The phenotypic characterization methods were Gram staining, direct microscopy and *in vitro* sensitivity test. For genotypic characterization purposes, genomic DNA extraction, species differentiation through Quadruplex PCR and PCR for identification of resistance genes were performed. The C40A strain was identified as an *Escherichia coli* belonging to filogroup D. The bacterium was resistant to 87.5% of the clinically available antibiotics for the treatment of bacterial infections and susceptible to only 12.5% (Imipenem and Kanamycin). The presence of the *bla*CTX gene and the mobile elements *Int1* and *Int2* were identified. These genetic components were markedly associated with the expression of antibiotic resistance profiles.

KEYWORDS: Molecular Genetics, Microbiology and Resistance

1 | INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são substâncias naturais, químicas, sintéticas ou semissintéticas (quimioterápicos), produzidas por várias espécies de microrganismos, vegetais e animais (OKEKE et al., 2005) Encontram-se dentro do grupo de substâncias antimicrobianas, que atualmente representam a classe de medicamentos mais utilizados e prescritos tanto no uso hospitalar quanto na automedicação para o tratamento de doenças bacterianas (WALSH, 2013).

Os antibióticos são rotineiramente utilizados para combater uma infecção estabelecida e possuem a finalidade de eliminar ou impedir o crescimento bacteriano, no entanto, quando usados de forma incorreta trazem sérios problemas à saúde pública e ao meio ambiente (NICOLINI et al., 2008). Segundo Lohner & Staudegger (2001), as doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana devido ao surgimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos, causada pela utilização excessiva e errônea praticada ao longo de décadas (INSA, 2010).

Este uso indiscriminado permitiu que os microrganismos conseguissem se adaptar, por meio de mecanismos de aquisição e transferência de genes de resistência (CDC, 2010). Adaptação esta que contribuiu para a emergência e incidência de bactérias patogênicas e resistentes aos antibióticos não apenas em ambiente hospitalar, mas também no meio ambiente e em animais produtores de alimentos, representando assim, uma grave preocupação e ameaça à saúde pública (FORGETTA et al., 2012).

As bactérias têm sido classificadas como resistentes ou multirresistentes quando são inibidas de forma *in vitro* por antibióticos apenas em concentrações superiores àquelas atingidas de maneira *in vivo* (SA; FIOL; GROppo, 2014), quando esta possui a capacidade de crescer na presença de um ou de várias classes de antibióticos, respectivamente, sinalizando assim, o momento em que este ou estes medicamentos perderam a capacidade de controlar o crescimento bacteriano (SEAN, 2005).

A água é um meio de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humanas e animal, mas também a via pela qual genes de resistência são introduzidos no ecossistema de bactérias naturais alterando a microbiota ambiental, possibilitando assim, o surgimento de cepas multirresistentes nesses ambientes. Dessa forma, os ambientes aquáticos são considerados os principais recipientes para cepas resistentes e genes de resistência à antibióticos (GILLINGS; STOKES, 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho foi conduzido objetivando a caracterização fenotípica e genotípica de cepas de bactérias, bem como a identificação dos genes responsáveis pela resistência.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das análises de caracterização fenotípica e genotípica foi selecionada a cepa C40A, por se tratar de uma cepa previamente identificada como resistente ao antibiótico Cefotaxima e com potencial patogênico a animais de produção. A mesma foi selecionada a partir da bacterioteca disponível do acervo Centro de Genômica e Biologia de Sistemas – CBGS/UFPA, isolada em estudo anterior do lago Água Preta, localizado no Parque Utinga pertencente à COSANPA, considerado como principal reservatório que serve como fonte de abastecimento da cidade de Belém, Pará.

A cepa foi cultivada em meio caldo MacConkey por 24 horas à 37°C, e posteriormente, semeada em meio ágar MacConkey suplementado com 8µg/ml de antibiótico Cefotaxima.

A fim de destacar diferenças morfológicas e tintoriais apresentadas pelas bactérias no processo de identificação, foi utilizada a técnica de coloração de Gram que permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina por determinados intervalos de tempo. As bactérias que adquirem coloração violeta são classificadas como Gram-positivas e aquelas que adquirem a coloração rosa Gram-negativas.

Realizada conseguinte à coloração de Gram, a técnica de microscopia direta disponibiliza informações quanto à composição celular, morfologia e motilidade

do microrganismo. As amostras foram observadas por microscópio óptico de luz direta o qual destacou as características morfológicas, a disposição e a quantidade de microrganismos, dando informações preliminares quanto à identificação do microrganismo.

O antibiograma foi realizado por meio da técnica de difusão em disco (método de Kirby & Bauer). A cepa isolada foi diluída em solução salina até o valor de 0,5 da escala de MacFarland, posteriormente, esta diluição foi semeada em placa com meio de cultura ágar Müeller-Hinton com auxílio de um *swab* estéril. Posterior a isso, os discos dos 16 antibióticos utilizados foram aplicados sob a superfície da placa (Quadro 2), este processo foi realizado duas vezes a fim de confirmar os resultados obtidos. Após 16 horas ou período de *overnight*, de incubação à 37°C em estufa, foi realizada a leitura dos halos de inibição segundo os valores padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*. E como controle, foi utilizada a linhagem *E. coli* ATCC 25922.

Subclasses	Antibióticos
Aminoglicosídeos	Gentamicina (CN) e Canamicina (K)
Carbapenêmicos	Imipenem (IPM)
Cefalosporinas	Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Cefepima (FEP), Cefalotina (KPF)
Fenicolis	Cloranfenicol (C)
Inibidor de β -lactamase	Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC)
Monobactâmicos	Aztreonam (ATM)
Penicilinas	Amoxicilina (AML) e Ampicilina (AMP)
Quinolonas	Ácido Nalidixico (NA) e Ciprofloxacina (CIP)
Sulfonamidas	Sulfametoxazol + Trimetoprim (SXT)
Tetraciclinas	Tetraciclina (TE)

Quadro 2: Antibióticos utilizados no teste de susceptibilidade

Fonte: O autor.

As colônias da cepa C40A inicialmente isoladas em meio sólido, foram cultivadas em meio tríplico de soja (caldo TSB) com agitação a 37°C por 24h, e o *pellet* foi transferido para tubos *ependorf*, onde ocorreu a extração do DNA genômico utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), segundo o protocolo especificado pelo fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizada utilizando espectrofotômetro NanoDrop e a qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio.

Por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) Quadruplex utilizando como alvo os genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2, caracterizado como um gene de lipase esterase putativo (GORDON et al., 2008).

Para a realização da PCR para identificar os genes de resistência, foi utilizado os *primers* dos genes: *blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaSHV*, *blaCTX* e *blaTEM* (BÖCKELMANN et al., 2009; HENRIQUES et al., 2006; HINDIYEH et al., 2011). E a identificação dos *integrans* *Int1* e *Int2* também foi realizada utilizando *primers* previamente descritos na literatura (MOURA et al., 2010).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material biológico obtido a partir do Lago Água Preta e mantido em glicerol 25% em freezer à -80°C foi cultivado em placas de ágar MacConkey, meio este, seletivo para crescimento de enterobactérias. Após 24h de incubação à 37° , foi observado crescimento da cepa C40A de forma pura, sem a presença de qualquer contaminante ambiental ou laboratorial (Figura 4).



Figura 4: Crescimento bacteriano em meio seletivo

Fonte: Arquivo pessoal

A partir da coloração de Gram, a bactéria foi identificada como gram-negativa, apresentando-se na configuração de bacilos (Figura 5).



Figura 5: Microscopia direta de bactérias submetidas à coloração de Gram

Fonte: Arquivo pessoal

Com base nos resultados obtidos a partir das propriedades morfotintoriais, pode-se classificar preliminarmente a bactéria como sendo da família Enterobacteriaceae, devido a mesma ter manifestado características descritas na literatura.

A família Enterobacteriaceae constitui um grande grupo heterogêneo de bactérias cujo hábitat natural é o trato intestinal de humanos e animais. A família inclui numerosos gêneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* e outros). O processo de diferenciação dos gêneros e espécies é realizado por meio de uma série de provas bioquímicas. Algumas espécies, em um mesmo gênero, são muito semelhantes, sendo necessária a realização de provas genéticas específicas para diferencia-las (TRABULSI, 2015).

No Brasil já foram identificadas bactérias resistentes aos antibióticos em água de rio (COUTINHO et al., 2014), lago e lagoa (COUTINHO et al., 2014; MARTINS et al., 2014), e do mar (COUTINHO et al., 2014)

Também já foram identificadas bactérias resistentes em estações de tratamento de esgotos (RIBEIRO, 2011), em água de tanques usados para aquicultura (CARVALHO et al., 2013; RESENDE et al., 2012) e até mesmo em água potável (LASCOWSKI et al., 2013). Esse cenário se torna mais preocupante uma vez que em algumas regiões brasileiras o uso da água apresenta certas limitações em decorrência da sua escassez, más condições de tratamento, contaminação por efluentes domésticos, industriais e/ou agropecuários contendo resíduos de antibióticos (MARENGO, 2008).

Para o teste de disco-difusão, foram utilizados 16 antibióticos clinicamente utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, pertencentes a diversas subclasses deste tipo de fármaco disponíveis para o tratamento de infecções. A partir destes, foi analisada a capacidade de impedir o crescimento microbiano por meio da medida do halo formado ao redor do disco de antibiótico (Figura 6). Os resultados foram interpretados de acordo com os valores estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*, utilizando como controle do teste a cepa padrão de *E. coli* (ATCC 25922), cujas variações aceitáveis para as medidas dos halos de inibição encontram-se estabelecidas no CLSI.

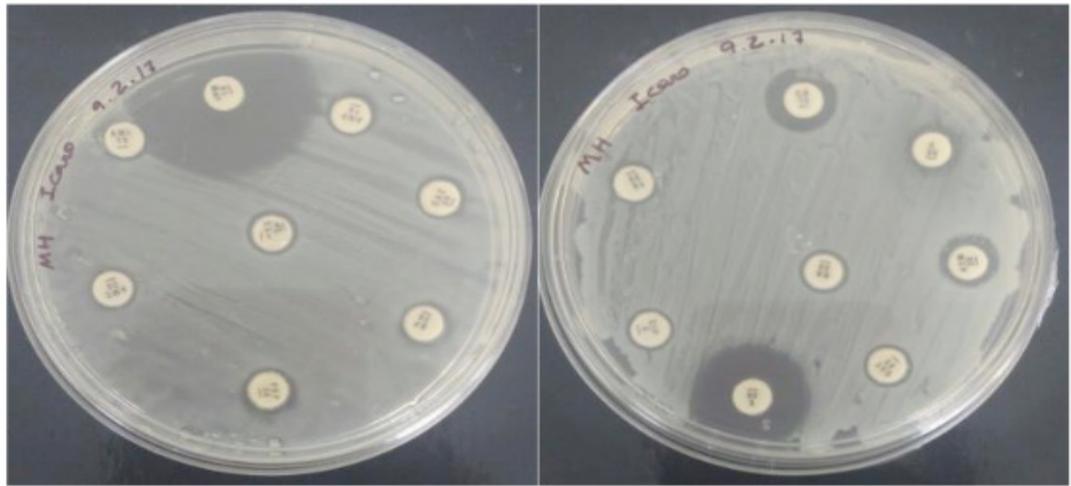


Figura 6: Resposta do crescimento bacteriano em relação a presença de antibióticos

Fonte: Arquivo pessoal

As respostas de crescimento ou inibição na presença dos antibióticos foram classificadas como: Resistente (R), Intermediário (I) ou Sensível (S). Podendo-se observar que dos 16 antibióticos utilizados, a cepa C40A apresentou susceptibilidade a 12,5% dos antibióticos IMP e K, pertencentes às subclasses carbapenêmicos e aminoglicosídeos, respectivamente e apresentou resistência a 87,5% dos antibióticos testados AML, AMC, AMP, CAZ, KPF, CTX, FEP, CIP, CN, C, STX, ATM, NA e TE, pertencentes às demais subclasses utilizadas no presente estudo (Quadro 3 e 4).

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)			Padrão observado	Diagnóstico
	Padrão CLSI				
	R	I	S		
Imipenem	≤ 13	14-15	≥ 16	34	S
Canamicina	≤ 13	14-17	≥ 18	20	S
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15	12	R
Aztreonam	≤ 15	16-21	≥ 22	10	R
Demais antibióticos	≤ R	-	-	-	-

Quadro 3: Resultados observados do halo de inibição do teste de antibiograma

Fonte: O autor.

Data do ensaio:14/02/2017								
Antibióticos								
Colônia	AML	AMC	AMP	CAZ	KPF	CTX	FEP	IPM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	OK							
C40A	R	R	R	R	R	R	R	S
Antibióticos								
Colônia	CIP	CN	C	STX	K	ATM	NA	TE
<i>E. coli</i> ATCC 25922	OK	-	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Quadro 4: Resultado do teste de antibiograma
(-) Ausência de padrão de controle qualidade. Fonte: O autor.

Vasconcelos et al. (2010) em estudo caracterizou a resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas do açude Santo Anastácio (Fortaleza, CE), constatou que as cepas analisadas apresentaram resistência à tetraciclina, ácido nalidixico, ciprofloxacina e ao sulfazotrin. E em desacordo com o presente trabalho, nenhuma resistência foi observada aos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos (Imipenem).

Li et al. (2016) observaram em seu estudo que todos os isolados de *E. coli* coletados em quatro distritos diferentes da China possuíam perfil de multirresistência, mostrando-se resistentes a cefotaxima, cefepima, aztreonam, ceftazidima, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, ampicilina-sulbactama e piperacilina-tazobactam. Destaca-se que alguns desses isolados também eram resistentes a tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, gentamicina e amicacina. No entanto, foi observado que todos os isolados foram susceptíveis ao imipenem, confirmando os resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados do presente estudo também são semelhantes aos apresentados em estudo conduzido por Gharout-Sait et al. (2015) na Argélia, onde todos os isolados apresentaram resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e cefoxitina. A resistência dos isolados foi alta para os antibióticos sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, clorafenicol e trimetoprim. E baixa para ácido nalidixico e amicacina. Os isolados demonstraram-se suscetíveis a imipenem e antibióticos da subclasse das fluoroquinolonas.

Um estudo desenvolvido em Portugal por Machado et al. (2008) descreveu a presença de *integrons* e de vários genes de resistência (como codificadores de β -lactamases de espectro estendido) em amostras identificadas como sendo Enterobacteriaceae, provenientes de frangos e suínos. Os resultados deste estudo mostraram que vários isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido eram resistentes a antibióticos usados na produção animal intensiva. Foi possível ainda, concluir que as resistências estavam associadas a estirpes de *E. coli* comensais de origem animal. Foi aferido que os animais, como as aves e suínos, podem ser potenciais reservatórios de bactérias e genes de resistência a antibióticos. Essas bactérias comensais e patogênicas (incluindo estirpes resistentes) podem

chegar ao ambiente através dos esgotos e contaminar cursos d'água subterrâneos e superficiais, desencadeando um problema ambiental.

Em estudo de larga escala realizado em 1427 bovinos na França revelou prevalência de 0,4% de *E. coli* produtoras de ESBL na mastite bovina. Essa prevalência pode ter sido oriunda do tratamento com antibióticos nos tetos dos animais, que geralmente é local e altamente administrado, e/ou ao fato de que a glândula mamária geralmente é estéril e não é um nicho ecológico favorável para troca genética e seleção de resistência entre cepas (DAHMEN et al., 2013).

Walk et al., (2009) relataram que várias novas linhagens de *Escherichia* são geneticamente distintas, mas fenotípica indistinguíveis. Devido a essa alta similaridade presente entre as bactérias pertencentes a esse gênero, a técnica de PCR Quadruplex foi empregada a fim de confirmar a identidade da cepa bacteriana no presente estudo.

O método pressupõe que apenas isolado com um fenótipo típico de *Escherichia* (por exemplo, lactose +, citrato -, indol +) serão rastreados, isto é, isolados pertencentes a *E. coli* ou a qualquer um dos cinco grupos crípticos de *Escherichia* (WALK et al., 2009).

Como resultado, a cepa C40A amplificou os genes *arpA* e *chuA*, e foi negativa para a amplificação dos genes *yjaA* e TspE4.C2 (Figura 8).

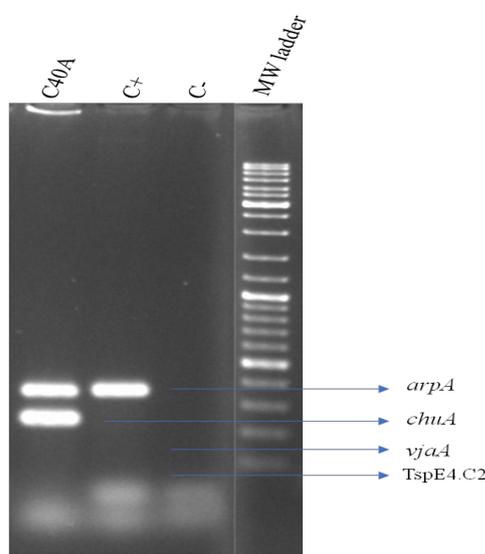


Figura 5: Amplificação de fragmento de *E. coli*, controle positivo e negativo em PCR

Fonte: ARAÚJO, S. (2017).

Pode-se concluir que a cepa C40A trata-se realmente de um exemplar de *E. coli*, com base nos parâmetros de diferenciação de bactérias do gênero *Escherichia* estabelecidos por Clermont et al., (2013).

Ainda com base nos obtidos e seguindo recomendação de (CLERMONT et al., 2013) C40A pode ser enquadrada dentro dos filogrupos D ou E, por apresentar *arpA*⁺ e *chuA*⁺, conforme padrão estabelecido pelos mesmos autores (Figura 9), contudo, microrganismos pertencentes ao filogrupo E são unicamente oriundos de isolados clínicos humanos, enquanto os pertencentes ao filogrupo D são isolados de origem ambiental, tidos como virulentos e potenciais causadores de patologias.

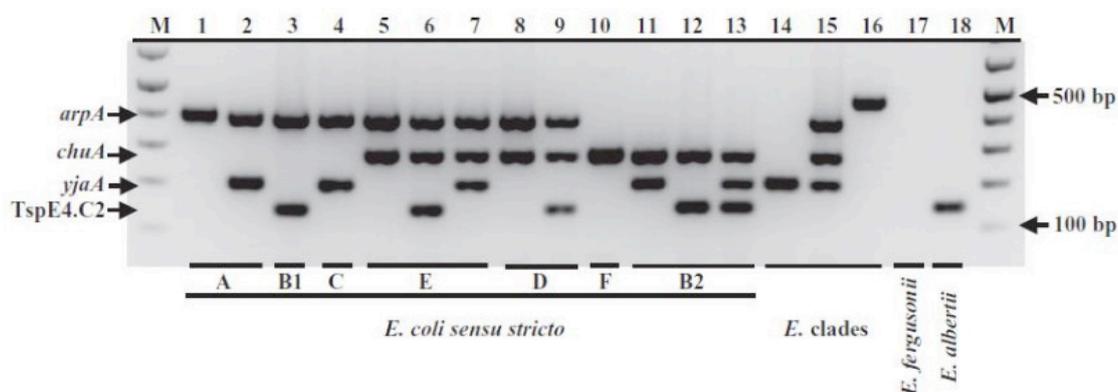


Figura 6: Padrões de classificação de bactérias do gênero *Escherichia* e seus filogrupos.

Fonte: CLERMONT et al., (2013)

Meireles (2013) levando em consideração unicamente os filogrupos que possuíam isolados de origem ambiental, desenvolveu método alternativo de classificação das espécies bacterianas dentro de seus respectivos filogrupos, também de acordo com o padrão de amplificação de três genes marcadores específicos (*arpA*, *chuA*, *yjaA*) e um fragmento de DNA TSPE4.C2.

Desta forma, confirmando os resultados apresentados pelo estudo de Clermont et al. (2013), devido ao fato do presente isolado se tratar de um isolado de origem ambiental, sendo o mesmo foi classificado e confirmado por ambos os métodos de classificação como sendo pertencente ao grupo filogenético D.

Estudo realizado por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), aponta que os grupos filogenéticos B2 e D são isolados principalmente a partir de infecções extra-intestinais e são principalmente constituídos por cepas invasivas. Em estudos tendo como objeto os grupos filogenéticos foram publicados em outros países Irã (GHANBARPOUR; OSWALD, 2010), Israel (BLUM; LEITNER, 2013) Finlândia (SUOJALA et al., 2011), e esses achados sustentam o papel da *E. coli* do filogrupo D e de ocorrência ambiental como principal agente etiológico de mastite em bovinos.

Em pesquisa realizada por Casella (2016), o grupo filogenético D, por vezes considerado como virulento e causador de infecções extra-intestinais, predominou dentre as linhagens de *E. coli* oriundas tanto de carnes quanto do trato gastrointestinal (TGI) de frangos do Brasil.

A identificação dos genes de resistência à β -lactâmicos foi realizada por técnica de PCR com os primers: *bla*TEM, *bla*IAMP, *bla*SHV, *bla*CTX, *bla*VIM e *bla*KPC.

Além dos genes, buscou-se identificar os *integrons Int1* e *Int2* (Quadro 5).

Primers	Gene alvo	Sequência (5' - 3')	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho amplificado (pb)
TEM_F TEM_R	<i>bla</i> TEM	AAAGATGCTGAAGATCA TTTGGTATGGCTTCATTC	44	425
SHV_F SHV_R	<i>bla</i> SHV	GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC GATTGGCGGCGCTGTTATCGC	62	304
CTX_F CTX_R	<i>bla</i> CTX	GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG CGCAATATCATTGGTGGTGCC	55	538
IMP_F IMP_R	<i>bla</i> IMP	GAATAGAGTGGATTAATTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	55	232
VIM_F VIM_R	<i>bla</i> VIM	GATGGTGTGGTTCGCATATCG GCCACGTTCCCCGCAGACG	58	475
KPC_F KPC_R	<i>bla</i> KPC	GATACCACGTTCCGTCTGG GCAGGTTCCGGTTTTGTCTC	62	246
Int1_F Int1_R	Integrase Classe 1	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC	55	280
Int2_F Int2_R	Integrase Classe 2	TTATTGCTGGGATTAGGC ACGGCTACCCTCTGTTATC	50	233

Quadro 5: Primers utilizados na identificação dos genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX, *bla*IMP, *bla*VIM, *Int1* e *Int2*.

Fonte: Adaptado HENRIQUES et al., 2006 et al., 2011..

Os resultados da PCR foram avaliados em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio e visualizados por meio de eletroforese sob luz UV.

A cepa de *E. coli* apresentou resultado positivo quanto à amplificação dos genes *bla*CTX e os *integrons Int1* e *Int2*, confirmando assim, a presença desses genes e elementos móveis em seu genoma. Entretanto, a espécie mostrou-se negativa quanto à amplificação dos genes *bla*TEM, *bla*IMP, *bla*SHV, *bla*VIM e *bla*KPC (Quadro 6).

<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> IMP	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> CTX	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> KPC	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>
-	-	-	+	-	-	+	+

Quadro 6: Resultado PCR dos primers de genes de resistência.

Fonte: O autor.

Kotlarska et al. (2015) analisando o perfil de resistência de *E. coli* isolada de duas estações de tratamento de águas residuais e suas águas receptoras na Polônia, identificou a presença de *integrons* de classe 1 e 2 entre os isolados de *E. coli* testados com taxa de 32,06% e 3,05%, respectivamente. A presença de *integrons* foi associada ao aumento da frequência de resistência a fluoroquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina/clavulanato, piperacilina/tazobactam e presença de fenótipo de multirresistência. Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com os apresentados pelos autores supracitados, contudo, o aumento da frequência de resistência não foi possível de ser mensurado para os mesmos antibióticos testados

no estudo de Kotlarska e colaboradores.

Em estudo realizado por Canal (2010) em *E. coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos (RS) observou uma associação significativa entre a multirresistência aos antibióticos e a presença de *integrons* de classe 1 nas amostras analisadas, onde a maioria dos isolados (67,7%) que apresentaram o *Int1* em sua composição genética foram considerados multirresistentes, estando este estudo em concordância com trabalho apresentado por Henriques et al. (2006) e podendo-se inferir que em concordância com os achados no presente estudo.

Casella (2016) objetivando a identificação de genes de resistências cefalosporinas de espectro estendido (ESC) mediada pela produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) em *E. coli* isolada partir de carne de frango no Brasil e na França, identificou que o gene *blaCTX* foi o principal responsável pela resistência dos isolados a ESC, mas os genes *blaTEM* e *blaSHV* também foram detectados. Estando a maioria dos genes *blaCTX* associados à *integrons* complexos de classe 1, resultado que pode ser considerado como similar ao apresentado no presente estudo.

Cupertino (2016) em estudo realizado com isolados de *E. coli* provenientes de animais de produção identificou que 20% do total de isolados apresentou pelo menos um gene de resistência. Sendo, 1% dos isolados positivos para o gene *blaSHV*, 5% positivos para o gene *blaCTX* e 9% positivos para o gene *blaTEM*. Além dos resultados acima descritos 2% isolados apresentaram resultado positivo frente a dois genes simultaneamente: *blaCTX* e *blaTEM*. O que diferiu do apresentado neste trabalho, uma vez que a cepa em estudo amplificou unicamente o gene *blaCTX*.

4 | CONCLUSÕES

A cepa C40A foi identificada como sendo uma bactéria da espécie *E. coli* e revelou altos níveis de resistência à maioria dos antimicrobianos clinicamente disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas, exceto para Imipenem e Canamicina. A cepa classificada como pertencente ao filogruppo D. Foi detectada a presença do gene *blaCTX* e dos elementos móveis *Int1* e *Int2*.

REFERÊNCIAS

BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3–4, p. 305–312, 2013.

BÖCKELMANN, U. et al. Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three european artificial groundwater recharge systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 154–163, 2009.

CANAL, N. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos , RS.** [s.l.] Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

CARVALHO, F. C. T. et al. Antibiotic Resistance of *Salmonella* spp. Isolated from Shrimp Farming Freshwater Environment in Northeast Region of Brazil. **Journal of Pathogens**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

CASELLA, T. **Caracterização molecular de genes de resistência a cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli* isoladas de frango e carnes de frango.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 2016.

CDC. **About Antimicrobial Resistance: A Brief overview.**

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

COUTINHO, F. H. et al. Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 441–452, 2014.

CUPERTINO, V. M. L. **Prevalência de genes de resistência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de animais de produção.** Porto Alegre: [s.n.].

DAHMEN, S. et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 793–799, 2013.

FORGETTA, V. et al. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. **Poult Sci**, v. 91, n. 2, p. 512–525, 2012.

GHANBARPOUR, R.; OSWALD, E. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 6–10, 2010.

GHAROUT-SAIT, A. et al. Molecular characterization and epidemiology of cefoxitin resistance among Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes from hospitalized and non-hospitalized patients in Algeria: Description of new sequence type in *Klebsiella pneumoniae* iso. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 187–195, 2015.

GILLINGS, M. R.; STOKES, H. W. Are humans increasing bacterial evolvability? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 6, p. 346–352, 2012.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–2496, 2008.

HENRIQUES, I. S. et al. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 938–947, 2006.

HINDIYEH, M. et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR assay using bactec blood culture bottles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2480–2484, 2011.

INSA. **Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos.**

- KOTLARSKA, E. et al. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 3, p. 2018–2030, 2015.
- LASCOWSKI, K. M. S. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1230–1239, 2013.
- LI, S. et al. Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Shandong Province, China. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1169–1173, 2016.
- LOHNER, K. .; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: **Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies**. England: Horizon Scientific Press, 2001. p. 1–15.
- MACHADO, E. et al. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. May, p. 296–302, 2008.
- MARENGO, J. A. Água E Mudanças Climaticass. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 83–96, 2008.
- MARTINS, V. V. et al. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: A human health hazard. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 9, p. 5873–5878, 2014.
- MEIRELES, D. M. F. DE. Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre animais de companhia e coabitantes humanos. 2013.
- MOURA, A. et al. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 58–66, 2010.
- NICOLINI, P. et al. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo TT - Factors related to prescriptions of antibiotics in a public pharmacy in the Western region of the city of São Paulo. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 13, n. supl, p. 689–696, 2008.
- OKEKE, I. N. et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: Strategies for containment. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 9, p. 568–580, 2005.
- RESENDE, J. A. et al. Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. **Microbes and environments / JSME**, v. 27, n. 4, p. 449–55, 2012.
- RIBEIRO, R. V. Avaliação de sistema de cultivo integrado, a partir da reciclagem de águas residuais submetidas a tratamento primário: pesquisa de espécies dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *Aeromonas*. p. 91, 2011.
- SA, F.; FIOL, D.; GROPPPO, F. C. Resistência Bacteriana. n. January 2000, 2014.
- SEAN, S. K. **Antibiotic Resistance: New Approaches to a Historical Problem, Action Bioscience**.
- SUOJALA, L. et al. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3–4, p. 383–388, 2011.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015.

VASCONCELOS, F. R. et al. Perfil De Resistência Antimicrobiana De Escherichia Coli Isoladas Do Açude Santo Anastacio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 405–410, 2010.

WALK, S. T. et al. Cryptic lineages of the genus Escherichia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6534–6544, 2009.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. Washington: ASM Press, 2013.

DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE *PSEUDOCOWPOXVIRUS* – PCPV EM BOVINOS

Érica Eustáquia de Freitas Passos

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais

Giliane de Souza Trindade

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais

Antônio Augusto Fonseca Júnior

Auditor Fiscal Federal Agropecuário, Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo – Minas Gerais

RESUMO: O Brasil apresenta uma forte atuação na comercialização mundial de carnes, liderando o *ranking* mundial como o maior exportador de carne bovina e detentor de uns dos maiores rebanhos do mundo. Por esta razão, qualquer doença disseminada que resulte em prejuízos ou que imponham restrições ao comércio de animais e aos produtos impacta desfavoravelmente toda a economia nacional. As doenças causadas por *Parapoxvirus* (PPV) possuem grande importância no cenário da pecuária brasileira, tanto pela possibilidade de gerar intensos prejuízos econômicos, quanto pela alta vulnerabilidade humana. Considerando os inúmeros casos descritos de infecções causados por PPV no país e por apresentarem sintomatologia clínica

semelhante com as causadas pelo vírus da febre aftosa, torna-se imprescindível o desenvolvimento de diagnósticos laboratoriais bem estruturados e aptos para detecção rápida e específica, proporcionando a diferenciação do agente etiológico. Neste trabalho são relatados procedimentos da validação do método de PCR em tempo real para detecção do *Pseudocowpoxvirus* (PCPV) em bovinos. Foram analisados os parâmetros de Limite de detecção (LD), Sensibilidade em matriz, Repetibilidade, Robustez, Reprodutibilidade e Especificidade analítica. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através da Análise de Variância - ANOVA em que a determinação das variâncias dos erros foi utilizada para a verificação da aceitabilidade do sistema de medidas. A aplicabilidade do método diferencial de q-PCR foi demonstrada através da análise de amostras clínicas. O método validado apresentou adequação para seus respectivos propósitos de uso.

PALAVRAS CHAVE: *Pseudocowpoxvirus*; Diagnóstico molecular diferencial; q-PCR; Validação; Bovinos.

ABSTRACT: Brazil has a strong presence in the world meat trade, leading the world ranking as the largest beef exporter and holder of one of the largest herds in the world. For this reason, any widespread disease that results in damage

or imposes restrictions on trade in animals and products adversely impacts the entire national economy. The diseases caused by Parapoxvirus (PPV) are of great importance in the Brazilian livestock scenario, both for the possibility of generating intense economic losses and for the high human vulnerability. Considering the numerous cases of infections caused by PPV in the country and because they present clinical symptoms similar to those caused by foot-and-mouth disease virus, it is essential to develop well-structured laboratory diagnoses capable of rapid and specific detection, providing differentiation of the disease. etiological agent. This work reports the validation procedures of the real time PCR method for detection of Pseudocowpoxvirus (PCPV) in cattle. The Limit of Detection (LD), Matrix Sensitivity, Repeatability, Robustness, Reproducibility and Analytical Specificity parameters were analyzed. The obtained results were statistically evaluated by Analysis of Variance - ANOVA in which the error variance determination was used to verify the acceptability of the measurement system. The applicability of the differential q-PCR method was demonstrated by analysis of clinical samples. The validated method was suitable for its respective use purposes.

KEYWORDS: *Pseudocowpoxvirus*; Differential molecular diagnosis; Q-PCR; Validation; Cattle.

1 | INTRODUÇÃO

Vulgarmente denominada Paravaccinia ou “Nódulo do ordenhador”, a infecção humana por *Pseudocowpox virus* é de origem laboral e acidental observada em ordenhadores e veterinários. Geralmente, acontece através do contato com lesões no úbere de animais infectados, manipulação da carcaça de animais contaminados ou através da transmissão indireta via equipamentos de ordenha, objetos contaminados, bezerros em lactação, moscas, pastagens dentre outros. Os sinais clínicos desaparecem espontaneamente sem cicatrizes, na maioria dos casos, os nódulos são anelares e ocasionalmente acometem a face (Iketani *et al.*, 2002; Lederman *et al.*, 2013). As espécies pertencentes ao gênero *Parapoxvirus* atualmente descritas são o *Orf virus* (ORFV) endêmico em ovinos e caprinos, o *Bovine papular stomatitis virus* (BPSV) e o *Pseudocowpox virus* (PCPV) que infectam principalmente bovinos. O *Parapoxvirus of red deer in new Zealand* (PVNZ) é uma espécie recém-definida do gênero e, até o momento, significativo para a infecção de cervídeos (Abrahão *et al.*, 2010; Scagliarini *et al.*, 2011). Em vários estados brasileiros, episódios de doenças infecciosas provocadas por PCPV, BPSV e ORFV, são frequentemente relatados em ruminantes e humanos (Oliveira *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2012; Cargnelutti *et al.*, 2014; Nascimento, 2016). Nas últimas décadas, episódios envolvendo coinfeções em bovinos e em humanos também foram registrados em território nacional. A origem e o significado de coinfeções na patogenia das doenças não são totalmente elucidados e, na atualidade, a frequência das coinfeções no Brasil, é também desconhecida, mas encontra-se sob vigilância (Abrahão *et al.*, 2010; Canal *et al.*,

2012; Campos *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016; Sant'ana *et al.*, 2013;).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas amostras de tecido epitelial de língua bovina provenientes de animais sem o histórico de infecções. O plasmídeo foi construído a partir do alinhamento de sequências de genomas completos do PCPV disponíveis no *GenBank*, considerando as regiões de pareamento dos iniciadores e a porção interna amplificada. As sequências específicas para os alvos dos iniciadores foram enviadas para IDT (Estados Unidos) para síntese do gene sintético e inserção no plasmídeo pUCIDT (Amp), da IDT (*Integrated DNA Technologies*). A partir do estoque do CPS na concentração inicial de 0,1 ng/ μ L, foram realizadas diluições seriadas na base dez em água deionizada estéril tratada com dietilpirocarbonato (DPEC). As diluições do CPS obtidas foram adicionadas às amostras negativas de tecido epitelial de língua bovina, obtendo então, amostras sabidamente positivas, para a realização dos ensaios de verificação de desempenho e validação dos métodos de q-PCR. As amostras clínicas foram obtidas através de crostas ou de epitélio de lesões orais de animais infectados, procedentes de vários estados brasileiros, enviados ao Laboratório de Biologia Molecular – LBM/ LANAGRO-MG para a realização do processo identificação, detecção e confirmação por diagnóstico molecular. As amostras diagnosticadas positivamente para *Parapoxvirus* foram selecionadas e submetidas à análise molecular pelo método de q-PCR desenvolvido, com a finalidade de avaliar o desempenho do método em escala experimental.

2.2 Extração de ácidos nucleicos – DNA

O processo de extração foi realizado utilizando o Kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Alemanha) conforme as orientações descritas no protocolo fornecido pelo fabricante.

3 | PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS

3.1 Seleção de Oligonucleotídeos para os métodos de q-PCR

Os iniciadores e as sondas utilizados na q-PCR de PCPV foram desenhados pelo Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior, Auditor Fiscal Federal do Laboratório de Biologia Molecular do LANAGRO/MG. As regiões mais divergentes mencionadas na literatura de Hautaniemi e colaboradores, 2010 foram selecionados. Os iniciadores

foram desenhados após alinhamento das sequências de genomas completos de *Parapoxvirus* disponíveis no *GenBank*. As sequências consenso foram submetidas ao programa *Primer3 Plus* para o desenho dos oligonucleotídeos utilizando os parâmetros automáticos para PCR convencionais ou para q-PCR (Untergasser *et al.*, 2007).

3.2 Controles utilizados nos métodos de q-PCR

Para todos os grupos de reações efetuadas, foram utilizados os controles negativo (CN) compostos pela matriz adicionada de todos os componentes que a acompanham, exceto o agente infeccioso a ser diagnosticado. Os controles positivos (CP), que foram as diluições do plasmídeo, o controle branco (CBR) composto apenas pelos reagentes utilizados na reação, o controle de extração (CBE) contendo apenas água tratada com DPEC. Foi utilizado como controle interno (CI) a q-PCR para detecção de β -actina, que serviu como gene normalizador do método validado.

3.3 Padronização dos ensaios de q-PCR

Todas as reações de padronização foram realizadas com base em uma curva de diluição seriada na base cinco do controle positivo em água tratada com DPEC nas concentrações variando de 10^{-1} (0,1ng/ μ L) a 10^{-6} (0,000032ng/ μ L) em duplicata. A curva de diluição foi submetida a quatro padronizações diferentes para avaliar as melhores concentrações dos iniciadores, de $MgCl_2$, a temperatura mais adequada de *T_m* e o reagente comercial *Master mix* mais adequado. Os testes iniciais para padronizar as concentrações dos iniciadores foram realizados utilizando o *Master mix* (*Melt Doctor™ HRM Master Mix*) e detecção por *SYBR® Green*. Foram analisadas três concentrações diferentes para a definição do melhor protocolo. As reações de padronização que apresentaram os melhores valores de sensibilidade e eficiência foram submetidas ao processo de verificação de desempenho. Todos os testes de padronização da q-PCR foram compostas por *Master Mix*, $MgCl_2$ 25mM (Promega), um par de iniciadores, sonda *TaqMan®* (ou *SYBR® Green*) e água livre de DNase totalizando um volume total por tubo ou poço de 23 μ L. Os testes de padronização da q-PCR foram submetidas à ciclagem para amplificação do gene alvo no equipamento CFX96™ *Real-Time System* (BIO-RAD USA) ou no equipamento *RotorGene* (Qiagen, Alemanha) dependendo da disponibilidade de cada um dos equipamentos.

3.4 Sequenciamento

Os resultados gerados pelos métodos de q-PCR positivos para PCPV foram sequenciados para a confirmação. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *kit Big Dye Terminator* (*Life Technologies*, Estados Unidos) em termociclador *Veriti* (*Life Technologies*, Estados Unidos) com ciclagem recomendada pelo fabricante. Os resultados do sequenciamento foram armazenados na forma de

cromatogramas processados automaticamente pelo equipamento mencionado. Os eletroferogramas foram analisados utilizando o *software Bioedit*. As sequências foram submetidas ao *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação de acordo com o valor e a identidade.

4 | ETAPAS DA VALIDAÇÃO

4.1 Curva de sensibilidade

A curva de sensibilidade foi determinada para todas as reações dos métodos. Essa etapa foi essencial para avaliar a funcionalidade dos iniciadores, do plasmídeo, a eficiência das reações, do *Tm* e da sensibilidade analítica conforme anteriormente definida. Para esse experimento, as diluições seriadas do CPS (0,1ng/ μ L) foram realizadas a partir da diluição 1×10^{-1} (0,01ng/ μ L) foram realizadas três diluições na base dez (1×10^{-2} ao 1×10^{-4}) e, sequencialmente, foram realizadas quatro diluições na base cinco (1×10^{-5} a 1×10^{-8}) em duplicatas. As concentrações das diluições do CPS utilizados nas curvas de sensibilidade estão descritas na TABELA 1.

Reação	Concentrações dos pontos da curva de sensibilidade							
PCPV	base 10				base 5			
	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}	1×10^{-8}
	0,01 ng	0,001 ng	0,1 pg	0,01 pg	0,002 pg	0,4 fg	0,08 fg	0,0016 fg

Tabela 1- Concentrações de cada diluição do CPS utilizados nas curvas de sensibilidade

4.2 Limite de Detecção – LD

O limite de detecção (LD) foi calculado da seguinte maneira: as amostras de tecido epitelial de língua bovina foram fracionadas em nove fragmentos de aproximadamente 25 mg. O CPS na concentração inicial de 0,1ng/ μ L foi diluído sucessivamente para as concentrações descritas detalhadamente na TABELA 1. Para cada suspensão obtida de CPS, foram separadas duas alíquotas, sendo que a uma delas foi adicionado à amostra de língua bovina. O DNA de ambas as alíquotas (na presença e na ausência da matriz) foi extraído. Os ácidos nucleicos foram submetidos ao método q-PCR em duplicatas. Todos os controles (CP, CN, CBE, CEE, CBR) foram utilizados em todas as etapas descritas acima. Durante a etapa do cálculo do LD foi possível calcular a eficiência da q-PCR. A partir das diluições em série, traçou-se uma curva padrão para que o programa defina a eficiência (entre 90 e 110%), o R^2 (maior do que 0,99) e o *Slope* da curva padrão, que deve ser de

aproximadamente – 3,32, indicando uma reação de PCR com 100% de eficiência.

4.3 Sensibilidade em matriz

Simultaneamente com o cálculo do LD foi avaliado o efeito da interferência da matriz (amostras) na q-PCR. Utilizamos as sete diluições do CPS para contaminação das amostras negativas. Então, realizamos os ensaios em duplicata, com alíquotas contendo somente as diluições do CPS e alíquotas contendo a matriz contaminada com as diluições do CPS.

5 | VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

5.1 Repetibilidade e Robustez

Para a análise da repetibilidade dos métodos de q-PCR, foram utilizadas as sete parcelas experimentais definidas a partir do LD. O DNA dessas amostras foi extraído e analisado em triplicata. A etapa de extração do DNA e a realização dos ensaios foram realizadas em três dias diferentes utilizando o mesmo equipamento de termociclagem. Um segundo analista realizou a etapa de extração e os ensaios utilizando as mesmas amostras e os mesmos critérios para avaliar as possíveis variações no teste. A robustez do método é a medida de sua capacidade em não ser afetado por variações nas condições do experimento. Para a avaliação da robustez das reações envolvidas neste método foi escolhida a variável equipamento. Os equipamentos selecionados para a realização da robustez do método de q-PCR foram: O CFX96™ *Real-Time System* (BIO-RAD, USA) e o *RotorGene* (Qiagen, Alemanha). As reações foram realizadas utilizando o mesmo protocolo padrão em equipamentos diferentes, acima citados, em dias diferentes, no mesmo laboratório pelo mesmo analista. A avaliação dos resultados foi realizada utilizando o critério de coeficiente de variação (CV) a partir dos valores de média e desvio padrão dos *Ct* obtidos. Os resultados foram representados em porcentagem com tolerância de até 30% de variação.

5.2 Reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade do método de q-PCR, foram utilizadas as sete parcelas experimentais definidas a partir do LD. A extração foi realizada e as análises foram feitas em triplicata. O teste de reprodutibilidade foi realizado com a finalidade de avaliar as possíveis diferenças entre os resultados obtidos, utilizando dois tipos diferentes de reagentes *Master mix* e dois tipos diferentes de equipamentos termocicladores para os ensaios de q-PCR. Para execução do experimento, foram utilizados o *Real Q-PCR Master mix 2x Kit - Ampliqon®* e o equipamento *RotorGene* (Qiagen, Alemanha). Os *Ct* obtidos foram usados para a comparação dos resultados. Os valores foram representados em porcentagem com tolerância de até 30% de

variação.

5.3 Especificidade Analítica

Foram analisadas, juntamente com o controle positivo, 80 amostras sabidamente negativas provenientes de animais sem histórico de infecção. O objetivo foi avaliar a capacidade do método q-PCR desenvolvido em discernir o DNA alvo dos outros componentes da matriz que possam ser detectados no ensaio.

5.4 Especificidade Analítica pelo critério de Exclusividade

Para a realização deste teste, selecionamos previamente doze amostras positivas para outros agentes virais, sendo uma amostra clínica positiva para BoHV, cinco amostras clínicas positivas para VACV, três amostras clínicas positivas para BVDV e três amostras positivas para FMDV (Titulação viral). O objetivo foi avaliar a exclusividade do método q-PCR em detectar somente o gene alvo de PCPV com a ausência de reatividade cruzada.

5.5 Análise Estatística e critérios de aceitação do método q-PCR

Os valores de *Cycle threshold* (*Ct*) obtidos na Verificação de Desempenho foram avaliados em triplicata para cada ensaio realizado, considerando as variações das q-PCR, dos dias, dos analistas, dos equipamentos e dos reagentes para Análise de Variância – ANOVA. A determinação das variâncias dos erros das medidas em repetibilidade e reprodutibilidade foram utilizadas para a verificação da aceitabilidade do sistema de medidas de acordo com o Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários do Ministério da Agricultura (Fonseca Jr. *et al.*, 2014; MAPA, 2011).

6 | UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO Q-PCR EM AMOSTRAS CLÍNICAS

O desempenho do método q-PCR foi avaliado utilizando 44 amostras clínicas de crostas ou do epitélio de lesões orais bovinas. As amostras são provenientes de várias regiões brasileiras que foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular - LBM / LANAGRO/MG para a realização do diagnóstico molecular, abrangendo diversas doenças vesiculares, incluindo FMDV. As amostras positivas para o gênero *Parapoxvirus* foram previamente selecionadas para execução deste experimento.

6.1 Confirmação dos resultados

Para confirmar os resultados positivos gerados pelo método q-PCR foi realizado o sequenciamento de todas as amostras positivas para PCPV, por meio das amplificações obtidas pela PCR convencional.

7 | RESULTADOS

7.1 Limite de Detecção – LD

Conforme os resultados obtidos, foi determinada como o limite de detecção para o método de q-PCR para detecção do PCPV, a diluição 1×10^{-5} [0,002 pg/ μ L], utilizando detecção por *SYBR® Green*. Os resultados obtidos foram satisfatórios apresentando valores de Eficiência, *Slope* e de R^2 adequados para os critérios de aceitabilidade para o método. O mesmo teste de LD foi realizado utilizando a detecção por sonda *TaqMan®*, porém os resultados foram insatisfatórios apresentando valores de Eficiência, *Slope* e R^2 inadequados.

7.2 Sensibilidade em matriz e controle interno

O efeito da interferência da matriz na q-PCR foi avaliado simultaneamente com as análises para a determinação do LD. A comparação entre as duas curvas permitiram a avaliação da perda de eficiência do método q-PCR quando o DNA alvo se encontra diluído no material genético da matriz. Os resultados foram úteis para avaliar o comportamento das reações e suas particularidades utilizando uma matriz bovina homogênea permitindo a comparação entre os *Ct* das curvas. Observa-se que o DNA da matriz exerce influência no desempenho da q-PCR. Portanto, assume-se o efeito de matriz nas reações do método.

As reações para a detecção da β -*actina* foram realizadas em todas as amostras de tecido epitelial de língua bovina utilizadas neste trabalho. Os resultados foram positivos, demonstrando boa extração de DNA e com ausência de inibidores na reação (dados não mostrados).

7.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através da medida de concordância ou conformidade entre resultados utilizando um mesmo método, o mesmo equipamento CFX96™ *Real-Time System* (BIO-RAD, USA) e o mesmo processo de extração dado às amostras, variando os analistas, em três dias diferentes. A repetibilidade do método foi estimada através dos resultados de coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos valores *Ct* obtidos em cada ensaio. A partir dos *Ct* obtidos em cada replicata, foi realizada a análise de variância (ANOVA), onde é possível verificar os valores de variância dos ensaios realizados. De acordo com os resultados obtidos nesta análise, concluiu-se que os sistemas de medida executados pelos dois analistas são semelhantes, apresentando uma variância total no erro de análise de 4,82%. A variância entre os analistas foi de 0% e entre os dias foi de 1,18%. A alta porcentagem de variância observada, entre as parcelas experimentais, é um resultado normal, que confirma a existência de variações entre as parcelas, o que é intrínseco da extração do DNA e, também ao fato da dosagem

de DNA adicionada nas PCRs, não ser mensurada. A análise dos resultados obtidos foi realizada através do coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos *Ct* com tolerância de até 30% de variação.

7.4 Robustez e Reprodutibilidade

Para a realização dos experimentos, foram utilizados como variações o equipamento e o reagente *Master mix*. As amostras foram analisadas em triplicata, em três dias diferentes pelo mesmo analista utilizando o *Real Q-PCR Master mix Kit - Ampliqon®* e o equipamento *RotorGene* (Qiagen, Alemanha). Os resultados dos *Ct* obtidos foram usados para a comparação entre os resultados obtidos utilizando o equipamento *CFX96™ Real-Time System* (BIO-RAD, USA) e o *Master Mix Quantifast* (Qiagen). A análise dos resultados obtidos foi realizada através do coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos *Ct* com tolerância de até 30% de variação. Os testes de robustez e reprodutibilidade tiveram a finalidade de verificar as possíveis diferenças entre os resultados obtidos através de variações deliberadas para os ensaios de q-PCR.

Os resultados obtidos foram satisfatórios nos experimentos realizados. A variância total do erro de análise da reprodutibilidade foi de 3,01%, entre os dias a variância foi de 0% e entre os reagentes *Master mix* a variância foi de 19,71%. A variância do total do erro de análise da robustez foi de 4,77%, a variância entre as diluições foi de 0% e a variância entre os equipamentos foi de 2,76%. Os resultados alcançados comprovam a capacidade do método de q-PCR de manter seu desempenho analítico inalterado por variações nas condições do experimento. Vale ressaltar que, a alta porcentagem de variância observada entre as parcelas experimentais, é um resultado normal, confirmando a existência de variações entre as parcelas, o que é intrínseco da extração do DNA e, também ao fato da dosagem de DNA adicionada nas PCRs, não ser mensurada.

7.5 Especificidade Analítica

Para avaliar a especificidade dos métodos de q-PCR foram analisadas oitenta amostras negativas de tecido epitelial de língua bovina juntamente com o controle positivo. O objetivo foi verificar a capacidade dos métodos desenvolvidos em discernir o DNA alvo dos outros componentes da matriz. Os resultados de especificidade obtidos pela análise realizada em q-PCR e detecção por sonda *TaqMan®* mostraram amplificação somente do controle positivo. Nas demais amostras não houve amplificações, conforme o esperado. O teste certifica a capacidade do método q-PCR em discernir o DNA alvo dos outros componentes da matriz. No experimento utilizando a detecção por *SYBR® Green*, diversas amplificações inespecíficas foram observadas, evidenciando uma característica limitante relacionado ao sistema de detecção. Portanto, entre as duas químicas de detecção avaliadas, a detecção por a

sonda *TaqMan*[®] apresentou o melhor resultado para o método q-PCR.

7.6 Especificidade Analítica pelo critério de Exclusividade

Para a realização dos testes de especificidade analítica por exclusão utilizamos amostras positivas para outros agentes virais. Foi previamente selecionado um total de doze amostras positivas sendo: uma amostra positiva de BoHV, cinco amostras positivas de VACV, três amostras positivas de BVDV e três amostras positivas de FMDV. As amostras positivas foram analisadas utilizando o método q-PCR desenvolvido, com a finalidade de avaliar a sua capacidade em detectar somente a sequência alvo de PCPV e excluir as outras sequências virais. Os resultados obtidos neste experimento mostraram ampliações na amostra de BoHV com um *Ct* de 39,92 e em três amostras de VACV com *Ct* de 39,39 ; 39,72 e 38,00 no final da reação. Nas outras oito amostras analisadas, não foi observado amplificação. Os resultados concluem que, para o método q-PCR desenvolvido, o valor máximo aceitável do *Ct* é de 37,00. Valores de *Ct* acima desse valor serão considerados inespecíficos para o diagnóstico de PCPV. Portanto, este critério deverá ser obrigatório para a conclusão final de um diagnóstico utilizando este método q-PCR.

8 | UTILIZAÇÃO DOS MÉTODOS Q-PCR PARA ANÁLISE EM AMOSTRAS CLÍNICAS

O desempenho dos métodos q-PCR foram avaliados utilizando quarenta e quatro amostras clínicas bovinas. As amostras com o resultado positivo para o gênero *Parapoxvirus* foram previamente selecionadas e reanalisadas, desta vez, utilizando os métodos q-PCR para a detecção específica de PCPV, desenvolvidos neste trabalho. As mesmas amostras foram submetidas também aos métodos de q-PCR específica para o BPSV, com a finalidade de obter um resultado complementar. O desempenho do método q-PCR demonstrado na rotina do Laboratório de Biologia Molecular - LBM / LANAGRO – MG foi bastante satisfatória proporcionando um resultado rápido e específico para PCPV. As cinco amostras que apresentaram resultado positivo para PCPV foram sequenciadas para a confirmação dos resultados obtidos.

9 | CONCLUSÃO

No processo de validação, o método desenvolvido apresentou resultados bem sucedidos para os critérios de sensibilidade, robustez, repetibilidade, reprodutibilidade e especificidade analítica. O método q-PCR apresentou também, resultados bem sucedidos quando utilizados para a análise de amostras clínicas, demonstrando aptidão para o uso em rotina laboratorial. De acordo com os resultados da análise de especificidade analítica, realizada para o método de q-PCR, o valor máximo aceitável

do *Ct* é de 37,00. Amplificações que apresentarem *Ct* acima desse valor devem ser consideradas inespecíficas para o diagnóstico de PCPV. Este é um critério obrigatório para a conclusão final de um diagnóstico utilizando o método q-PCR validado neste trabalho. O método q-PCR para detecção de PCPV foi utilizado em escala experimental na rotina laboratorial com a utilização de quarenta e quatro amostras clínicas com o diagnóstico positivo para o gênero *Parapoxvirus*. O teste alcançou resultados satisfatórios e específicos demonstrando a capacidade do método em determinar a espécie viral estudada com rapidez, precisão e especificidade. Os resultados bem sucedidos da validação permitiram a inclusão do método de q-PCR para detecção diferencial do PCPV no Laboratório de Biologia Molecular - LBM / LANAGRO – MG com capacidade e competência para emitir diagnósticos oficiais específicos e precisos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, J. S. *et al.* Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: clinical description and phylogenetic characterization, **Journal of Clinical Virology**, v.: 48, n.:1, p.: 69-72, 2010.

ALVES, A. P. *et al.* Occurrence of *Pseudocowpox virus* associated to *Bovine viral diarrhea virus-1*, Brazilian Amazon, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, V.: 49, p.: 70–75, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**, MAPA, 2011.

CAMPOS, R. K. *et al.* Assessing the variability of Brazilian vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: Coinfection with distinct viruses. **Archives of Virology**, v.: 156, n.: 2, p.: 275-283, 2011.

CANAL, C. W; DIEHL, D. G. **Virologia Veterinária**: In: Flores, E. F. 2ªed. Editora: UFSM, p.: 571-603, 2012.

CARGNELUTTI, J. F. *et al.* Pseudovaríola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.: 44, n.: 3, p.: 479-485, 2014.

FONSECA, Jr. A. A; GOUVÊA, M. V; ZARONI, M. M. H. **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de doenças Infeciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários**: Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. Coordenação-geral de apoio laboratorial. 1ª ed. Brasília: Mapa/SDA/CGAL: Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI, 2014.

HAUTANIEMI, M. *et al.* The genome of pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain, **Journal General Virology**, v.: 91, p.: 1560-1576, 2010.

IKETANI, Y. *et al.* Persistent parapoxvirus infection in cattle, **Microbiology and Immunology**, v.: 46, p.: 285-91, 2002.

LEDERMAN, E.R. *et al.* An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006: Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects, **Animals (Basel)**, v.: 3, n.: 1, p.: 142-157, 2013.

NASCIMENTO, L. M. Detection of pseudocowpox virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) with vesicular disease in the state of São Paulo, Brazil, in 2016. **Veterinary Quarterly**, v.: 37, n.: 1, p.: 16-22, 2016.

NASCIMENTO, L. M. *et al.* Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.: 28, n.: 4, p.: 377 – 381, 2016.

OLIVEIRA, C. H. *et al.* Multifocal cutaneous ORF virus infection in goats in the Amazon region, Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases**, v.: 12, n.: 2, p.: 336-40, 2012.

SANT'ANA, F. J. *et al.* Coinfection by Vaccinia virus and an Orf virus-like parapoxvirus in an outbreak of vesicular disease in dairy cows in midwestern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.: 25 n.: 2. p.: 267-272, 2013.

SARDI, I. S. *et al.* Primeiro relato do vírus Orf em rebanhos caprinos do semi-árido brasileiro. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.: 71. n.: 3, p.: 597-600, 2012.

SCAGLIARINI, A. *et al.* Parapoxvirus infections of red deer, Italy, **Emerging Infectious Diseases**, v.: 17, n.: 4. p.: 684-7, 2011.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, **Nucleic Acids Research**, v.: 35, p.: 71-74, 2007.

VERIFICAÇÃO DA TEMPERATURA DE DISTRIBUIÇÃO DE REFEIÇÕES QUENTES OFERTADAS EM UMA INSTITUIÇÃO DE LONGA PERMANÊNCIA PARA IDOSOS E A CORRELAÇÃO COM O CRESCIMENTO MICROBIOLÓGICO

Eliane Costa Souza

Docente do Centro Universitário CESMAC
Maceió-AL

Déborah Maria Tenório Braga Cavalcante Pinto

Docente do Centro Universitário CESMAC
Maceió-AL

Ismaell Avelino de Sousa Sobrinho

Graduando do Curso de Nutrição
Maceió-AL

Andressa Lima dos Santos

Graduanda do Curso de Nutrição
Maceió-AL

Julia Dayane de Miranda Vasconcelos Cardoso

Graduanda do Curso de Nutrição
Maceió-AL

Mirelly Raylla dos Santos

Graduanda do curso de Nutrição
Maceió-AL

Mateus Oliveira Santana

Graduando do curso de Medicina
Maceió-AL

RESUMO: As instituições de longa permanência para idosos (ILPI) são afetadas pela indisponibilidade de profissionais, como o nutricionista, podendo comprometer a qualidade higiênico-sanitária das refeições. O objetivo do estudo foi verificar a qualidade microbiológica

das refeições ofertadas em uma ILPI. Estudo de caráter analítico, onde o tempo de exposição foi definido através do horário inicial e final de distribuição, sendo a temperatura foi aferida a partir de um termômetro portátil digital e as análises microbiológicas seguiram a metodologia descrita por Silva et al. Nenhuma das amostras (100%) mantiveram-se em temperaturas constantes acima de 60°C. O tempo de exposição foi variável, sendo o café da manhã a refeição com maior tempo de exposição e o jantar com menor tempo. 100% das amostras apresentaram contagem desejável de bactérias aeróbias mesófilas. Conclui-se que é importante adotar balcões que possam garantir a manutenção da temperatura na impossibilidade, o binômio tempo-temperatura deve ser respeitado.

PALAVRAS-CHAVE: Serviços de Saúde para Idosos. Bactérias. Alimentos.

VERIFICATION OF THE TEMPERATURE OF DISTRIBUTION OF HOT MEALS OFFERED IN A LONG-TERM CARE INSTITUTION FOR ELDERLYS AND THE CORRELATION WITH MICROBIOLOGICAL GROWTH

ABSTRACT: Long-term care institutions for the elderly (LTCIFE) are affected by the unavailability

of professionals, such as the nutritionist, which may compromise the hygienic-sanitary quality of meals. The objective of the study was to verify the microbiological quality of the meals offered in a LTCIFE. An analytical study, where the exposure time was defined through the beginning and end distribution schedule, the temperature was measured through a portable digital thermometer and the microbiological analyzes followed the methodology described by Silva et al. None of the samples (100%) were maintained at constant temperatures above 60°C. The time of exposure was variable, being the breakfast the meal with biggest time of exhibition and the dinner with smaller. 100% of the samples presented desirable counts of mesophilic aerobic bacteria. It is important to adopt balconies that can guarantee the temperature maintenance and when it is not possible, the time-temperature bimomio need to be respected.

KEYWORDS: Health Services for the Aged. Bacteria. Food.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um processo natural universal, progressivo e intrínseco, caracterizado por diversas alterações fisiológicas. Este, por sua vez, vem aumentando no Brasil desde a década de 70, enquanto a taxa de fecundidade vem diminuindo. O processo de transição demográfica anteriormente citado é resultado de mudanças culturais, como a inserção da mulher no mercado de trabalho, melhoria das condições higiênico-sanitárias e ao avanço tecnológico (FAGUNDES et al., 2017; OLIVEIRA; DELGADO; BRESOVICI, 2014; JEREZ-ROIG et al., 2016).

Por conseguinte, a pirâmide etária brasileira sofreu modificações, e projeções indicam que em 2020 o Brasil será composto por mais de 30 milhões de idosos, sendo assim classificado como sexto país com maior número de idosos (FAGUNDES et al., 2017). É oportuno lembrar que a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) considera como idosa a pessoa maior de 60 anos.

Nesse sentido, ao considerarmos o processo de envelhecimento, é indiscutível que os anos de vida adicionais podem representar um grande desafio se não forem vividos sob condições adequadas (JEREZ-ROIG et al., 2016). Principalmente se levarmos em conta que o envelhecimento e o próprio idoso são considerados, muitas vezes, como um empecilho pela sociedade, e como um encargo pelo governo, embora existam políticas que assegurem essa população (COIMBRA et al., 2018).

Com isso, nota-se que, geralmente, após os 60 anos e/ou em casos de doenças crônicas, cresce a procura por instituições de longa permanência para idosos (ILPI). As famílias possuem como propósito garantir o bem-estar, cuidado profissional e conforto para esse familiar, partindo da ideia de que este se tornou dependente de cuidados específicos inerentes ao processo de envelhecimento (COIMBRA et al., 2018).

As ILPIs brasileiras são regulamentadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 283, de 26 de setembro de 2005, da ANVISA, que discorre dos critérios

mínimos para o seu funcionamento. Entretanto, o processo de institucionalização pode expor o idoso a diversos riscos que estão relacionados com a inadequação físico-estrutural e organizacional das ILPIs, principalmente quando falamos de instituições de caráter filantrópico, uma vez que estas possuem limitações ao que diz respeito ao aspecto financeiro (ALVES et al., 2017).

Desta forma, nota-se que estas instituições podem ser afetadas pela indisponibilidade de profissionais, como o nutricionista, profissional capacitado para cálculo da adequação nutricional das preparações oferecidas, dos cardápios, e pela administração do setor de produção de alimentos, tendo como objetivo fornecer garantir uma alimentação balanceada, que leva em consideração o estado nutricional, fisiológico e patológico dos indivíduos (CAMARGOS et al., 2015).

Segundo a Resolução CFN N° 600/2018, que discorre das atribuições do nutricionista nas Unidades de Alimentação e Nutrição (UANs), compete a estes o planejamento, organização, direção, supervisão e avaliação dos serviços de alimentação e nutrição. Desta forma, o profissional deve desenvolver atividades obrigatórias para efetivar as atribuições supracitadas.

Nessa perspectiva, o nutricionista deve planejar, implantar, coordenar e supervisionar as atividades de pré-preparo, preparo, distribuição e transporte de refeições e/ou preparações, além de estabelecer e implantar procedimentos operacionais padronizados, métodos de controle de qualidade de alimentos, e manual de boas práticas (BRASIL, 2005). A propósito destas informações, é possível que a ausência deste profissional em UANs possa comprometer a qualidade higiênico sanitária das refeições produzidas, oferecendo assim um risco à saúde daqueles que as consomem.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as condições microbiológicas das principais refeições (café da manhã, almoço e jantar) ofertadas em uma ILPI.

METODOLOGIA

Estudo de caráter analítico, realizado em uma ILPI de caráter filantrópico, na cidade de Maceió-AL, durante o período de abril a maio de 2019.

AMOSTRAS

A amostragem foi composta pelos alimentos servidos nas três principais refeições do dia (café da manhã, almoço e jantar), no momento em que os alimentos chegaram no balcão de distribuição, e no momento em que voltaram para a área de manipulação, totalizando 16 amostras. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, armazenadas em mochila isotérmica contendo gelo, de água potável, e foram levadas ao Laboratório de Pesquisa do

Campus I do Centro Universitário CESMAC para serem analisadas.

As amostras foram coletadas em um único dia pelo fato de que os manipuladores, bem como as técnicas de pré-preparo, preparo, distribuição dos alimentos e tempo de exposição não sofrem alterações durante os dias.

Junto a isto, foi definido o tempo de exposição dos alimentos através do horário em que estes chegaram ao balcão de distribuição e o horário em que voltaram para a área de manipulação.

AFERIÇÃO DA TEMPERATURA

As temperaturas das preparações servidas foram avaliadas através de um termômetro portátil digital do tipo infravermelho *laser*, da marca Multi-Temp., com variação de -60°C a $+500^{\circ}\text{C}$, com leitura instantânea. A temperatura foi verificada em dois momentos distintos: ao início e ao fim da distribuição dos alimentos. Posteriormente foram comparadas com os valores preconizados pelas legislações vigentes.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Após o transporte das amostras para o Laboratório de Pesquisa, foram devidamente identificadas e realizada a técnica da diluição sucessiva seriada, para iniciar as análises, esta consiste em: pesar assepticamente 25g de cada amostra e transferir para 225 mL de Solução Salina a 0,85%. A partir deste homogêneo (diluição 10^{-1}), foi preparada a próxima diluição transferiu-se 1 mL para tubo contendo 9 mL do mesmo diluente (diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente até a diluição 10^{-3} (SILVA et al., 2010).

QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS

A quantificação foi realizada com as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} . Foram transferidas alíquotas de 0,1 mL das diluições para as placas estéreis contendo Ágar Padrão Contagem/PCA, sendo realizado a semeadura das alíquotas com a alça de Drigalski. As placas foram invertidas e incubadas a temperatura de $35-37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. Passado o tempo de incubação, foram selecionadas as placas contendo 25 a 250 colônias e realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g ou mL. As análises foram realizadas em duplicatas.

RESULTADOS

A partir dos dados coletados, foi possível observar que a temperatura inicial das preparações variou entre 35,7°C e 60,6°C, enquanto o valor final analisado no mesmo período variou entre 28,1°C e 52,6°C. Nenhuma das amostras (100%) mantiveram-se em temperaturas constantes de distribuição acima de 60°C.

O tempo de exposição dos alimentos foi variável, sendo o café da manhã a refeição com maior tempo de exposição (90 minutos) e o jantar a refeição com menos tempo de exposição (30 minutos).

As análises microbiológicas dos alimentos, o tempo de exposição e a temperatura ao início e fim da distribuição podem ser observadas na Tabela 1.

Refeições	Alimentos	Tempo de exposição (Minutos)	Temperatura Inicial (° C)	Temperatura Final (° C)	Bactérias aeróbias Mesófilas	
					Valor Inicial (UFC/g)	Valor Final (UFC/g)
Café da Manhã	Cuscuz	90	48,8	31	4,5x10 ⁴	5,7x10 ⁴
	Soja com salsicha		60,6	45,8	<10	<10
	Papa de pão		45,9	28,1	1x10 ³	3x10 ²
	Feijão		49,5	37,8	1x10 ³	3x10 ⁴
Almoço	Carne	60	43	30,6	<10	1,8x10 ⁴
	Macarrão		49,6	28,3	<10	7x10 ⁴
	Arroz		35,7	30,8	<10	<10
Jantar	Sopa	30	60,1	52,6	2x10 ⁴	1,3x10 ⁴
	Papa de arroz		46,8	34,6	<10	8x10 ³

Tabela I. Resultados do tempo de exposição, temperaturas iniciais e finais e das análises microbiológicas de refeições ofertadas em uma instituição de longa permanência para idosos na cidade de Maceió-AL.

Fonte: dados da pesquisa

DISCUSSÃO

Dentre os alimentos analisados, apenas a soja com salsicha e a sopa (25%) atingiram, no momento inicial de distribuição, temperaturas acima de 60°C. Temperatura essa preconizada pela Resolução de Diretoria Colegiada RDC 216 de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pela Portaria CVS 5, de 09 de abril de 2013 para a distribuição de alimentos quentes. Entretanto, durante o tempo de exposição, esta não se manteve constante, sendo reduzida para 45,8°C e 52,6°C, respectivamente.

Silva et al (2017), que verificou em seu trabalho o binômio tempo X temperatura na distribuição de preparações em uma unidade de alimentação e nutrição em João

Pessoa – PB, também encontrou resultados semelhantes ao que diz respeito a queda de temperatura no início e final da verificação, atribuindo a queda de temperatura a diminuição do volume das preparações, o que, conseqüentemente, reduz a superfície de contato com a cuba aquecida, podendo assim ser um risco para a integridade das preparações, uma vez que irão tornar-se mais propícias a multiplicação microbiana.

A ILPI onde foi desenvolvido o presente estudo, não conta com a assistência de um balcão distribuição que favoreça a manutenção da temperatura das preparações. Rosa et al 2008, avaliando o tempo e temperatura de distribuição de preparações em escolas, também encontrou resultados semelhantes, onde carnes avaliadas sofreram redução de temperatura em virtude da inexistência de um sistema de manutenção de calor.

Outro dado importante encontrado no presente estudo é que as preparações permanecem na área de distribuição sem tampas. A mesma irregularidade foi encontrada no trabalho supracitado, de Rosa et al 2008, onde as preparações avaliadas em algumas das escolas também permaneciam sem tampa, favorecendo assim a redução da temperatura do alimento e, conseqüentemente, a multiplicação bacteriana.

O arroz ($35,7^{\circ}\text{C} - 30,8^{\circ}\text{C}$) e a carne ($43^{\circ}\text{C} - 30,6^{\circ}\text{C}$) foram os alimentos que apresentaram a maior inadequação de temperatura durante a distribuição ($<60^{\circ}\text{C}$). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Oliveira et al. 2012, que avaliaram as temperaturas das preparações de restaurantes do tipo self service de Belo Horizonte-MG, onde 67,1% e 58,2% dos restaurantes avaliados faziam distribuição de arroz e carne, respectivamente, em temperaturas entre $30,1^{\circ}\text{C}$ a 45°C .

Com relação as bactérias aeróbias mesófilas, 100% das amostras apresentaram contagem menor que 10^6 UFC/g. A RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 não apresenta limites para contagens de bactérias aeróbias mesófilas em alimentos prontos para o consumo, alimentos servidos em restaurantes e similares, entretanto, contagens acima de 10^6 UFC/g podem indicar exposição à contaminação ambiental, permanência por tempo prolongado em temperatura abusiva, armazenamento em temperatura inadequada de refrigeração, assim como manipulação excessiva (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A média de tempo de exposição dos alimentos foi de 60 minutos. Apesar de estarem expostos em temperaturas abusivas (menores que 60°C), estes ainda respeitam o binômio tempo-temperatura. A Portaria CVS 5, de 09 de abril de 2013, discorre que os alimentos quentes devem atingir uma temperatura mínima de 60°C , podendo ficar expostos por, no máximo, 6 horas. Quando se encontram em temperaturas abaixo de 60°C , devem ficar expostos por, no máximo, 1 hora, justificando a contagem aceitável de bactérias aeróbias mesófilas.

Entretanto, podemos perceber que, apesar de nenhuma das amostras tenham ultrapassado a contagem aceitável para bactérias aeróbias mesófilas, algumas

preparações, como o feijão, a carne, o macarrão e a sopa, atingiram valores próximos ao considerado de risco ($> 10^6$ UFC/g). Sendo assim, percebe-se mais uma vez a importância do respeito ao binômio tempo-temperatura, pois, se o tempo de exposição fosse maior do que o observado, seria possível que o crescimento microbiano ultrapassasse os valores recomendados pela literatura.

Cabe aqui ressaltar que, segundo Franco e Landgraf (2008), todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, e que existem relatos de alguns casos de toxinfecção causadas por cepas de bactérias mesófilas.

CONCLUSÃO

Embora a instituição não apresente um balcão de manutenção de temperatura, o tempo de exposição dos alimentos foi suficiente para inibir uma exacerbada contaminação microbiológica.

A exposição de alimentos a temperaturas abusivas pode configurar-se como um fator de risco para a saúde através das doenças transmitidas por alimentos, sobretudo para idosos institucionalizados, levando em consideração as diversas alterações inerentes ao processo de envelhecimento.

Sendo assim, é importante adotar, sempre que possível, balcões que possam garantir a manutenção constante da temperatura adequada conforme o que é preconizado pelas resoluções vigentes e, quando não for possível, deve ser respeitado o binômio tempo-temperatura, afim de garantir a integridade microbiológica das refeições.

REFERÊNCIAS

ALVES, B. M. et al. **Instituições de longa permanência para idosos: aspectos físico-estruturais e organizacionais.** Esc Anna Nery, v. 21, n. 4, p. 1-8, 2017.

CAMARGOS, M. C. S. et al. **Aspectos relacionados à alimentação em Instituições de Longa Permanência para Idosos em Minas Gerais.** Cad. Saúde. Colet., v. 23, n.1, p. 38-43, 2015.

COIMBRA, V. S. A. et al. **Contribuições gerontológicas para assistência de idosos em instituição de longa permanência.** Rev. Bras. Enferm., v. 71, n. 2, p. 967-975, 2018.

Conselho Federal de Nutrição (CFN). **Resolução CFN Nº 600/2018. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do Nutricionista e suas atribuições, estabelece parâmetros numéricos de referência, por área de atuação, e dá outras providências** [Internet]. Brasília, DF: CFN; 2018 [Citado em 8 de maio de 2019]. Disponível em: http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/resolucoes/Res_600_2018.htm

DE OLIVEIRA, L. C. et al. **Avaliação das temperaturas das preparações dos restaurantes self service do hipercentro de Belo Horizonte/MG.** HU Revista, v. 38, n. 3 e 4, p. 167-173, jul./dez. 2012.

FAGUNDES, K. V. D. L. et al. **Instituições de longa permanência como alternativa no acolhimento das pessoas idosas.** Rev. Salud Pública, v. 19, n. 2, p. 210-214, 2017.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

JEREZ-ROIG, J. et al. Autopercepção da saúde em idosos institucionalizados. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 11, p. 3367-3375, 2016.

Ministério da Saúde (BR). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 216 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação** [Internet]. 2004 [citado em 8 de maio de 2019]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RESOLU%25C3%2587%25C3%2583ORDC%2BN%2B216%2BDE%2B15%2BDE%2BSETEMBRO%2BDE%2B2004.pdf/23701496-925d-4d4d-99aa-9d479b316c4b>

Ministério da Saúde (BR). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 283 de 26 de setembro de 2005. Regulamento Técnico que define normas de funcionamento para as Instituições de Longa Permanência para Idosos** [Internet]. 2005 [citado em 8 de maio de 2019]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0283_26_09_2005.html

OLIVEIRA, B. S.; DELGADO, S. E.; BRESCOVICI, S. M. **Alterações das funções de mastigação e deglutição no processo de alimentação de idosos institucionalizados**. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol., v. 17, n. 3, p. 575-587, 2014.

ROSA, M. S. et al. **Monitoramento de tempo e temperatura de distribuição de preparações à base de carne em escolas municipais de Natal (RN), Brasil**. Rev. Nutr., v. 21, n. 1, p. 21-28, jan./fev., 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.

SILVA, R. O. et al. **AVALIAÇÃO DO BINÔMIO TEMPO X TEMPERATURA NA DISTRIBUIÇÃO DE PREPARAÇÕES EM UMA UNIDADE DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO EM JOÃO PESSOA-PB**. In: Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, 2017.

World Health Organization. **Proposed working definition of an older person in Africa for the MDS Project** [Internet]. 2002 [citado em 8 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>

São Paulo. **Centro de Vigilância Sanitária. Secretaria de Estado de Saúde. Portaria CVS-5/13, de 09/04/2013. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Estabelecimentos Comerciais de Alimentos e para Serviços de Alimentação, e o Roteiro de Inspeção** [Internet]. 2013 [citado em 6 de junho de 2019]. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/up/PORTARIA%20CVS-5_090413.pdf

A DIVERSIDADE DA CLASSIFICAÇÃO DE RNAS NÃO-CODIFICADORES EM BACTÉRIAS

Amanda Carvalho Garcia

Programa de Pós-graduação em Medicina Interna
e Ciências da Saúde
Universidade Federal do Paraná
Curitiba – PR, Brasil.

RESUMO: Os genes codificadores de RNAs com função regulatória conhecidos como RNAs curtos (*small RNAs* ou sRNAs) ou sRNAs não codificadores (*non-coding RNAs* ou ncRNAs), modulam respostas fisiológicas através de diferentes mecanismos, através de interação RNA-RNA ou interação RNA-proteína. Essas moléculas são transcritas *in trans* e *in cis* em relação ao RNA alvo. Estão localizados entre as regiões codificadoras de proteínas, ou seja, nas regiões intergênicas do genoma e apresentam sinais de promotores e sequências terminadoras geralmente Rho- independente. O tamanho dos genes de ncRNAs varia entre ~50 até ~500 nucleotídeos e vários transcritos são processados por RNase com produtos finais menores, que modulam respostas fisiológicas através de diferentes mecanismos, pela interação RNA-RNA ou interações RNA-proteína e algumas interações podem ser estabilizadas pela chaperona Hfq. Os *Riboswitches* constituem outra classe ncRNAs, localizados na região 5'UTR de um mRNA que promovem a regulação transcricional através

de sua interação com uma molécula ligante.

PALAVRA-CHAVE: ncRNA, *cis*-encoded ncRNA, *trans*-encoded ncRNA, *riboswitch*.

THE DIVERSITY OF THE CLASSIFICATION OF NON-CODING RNAs IN PROKARYOTES

ABSTRACT: The genes that encode regulatory RNAs in prokaryotes - known as short RNAs (sRNAs) or *non-coding sRNAs* (ncRNAs). These molecules are transcribed *in trans* and *in cis* relative to the targeted RNA. They are located within the protein coding regions, in the intergenic regions of the genome and show signs of promoter and terminator sequences that are generally Rho-independent. The size of the ncRNA genes ranges from ~ 50 to ~ 500 nucleotides and several transcripts are processed by RNase with smaller end-products. These modulate the physiological responses through different mechanisms, either by RNA-RNA or RNA-protein interactions, and some of the interactions can be stabilized by the Hfq chaperone. The *Riboswitches* constitute another class of ncRNAs, that are located in the 5'UTR region of an mRNA and induce transcriptional regulation through their molecular interactions with linkers. CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) regions have been recently described in prokaryotes, which are based on repeated palindromic

sequences. Each replicate consists of small segments of “spacer DNA” taken from exposures prior to the isolation of a bacteriophage virus or exogenous plasmid. CRISPR can be defined as an immune system of resistance to exogenous molecules.

KEYWORDS: ncRNA, *cis-encoded*ncRNA, *trans-encoded*ncRNA, *riboswitch*, CRISPR.

1 | INTRODUÇÃO

Os RNAs não codificadores podem ser classificados como RNAs curtos não-mensageiros (snmRNAs, do inglês *small no-messenger RNAs*), RNAs curtos não codificadores (ncRNAs, do inglês *small no-coding RNAs*), RNAs não traduzidos (utRNAs, do inglês *untranslated RNAs*), ou RNAs não codificadores de proteínas (npcRNAs, do inglês *no-protein-coding RNAs*) (HOE et al., 2013). Os RNAs curtos (*small RNAs* ou sRNAs) ou RNAs não codificadores (*non-coding RNAs* ou ncRNAs). Estas moléculas modulam respostas fisiológicas através de diferentes mecanismos, através de interação RNA-RNA ou interação RNA-proteína. Algumas interações podem ser estabilizadas pela chaperona Hfq (PICHON e FELDEN, 2007; LIVNY e WALDOR, 2007; LIU e CAMILLI, 2010). É o que ocorre comumente na classe dos ncRNAs *trans-encoded* onde a formação do complexo ncRNA:Hfq:mRNA pode atuar positiva ou negativamente na regulação pós-transcricional (FANER e FEIG, 2013).

Os ncRNAs mais estudados são os *cis-encoded* RNAs e os *trans-encoded* RNAs, sendo os primeiros transcritos *in cis* e antisenso em relação ao mRNA alvo e os segundos transcritos em regiões genômicas distantes do mRNA alvo (AZHIKINA et al., 2015). Por isso, somente os *cis-encoded* RNAs apresentam pareamento de bases perfeito com os alvos. Os *Riboswitches* constituem outra classe ncRNAs, localizados na região 5'UTR de um mRNA, que promovem a regulação transcricional através de sua interação com uma molécula ligante (WINKLER, 2005; MEYER et al., 2011; IZAR, MRAHEIL e HAIN, 2011). Recentemente, em procariotos, foram descritas regiões CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que são repetições de sequências de bases palindrômicas (BRONS et al., 2008; AZHIKINA et al., 2015). Cada repetição consiste em segmentos curtos de “DNA espaçador” de exposições anteriores a um vírus bacteriófago ou plasmídeo exógeno. O sistema CRISPR_{cas} consiste em um sistema imune de resistência à moléculas exógenas (MARRAFFINI e SONTHEIMER; 2008).

Ferramentas computacionais são muito utilizadas para a predição de ncRNAs, como o QRNA (RIVAS et al., 2001) que realiza a análise comparativa de genomas, o ISI (PICHON e FELDEN, 2003) que analisa sequências intergênicas conservadas entre genomas relacionados para a identificação ncRNAs. O programa computacional RNAz 2.0 (GRUBER et al.; 2010) analisa a estabilidade termodinâmica da estrutura conservada do RNA e a existência de promotor e terminador nos possíveis preditos ncRNAs. As ferramentas de predição sRNAPredict2 (LIVNY et al., 2006) e SIPHT (LIVNY et al., 2008) avaliam as informações dos promotores terminadores Rho-

independentes contra banco de dados. Além disso, a abordagem experimental de larga escala que envolve sequenciamento de cDNA (RNA-seq), tem sido amplamente utilizada na predição de ncRNAs e constitui um método bastante eficiente devido à possibilidade de confirmar a expressão de ncRNAs preditos (SHARMA e VOGEL, 2009; SHINHARA et al., 2011; PICHON et al., 2012; SCHROEDER et al., 2015). Pretende-se assim contribuir para o entendimento da participação desse tipo de RNA na regulação do metabolismo bacteriano.

2 | RNAS NÃO CODIFICADORES EM PROCARIOTOS

O avanço científico e tecnológico proporcionou a descoberta das funções daqueles tidos como principais RNAs: RNA mensageiro (mRNA), molécula de transferência da informação durante a síntese de proteínas; RNA ribossômico (rRNA) componente da estrutura da síntese de proteínas e RNA transportador (tRNA) com capacidade de transportar os aminoácidos e interagir com as proteínas (COX et al., 2012). Diversos estudos estruturais e funcionais do RNA têm sido realizados e possibilitaram a descrição de novas classes de RNA, com funções variadas e nos domínios *Archea*, *Bacteria* e *Eukaria* (QUADRO 1) (BROSIUS e RAABE, 2016).

Enquanto a genômica considera e analisa os genomas como sequências codificadoras de mRNAs, rRNAs e tRNAs, a RNômica investiga, além desses, os genes codificadores de RNAs que são não traduzidos, mas que são RNAs funcionais e estão envolvidos em diferentes processos celulares (HUNTENHOFER et al., 2005; ULVÉ et al., 2007). Os RNAs não codificadores estão envolvidos em vários processos celulares, como por exemplo: replicação dos cromossomos na divisão celular (*dif*), regulação da transcrição (6S RNA), processamento do RNA (*rnpB*), estabilidade do mRNA e tradução (sequência antisense – *spot42*), estabilidade de proteína (tmRNA) e transporte (4.5S ou *ffs*) (MIKULIK, 2003). Existem ncRNAs envolvidos no stress oxidativo (*oxyS*), na transcrição da fase estacionária (*dsrA*, *rprA*), relacionados ao controle do número de cópias de plasmídeos (RNAI, RNAIII), armazenamento de carbono (*csrBC*) e transporte de carbono (*gcvB*) (ULVÉ et al., 2007).

A classe dos ncRNAs com função regulatória está envolvida em diversos mecanismos regulatórios como na expressão gênica, na modulação das proteínas de superfície da membrana externa (Omp) (MASSÉ et al., 2003). Alguns ncRNAs podem ligar-se à proteínas a fim de modular suas atividades, como é o caso do 6S RNA que forma um complexo com a RNA polimerase (RNAP) (ULVÉ et al., 2007; PICHON, FELDEN, 2007; GOTTESMAN e STORZ, 2011). Essas moléculas são transcritas *in trans* ou em *in cis* em relação ao RNA alvo (STORZ, ALTUVIA e WASSARMAN, 2005; LIU e CAMILLI, 2010). Os genes estão localizados entre as regiões codificadoras de proteínas, ou seja, nas regiões intergênicas do genoma e apresentam sinais de promotores e sequências terminadoras, geralmente Rho-independente (ERMOLAE et al., 2000; WASSARMAN et al., 2001; ARGAMAN et al.,

2001; CIAMPI, 2006).

O tamanho dos genes de ncRNAs varia entre ~50 até ~500 nucleotídeos e vários transcritos são processados por RNase com produtos finais menores (FIGURA 1) (WASSARMAN e KILEY, 2010; ARNVIG, CORTES e YOUNG; 2014; UPDEGROVE et al., 2015; SCHROEDER et al., 2015). O pareamento antisense entre o ncRNA regulatório e o RNA mensageiro alvo é o mecanismo de ação mais comum (SHARMA e VOGEL, 2009; MASSÉ e GOTTSMAN, 2002). Essa interação ocorre em regiões curtas e de complementariedade imperfeita de sequência, podendo ser estabilizada pela proteína chaperona Hfq (MASSÉ et al., 2003; REPOILA e DARFEUILLE, 2009; STORZ et al., 2011).

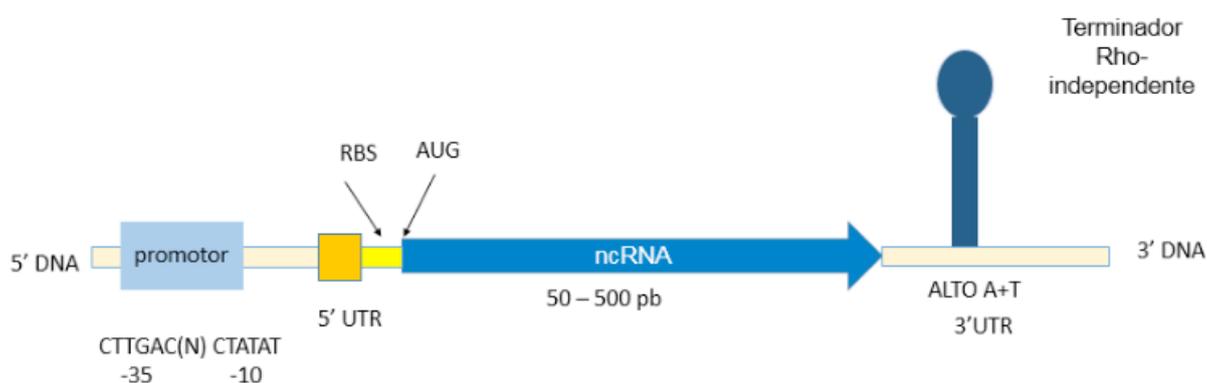


FIGURA 1 – Estrutura de um gene de ncRNAs em bactéria, onde apresenta uma região promotora CTTGAC (N) (-35) e CTATAT (-10), sítio de ligação de ribossomo (RBS), uma região codificadora AUG na extremidade 5'UTR. Podendo variar o tamanho entre 50 a 500 pares de bases, e na região 3'UTR apresenta uma sequência terminadora (Rho-independente).

Jager e colaboradores (2012) demonstraram que a interação ncRNA₁₆₂/ RNA alvo em *Archaea* pode ocorrer com ação *cis-encoded* ou *trans-encoded*, através de dois domínios distintos. Assim como em *Bacteria*, os ncRNAs em *Archaea* estão envolvidos em muitos processos biológicos, tais como: regulação metabólica, adaptação a condições ambientais, resposta ao stress, regulação da morfologia e no comportamento celular. Em *Methanosarcina mazei* GO1, Babski e colaboradores (2014) identificaram ncRNAs que alinham na região 5'UTR dos mRNAs alvos e em *Sulfolobus solfataricus* ncRNAs que alinham na região 3'UTR dos mRNAs alvos. Já para *Pyrobaculum* sp. e *Haloferax volcanii*, há evidências que os ncRNAs podem alinhar com mRNAs alvos tanto na extremidade 5'UTR, quanto na extremidade 3'UTR. Além disso, observaram que o ncRNA TRF regula negativamente a tradução em resposta à ligação ao RBS.

O modo de ação dos ncRNAs regulatórios depende da co-localização com os seus mRNA alvos (FIGURA 2). Podendo ser classificados em *trans-encoded* RNA, codificados distantes dos seus mRNA alvos, e em *cis-encoded* quando localizam-se na região 5'UTR em relação ao alvo. Os *riboswitches*, em sua maioria, encontram-se na região 5'UTR, sofrem alterações conformacionais na sua estrutura secundária,

devido a ligação de um ligante, e regulam a expressão gênica (GOTTESMAN e STORZ, 2011; ARNVIG et al., 2014).

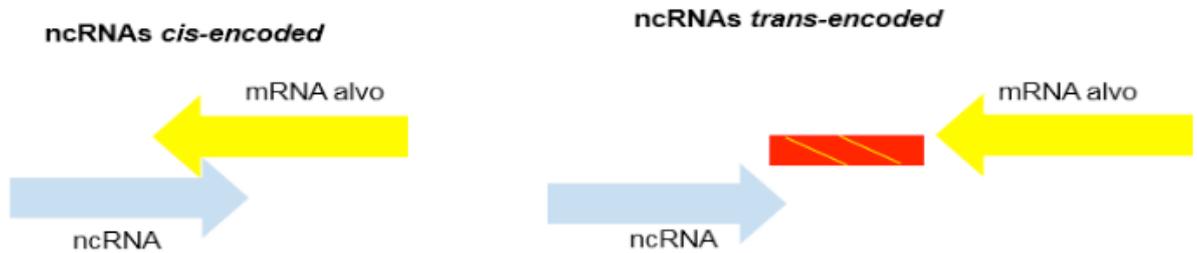


FIGURA 2 – Sentido de transcrição ncRNAs e modo de pareamento com RNAs alvos. Genes de ncRNAs *cis-encoded* estão localizados próximos aos genes codificadores de mRNAs alvos enquanto que genes de ncRNAs *trans-encoded* estão localizados distantes dos seus mRNAs alvo. Após a transcrição os ncRNAs *cis-encoded* fazem pareamento curto e perfeito com seus alvos e os ncRNAs *trans-encoded* fazem pareamento longo e imperfeito.

O mecanismo de ação dos ncRNAs varia de acordo com a sua função (FIGURAS 3 e 4). No passo pós-transcricional o ncRNAs *cis-encoded* pode causar a degradação do mRNA (FIGURA 3a), a inibição da tradução (FIGURA 3b), a clivagem do mRNA alvo (FIGURA 3c) (*Overlapping* da 5'UTR) e terminação da transcrição (FIGURA 2d) (WATERS e STORZ, 2009). A interação do ncRNA *trans-encoded* com mRNA alvo pode resultar na inibição da tradução (FIGURA 4a) e na degradação do mRNA pela interação negativa da 5'UTR inibindo o sítio de ligação do ribossoma, ou na degradação pela RNase (FIGURA 4b). O ncRNA *trans-encoded* com o seu mRNA alvo pode formar uma estrutura inibitória que poderia bloquear de alguma forma o local do sítio de ligação do ribossoma, impedindo assim, a tradução (FIGURA 4.c) (WATERS e STORZ, 2009). Muitos RNAs codificados em *cis* com orientação antisense, podem formar complexos binários *trans-encoded* com o mRNA alvo, o que demonstra que esta classificação não é rígida ou decisiva (OLIVA, 2015).

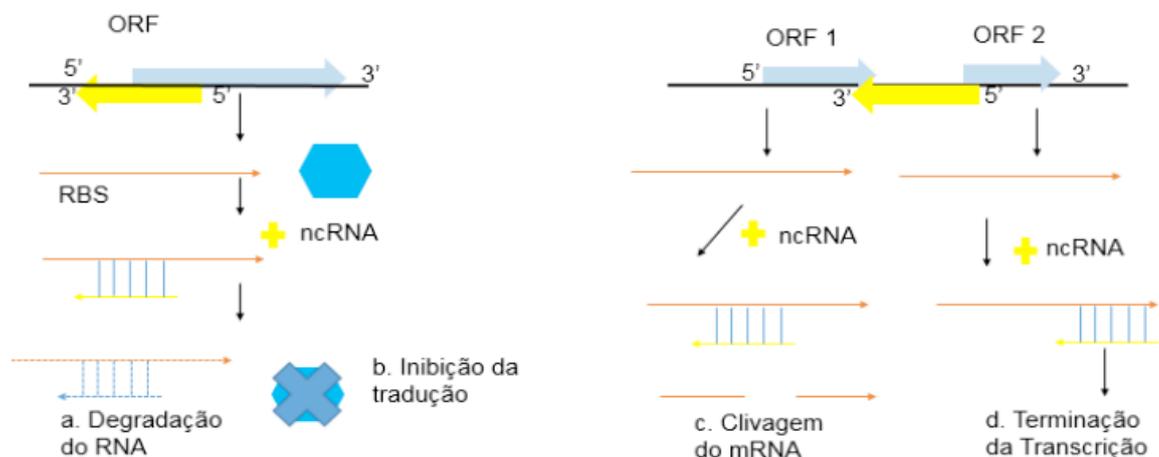


FIGURA 3 – Mecanismos de ação *cis-encoded* em que, no genoma, o ncRNA está localizado próximo ao gene do seu mRNA alvo. O ncRNAs *cis-encoded* está representado em amarelo e seu alvo em azul. 3a. Degradação do mRNA. 3b. Inibição da tradução. 3c. Clivagem do mRNA e 3d. Terminação da transcrição.

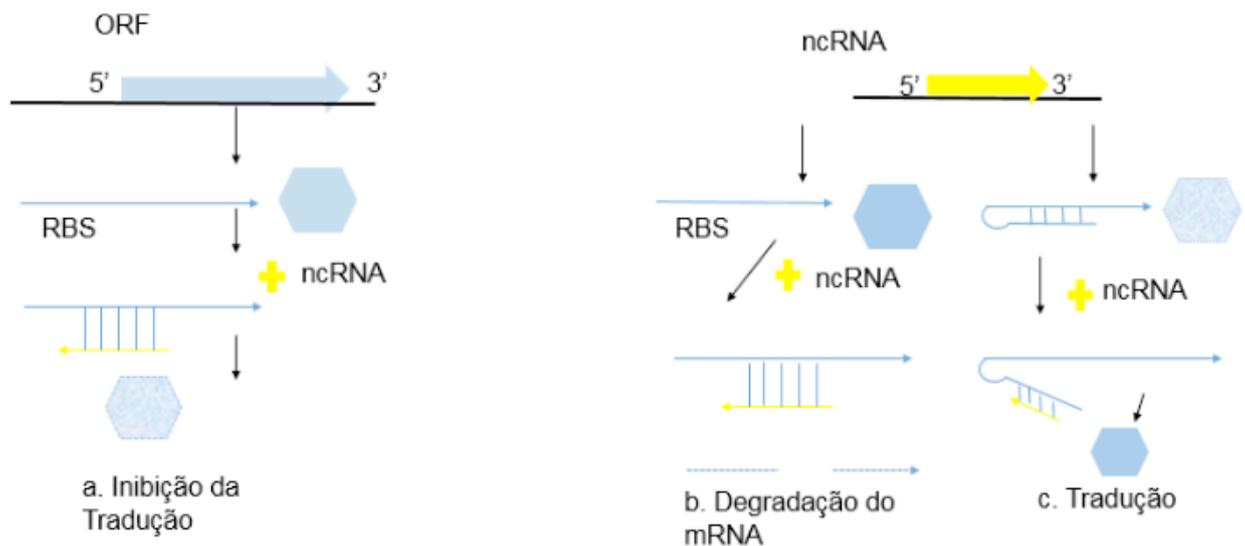


FIGURA 4 – Mecanismos de ação *trans-encoded* em que, no genoma, o ncRNA está localizado distante do gene do seu mRNA alvo. O ncRNAs *trans-encoded* está representado em vermelho e o seu mRNA alvo em azul. Complementariedade de pares de bases é limitada. 3a. Inibição da tradução. 3b. Degradação do mRNA. 3c. Permite a tradução.

2.1 *cis-encoded* ncRNAs

Os *cis-encoded* ncRNAs estão presentes em diferentes espécies bacterianas, Gram-positivas e Gram-negativas (STORZ, ALTUVIA e WASSARMAN; 2005; OLIVA, SAHR e BUCHRIESER, 2015). Em *E. coli*, Wagner e Simons (1994) descreveram o papel regulatório antisense do RNA no controle da expressão gênica de mRNAs, na maturação de fagos, na transposição de elementos móveis e na replicação de plasmídeos. Além disso, podem participar da regulação do início da replicação, conjugação de plasmídeos, transposição, degradação do mRNA e também de algumas vias do metabolismo celular. Estes eventos continuam sendo objeto de investigação de diferentes pesquisadores (STORZ, ALTUVIA e WASSARMAN; 2005; BRANTL, 2007; LIU e CAMILLI, 2010; OLIVA, SAHR e BUCHRIESER, 2015).

Os *cis-encoded* ncRNAs são codificados no mesmo locus do seu mRNA alvo, mas no sentido antisense do duplex, sendo assim, totalmente complementares durante a interação. O mecanismo de resposta pós-transcricional da regulação gênica envolve um elevado grau de complementariedade de sequência, e isso foi considerado um indício de que não seria necessária a interação da proteína Hfq (HÜTTENHOFER, SCHATTNER e POLACEK, 2005; BRANTL, 2007). Entretanto, alguns pesquisadores reportaram a interferência de Hfq no pareamento ncRNA *cis-encoded* mRNA alvo (SITTKA et al., 2008; LORENZ et al., 2010; ROSSI et al., 2016). De forma geral, esses ncRNAs atuam através do pareamento complementar ao sítio de ligação do ribossoma do mRNA, inibindo, por sua vez, a tradução (BRANTL, 2007; REPOILA e DARFEUILLE, 2009).

Um exemplo de *cis-encoded* ncRNA típico é o 5' *ureB* de *Helicobacter pylori*, localizado 5'-antisense ao gene *ureB* que compõe o operon *ureAB* (WEN, FENG e SACHS, 2013; HAN et al., 2013). Esse ncRNA contém 292 pb e regula negativamente

a expressão do operon *ureAB* ao bloquear a tradução na porção 5' do *ureB* (FIGURA 4). Os genes *ureAB* de *H. pylori* localizam-se no cluster de dois operons *ureAB-ureIEFGH* e codificam as subunidades UreA e UreB da apoenzima urease. Essa enzima é essencial para a sobrevivência da *H. pylori* em baixo pH uma vez que sua reação produz NH_3 e HCO_3^- para o ambiente, permitindo assim, a homeostasia para o crescimento bacteriano (WEN, FENG e SACHS, 2013). A diversidade do *cis-encoded* ncRNA e seus papéis regulatórios variam de acordo com cada organismo como. Por exemplo, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* possui o *cis-encoded* ncRNA *lesR-1* cuja a função é controlar a replicação em células de eucarioto (GONZALO-ASENSIO et al., 2013) e *Salmonella entérica serovar Typhi* possui o *cis-encoded* ncRNA *AmgR* envolvido na virulência em ratos (LEE e GROISMAN, 2010) e o *AsdA* que é regulador da replicação intracelular (DADZIE et al., 2013).

A mesma diversidade pode ser observada com relação às estratégias regulatórias. Em *Escherichia coli* o emparelhamento de bases entre o *cis-encoded* ncRNA *GadY* e seu mRNA alvo *gadXW* causa a clivagem do duplex entre *gadX* e *gadW*, proporcionando o aumento dos níveis do transcrito *gadX*. O produto *GadX* funciona como fator de transcrição do operon *GadAGadB* durante a síntese da glutamato descarboxilase e este processo consiste em um sistema de defesa contra estresse ácido em *E. coli* (WATERS e STORZ, 2009; AZHIKINA et al., 2015).

O sistema *SymR-SymE* em *E. coli* consiste em dois genes, o *cis-encoded* ncRNA *symR* e o gene *symE* que codificam uma proteína tóxica (REPOILA e DARFEUILLE, 2009; LIU e CAMILL, 2010; AZHIKINA et al., 2015). O aumento da concentração celular da proteína *SymE* diminui a atividade sintética dos ribossomos. O *cis-encoded* ncRNA *symR* regula negativamente a expressão do gene *symE* pela complementariedade de bases ncRNA/mRNA, resultando na inibição da tradução de mRNA_{*symE*} e na retomada da atividade sintética ribossomal (REPOILA e DARFEUILLE, 2009; WATERS e STORZ, 2009; HAN et al., 2013; AZHIKINA et al., 2015). Peng e colaboradores (2015) identificaram, em *Brucella abortus* 2308, o *cis-encoded* ncRNA *BsrH* que regula positivamente a expressão do gene *hemH*, evidenciando, com isso, a importância da expressão regulatória que ncRNA *BsrH* exerce sobre seu mRNA alvo.

Os *cis-encoded* ncRNA antisense são também comuns no mecanismo de replicação de plasmídeos. Por exemplo, no controle da replicação do plasmídeo *ColE1*, que usa ncRNA em vez de proteínas para iniciar a replicação no sítio de origem, são transcritos dois RNAs parcialmente complementares a partir de fitas opostas. O RNA maior, com 250-500 nucleotídeos (RNAII), é transcrito a partir da fita sense e forma um híbrido estável com o DNA molde. Este híbrido é então processado pela RNase H para gerar um primer para a DNA polimerase. O RNA menor, com 68-108 nucleotídeos (RNAI), é transcrito a partir da fita antisense e é complementar à região 5' do RNAII. Ele funciona como um regulador negativo da formação do primer pela formação do duplex RNAI/RNAII que impede a formação do híbrido RNAII/DNA

molde. A concentração de RNAI é proporcional ao número de plasmídeos por célula, constituindo assim uma alça de *feedback* negativo que regula a replicação plasmidial em resposta às alterações metabólicas (MASSÉ, MAJDALANI e GOTTSEMAN, 2003; CAMPS, 2010).

2.2 *trans-encoded* ncRNAs

Como já mencionado, o modo de ação dos *trans-encoded* ncRNAs difere dos *cis-encoded* ncRNAs pelo limitado compartilhamento de pares de bases com os seus mRNA alvos (WATERS e STORZ, 2009; HAN et al., 2013; AZHIKINA et al., 2013). Esse tipo de ncRNA é codificado *in trans* e pode ter mRNAs alvos em diferentes locais no genoma. O ncRNA transcrito necessita geralmente da proteína chaperona Hfq para estabilizar a interação ncRNA-RNA alvo, devido ao pareamento de bases imperfeito e, assim, evita-se sua eventual degradação pela RNase (RICHARDS e BELASCO, 2008; STORZ et al., 2011, WATERS e STORZ, 2009). A chaperona mais estudada é a proteína Hfq que em *E. coli* interage com 40% dos ncRNAs (AZHIKINA et al., 2015). Schoroeder e colaboradores (2016) relatam que quase 50% de todas as espécies bacterianas possuem *trans-encoded* ncRNAs que necessitam da proteína chaperona Hfq, uma exceção é *Listeria monocytogenes* em que a maioria dos *trans-encoded* ncRNAs são independentes da Hfq.

A interação de Hfq com *trans-encoded* ncRNAs está envolvida na regulação pós-transcricional em várias espécies de bactérias, e pode exercer efeito negativo ou positivo sobre os seus mRNAs (RICHARDS, VARDERPOOL, 2011; CECH et al., 2016). A estrutura de Hfq, baseada em estudos de cristalografia, mostra uma proteína hexamérica, homóloga a proteínas Sm que possuem dois motivos (Sm1 e Sm2) (STORZ et al., 2011; PENG, DONG e WU; 2015). Em *E. coli*, Link e colaboradores (2009) caracterizaram dois sítios de ligação de RNA da proteína Hfq: proximal que se liga ao ncRNA e mRNA alvo e o outro distal que se liga a cauda poli U (FIGURA 5) (HOLMQVIST et al., 2016).

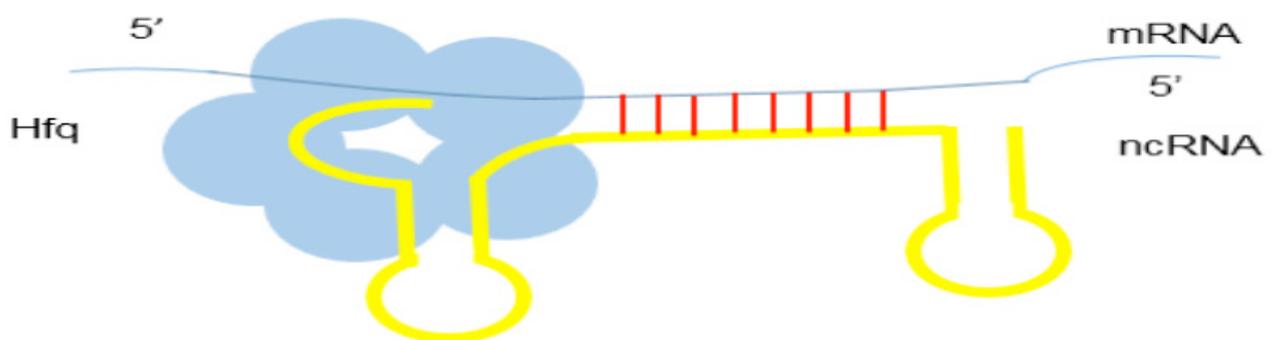


FIGURA 5 - Modelo provável da interação da proteína Hfq com o par ncRNA/mRNA.

Peng e colaboradores (2015) reportaram, através de estudos de transferência de energia por ressonância fluorescência (FRET), modelos estruturais em a Hfq

interage com PAPI, PNPase e RNaseE. Soper e colaboradores (2010) descreveram três ncRNAs regulatórios DsrA, RprA, ArcZ em *E. coli* que regulam positivamente a tradução do fator sigma RpoS quando ocorre o emparelhamento de bases ncRNA e mRNA *rpoS*. Eles identificaram a formação de um grampo inibitório na região 5'UTR e demonstraram que a ligação à Hfq é importante para a estabilidade do complexo RNA:RNA. Já na regulação negativa, o emparelhamento de bases ocorre entre a sequência de ligação ao ribossomo (RBS) e o ncRNA, bloqueando a ligação ao ribossomo, ou a degradação pela RNases.

Em *E. coli*, a regulação da expressão da proteína OmpC envolve o ncRNA MicF e uma região 5' UTR de 22 nucleotídeos antisense ao mRNA *ompC* (CHEN et al., 2004). Esta interação envolve também a Hfq e resulta na inibição da tradução. Já em *Salmonella typhimurium* é o ncRNA MicC, associado a proteína Hfq, que silencia o mRNA *ompD* através do duplex de RNA/RNA de 12 pares de bases na região codificadora de proteína. O MicC não inibe a iniciação da tradução na posição a jusante, mas acelera a atividade de RNaseE-dependente (PFEIFFER et al., 2009; WROBLEWSKA e OLEJINICZAK, 2016).

3 | RIBOSWITCHES

Riboswitches são elementos estruturados de RNA não codificante considerados elementos *cis-encoded* de RNA, localizados em sua maioria na região 5'UTR de um mRNA alvo e menos frequentes na extremidade 3' UTR (WINKLER, 2005; WATERZ e STORZ, 2009; HAN et al., 2013). Entretanto, Loh e colaboradores (2009) descreveram um caso de *riboswitch* que controla *in trans* a expressão da proteína reguladora da virulência PrfA em *Listeria monocytogenes*. Possuem a capacidade de controlar a expressão gênica a nível de transcrição e tradução e de adquirir diferentes conformações em resposta a sinais ambientais, como elevadas temperaturas e a ligação de pequenas moléculas, como metabólitos ou íons metálicos (WATERS e STORZ, 2009; IZAR, MRAHEIL e HAIN, 2011).

Recentemente, uma grande variedade de *riboswitches* foi identificada em procariotos. *Bacillus subtilis* possui 2% de todos os seus genes regulados por *riboswitches* que sem ligam a metabólitos intracelulares, como Flavina mononucleotídeo (FMN), pirofosfato de timina, S-adenosil-metionina (SAM), lisina e guanina (FIGURA 6) (MIRONOV et al., 2002; HENKIN, 2008; HAN et al., 2013; OLIVA, SAHR e BUCHRIESER, 2015). A estrutura do *riboswitch* é composta por duas partes, a região de aptâmero que serve de sítio de ligação para um ligante e a plataforma de expressão que assume uma conformação adequada para a tradução (FIGURA 7) (WATERS e STORZ, 2009; ANTHONY et al., 2012). A ligação da molécula ligante provoca alterações conformacionais na estrutura nativa do *riboswitch*, podendo regular os processos de transcrição e tradução (WINKLER, 2005). A última

sequência da plataforma de expressão forma um emperalhamento com o domínio aptâmero, dependendo se estiver ligado ou não ao ligante e pode, eventualmente, sinalizar um término de transcrição ou controlar a estrutura helicoidal no sítio de ligação do ribossoma (WEINBERG et al., 2011).

Assim os *riboswitches* são utilizados para regulação da terminação da transcrição (atenuação) do mRNA e a na iniciação da tradução (BARRICK et al., 2004). Na transcrição quando o ligante se liga ao mRNA na região do aptâmero, ocorrem alterações conformacionais, resultando na formação de um grampo alternativo (FIGURA 7a) (WATERS e STORZ, 2009). Este grampo atua como um terminador da transcrição que inibe a expressão gênica. A ligação da molécula ligante ao grampo alternativo leva à anti-terminação (FIGURA 7b). A ligação de um ligante que provoca alteração estrutural e leva ao sequestro do RBS impede a tradução (FIGURA 7c). Ao contrário, a ligação de um ligante pode causar a exposição do RBS e promover a tradução (FIGURA 7d).

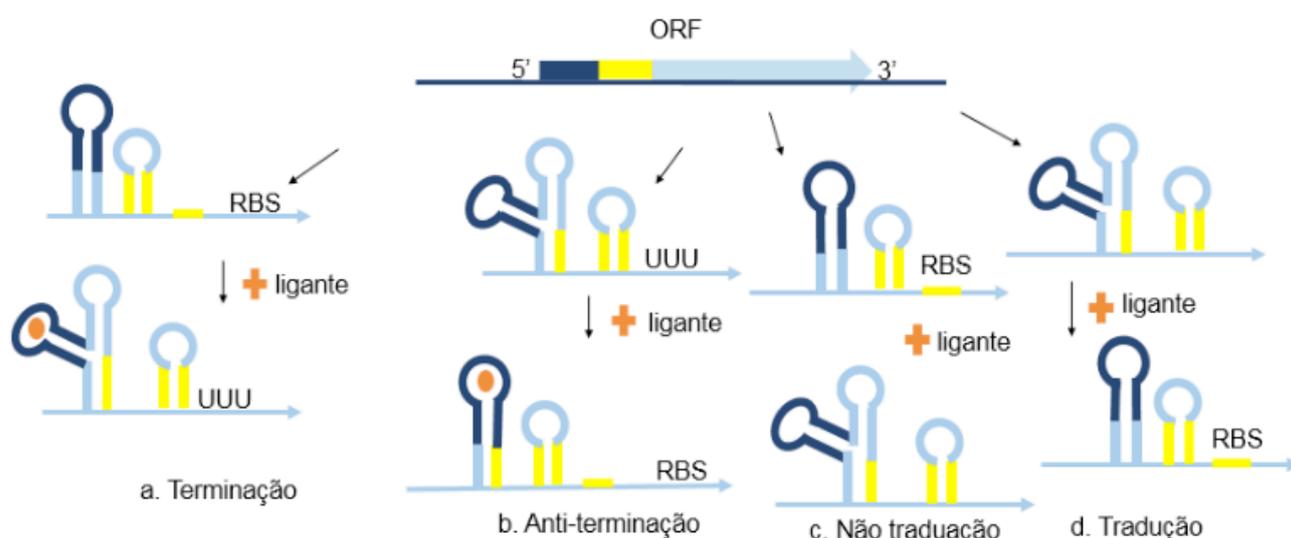


FIGURA 6 – Arranjo Estrutural do Riboswitch e Função Regulatória do Ligante. Riboswitch é formado pela região aptâmero (rosa) e uma plataforma de expressão (amarelo) na 5'UTR do respectivo mRNA (azul). Molécula ligante exerce função regulatória nos processos da transcrição (A e B) e da tradução. Modificado de WATERS e STORZ, 2009.

Os *riboswitches* podem desempenhar função em sistemas biológicos da célula, devido o grande número de famílias de genes envolvidos. Corbino e colaboradores (2005) descobriram motivos metaA em *Agrobacterium tumefaciens* semelhante ao *riboswitch* dectetor de S-adenosilmetionina (SAM). A classe de *riboswitch* SAM-II apresenta grande diversidade estrutural, de baixa conservação, podendo alterar a estrutura conformacional do mRNA (EPSHEIN, MIRONOV e NUDLER, 2003; McDANIEL et al., 2003; WINKLER et al., 2003; LALAOUNA et al., 2013). A estrutura do *riboswitch* pode conter diversos motivos que controlam a expressão do gene, através da detecção de concentrações dos metabólitos específicos, o que torna estas estruturas promissoras alvo para antibióticos. Suresch e colaboradores (2016)

demonstraram que o S-adenosilmetionina *riboswitch*-III, presente em bactérias anaeróbicas, está envolvido no processo de regulação da metionina e das vias biossintéticas SAM. Em presença ou ausência do ligante, o S-adenosilmetionina *riboswitch*-III exerce uma dupla função, o que facilita a mudança conformacional entre o estado parcial e totalmente dobrado, formando uma estrutura duplex estável, a qual fortalece as interações entre os nucleotídeos Shine-Dalgarno (SD) e anti-Shine-Dalgarno (aDS).

4 | CONCLUSÃO

O conhecimento acerca da regulação pós-transcricional que os ncRNAs exercem em um determinado mRNA alvo, está relacionado com a sua posição e o pareamento entre ncRNA:RNAm, e qual a classe de sRNA que se está trabalhando. Há diferentes classes de sRNAs e como estes podem regular diversos mecanismos formando uma rede regulatória, a qual, desempenha um papel fundamental no circuito regulatório do genoma em estudo. Com o avanço das tecnologias computacionais visando proporcionar um conhecimento a respeito do papel e da funcionalidade dos non-coding RNA nos diversos domínios da vida, os quais vem sendo desenvolvidos pesquisas para predição e validação que auxiliam ao entendimento do que era considerado lixo genômico, hoje se sabe, da grande importância que os ncRNAs exercem apesar do tamanho são excelentes construtores e alicerces que compõem a maquinaria genômica.

AGRADECIMENTO

Colaborador J.C Hamashia.

REFERÊNCIA

ALTUVIA, S. Identification of bacterial small non-coding RNAs; experimental approaches. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 257-261, 2007.

ANTHONY, P. C.; PEREZ, C. F.; GARCÍA-GARCÍA, C.; BLOCK, S. M. Folding energy landscape of the thiamine pyrophosphate *riboswitch* aptamer. **PNAS**, v. 109, n. 5, p. 1485-1489, 2012.

ARNVIG, K. B., CORTES, T., YOUNG, D. B. Noncoding RNA in Mycobacteria. **Microbiol Spectrum**, 2014.

ARGAMAN, L., HERSHBERG, R., VOGEL, J., BEJERANO, G., WAGNER, E. G. H., MARGALIT, H., ALTUVIA, S. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic region of *Escherichia coli*. **Current Biology**, v.11, n. 12, p. 941–950, 2001.

AZHIKINA, T. L., IGNATOV D. V., SALINA, E. G., FURSOV, M. V., KAPRELYANTS, A. S. Role of Small Noncoding RNAs in Bacterial Metabolism. **Biochemistry**, Moscow, v. 80, n. 13, p. 1633-1646, 2015.

- BABSKI, J.; MAIER, L. K.; HEYER, R.; JASCHINSKI, K.; PRASSE, D.; JÄGER, D.; RANDAU, L.; SCHMITZ, R. A.; MARCHFELDER, A.; SOPPA, J. Small regulatory RNAs in Archaea. **RNA. Biol.**, v. 11, n. 5, p. 484-493, 2014.
- BARRICK, J. E.; CORBINO, K. A.; WINKLER, W. C.; NAHVI, A.; MANDAL, M.; COLLINS, J.; LEE, M.; ROTH, A.; SUDARSAN, N.; JONA, I.; WICKISER, J. K.; BREAKER, R. R. New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. **PNAS**, v. 101, n. 17, p. 6421-6426, 2004.
- BRANTL, S. Regulatory mechanisms employed by *cis-encoded* antisense RNAs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 102–109, 2007.
- BROSIUS, J., RAABE, C. A. What is an RNA? A top layer for RNA classification. **RNA. biology**, v. 13, n. 2, p. 140-144, 2016.
- CAMPS, M. Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent. Pat. DNA, Gene. Seq.*, v. 4, n. 1, p. 58-73, 2010.
- CECH, G. M.; SZALEWSKA-PAŁASZ, A.; KUBIAK, K.; MALABIRADE, A.; GRANGE, W.; ARLUISON, V.; WĘGRZYN, G. The Escherichia Coli Hfq Protein: An Unattended DNA-Transactions Regulator. **Front. Mol. Biosci.**, v. 3, p. 36, 2016.
- CIAMPI, M. S. Rho-dependent terminators and transcription termination. **Microbiology**, v. 152, p. 2515–2528, 2006.
- CHEN, S.; ZHANG, A.; BLYN, L. B.; STORZ, G. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in Escherichia coli. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 20, p. 6689-6697, 2004.
- COX, M. M., DOUDNA, J. A., O'DONNELL, M. **Biologia Molecular – Princípios e Técnicas**, 1ªed. Artmed, 2012.
- DADZIE, I.; XU, S.; NI, B.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; SHENG, X.; XU, H.; HUANG, X. Identification and characterization of a *cis-encoded* antisense RNA associated with the replication process of Salmonella enterica serovar Typhi. **PLoS. One**, v. 8, n. 4, p. e61308, 2013.
- FANER, M. A., FEIG A. L. Identifying and characterizing Hfq–RNA interactions. **Methods**, n. 63, p. 144–159, 2013.
- GONZALO-ASENSIO, J.; ORTEGA, A. D.; RICO-PÉREZ, G.; PUCCIARELLI, M. G.; GARCÍA-DEL PORTILLO, F. A novel antisense RNA from the Salmonella virulence plasmid pSLT expressed by non-growing bacteria inside eukaryotic cells. **PLoS One**. v. 8, n. 10, p. e77939, 2013.
- GOTTESMAN, S., STORZ, G. Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 3, p. a003798, 2011.
- GRUBER, A. R.; FINDEISS, S.; WASHIETL, S.; HOFACKER, I. L.; STADLER, P. F. RNAz 2.0: improved noncoding RNA detection. **Pac. Symp. Biocomput.**, p. 69–79, 2010.
- HAN, Y; LIU, L.; FANG, N.; YANG, R.; ZHOU, D. Regulation of pathogenicity by noncoding RNAs in bacteria. **Future. Microbiol.**, v. 8, n. 5, p. 579-591, 2013.
- HENKIN, T. M. Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. **Genes Dev**, v. 22, n. 24, p. 3383-3390, 2008.
- HOE, C. H.; RAABE, C. A.; ROZHDESTVENSKY, T. S.; TANG, T. H. Bacterial sRNAs: Regulation in stress. **Int. J. Med. Microbiol.**, 2013.

- HOLMQVIST, E.; WRIGHT, P. R.; LI, L.; BISCHLER, T.; BARQUIST, L.; REINHARDT, R.; BACKOFEN, R.; VOGEL, J. Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking in vivo. **EMBO. J.**, v. 35, n. 9, p. 991-1011, 2016.
- IZAR, B.; MRAHEIL, M. A.; HAIN, T. Identification and Role of Regulatory Non-Coding RNAs in *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 5070-5079, 2011.
- LALAOUNA, D.; SIMONEAU-ROY, M.; LAFONTAINE, D.; MASSÉ, E. Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1829, n. 6-7, p. 742-747, 2013.
- LINK, T. M.; VALENTIN-HANSEN, P.; BRENNAN, R. G. Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. **PNAS**, v. 106, n. 46, p. 19292-19297, 2009.
- LIU, W. B.; SHI, Y.; YAO, L. L.; ZHOU, Y.; YE, BC. Prediction and characterization of small non-coding RNAs related to secondary metabolites in *saccharopolyspora erythraea*. **Plos one**. v. 8, n. 11, p. e80676, 2013.
- LIVNY, J.; BRENCIC, A.; LORY, S.; WALDOR, M. K. Identification of Pseudomonas aeruginosa sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2. **Nucleic Acids Res.** v. 34, p. 3484-3493, 2006.
- LIVNY, J.; TEONADI, H.; LIVNY, M.; WALDOR, M. K. High-Throughput, Kingdom wide prediction and annotation of bacterial non-coding RNAs. **PLoS One** v. 3, n. 9, p. e3197, 2008.
- LOH, E.; DUSSURGET, O.; GRIPENLAND, J.; VAITKEVICIUS, K.; TIENSUU, T.; MANDIN, P.; REPOILA, F.; BUCHRIESER, C.; COSSART, P.; JOHANSSON, J. A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 770-9, 2009.
- LORENZ, R.; BERNHART, S. H.; HÖNER, ZU.; SIEDERDISSEN, C.; TAFER, H.; FLAMM, C.; STADLER, P. F.; HOFACKER, I. L. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms. Mol. Biol.**, v. 6, n. 26, 2011.
- MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1843-1845, 2008.
- MASSÉ, E.; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 7, p. 4620-4625, 2002.
- MASSÉ, E.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 6, p. 120-124, 2003.
- MCDANIEL, B. A.; GRUNDY, F.J.; ARTSIMOVITCH, I.; HENKIN, T. M. Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 6, p. 3083-3038, 2003.
- MIRONOV, A. S.; GUSAROV, I.; RAFIKOV, R.; LOPEZ, L. E.; SHATALIN, K.; KRENEVA, R. A.; PERUMOV, D. A.; NUDLER, E. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. **Cell**, v. 11, n. 5, p. 747-756, 2002.
- OLIVA, G.; SAHR, T.; BUCHRIESER, C. Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: impact on metabolism and virulence. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 39, n. 3, p. 331-49, 2015.
- PENG, X.; DONG, H.; WU, Q. A new *cis-encoded* sRNA, BsrH, regulating the expression of hemH gene in *Brucella abortus* 2308. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 362, n. 2, p. 1-7, 2015.
- PICHON, C.; FELDEN, B. Intergenic sequence inspector: searching and identifying bacterial RNAs.

Bioinformatics, v. 19, p. 1707–1709, 2003.

PICHON, C.; FELDEN, B. Proteins that interact with bacterial small RNA regulators. **Fems. Microbiol. Rev**, v. 31, p. 614-625, 2007.

PICHON, C.; MERLE, L. D.; CALIOT, M. E.; TRIEU-CUOT, P.; BOUGUÉNEC, C. L. An in silico model for identification of small RNAs in whole bacterial genomes: characterization of antisense RNAs in pathogenic *Escherichia coli* and *Streptococcus agalactiae* strains. **Nucleic. Acids. Research**, v. 40, n. 7, 2012.

PFEIFFER, V.; PAPPENFORTH, K.; LUCCHINI, S.; HINTON, J. C.; VOGEL, J. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. **Nat. Struct. Mol. Biol**, v. 16, n. 8, p. 840-846, 2009.

REPOILA, F.; DARFEUILLE, F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects, **Biol Cell**, v. 101, n. 2, p. 117-131, 2009.

RICHARDS, J.; BELASCO, J. G. A new window onto translational repression by bacterial sRNAs. **Mol. Cell**, v. 32, n. 6, p. 751-753, 2008.

RICHARDS, G. R.; VANDERPOOL, C. K. Molecular call and response: the physiology of bacterial small RNAs. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1809, n. 10, p. 525-31, 2011.

RIVAS E., KLEIN R. J., JONES T. A., EDDY S. R. Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. **Curr. Biol**, v. 11 n. 17 p. 1369, 2001.

ROSSI, C. C.; BOSSÉ, J. T.; LI, Y.; WITNEY, A. A.; GOULD, K. A.; LANGFORD, P. R.; BAZZOLLI, D. M. A computational strategy for the search of regulatory small RNAs in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **RNA**, v. 22, n. 9, p. 1373-1385, 2016.

SAHR, T.; BRÜGGEMANN, H.; JULES, M.; LOMMA, M.; ALBERT-WEISSENBERGER, C.; CAZALET, C.; BUCHRIESER, C. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. **Mol. Microbiol**, v. 72, n. 3, p. 741-762, 2009.

SCHROEDER, C. L. C., NARRA, H. P., ROJAS, M., SAHNI, A., PATEL, J., KHANIPOV, K., WOOD, T. G., FOFANOV, Y., SAHNI, S. K. Bacterial small RNAs in the Genus *Rickettsia*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1075, 2015.

SCHROEDER, C. L.; NARRA, H. P.; SAHNI, A.; ROJAS, M.; KHANIPOV, K.; PATEL, J.; SHAH, R.; FOFANOV, Y.; SAHNI, S. K. Identification and Characterization of Novel Small RNAs in *Rickettsia prowazekii*. **Front. Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 859, 2016.

SHARMA, C. M., VOGEL, J. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 12, n. 5, p. 536-546, 2009.

SHINHARA, A., MATSUI, M., HIRAOKA, K., NOMURA, W., HIRANO, R., NAKAHIGASHI, K., TOMITA, M., MORI, H., KANAI, A. Deep sequencing reveals as-yet-undiscovered small RNAs in *Escherichia coli*. **BMC. Genomics**, v. 12, n. 428, p. 1471-2164, 2011.

SOPER, T.; MANDIN, P.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S.; WOODSON, S. A. Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 107, n. 21, p. 9602-9607, 2010.

STORZ G.; ALTUVIA, S.; WASSARMAN, K. M. An abundance of RNA regulators. **Annu. Rev. Biochem**, v. 74, p. 199-217, 2005.

STORZ, G.; VOGEL, J.; WASSARMAN, K. M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. **Mol. Cell**, v. 43, n. 6, p. 880-891, 2011.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTAS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE

Rosimeire Oenning da Silva

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Sinésio de Novaes Junior

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Meirielelem do Nascimento Serpa

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Italo Andrey Souza Inácio Lima

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

Raquel Aparecida Loss

Universidade do Estado de Mato Grosso Campus
Deputado Estadual Renê Barbour Faculdade de
Arquitetura e Engenharia Barra do Bugres MT

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de leveduras isoladas de frutas para fermentar xilose a etanol. Foram testadas 23 cepas de leveduras isoladas de frutas em relação a sua capacidade de fermentação a partir de diferentes substratos (xilose, glicose, maltose, sacarose e lactose), utilizando o caldo carboidrato vermelho de fenol. As leveduras que apresentaram resultado positivo para a xilose, foram submetidas a cinética de fermentação

alcoólica, sendo acompanhado o consumo de substrato, viabilidade celular e produção de etanol. As cepas que apresentaram a produção de etanol em meio sintético foram submetidas a fermentação empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de cana de açúcar como meio de cultivo. No teste de fermentação de carboidratos foram consideradas positivas os ensaios que apresentaram produção de ácido e de gás. A glicose e a sacarose foram os carboidratos com maior assimilação pelas leveduras avaliadas, sendo que ambos os carboidratos, 65% das leveduras avaliadas foram capazes de produzir tanto ácido quanto o gás. A xilose foi o terceiro carboidrato que obteve o maior percentual de positivos, sendo que 56% das leveduras apresentaram produção de ácido e de gás. Das 23 leveduras avaliadas, 7 foram submetidas a ensaios de fermentação alcoólica e 3 delas se destacaram na produção de etanol a partir de xilose, sendo elas a BB 146, BB 149 e BB169, com uma produção de álcool de $0,78 \pm 0,011$ g/L, $0,92 \pm 0,0008$ e $0,65 \pm 0,085$ g/L, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVES: Fermentação alcoólica; Cana de açúcar; Xilose.

EVALUATION OF FERMENTATIVE
POTENTIAL OF ISOLATED FRUIT YEAST
FOR THE PRODUCTION OF ETHANOL

ABSTRACT: This work aimed to evaluate the ability of isolated yeasts of fruits to ferment xylose to ethanol. Twenty-three strains of yeast isolated from fruits were tested for their fermentation capacity from different substrates (xylose, glucose, maltose, sucrose and lactose) using red phenol carbohydrate broth. The yeasts that showed positive results for xylose were submitted to alcoholic fermentation kinetics, followed by substrate consumption, cell viability and ethanol production. The yeasts that presented the ethanol production in synthetic medium were submitted to the fermentation using hemicellulosic hydrolyzate of sugar cane straw as culture medium. In the carbohydrate fermentation test, acid and gas production tests were considered positive. Glucose and sucrose were the carbohydrates with the highest assimilation by the evaluated yeasts, and both carbohydrates, 65% of the yeasts evaluated were able to produce both acid and gas. The xylose was the third carbohydrate that obtained the highest percentage of positives, and 56% of the yeasts presented acid and gas production. Of the 23 yeasts evaluated, 7 were submitted to alcoholic fermentation tests and 3 of them were highlighted in the production of ethanol from xylose, being BB 146, BB 149 and BB169, with an alcohol production of 0.78 ± 0.011 g / L, 0.92 ± 0.0008 and 0.65 ± 0.085 g / L, respectively. Keywords: Alcoholic fermentation; Sugar cane; Xylose.

KEYWORDS: Alcoholic fermentation; Sugar cane; Xylose.

1 | INTRODUÇÃO

No Brasil, o etanol é majoritariamente obtido pela fermentação usando matérias primas como o caldo e o melaço de cana de açúcar, empregando como micro-organismo fermentador a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, no cultivo e processamento da cana de açúcar também são gerados subprodutos como o bagaço e a palha, sendo estas, interessantes fontes de celulose e hemicelulose. A hemicelulose é um polímero de hexoses e pentoses, que quando hidrolisadas, a maior quantidade de açúcar liberado é a xilose (ZHANG et al., 2010). A produção do etanol de segunda geração utilizando a palha da cana de açúcar apresenta benefícios econômicos, uma vez que a palha que antes era queimada ou deixada no solo sem qualquer utilidade passa a gerar um aumento em torno de 30% na produção do etanol utilizando a mesma área de plantio, tendo custo zero e diminuindo o impacto ambiental. Além disso, a utilização da palha de cana de açúcar para produção de etanol pode contribuir para a redução do risco de incêndio e auxiliar no controle da proliferação de pragas e doenças causadas pelo excesso desse material no solo (GÓMEZ et al., 2010; TEODORO et al., 2011). Outro fator importante que merece destaque é o fato que tanto o cultivo de cana de açúcar quanto o seu beneficiamento pelas usinas produtoras de açúcar e álcool são atividades econômicas de grande impacto na cidade de Barra do Bugres, onde encontra-se a Instituição de Ensino executora do presente projeto de pesquisa. As leveduras utilizadas atualmente

na produção desse biocombustível são leveduras *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. No entanto, mesmo esse micro-organismo apresenta problemas no rendimento e eficiência fermentativa devido ao estresse no momento da fermentação. Para produzir etanol aproveitando a fração hemicelulósica da palha é necessária uma levedura com potencial de assimilar e fermentar esta pentose com bom rendimento fermentativo e resistência aos estresses do processo. Tendo em vista que, na natureza existe uma infinidade de cepas de leveduras ainda não estudadas que podem apresentar características favoráveis para tornar esse processo biotecnológico mais eficiente, justifica-se a importância da pesquisa voltada para a bioprospecção de leveduras consumidoras e fermentadoras de xilose (SANTOS et al., 2012). Dentro deste contexto, o presente trabalho objetiva avaliar o potencial fermentativo de leveduras isoladas de frutas em relação a sua capacidade de metabolizar a xilose para produção de etanol.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Para realização desta pesquisa foram previamente avaliadas 23 cepas de leveduras previamente isoladas de frutas e selecionadas pela capacidade de consumir e fermentar xilose em testes de tubos de ensaio com tubos de durhan. Desta foram selecionadas sete BB146, BB149 e BB169 BB147, BB157, BB158 e BB159 para o desenvolvimento da presente pesquisa. Estas cepas foram armazenadas em tubos com YEPD inclinados, preservados pela técnica de Castellani (CASTELLANI, 1939) no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Mato Grosso - Campus de Barra do Bugres.

2.2 Fermentação em meio sintético

Para avaliar a capacidade das cepas, selecionadas na etapa anterior, em produzir etanol a partir de xilose as leveduras foram pré-cultivadas em meio YEPX 2%, em frascos erlenmeyer de 125 mL, a temperatura de 30°C e agitação de 180 rpm, por 24 a 48 horas. Após esse período, alíquotas foram centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de células será inoculado a uma, (concentração celular inicial de aproximadamente $1,0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) em 25 ml do meio YEPD 7% com pH corrigido para 4,0 utilizando-se frascos erlenmeyers de 125 ml fechados com válvula própria para fermentação.

A fermentação foi realizada durante 72 horas sob agitação de 100 rpm em temperatura de 30°C. Para efeitos de comparação, a fermentação também foi conduzida utilizando meio contendo glicose como fonte de carbono. As amostras foram retiradas a cada 24 horas. Os parâmetros avaliados na fermentação foi: consumo

de substrato, produção de etanol e viabilidade celular. A partir dos resultados dessas análises, foram selecionadas as melhores cepas produtoras de etanol a partir da xilose para posterior fermentação em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi periodicamente acompanhada pelo método de coloração com azul de metileno descrito por Lee, Robinson e Wang (1981). Amostras de 200 μL foram transferidas para 200 μL da solução de azul de metileno e homogeneizadas. A contagem foi feita em câmara de Neubauer. As células viáveis ficaram incolores, enquanto as não viáveis, azuis.

2.3.2 Determinação das Concentrações de Etanol

Para a determinação de etanol, o mosto fermentado foi destilado em microdestilador de álcool (Tecnal, TE-012) e a concentração foi realizada por densidade em medidor de etanol (Density Meter, DMA 4500M). Os resultados foram expressos em $^{\circ}\text{GL}$ (Gay-Lussac).

2.3.3 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis Totais

O método de determinação de sólidos solúveis foi efetuado com refratômetro de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.4 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica calculados foram produtividade (g/L.h), rendimento (%) e eficiência da fermentação (%) utilizando as Equações de 1 a 3 (Tessaro et al., 2010)

$$\text{Produtividade } \left(\frac{\text{g}}{\text{L.h}} \right) = \frac{\text{etanol produzido } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{\text{tempo (h)}} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Rendimento } Y = P/C = \frac{\text{Etanol produzido (g/L)}}{\text{Açúcar consumido (g/L)}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Etanol produzido (g/L)}}{\text{Etanol teórico (g/L)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fermentação em meio sintético

As cepas selecionadas em etapas anteriores foram BB146, BB149 e BB169 BB147, BB157, BB158 e BB159. Estas foram submetidas a fermentação com meio sintético usando xilose como fonte de carbono. Como controle, as mesmas cepas foram incubadas em meio contendo glicose. A Figura 1 apresenta consumo de substrato e a viabilidade celular na fermentação alcoólica para as diferentes leveduras avaliadas.

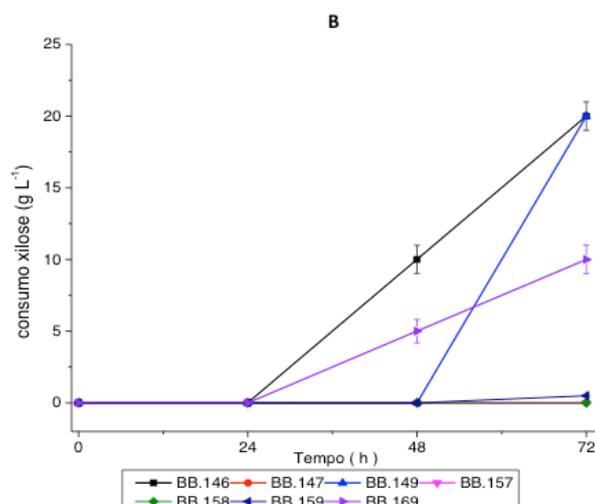
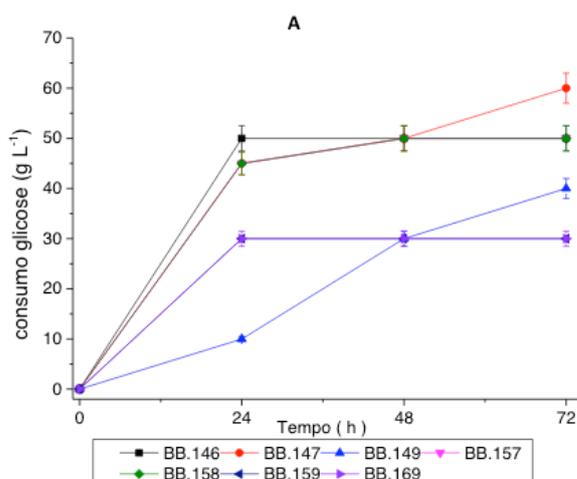
Na Figura 1 A, pode-se observar que as sete leveduras avaliadas foram capazes de metabolizar a glicose. Porém, cinco dessas leveduras se destacaram no consumo de glicose, sendo elas a BB 146, BB 147, BB 149, BB 158 e BB 169. Já na Figura 1B, observa-se que apenas três leveduras foram capazes de metabolizar a xilose (BB 146, BB 149 e a BB 169), sendo que as leveduras BB 146 e BB149 foram as que mais consumiram a xilose.

Em relação a viabilidade celular (Figura 1 C e D), a BB 147 foi a que mais consumiu glicose e apresentou boa estabilidade celular. Porém, está levedura não foi capaz de consumir a xilose. A levedura BB149 apresentou uma redução na viabilidade celular após 24 h de fermentação, quando a glicose foi usada como fonte de carbono. No entanto, quando a fonte de carbono foi a xilose esta levedura apresentou uma elevada viabilidade celular. Já a levedura BB 157 apresentou um declínio na viabilidade celular para ambas as fontes de carbono utilizadas. As leveduras BB 146, BB158, BB159 e BB169 apresentaram uma elevação na viabilidade celular, sendo que a levedura BB146 apresentou a mesma viabilidade celular em ambas as fontes de carbono. Já para levedura BB169 a xilose contribuiu para uma maior viabilidade celular, enquanto que a glicose foi melhor para as leveduras BB158 e BB159.

A viabilidade celular representa a relação entre células vivas e total de células, de maneira que representa o percentual de levedura que está consumindo o açúcar, e fermentando para a produção de etanol (NOBRE, 2005). Alguns fatores podem influenciar na sensibilidade da levedura ao etanol, como temperatura, aeração e composição do meio de cultivo. Segundo Veloso, Rodrigues e ColliBadino Júnior (2018), em concentrações acima de 40 g/L, o etanol pode afetar o metabolismo celular, diminuindo a velocidade de formação de produto, podendo inibir completamente o crescimento das leveduras quando são atingidas concentrações em torno de 95 g/L. Além disso, o efeito tóxico do etanol é acentuado em elevadas temperaturas devido ao aumento da fluidez da membrana celular, que tem como consequência o transporte de substâncias tóxicas para o interior da levedura, levando a elevados percentuais de inviabilidade celular. Desta forma, as baixas concentrações de etanol e obtidas no presente estudo e a temperatura relativamente baixa (30°C) usadas nos ensaios de fermentação podem justificar os elevados percentuais de viabilidade celular, visto que

a concentração de compostos tóxicos presentes no meio provavelmente era baixa. Na Figura 2, é possível observar o consumo da levedura BB146 em relação a xilose e glicose, sendo que o consumo de glicose foi maior que xilose. O consumo de xilose resultou em uma produção de álcool para ambos os substratos, com uma produção de $10,30 \pm 1,011$ e $0,78 \pm 0,011$ g/L de etanol para a glicose e xilose, respectivamente. Em relação a viabilidade celular, observa-se que a levedura apresentou viabilidade celular maior quando a xilose foi empregada como fonte de carbono.

Na Figura 3, é possível observar o consumo da levedura BB149 em relação a xilose e glicose, sendo que o consumo de glicose também foi maior que xilose, como observado na levedura BB146. No entanto, a BB149, consumiu uma quantidade menor de substrato, tanto para a xilose quanto para a glicose, em comparação com a BB146. Desta forma, a quantidade de álcool produzida também foi menor, com uma produção de $0,70 \pm 0,007$ e $0,92 \pm 0,0008$ g/L de etanol para a glicose e xilose, respectivamente. Apesar do consumo de glicose ser maior que o de xilose, a concentração de álcool foi maior quando a xilose foi empregada como fonte de carbono. Isso pode ter ocorrido pela utilização da fonte de carbono para o crescimento de biomassa. Em relação a viabilidade celular, observa-se que a fonte de carbono não interferiu na viabilidade celular.



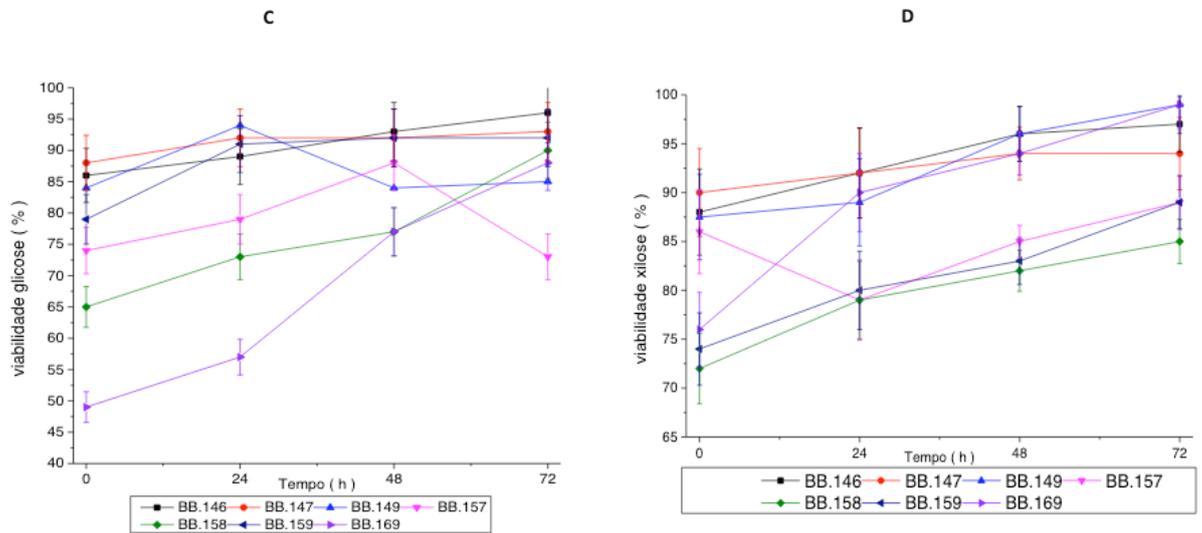


Figura 1 – Consumo de substrato e viabilidade celular na fermentação alcoólica empregando xilose e glicose como fontes de carbono e diferentes leveduras:

A) consumo de glicose; B) consumo de xilose; C) viabilidade celular empregando glicose e D) viabilidade celular empregando xilose

Desta forma, as leveduras BB 146, BB 149 e BB169, além de metabolizar a xilose, apresentaram uma elevada viabilidade celular, sendo selecionadas para a etapa posterior deste trabalho, sendo submetidas novamente a fermentação alcoólica usando meio sintético. As cinéticas foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados na Figura 2 a 4.

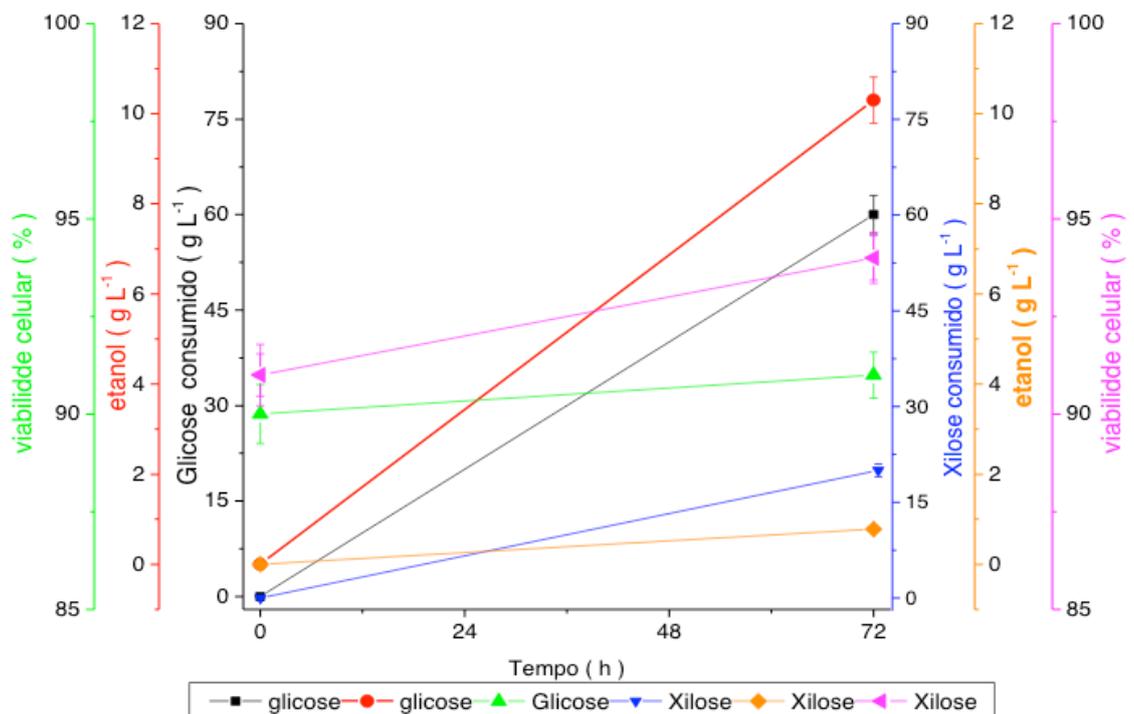


Figura 2 – Consumo, viabilidade celular e produção de etanol na fermentação alcoólica empregando xilose e glicose como fonte de carbono para a levedura BB 146

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

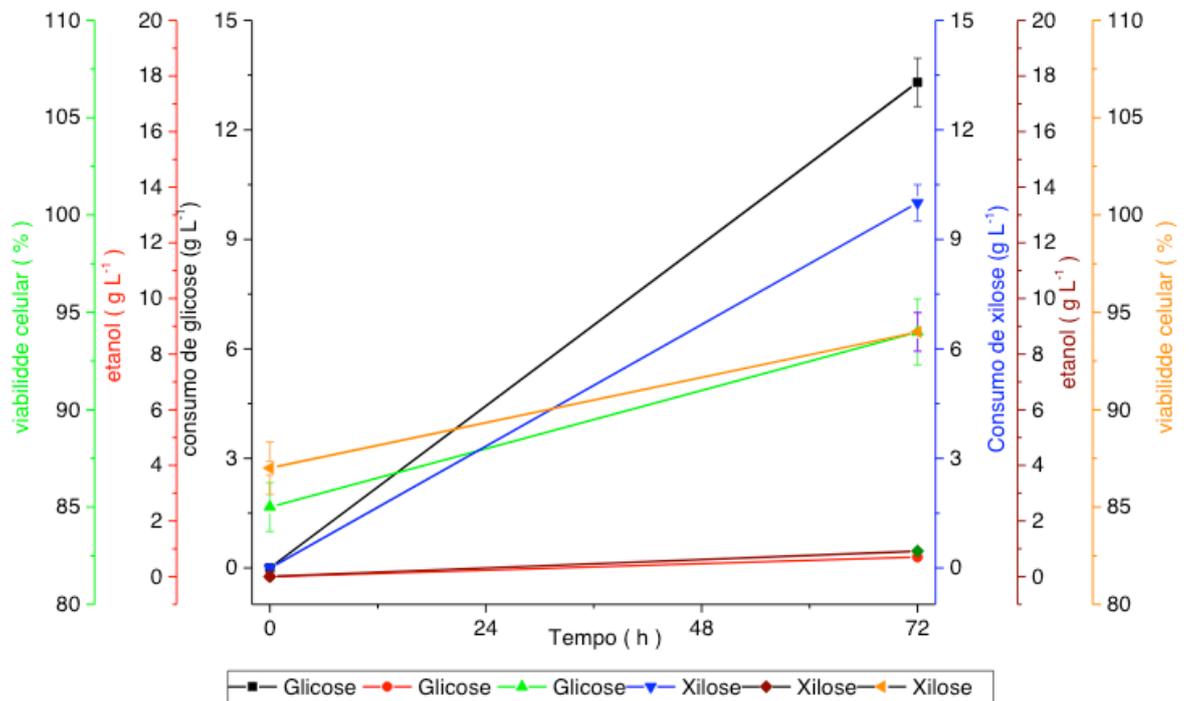


Figura 3 – Consumo, viabilidade celular e produção de etanol na fermentação alcoólica empregando xilose e glicose como fonte de carbono para a levedura BB 149

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Na Figura 4, é possível observar o consumo da levedura BB169 em relação a xilose e glicose, sendo que o consumo de glicose também foi maior que xilose, como observado nas leveduras BB146 e BB149. No entanto, a BB169, consumiu uma quantidade menor de substrato, tanto para a xilose quanto para a glicose, em comparação com a BB146 e maior em relação a BB149. Desta forma, a quantidade de álcool produzida também foi menor que a BB146 e maior que a BB149, com uma produção de $7,6 \pm 0,426$ e $0,65 \pm 0,085$ g/L de etanol para a glicose e xilose, respectivamente. Em relação a viabilidade celular, observa-se que a levedura apresentou viabilidade celular maior quando a xilose foi empregada como fonte de carbono.

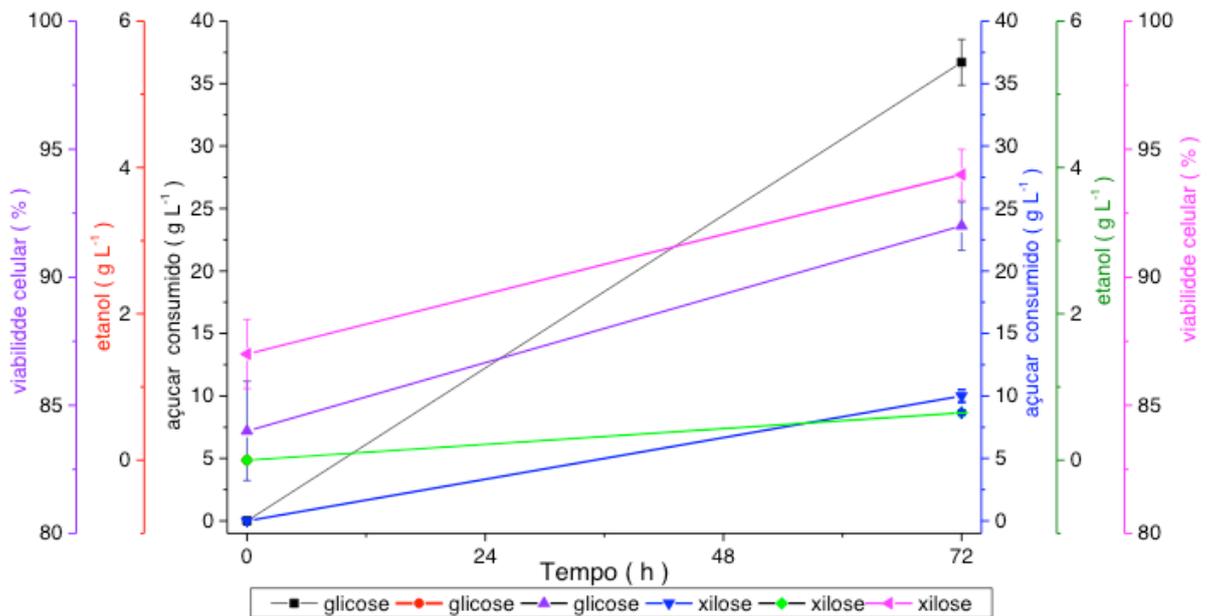


Figura 4 – Consumo, viabilidade celular e produção de etanol na fermentação alcoólica empregando xilose e glicose como fonte de carbono para a levedura BB 169

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Desta forma, as leveduras BB146, BB149 e BB169 podem ser consideradas potenciais micro-organismos para o processo biotecnológico de produção de etanol. As concentrações de etanol obtidas no presente estudo são semelhantes as reportadas na literatura científica. Silva et al. (2015), avaliaram a fermentação em meio de cultura com xilose empregando as leveduras *Starmerella meliponinorum* e *Schizosaccharomyces pombe* e obtiveram 0,63 e 2,7 g L⁻¹ de etanol, respectivamente. No mesmo estudo, as cepas de leveduras *Wickerhamomyces anomalus* BB.10 e FRP.04 produziram 0,50 g/L. Silveira (2014) avaliou o potencial fermentativo de 43 leveduras e verificou que apenas 5 cepas foram capazes de fermentar a xilose a etanol, com uma produção de etanol variando de 0,13 a 0,36 g/L. Martins (2011) avaliou 25 cepas de leveduras isoladas de flores e frutas e observou que apesar de todas elas assimilarem a xilose em aerobiose (formação de biomassa), apenas 4 leveduras fermentaram a xilose a etanol, com concentrações variando de 0,63 a 1,9 g/L de etanol.

3.2 Parâmetros cinético da fermentação em meio sintético

A Figura 5 apresenta os parâmetros cinéticos de produtividade, rendimento e eficiência na fermentação alcóolica, empregando xilose e glicose como fonte de carbono e as leveduras BB146, BB149 e BB169.

Pela Figura 5 é possível observar que a levedura BB 149 apresentou uma maior eficiência quando a xilose foi usada como fonte de carbono no processo fermentativo, enquanto para as demais leveduras e eficiência foi maior para a glicose. Esta diferença pode estar relacionada com a maior produção de etanol a

partir de xilose apresentada pela levedura BB149. Em relação ao rendimento, para as leveduras BB 146 e BB169, a fonte de carbono na fermentação não interferiu nesse parâmetro cinético. Já para a BB149, a xilose apresentou um maior rendimento quando comparada com a glicose. A fonte de carbono não interferiu na produtividade volumétrica para as 3 leveduras avaliadas.

Os parâmetros cinéticos são semelhantes aos reportados na literatura. Martins (2011) obteve um rendimento em conversão de etanol a partir de glicose variando de 0,09 até 0,17 g de etanol/g de xilose consumida, para 4 linhagens de leveduras selvagens isolada de flores e frutos.

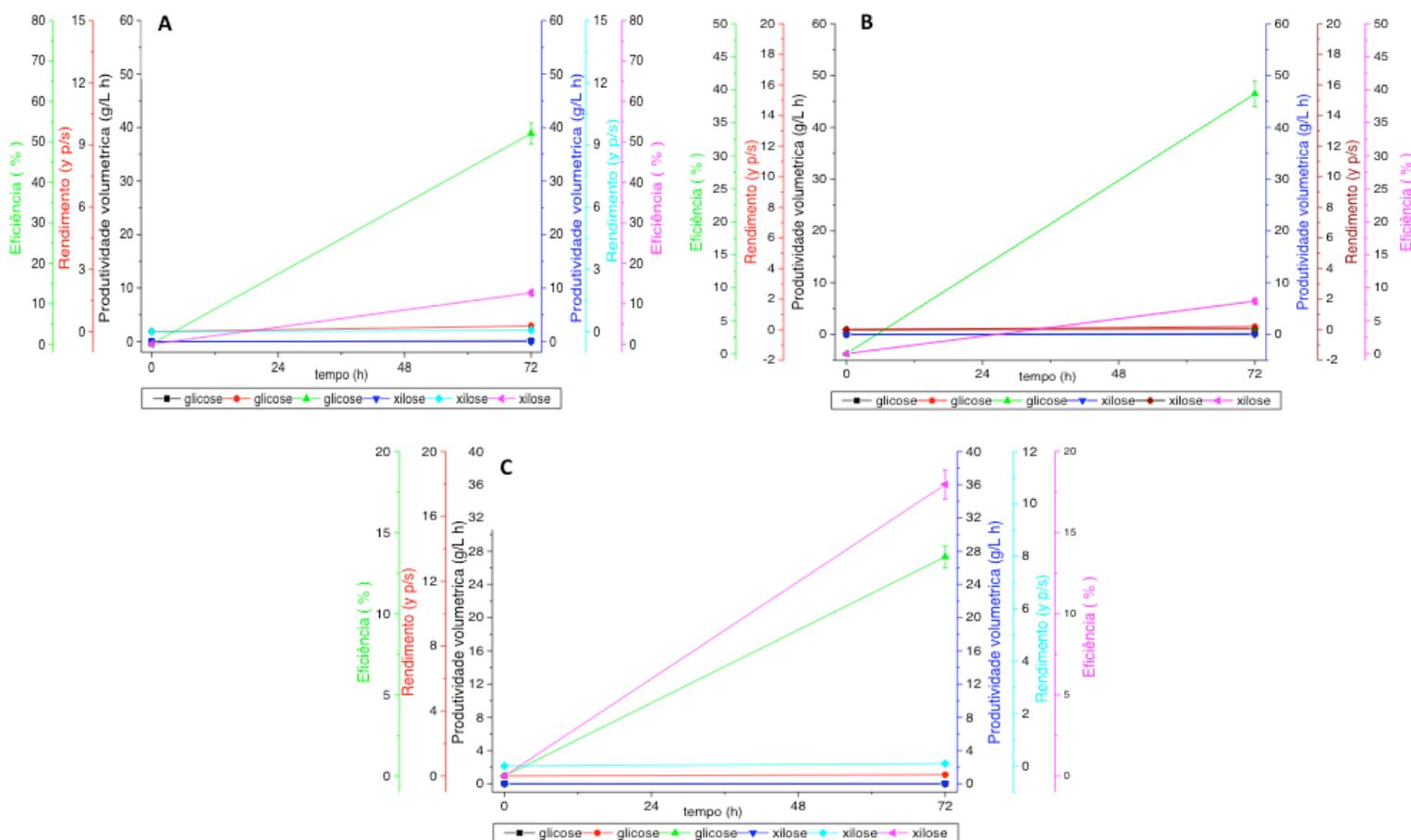


Figura 5 - Parâmetros cinéticos de produtividade, rendimento e eficiência na fermentação alcoólica empregando xilose e glicose como fonte de carbono e as leveduras A) BB146, B) BB169 C) BB149

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

4 | CONCLUSÃO

Nos ensaios de fermentação alcoólica as leveduras BB 146, BB149 e BB169 apresentaram potencial para serem utilizadas na produção de etanol, sendo que as BB149 foi a que produziu maior concentração de etanol e a BB 169 a menor concentração.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.A. **Seleção de linhagens de leveduras fermentadoras de xilose para produção de etanol.** (2012). Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Palmas. 2012.
- CASTELLANIA . **Viability of some pathogenic fungi in distilled water.** Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 42, p. 225-226, 1939.
- DOS SANTOS, D.S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica.** Tese de doutorado. (Doutorado em *Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos*). Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012
- FADDIN, J. F. M. **Biochemical test for identification of medical bacteria.** Lippincott Williams & Wilkins, 912 p. 2000.
- FONSECA, C.; ROMÃO, R.; DE SOUSA, H. R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; SPENCERMARTINS, I. (2007). **L-Arabinose transport and catabolism in yeast.** FEBS Journal, v.274,p. 3589–3600, 2007.
- FORTES, F. B. B. **Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020. 2008.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. **Rapid determination of yeast viability.** *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v.11, n.1, p. 641-649, 1981.
- LENNETTE, Edwin H. **Manual of clinical microbiology** . 4. ed. United States: D. C. Washington., 1985. 1149 p.
- MARTINS, Gisele Marta. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose** / Gisele Marta Martins. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
- NASCIMENTO, N. G. S.; CARREIRO, S.C. **Estudo da fermentação de xilose em leveduras isoladas de substratos vegetais.** PIBIC/CNPq. Palmas-TO, 2012.
- NOBRE, T. de P. . **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica.** Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2005.
- PING, L.Y., PANOCEA, F.C. **Seleção de leveduras que metabolizam pentoses screening of pentose-fermenting yeasts,** Universidade Estadual de São Paulo – Campus de Rio Claro – PIBIC/ CNPq. 2009/2010.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** 2012.
- SILVA, Rosimeire Oenning da. **Bioprospecção de leveduras fermentadoras de xilose visando a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.
- SILVEIRA, Fernando Augusto da, 19-S 586s **2014 Seleção de leveduras fermentadoras de xilose e análise do exometaboloma de *Meyerozyma guilliermondii*, UFV-1.** / Fernando Augusto da Silveira. – Viçosa, MG, 2014.

TEODORO, J. C.; ANDRADE, L. P.; GODOY NETO, O.; RAMOS, L. P.; KNUDSEN, B. R.; GALVÃO, C. M. A.; **Aproveitamento de Bagaço e Palha de Cana-deAçúcar para Produção de Etanol Celulósico a partir de Fermentações em Batelada Alimentada**, XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul,RS, 2011.

TESSARO, D.; LARSEN A. C.; DALLAGO R. C.; DAMASCENO S. G.; SENE L.; VELOSO, I. I.; RODRIGUES, K. C. da S.; COLLIBADINO JUNIOR, A. **Avaliação da viabilidade celular na fermentação alcoólica em diferentes temperaturas**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Dissertação de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Araraquara-SP, 2018.

ZHANG, L.; ZHAO H.; GAN M.; JIN Y.; GAO X.; CHEN Q.; GUAN J.; WANG Z. **Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales**. Bioresource Technology, v. 102, p. 4573-4579, 2011.

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico. Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro. Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Alimentos 13, 119, 120, 124, 154, 180, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 212

Allium sativum 14, 15, 16, 19, 20, 21

Análise 4, 12, 13, 21, 58, 59, 65, 68, 76, 80, 98, 99, 102, 105, 106, 107, 114, 116, 120, 143, 150, 168, 170, 173, 174, 175, 176, 177, 187, 189, 212, 214

Antibiograma 117, 118, 121, 122, 123, 149, 156, 159, 160

Antibióticos 14, 16, 19, 20, 97, 108, 110, 119, 124, 125, 128, 129, 130, 132, 133, 141, 142, 146, 149, 150, 151, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 163, 164, 166, 197

B

Bactérias 1, 4, 5, 7, 8, 14, 16, 17, 18, 19, 108, 109, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 130, 132, 141, 142, 144, 148, 154, 155, 157, 158, 160, 161, 162, 180, 184, 185, 186, 188, 195, 198, 212

Bacteroides 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 125

Biofilme 71, 118, 122, 124, 125, 127, 131, 132, 133, 134

Bioindicador 7, 8, 98, 107

Bioinformática 55, 57, 65, 214

Bovinos 112, 113, 114, 116, 161, 162, 168, 169, 178

C

Candida 68, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81

Candidemia 68, 69, 74, 75, 76, 77, 80, 81

Carbapenêmicos 108, 109, 149, 159

Cloranfenicol 14, 16, 17, 18

Contaminação biológica 1

D

Dengue 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 35, 36, 37, 38, 57

Diagnóstico molecular diferencial 168

E

Enterococcus 8, 82, 83, 85, 86, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 117, 118, 122

Epidemiologia 53, 68, 80, 152

Epítomos imunodominantes 55, 57, 59, 61, 64

Escherichia coli 1, 2, 4, 8, 12, 14, 15, 16, 19, 20, 46, 61, 77, 97, 109, 122, 140, 141, 143, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 164, 165, 166, 198, 199, 200, 201, 212

F

Fasciolose 112, 113, 116

G

Genética molecular 153

I

Infecção 23, 45, 56, 57, 68, 70, 71, 72, 75, 76, 78, 80, 108, 111, 115, 126, 127, 128, 131, 132, 133, 142, 149, 154, 169, 174

Infecção intra-abdominal 45

L

Laboratórios 1, 3, 9, 11, 16, 174, 178

Líquén 98, 100, 102, 107

M

Microbiologia 44, 55, 68, 76, 82, 102, 107, 117, 120, 125, 151, 152, 153, 167, 187, 204, 214

Microrganismos patogênicos 1, 2, 11, 12

Modelo murino 23

O

Oportunista 68, 70, 126, 127

P

Parabacteroides 44, 45, 46, 47

Peptídeos 44, 55, 57, 59, 122, 124, 131, 132

Poluição 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105, 106

Proteínas recombinantes 55, 64, 65

Pseudocowpoxvirus 168, 169, 178

Q

q-PCR 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178

Quatro tamises 112, 113, 114, 116

R

Resistência 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 68, 70, 71, 74, 80, 97, 108, 109, 110, 119, 121, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 140, 141, 142, 146, 147, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 189, 204

Resistência antimicrobiana 15, 131, 141, 160

Rotinas de higienização 1, 5, 9, 11, 12

Rotinas de Higienização 1, 6

S

Serviços de Saúde para Idosos 180

Sistema nervoso central 23

Staphylococcus aureus 8, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 117, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 139

Substância antagonista 44, 45

V

Validação 168, 170, 177, 178, 198

Z

Zika vírus 55, 58, 64, 65, 66

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-772-7



9 788572 477727