

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

DANIELA CRISTINA DE MACEDO VIEIRA

**PESQUISA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS EM MEDICAMENTOS TÓPICOS:
PADRONIZAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DE METODOLOGIAS
CONVENCIONAL E MOLECULAR**

Alfenas/MG
2007

DANIELA CRISTINA DE MACEDO VIEIRA

**PESQUISA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS EM MEDICAMENTOS TÓPICOS:
PADRONIZAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DE METODOLOGIAS
CONVENCIONAL E MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Alfenas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Avaliação Físico Química e Microbiológica de Fármacos e Medicamentos.
ORIENTADOR: Paulo Márcio de Faria e Silva

Alfenas/MG

2007

Daniela Cristina de Macedo Vieira

**PESQUISA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS EM MEDICAMENTOS TÓPICOS:
PADRONIZAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DE METODOLOGIAS
CONVENCIONAL E MOLECULAR**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Avaliação Físico Química e Microbiológica de Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

À minha filha Anna Carolina,

Você soube, como ninguém, compreender o tempo de ausência, de isolamento nas infindáveis horas de estudo, da atenção que não lhe foi dada devidamente! O mérito da minha vitória também é seu!

Aos meus pais José Luiz e Neide,

Vocês se fizeram presentes em todos os momentos firmes e trêmulos. A presença de vocês é qualquer coisa como a luz e a vida, e eu sinto que, em meu gesto existe o gesto de vocês e em minha voz a voz de vocês.

Muito obrigada!

Aos meus irmãos, José Luiz, Gustavo Alexandre, Danilo Henrique e Ana Beatriz, aos meus cunhados e sobrinhos, muito obrigada!

Do apoio de vocês nasceu a tranquilidade, a felicidade de ver meu sonho realizado!

Prof. Dr. Paulo Márcio

"Ser mestre não é apenas lecionar. Ensinar não é só transmitir a matéria. É também transmitir seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida, com dedicação e carinho. É ser instrutor e amigo, guia e companheiro." A você, Paulo, meu carinho e gratidão, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e por me apoiar nas dificuldades.

Prof^a. Dr^a. Magali,

"Grande é aquele que descobre seus próprios talentos; mas, gigante é o que sabe descobrir os talentos dos outros." Obrigada pelo incentivo, sempre!

Audrei, Evanusa, Marcilene, Roberta, Sirléia, Nereyda e Fran,

"Amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo do peito, dentro do coração!" O mais profundo agradecimento pelo quanto contribuíram para esta conquista.

Mateus, Eduardo, Gustavo e Luciene,

"Verdadeiros amigos são aqueles que estão a nosso lado quando coisas boas acontecem. Eles torcem pela gente e se alegram com nossas vitórias". Sem vocês isto não teria sido possível.

Prof^a. Dr^a Marília,

"Nada podes ensinar a um homem. Podes somente ajudá-lo a descobrir as coisas dentro de si mesmo." Muito obrigada!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este sucesso, muito obrigada!

O sucesso é construído à noite! Durante o dia você faz o que todos fazem.

Não conheço ninguém que conseguiu realizar seu sonho, sem sacrificar feriados e domingos pelo menos uma centena de vezes.

Da mesma forma, se você quiser construir uma relação amiga com seus filhos, terá que se dedicar a isso, superar o cansaço, arrumar tempo para ficar com eles, deixar de lado o orgulho e o comodismo.

Se quiser um casamento gratificante, terá que investir tempo, energia e sentimentos nesse objetivo.

O sucesso é construído de noite! Durante o dia você faz o que todos fazem. Mas, para obter um resultado diferente da maioria, você tem que ser especial. Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados.

NÃO SE COMPARES À MAIORIA, POIS INFELIZMENTE ELA NÃO É MODELO DE SUCESSO.

Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas. Terá que planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão.

Terá que trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina.

A realização de um sonho depende de dedicação.

Há muita gente que espera que o sonho se realize por mágica.

Mas toda mágica é ilusão.

A ilusão não tira ninguém de onde está.

Ilusão é combustível de perdedores.

"Quem quer fazer alguma coisa, encontre um meio. Quem não quer fazer nada, encontra uma desculpa".

RESUMO

Com a ampla disseminação da AIDS, uma grande gama de microrganismos tem aparecido como patógenos emergentes, causando importantes infecções em pacientes imunocomprometidos. Por exemplo, *Rhodococcus equi*, um agente incomum de infecções em humanos, tem sido isolado em pacientes imunocomprometidos. A presença deste microrganismo oportunista em produtos farmacêuticos não tem tido considerável atenção. No presente trabalho, o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi comparado com métodos convencionais para rápida detecção de três espécies bacterianas em amostras de cremes tópicos contaminadas artificialmente. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C. Depois da incubação em caldo com 10% de tween 20, amostras foram semeadas em meio para crescimento seletivo. Identificação bioquímica de *Bacillus cereus* e *Rhodococcus equi* foram feitas utilizando o sistemas de identificação API 20E® e API Coryne®, respectivamente. Para identificação de *Micrococcus luteus* foram utilizados os testes de catalase, oxidase, morfologias das colônias e o sistema Gram. O DNA foi extraído usando o método do fenol-clorofórmio. Os iniciadores utilizados contendo a seqüência específica foram para *B. cereus* (BC1 e BC2), *R. equi* (COX-F e COX-R) e para *M. luteus* (ML-ISR-R e ML-ISR-F) foram utilizados na reação de PCR. Para validação da metodologia molecular, as seqüências dos produtos de PCR foram determinadas e analisadas utilizando-se os programas Blastn e Blastx. Foi observado uma alta similaridade ($E \text{ value} \leq 0,0$) e uma alta identidade ($> 99\%$) para as bactérias utilizadas neste estudo. Os métodos convencional e de PCR detectaram *B. cereus*, *R. equi* e *M. luteus* em todas as amostras contaminadas artificialmente. O tempo para completar o método de PCR incluindo o preparo de amostras e a amplificação específica do DNA bacteriano foi de 27 horas. Para o método convencional foi necessário de 72 a 96 horas para o isolamento e identificação bioquímica dos microrganismos pesquisados. A rápida detecção de PCR para *B. cereus*, *R. equi* e *M. luteus* mostrada neste trabalho sugerem o uso desta metodologia em controle de qualidade microbiológica de produtos tópicos não estéreis, especialmente utilizados por pacientes imunocomprometidos.

Palavras - chave: PCR, imunocomprometidos, patógenos oportunistas, produtos tópicos não estéreis.

ABSTRACT

With the ample dissemination of the AIDS, a wide range microorganisms has blunted as emergent pathogens, causing important infection in immunocompromised patients. For example, *Rhodococcus equi*, an unusual cause of infection in humans, has been isolated from HIV-infected patients. The presence of these opportunistic microorganisms in pharmaceutical products has not received considerable attention. In the present work PCR assay were compared with standard microbiological methods for rapid detection of three bacterial species from artificially contaminated sample of topical creams. Artificially contaminated samples were incubated for 24 horas at 37° C. After incubation in broth with 10% tween 20, samples were streaked on selective growth media. Biochemical identification of *Bacillus cereus* and *R. equi* was performed using API 20E® and API Coryne® identification systems, respectively. For *Micrococcus luteus* identification, colony and Gram-stained morphology of the bacterium and the biochemical tests of catalase and oxidase were used. DNA was extracted using phenol-chloroform method. DNA primers containing the specific sequences of the BC1 and BC2 for *B. cereus*, COX-R and COX-F for *R. equi* and ML-ISR-F and ML-ISR-F for *M. luteus* were used for detection in the PCR reaction. In order to validate this methodology, DNA sequences of the products were determined. The sequences of the cloned PCR products were analysed using Blastn and Blastx programs. It was observed a marked similarity (E.value ≤ 0,0) and a high identity (> 99%) to the bacteria used in the study. Both the PCR and the standard enrichment tests method detected *B. cereus*, *R. equi* and *M. luteus* in all of the deliberately contaminated samples. The time to complete the PCR assay including sample preparation and PCR amplification of the specific DNA bacterial targets was 27 h. Standard plating methods required 72-96 h for the bacteria to be isolated, purified and biochemically identified. Rapid PCR detection of *B. cereus*, *R. equi* and *M. luteus* showed in this work suggests the use of this methodology in the microbiology control of non-sterile topical products, specially intended for use with immunocompromised patients.

Keyword: PCR, immunocompromised patients, opportunistic microorganisms, non-sterile topical products.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Curva de crescimento da amostra de *Bacillus cereus* ATCC 10987. 52
- Figura 2** - Curva de crescimento da amostra de *Micrococcus luteus* ATCC 9341. 52
- Figura 3** - Curva de crescimento da amostra de *Rhodococcus equi* ATCC 33701. 52
- Figura 4A** - Meio MYP com coloração rosada-púrpura, característica de *B. cereus*. 55
- Figura 4B** - Meio ágar sangue, apresentando colônias irregulares, arredondadas, semi-transparentes, brilhosas, com bordas cremosas, com coloração marrom-claro características de *R. equi*. 55
- Figura 4C** - Meio ágar nutriente com características de *M. luteus*, onde se observa colônias amarelas brilhantes. 55
- Figura 5A** - Identificação da amostra de *B. cereus* ATCC 10987 pelo kit API 20E[®]. 1: Kit sem contaminação, 2: Kit contaminado. 56
- Figura 5B** - Identificação da amostra de *R. equi* ATCC 33701 pelo kit API Coryne[®]. 1: Kit sem contaminação, 2: Kit contaminado. 56
- Figura 5C** - Identificação da amostra de *M. luteus* ATCC 9341 pela prova da oxidase. 56
- Figura 6** - Gel de agarose apresentando variação do método de extração para *M. luteus* ATCC 9341. 1. Marcador de 100 pb; 2: Método proposto por Bolano e colaboradores (2001); 3: Método do aquecimento proposto por Jimenez e colaboradores (1999); 4: Método convencional com fenol-clorofórmio. 58
- Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA extraído pelo método convencional, da cultura pura de *B. cereus* ATCC 10987. 1: λ Hind III; 2 e 3: *B. cereus*. 58
- Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA extraído pelo método convencional, da cultura pura de *M. luteus* ATCC 9341. 1: λ Hind III; 2 e 3: *M. luteus*. 59
- Figura 9** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA extraído pelo método convencional, da cultura pura de *R. equi* ATCC 33701. 1: λ Hind III; 2 e 3: *R. equi*. 59

- Figura 10** - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *B. cereus* ATCC 10987 em cultura pura. **1:** Marcador de 100 pb; **2 e 3:** Amostra de *B. cereus*; **4:** Branco da reação. 59
- Figura 11** - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *M. luteus* ATCC 9341 em cultura pura. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** Amostra de *M. luteus*; **3:** Branco da reação. 60
- Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *R. equi* ATCC 33701 em cultura pura. **1:** Marcador de 100 pb; **2 e 3:** Amostra de *R. equi*; **4:** Branco da reação. 60
- Figura 13** - Seleção das colônias transformadas com o vetor *pGem* previamente clonado com o produto de PCR. 62
- Figura 14** - Eletroforese em gel de agarose 2% do produto de PCR amplificado. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** Amostra de DNA de *B. cereus* ATCC 10987 em cultura pura; **3:** Produtos de PCR de cultura pura de *B. cereus*; **4:** Branco da reação. 62
- Figura 15** - Eletroforese em gel de agarose 2% do produto de PCR amplificado. **1:** Marcador de 100 pb; **2 e 3:** Produtos de PCR de cultura pura de *M. luteus*; **4:** Branco da reação. 62
- Figura 16** - Eletroforese em gel de agarose 2% do produto de PCR amplificado a partir do plasmídeo *Pgem* clonado. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** Controle positivo; **3:** Produtos de PCR de cultura pura de *R. equi*; **4:** Branco da reação. 63
- Figura 17** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA recuperado de ácido fusídico **(1)**; neomicina-bacitracina **(2)**; .aciclovir **(3)**; contaminado com *B. cereus* ATCC 10987 65
- Figura 18** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA recuperado de ácido fusídico **(1)**; neomicina-bacitracina **(2)**; .aciclovir **(3)**; contaminado com *M. luteus* ATCC 9341 66
- Figura 19** - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA recuperado de ácido fusídico **(1)**; neomicina-bacitracina **(2)**; .aciclovir **(3)**; contaminado com *R. equi* ATCC 33701 66
- Figura 20** - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *B. cereus* ATCC 10987, nos medicamentos contaminados propositalmente. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** ácido fusídico; **3:** neomicina-bacitracina; **4:** aciclovir; **5:** Branco da reação. 66
- Figura 21** - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *M. luteus* ATCC 9341, nos medicamentos contaminados propositalmente. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** ácido fusídico; **3:** neomicina-bacitracina; **4:** aciclovir; **5:** Branco da reação . 67
- Figura 22** - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *R. equi* ATCC 33701, nos medicamentos 67

contaminados propositalmente. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** ácido fusídico; **3:** neomicina-bacitracina; **4:** aciclovir; **5:** Branco da reação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças mais importantes relacionadas à AIDS.	21
Tabela 2 - Média da pesquisa de bactérias viáveis totais, feita em triplicata, encontradas em aciclovir, ácido fusídico e neomicina-bacitracina que não foram contaminados propositalmente, após incubação por 48 horas a 37°C, pela metodologia convencional.	50
Tabela 3 - Média do número de UFC de cada bactéria no tempo exponencial de crescimento.	53
Tabela 4 - Número de UFC de <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Rhodococcus equi</i> encontrado após plaqueamento de cultura pura encontrada no tempo zero de contaminação.	53
Tabela 5 - Média da recuperação de <i>B. cereus</i> , <i>M. luteus</i> e <i>R. equi</i> em aciclovir, ácido fusídico e neomicina-bacitracina após incubação por 48 horas a 37°C, realizada em triplicata.	53
Tabela 6 - Seqüências do banco de dados com alinhamento significativo, comparadas com seqüência de <i>B. cereus</i> , <i>M. luteus</i> e <i>R. equi</i> provenientes de cultura pura.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARVs	Anti-retrovirais
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
Cels	Células
cGMP	current Good Manufacturing Practice
FDA	Food Drug Administration
GMP	Good Manufacturing Practice
GP	Glicoproteína
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Simples Viral
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IO's	Infecções Oportunistas
ISO	International Standard Organization
JUNPA	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS

JIT	Just in Time
LB	Luria Bertani
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MPR	Material Requirements Planning
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NRTIs	Nucleosídeos Inibidores da Transcriptase Reversa
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPT	Optimized Production Tecnology
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDCA	plan, do, check, act
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	TRATAMENTO DA AIDS E DAS INFECÇÕES OPORTUNISTAS	24
2.2	MEDICAMENTOS TÓPICOS E CONTROLE DE INFECÇÕES SECUNDÁRIAS	26
2.3	CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS	28
2.4	CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS	31
3	PROPOSIÇÕES	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	MICROORGANISMOS	36
4.2	CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS MICROORGANISMOS	36
4.3	PRODUTOS FARMACÊUTICOS	37
4.4	CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS TOTAIS E PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS	37
4.5	PADRONIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL E MOLECULAR PARA A PESQUISA DE MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS	37
4.5.1	Determinação da Curva de Crescimento	38
4.5.2	Determinação do Inóculo Bacteriano	38
4.5.3	Enriquecimento e Contaminação Proposital dos Cremes	39
4.6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS NAS AMOSTRAS CONTAMINADAS PROPOSITALMENTE	39

4.7	PESQUISA DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS PELO MÉTODO MOLECULAR	40
4.7.1	Extração do DNA Genômico	41
4.7.2	Quantificação do DNA Genômico	42
4.7.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.7.4	Eletroforese do Produto de PCR	44
4.8	CERTIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DO PRODUTO DE PCR	44
4.8.1	Purificação de Produto de PCR a Partir de Gel de Agarose	44
4.8.2	Clonagem do Produto de PCR	45
4.8.3	Preparo de Células Quimiocompetentes	46
4.8.4	Transformação das Células Competentes com Vetor Clonado	46
4.8.5	Seleção das Colônias Transformadas	47
4.8.6	Extração dos Plasmídeos	47
4.8.7	PCR de Inseto	48
4.8.8	Seqüenciamento dos Plasmídeos	48
4.8.9	Análise das Seqüências Obtidas	49
4.9	AVALIAÇÃO DOS CREMES EM EMBALAGEM ORIGINAL	49
5	RESULTADOS	50
5.1	PADRONIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL E MOLECULAR PARA A PESQUISA DE MICRORGANISMOS OPORTUNISTAS	50
5.1.1	Determinação do Inóculo Bacteriano	51
5.1.2	Enriquecimento e Contaminação Proposital dos Cremes	51
5.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS NAS AMOSTRAS CONTAMINADAS PROPOSITALMENTE	54
5.3	VARIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO DNA DAS BACTÉRIAS OPORTUNISTAS	57
5.4	PESQUISA DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS PELO MÉTODO MOLECULAR	57

5.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase	57
5.4.1.1	CERTIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DO PRODUTO DE PCR	61
5.4.1.2	TRANSFORMAÇÃO	61
5.4.1.3	PCR DE INSERTO	61
5.4.1.4	ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS	63
6	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR NOS PRODUTOS CONTAMINADOS PROPOSITAMENTE	65
7	PESQUISA DOS MICROORGANISMOS NOS CREMES EM EMBALAGEM ORIGINAL	68
8	DISCUSSÃO	69
9	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), considerada atualmente uma grande pandemia, é a manifestação clínica avançada da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

O HIV dirige seu ataque contra os linfócitos T CD4⁺ e os macrófagos, destruindo-os. Deste modo, ocorre o comprometimento dos mecanismos de defesa do organismo humano, provocando a perda da imunidade e permitindo o aparecimento de várias infecções oportunistas.

Infecções oportunistas são aquelas que se desenvolvem em decorrência de uma deficiência imunitária do hospedeiro. São geralmente de origem infecciosa, porém várias neoplasias podem também ser consideradas oportunistas. As infecções oportunistas podem ser causadas por microrganismos que, usualmente, são considerados não patogênicos, ou seja, aqueles que não são capazes de desencadear doença em pessoas com sistema imune funcionando normalmente.

Várias são as infecções oportunistas associadas à AIDS, podendo ser causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos.

O acompanhamento médico e os tratamentos anti-HIV (coquetéis) têm por finalidade impedir o desenvolvimento do vírus, evitando o enfraquecimento do sistema imunitário e diminuindo as chances de desenvolvimento de infecções oportunistas, permitindo assim, que a pessoa conserve boa saúde. Atualmente são empregados no tratamento de pacientes imunocomprometidos uma grande variedade de medicamentos, incluindo os anti-retrovirais (ARVs), que combatem o HIV. Além destes, medicamentos tópicos têm sido também regularmente empregados em pacientes

infectados com o HIV, visando o tratamento de infecções secundárias que tem como etiologia principal microrganismos considerados oportunistas.

O Controle de Qualidade é fundamental na Indústria Farmacêutica. Busca-se com a sua aplicação garantir que as características essenciais de qualidade, esperadas pelo consumidor, tais como eficácia terapêutica, funcional, cosmética, além da segurança, estejam presentes em todos os produtos (GIL, 2007).

O Controle Microbiológico de fármacos e medicamentos fundamenta-se na análise quantitativa e qualitativa dos produtos. A análise qualitativa rotineiramente empregada preconiza a pesquisa de bactérias patogênicas. Pouca atenção é dada à possível presença de microrganismos oportunistas em produtos farmacêuticos. Além disso, os métodos clássicos usados na pesquisa e identificação de patógenos baseiam-se em testes bioquímicos que, de modo geral, são testes complexos e demorados. O surgimento das técnicas de biologia molecular permite atualmente a identificação mais precisa e rápida de microrganismos. Contudo, para sua correta aplicação no controle de qualidade de medicamentos é indispensável a definição de parâmetros e padrões a serem avaliados segundo os diferentes tipos de medicamentos.

Para tanto, o diagnóstico baseado em metodologia molecular deve ser avaliado em relação aos métodos tradicionais antes de ser utilizado na rotina de laboratórios de controle de qualidade. A importância deste fato se deve à tendência mundial em aceitar esses métodos.

Para validação da metodologia foi aplicado o seqüenciamento do DNA obtido através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) através do BLAST, que busca seqüências similares em bancos de dados de seqüências, sendo que suas implementações mais conhecidas são a do NCBI – National Center for Biotechnology Information e o da University of Washington, conhecido como WU-BLAST.

Assim, buscou-se nesse trabalho a avaliação da presença de patógenos emergentes em medicamentos tópicos usualmente empregados em pacientes imunocomprometidos. Para tanto, foi proposto e padronizado método baseado em técnicas de biologia molecular como ferramenta analítica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi descoberto no início da década de 80. Atualmente, são conhecidos dois sub-tipos do vírus, o HIV-1 e o HIV-2. Trabalhos recentes sugerem que estes vírus passaram a infectar o homem há poucas décadas, provavelmente entre os anos 40 e 50 (www.abcd aids.com.br).

A organização Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (JUNPA) estima que, aproximadamente, 40 milhões de pessoas estão vivendo com o HIV/AIDS hoje e que 92,5% delas, são adultos, enquanto o restante são crianças abaixo de 15 anos de idade (ONYANCHA; OCHOLLA, 2005).

Na superfície de linfócitos T CD4⁺ humanos encontram-se glicoproteínas, dentre elas a glicoproteína de 120 kD (GP 120) que serve como molécula receptora para o vírus HIV. Utilizando esse receptor, o vírus penetra nessa célula e em seu interior se multiplica (geração de novas partículas virais), podendo levar à destruição destes linfócitos (SANTOS et al., 2002).

O estudo do funcionamento do Sistema Imune mostra que os linfócitos T CD4⁺ representam elemento central no desenvolvimento da resposta imune humoral e celular (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O organismo reage à infecção pelo vírus, produzindo anticorpos anti-HIV e fabricando mais linfócitos T CD4⁺. Em geral, o sistema imunitário continua a funcionar bem durante vários anos após a infecção pelo HIV. Nessa fase chamada de "assintomática" a pessoa não apresenta nenhum sinal visível da doença. Entretanto, no decorrer desse período, o vírus se multiplica muito intensamente e um grande número de linfócitos T CD4⁺ é destruído a cada dia. A relação entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

é rotineiramente utilizada para acompanhar a evolução da doença, sendo que quanto menor o número de T CD4⁺, pior é o prognóstico (MATTOS et al., 2004).

A diminuição de células de defesa implica na conseqüente diminuição da capacidade do organismo em responder aos diversos agentes nocivos ao organismo. Como conseqüência, o indivíduo passa a apresentar, caracteristicamente, sinais das primeiras manifestações de imunodeficiência, as infecções oportunistas (IO's). Mais adiante, com o grande espalhamento das IO's, o corpo enfraquece e a situação evolui para a morte (MATTOS et al., 2004).

O início dos anos 80 mostrou claramente o aumento da ocorrência de diversas infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. As doenças são geralmente de origem infecciosa, porém várias neoplasias podem também ser consideradas oportunistas (ONYANCHA; OCHOLLA, 2005).

Infecções oportunistas são causadas por microrganismos como vírus ou bactérias que em circunstâncias normais não causariam problemas à saúde das pessoas (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2003; West Penn Allerheny Health System for Patients and Public Health, 2003).

Segundo Trevejo (2005), as infecções oportunistas mais freqüentes são:

- ➔ a pneumonia por *Pneumocystis carinii* que afeta de 70-80% dos portadores;
- ➔ as infecções da boca e da garganta causadas por fungos, tais como *Candida albicans*, que em mulheres pode também causar infecções vaginais;
- ➔ as infecções do fígado, dos pulmões e da medula óssea pelo *Mycobacterium avium*;
- ➔ abscessos cerebrais e encefalopatia devidos à infecção pelo *Toxoplasma gondii*, que também pode afetar os olhos, pulmões e o tecido nervoso;
- ➔ infecções pelo *Cytomegalovirus* podendo causar colite, esofagite, pneumonia, além de infecções oculares;
- ➔ herpes viral caracterizada pelo surgimento de pequenas vesículas cheias de líquido.

No Brasil, de acordo com o último Boletim Epidemiológico (BRASIL, 2006) as infecções mais comumente comunicadas entre 2005-2006 quando da notificação dos casos de AIDS foram: candidíase; pneumonia por *Pneumocystis carinii*; tuberculose

(disseminada, extrapulmonar e pulmonar não-cavitária); toxoplasmose cerebral; herpes

Microrganismo	Infecção relacionada
Vírus	- Citomegalovirose
	- Herpes simples
	- Leucoencefalopatia multifocal progressiva (Vírus JC)
Bactérias	- Micobacterioses (tuberculose e complexo <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> ou MAI)
	- Pneumonias (<i>S. pneumoniae</i>)
	- Salmonelose
Fungos	- Pneumocistose
	- Candidíase
	- Criptococose
Protozoários	- Histoplasmose
	- Toxoplasmose
	- Criptosporidiose
	- Isosporíase

simples; sarcoma de Kaposi; criptococose extrapulmonar e citomegalovirose.

A Tabela 1 mostra as infecções mais importantes relacionadas à AIDS, apontando os principais patógenos divididos por grupos (MATTOS et al., 2004).

Tabela 1 – Infecções mais importantes relacionadas à AIDS (MATTOS et al., 2004).

Com a ampla disseminação da AIDS por todo o planeta, inúmeros microrganismos têm despontado como patógenos oportunistas, causando infecções importantes e muitas vezes letais nos indivíduos acometidos. Esses microrganismos podem ser encontrados contaminando medicamentos e seus correlatos, facilitando sua veiculação aos doentes.

Em decorrência do aumento do número de casos de indivíduos imunocomprometidos vários microrganismos têm surgido como potenciais patógenos oportunistas. Dentre esses patógenos, bactérias Gram positivas têm sido relatadas em uma grande variedade de casos (TREVEJO et al., 2005, SZCZERBA, 2005).

O gênero *Mycobacterium* tem sido freqüentemente descrito em infecções em pacientes imunocomprometidos. A tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* é a doença mais importante que afeta pacientes com HIV/AIDS. Esses mesmos pacientes apresentam grande susceptibilidade para infecções com *Mycobacterium avium* (GOLUB et al., 1986), ou o complexo *Mycobacterium avium* (MAC) que infecta os pulmões, intestino, medula óssea e fígado (www.aidsportugalcom/article.php). Cepas de *Mycobacterium bovis* foram identificadas em erupções nosocomiais em pacientes infectados pelo HIV (LINDER, 1997).

Outra bactéria Gram-positiva que tem tido um aumento comum e freqüentemente fatal como patógeno oportunista em humanos infectados com HIV é a espécie *Rhodococcus equi* (RABAGLIATI et al., 2005; MARCHIORI et al., 2006).

O primeiro caso de *Rhodococcus equi* foi relatado em 1967 em um paciente recebendo corticosteróide para tratamento da hepatite crônica (LINDER, 1997). Vários outros casos têm sido descritos desde então, confirmando o importante papel dessa bactéria nos casos de infecções pulmonares em pacientes imunocomprometidos (CAPDEVILA et al., 1997; GRAY et al., 2000; HULSEWE-EVERS et al., 2000; FERNANDEZ-RIAL et al., 2003). Pneumonia é a manifestação mais comum da infecção que ocorre por inalação dos microrganismos com aparecimento de necrose granulomatosa (KAMBOJ et al., 2005, ROZSYPAL et al., 2007).

Rabagliati e colaboradores (2005) relataram casos de presença de *R. equi* em biópsia torácica de pacientes com tosse, dispnéia, febre intermitente e pneumonia.

Até o início dos anos 90, *Brevibacterium* sp. não tinha sido descrita como patógeno humano. McCaughey e Damani (1991) relataram o primeiro caso de infecção humana causada, provavelmente, por cateter infectado por *Brevibacterium epidermidis*. Em 1993, Gruner, Pfyffer e Graevenitz isolaram nove cepas de *Brevibacterium* sp. no período de um ano. Estes microrganismos foram isolados de fluidos de diálise, culturas de sangue, fluido cerebrospinal e fluido pleural. Funke e Carlotti (1994) examinaram

quarenta e três cepas de *Brevibacterium* sp. encontradas em cateteres nos últimos vinte anos e identificaram quarenta e uma como *Brevibacterium casei* e duas como *Brevibacterium epidermidis*. Nos últimos anos, a presença de *Brevibacterium casei* foi descrita em pacientes com AIDS, adicionando esta espécie na lista de patógenos oportunistas (REINERT et al. 1995; BRAZZOLA et al., 2002).

Bacillus cereus tem surgido como causa de endoftalmia endógena, usualmente como complicação grave em pacientes com uso prolongado de cateter e substâncias injetáveis (CALLEGAN, 1998). Também tem sido reconhecido como o mais importante patógeno ocular (O'DAY et al., 1981) associado à queratite pós-traumática severa e à endoftalmia (PINNA et al., 2001).

Nos últimos anos, casos de infecções provocadas por *B. cereus* em pacientes infectados com o HIV foram relatados. A manifestação clínica da infecção pode se dar na forma de meningite (CHEMLAL et al., 1995), bacteremia (BALL; SEPKOWITZ, 1994) ou diarreia (ROWAN; ANDERSON, 1998).

Le Scanff e colaboradores (2006) afirmam que *B. cereus* é admitido como um sério patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos. Ele causa infecção no sistema nervoso central freqüentemente levando à morte (KUWABARA et al., 2006).

Micrococcus sp. são cocos Gram-positivos considerados habitantes normais da pele. Entretanto, em pacientes com HIV estas bactérias podem produzir infecções cutâneas (SMITH et al., 1999). A maioria das manifestações cutâneas surge quando a taxa de linfócitos T CD4⁺ encontra-se menor do que 100 cels/mm³. Contudo, alguns autores não observaram diferenças significativas na prevalência ou gravidade da doença entre pacientes assintomáticos e aqueles com AIDS (FERNANDEZ et al., 2006). Superfícies plásticas, como cânulas intravenosas, são comumente contaminadas com *Micrococcus* e são porta de entrada destes microrganismos no organismo humano (CASTAGNOLA et al., 1997).

O acompanhamento médico e os tratamentos anti-HIV (coquetéis) têm por finalidade evitar o enfraquecimento do sistema imunitário e impedir o desenvolvimento de infecções oportunistas, permitindo assim, que a pessoa conserve boa saúde. Atualmente são empregados no tratamento de pacientes aidéticos uma grande variedade de medicamentos, incluindo os anti-retrovirais (ARVs), que combatem o HIV.

Além destes, medicamentos tópicos têm sido regularmente empregados em pacientes infectados com o HIV, visando o tratamento de infecções secundárias que tem como etiologia principal microrganismos considerados oportunistas.

O Controle de Qualidade é fundamental na Indústria Farmacêutica. Busca-se com a sua aplicação garantir que as características essenciais de qualidade, esperadas pelo consumidor, tais como eficácia terapêutica, funcional, cosmética, além da segurança, estejam presentes em todos os produtos (GIL, 2007).

O Controle de Qualidade de Medicamentos requer criteriosa análise sobre a qualidade físico-química e microbiológica dos produtos farmacêuticos. O Controle Microbiológico de fármacos, medicamentos, cosméticos e correlatos fundamenta-se na análise quantitativa e qualitativa dos produtos. Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), a análise qualitativa de produtos não-estéreis valoriza, principalmente, quatro bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), cuja presença não é admitida em nenhum tipo de medicamento ou cosmético. Dependendo da via de administração, algumas espécies são consideradas indesejáveis, porém, para a grande maioria de espécies bacterianas, salvo legislação específica, observa-se apenas o limite quantitativo, havendo, portanto tolerância em relação à presença microbiana nesses produtos.

Pouca atenção é dada à possível presença de microrganismos oportunistas em produtos farmacêuticos. Além disso, os métodos clássicos usados na pesquisa e identificação de patógenos baseiam-se em testes bioquímicos que, de modo geral, são testes complexos e demorados. O surgimento das técnicas de biologia molecular permite atualmente a identificação mais precisa e rápida de microrganismos. Contudo, para sua correta aplicação no controle de qualidade de medicamentos é indispensável a definição de parâmetros e padrões a serem avaliados segundo os diferentes tipos de produtos farmacêuticos.

2.1 TRATAMENTO DA AIDS E DAS INFECÇÕES OPORTUNISTAS

O tratamento das doenças virais e das infecções oportunistas associadas é muitas vezes bastante difícil. As estratégias empregadas em pacientes com AIDS para superar este desafio, consistem em:

- preservar a função imune o maior tempo possível com terapias anti-retrovirais;
- usar terapias farmacológicas profiláticas para impedir as infecções;
- diagnosticar e tratar infecções agudas o mais cedo possível.

Desde a introdução dos anti-retrovirais em 1996, houve importante diminuição na incidência das infecções oportunistas, bem como na mortalidade associada à AIDS (BENENSON, 1995). O surgimento de novos medicamentos iniciou a terapia anti-retroviral de alta eficiência (highly active anti-retroviral therapy - HAART), que resultou numa diminuição significativa da mortalidade e morbidade (KERR, 2005).

Existem três classes de anti-retrovirais no mercado: os inibidores da protease; os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (MARKOWITZ, 1996; MARK et al., 1999; CHEQUER et al., 2001). Suas principais características são:

a) Nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa: os análogos de nucleosídeos representam a primeira classe de fármacos que demonstraram atividade anti-retroviral em pacientes tratados (BALINT, 2001). Atuam colocando-se como “falsos nucleosídeos” na formação da molécula de DNA pela transcriptase reversa. Quando ocupam o lugar de um verdadeiro nucleosídeo na formação da molécula do DNA viral, impedem que um novo nucleosídeo se ligue, interrompendo o processo. Portanto, têm a característica de serem inibidores competitivos. Porém, a transcriptase reversa possui grande capacidade de mutação. Com o passar do tempo, ocorre alteração de sua estrutura nos sítios de ligação dos análogos de nucleosídeos, sobrevivendo então a resistência (OMS, 1998). Os medicamentos inibidores da transcriptase reversa, análogos de nucleosídeos incluem a zidovudina, a didanosina e a zalcitabina (KOROLKOVAS, 2006; Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2005/2006).

b) Inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos: diferem dos análogos de nucleosídeos por inibirem a transcriptase reversa não competitivamente, bloqueando a reação química de duplicação da molécula de RNA viral pela transcriptase reversa sem interferir na ligação dos nucleosídeos (SPENCE et

al., 1995). Os inibidores da transcriptase reversa, não análogos de nucleosídeos incluem a nevirapina, a delavirdina, a lovirida e o efavirenz (KOROLKOVAS, 2006; Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2005/2006).

c) Inibidores de protease: no final de 1995, após diversas pesquisas, foi liberada para uso esta nova classe de medicamentos. Esses fármacos atuam na inibição da protease, enzima responsável por clivar a poliproteína codificada pelos genes *gag* e *pol*, formada no ribossomo da célula hospedeira. É essencial para a consolidação da replicação viral, já que a região *pol* é a transcriptase reversa e a *gag*, a proteína p24, levando à formação de partículas virais defectivas, incapazes de montar outro vírus completo (BALINT, 2001). Os inibidores da protease incluem o saquinavir, o ritonavir, o indinavir e o nelfinavir (KOROLKOVAS, 2006; Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2005/2006).

2.2 MEDICAMENTOS TÓPICOS E CONTROLE DE INFECÇÕES SECUNDÁRIAS

Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), preparações tópicas semi-sólidas são aquelas previstas para aplicação na pele ou em certas mucosas para ação local ou penetração percutânea de medicamentos, ou ainda por sua ação emoliente ou protetora.

As preparações tópicas têm sido muito importantes no tratamento de lesões secundárias de pele. O ácido fusídico tem sido de grande valia para tratamento de infecções superficiais, causadas por cocos Gram-positivos (SMEENK, SEBENS; HOUWING, 1998; WILKINSON, 1998).

O aciclovir foi descrito por Neves e colaboradores (1996) no tratamento de queratite ulcerativa provocada pelo herpes zoster e por Ganir e colaboradores (1996) no tratamento de dermatite atópica em crianças.

Também é usado no episódio inicial de herpes simples (HSV), na profilaxia das recorrências de herpes simples, herpes zoster e citomegalovírus, em encefalite por herpes simples, em herpes genital e zoster e infecção por varicela zoster em pessoas

sadias (não grávidas) acima de 13 anos e imunodeprimidos (KOROLKOVAS, 2006). O medicamento referência possui apresentação na forma de creme dermatológico 50 mg/g (GlaxoSmithKline).

Apresentado na forma farmacêutica (medicamento de referência) creme a 2% em bisnaga com 10 g e 15 g o ácido fusídico (Roche Brasil) é um antibiótico derivado do *Fucidium coccineum*, exerce poderosa atividade antibacteriana contra uma variedade de microrganismos Gram-positivos (www.roche.com.br). Os estafilococos, incluindo as espécies resistentes à penicilina e a outros antibióticos, são particularmente sensíveis ao ácido fusídico. A eficácia terapêutica de ácido fusídico decorre, em parte, da pronunciada atividade antibacteriana tópica contra os organismos responsáveis por infecções da pele e, em parte, da capacidade extraordinária de penetração deste antibiótico na pele intacta. Está indicado para o tratamento de infecções da pele causadas por estafilococos, estreptococos ou outros germes sensíveis à substância ativa, sendo as indicações mais importantes: impetigo, sicose da barba, furúnculos, antraz, eritema, foliculite, acne, paroníquia e hidradinite (KOROLKOVAS, 2006).

Infecções secundárias são mais comuns em adultos e as bactérias causadoras destas infecções são altamente susceptíveis a alguns antibióticos como a cefalexina, a neomicina, o cloranfenicol e o clotrimazol (SUGENG et al., 1999). A pomada do medicamento referência de neomicina+bacitracina (Altana Pharma[®]) é apresentada na forma de bisnagas com 15 g e 50 g, sendo que cada grama de pomada contém 5 mg de sulfato de neomicina e 250 UI de bacitracina (www.altanapharma.com.br). É indicada para o tratamento de infecções da pele e das mucosas causadas por microrganismos sensíveis: piodermite, impetigo, eczema infectado, infecção de mucosa nasal, furúnculo, abscesso, acne infectada e úlcera cutânea (KOROLKOVAS, 2006).

Vale salientar que a administração da associação de neomicina+bacitracina permite obter maior espectro de ação no tratamento das infecções, assim como, propiciar uma diminuição nas doses individuais dos fármacos isoladamente, acarretando diminuição dos efeitos colaterais. É indicada no tratamento de dermatites infecciosas, como piodermites, furunculose e impetigo, bem como abscessos

superficiais ou profundos, infecções abertas como eczemas infectados e úlceras (Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 2005/2006).

2.3 CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

As matérias-primas estão entre as principais fontes de contaminação microbiana em produtos farmacêuticos acabados. Os microrganismos são responsáveis pela perda da qualidade de produtos acabados e podem dar lugar a infecções em pacientes que estiverem fazendo uso destes medicamentos (DENYER, 1988).

Todo produto deve ser livre de patógenos usuais e o nível de qualidade deve ser mantido, mesmo que durante o uso haja alguma contaminação do usuário no produto (LINTER; GENET, 1998).

Maki (1994) relatou que 11,00% dos produtos administrados em pacientes no hospital foram contaminados aparentemente durante o uso.

Martínez-Bermudéz e colaboradores (1991) identificaram as bactérias contaminantes de matérias-primas farmacêuticas e observaram clara predominância do gênero *Bacillus* (86,53%). Neste tipo de produto outras bactérias aeróbias têm sido descritas em menor proporção incluindo cocos Gram-positivos (6,72%) pertencentes aos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos.

Em 1989, Abdelaziz e colaboradores relataram bacteremia causada por *Klebsiella pneumonia* originária de cremes para mãos. Em outro estudo, foi relatada a contaminação de talco com *Clostridium tetani*, o que resultou na morte de quatro bebês na Nova Zelândia (TREMEWAN, 1991).

Microrganismos causadores de bacteremia devido à presença em cateteres têm sido descritos com grande frequência (REINERT et al., 1995). Dentre os microrganismos isolados neste tipo de bacteremia são descritas várias espécies de

bactérias Gram-positivas, incluindo *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis* e *Brevibacterium casei* (O'DAY et al., 1981).

Em 1998, Itin e colaboradores investigaram a presença de patógenos facultativos em hidratantes, em níveis capazes de infectar imunocomprometidos. A origem da contaminação detectada na contagem inicial foi devida às matérias-primas usadas, bem como as condições ambientais e de como os produtos foram produzidos e embalados.

Okeke e Lamikanra, em 2001, mostraram que em 49 produtos (cremes e loções) analisados, 20 continham crescimento microbiano. Dos microrganismos encontrados, *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. foram os que apareceram mais freqüentemente na contagem inicial (sem uso do produto) e microrganismos Gram-negativos foram mais observados na contagem final (após o uso).

Em seu estudo, Behravan e colaboradores (2005) identificaram bacilos Gram-positivos como a bactéria mais freqüentemente isolada em cremes (54% após o uso e 38,00% antes do uso).

O aumento progressivo da complexidade da terapia anti-retroviral, bem como dos medicamentos utilizados no tratamento de infecções secundárias relacionadas, vem exigindo aplicações cotidianas de princípios de cuidados primários, como o intenso controle de qualidade na produção destes medicamentos (HOFFMAN et al., 2005).

O limite microbiano de medicamentos e seus insumos, assim como de correlatos, pode se constituir em ausência absoluta de formas viáveis ou sua presença em grandezas definidas, restritos ou não a determinadas cepas microbianas (FARMACOPÉIA, 1988). Várias são as fontes de contaminação microbiana presente durante o processo de fabricação de medicamentos. Esta contaminação pode estar presente na matéria-prima que será invariavelmente transferida para o produto, assim como outras contaminações oriundas de equipamentos e ambiente produtivo, dos operadores e do material de embalagem (BLOOMFIELD et al., 1988).

A área de produção deve ser freqüentemente monitorada quanto à contaminação, pois bacilos Gram-positivos, cocos e fungos são facilmente encontrados em paredes secas (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1982).

A contaminação derivada de operadores é normalmente significativa. Durante atividades normais, a perda de escamas da pele é da ordem de 10^4 por minuto. Os contaminantes por elas transportados são micrococcos não patogênicos, difteróides e estafilococos, assim como *Salmonella* e *Escherichia coli* também podem estar presentes associados a hábitos de higiene dos operadores (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

O material de embalagem deve ter uma atenção especial principalmente em relação a produtos tópicos, que são facilmente passíveis de contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (DENYER; BAYRD, 1990).

A água é muitas vezes o componente presente em maior quantidade em uma formulação podendo ser o de maior relevância como fonte de contaminação. O controle de qualidade da água é, também, uma ferramenta básica para otimização dos processos operacionais, oferecendo como retorno, um produto de melhor qualidade. Todo esse trabalho é feito para atender as exigências da Portaria nº 518, do Ministério da Saúde, que dita as normas para o tratamento e controle da qualidade da água potável (MACEDO, 2005) e a RDC nº 214 de 12 de dezembro de 2006, que estabelece a exigência de se controlar a água usada na produção farmacêutica.

Embora na maior parte das situações adultos saudáveis apresentem resistência adequada a infecções, os produtos farmacêuticos são freqüentemente administrados a pessoas cujas defesas se encontram prejudicadas. Esta situação pode ocorrer em pacientes com doenças como leucemia, diabetes ou AIDS. Pode também estar associada à terapia com fármaco imunossupressor, incluindo tratamento com corticosteróide ou quimioterápico ([www. anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)).

Produtos não estéreis são aqueles nos quais se admite conceitualmente a presença de carga microbiana, que em condições ordinárias de uso terão contato com áreas portadoras de flora microbiana natural, constituída de saprófitas em número por vezes elevado (FARMACOPÉIA, 1988). A presença de cepas reconhecidamente patogênicas é proibitiva, pois representa risco de aquisição de quadro clínico infeccioso. A qualidade microbiana de medicamentos deve ser definida frente a diferentes fatores, entre os quais, de elevada importância, o fato de ser consumido por pessoas debilitadas, inclusive imunodeprimidos (SANTORO, 1988).

2.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

De acordo com o conceito atual de Controle Total de Qualidade, a qualidade é algo que se constrói, durante todo o processo de fabricação de um medicamento, e não apenas é alcançado por inspeção do produto final (SANTORO, 1988).

O Controle de Qualidade consiste em um conjunto de operações cujos objetivos incluem a obtenção de medicamentos cada vez melhores, mais eficazes e seguros, menos tóxicos e mais estáveis. Antigamente, as soluções para estes problemas eram feitas intuitivamente e com base em observações e referências populares, isto é, empiricamente. Hoje, isto é feito racionalmente fixando-se hipóteses prévias que podem ou não ser comprovadas experimentalmente (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Outro objetivo do controle de qualidade é verificar se o produto está em conformidade com as especificações farmacopéicas. A não-conformação representa um somatório de atribuições para a empresa que podem resultar, além dos prejuízos decorrentes do retrabalho, a perda de credibilidade e até a cassação da licença de funcionamento e do registro do produto (COOPER, 1979). Para o paciente, a falta de qualidade do medicamento ocasiona sérios transtornos com o comprometimento da sua saúde (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

A produção de medicamentos de alta qualidade e a conservação desta qualidade, durante todo o processo de comercialização, interessa tanto aos fabricantes, quanto aos consumidores. Vários modelos de sistemas têm sido implementados visando assegurar a qualidade dos medicamentos (LACHMAN et al., 1986).

Na década de 60 surgiram sistemas importantes de controle de qualidade dentre eles o PDCA, a estratégia *benchmarking*, a metodologia dos seis sigma, o *Just in*

Time (JIT), o *Material Requirements Planning (MPR)*, o *Optimized Production Technology (OPT)*, o *brainstorming*, o diagrama de Ishikawa, o plano de ação 5W2H, as folhas de verificação, incluindo as Boas Práticas de Fabricação, o Controle de Qualidade Total e a ferramenta 5S: seiri (organização), seisô (limpeza), seiton (arrumação), seiketsu (asseio) e shitsuke (disciplina) (CORRÊA; GIANESI, 1994; GIL, 2007).

Na década de 70 surge a Garantia da Qualidade, que assegura apoio, com procedimentos, equipamentos adequados, pessoal qualificado e treinado para desenvolver em conjunto com os diversos setores envolvidos nos processos produtivos, as atividades necessárias para garantir a homogeneidade e qualidade dos produtos fabricados (JURAN, 1990).

Sem invalidar os conceitos anteriores, em 1987 surgem sistemas envolvendo certificação, respaldados em normas internacionais ISO (International Standard Organization), particularmente a série 9000. Tão grande foi sua influência, que o Food Drug Administration (FDA) realizou trabalho de compatibilização entre seu já tradicional sistema de *Good Manufacturing Practice (GMP)* e a ISO 9000. As necessárias atualizações se fazem imprescindíveis, assim é usual hoje a sigla cGMP (*current Good Manufacturing Practice*), cujo indicativo de atual (*current*), expressa a constante revisão do sistema (SGQ Consultoria, 2005).

O controle de medicamentos, não é, sem dúvida alguma, um processo estacionário; evolui sempre, de acordo com os problemas que vão surgindo (SANTORO, 1988). A qualidade de um produto pode ser considerada como um conjunto de características e propriedades que o tornam satisfatório para o atendimento às necessidades dos consumidores. Em vista disso, a avaliação da qualidade dos medicamentos na indústria farmacêutica representa uma etapa indispensável para a sua comercialização em condições adequadas (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

Para o paciente, a administração de medicamentos com qualidade, segurança e eficácia é imprescindível, considerando-se que o doente necessita do fármaco para obter uma melhoria ou cura dos processos patológicos, garantindo seu bem estar físico, social e mental e a melhoria na sua qualidade de vida (PEIXOTO Jr. et al., 2005).

Independentemente do modelo do sistema de controle de qualidade adotado, no caso de medicamentos, há a necessidade de serem estabelecidos padrões ou níveis de qualidade idealizados para cada produto, cujo modelo deve ser atingido em cada lote produzido, de forma que o médico, ao prescrever uma medicação e, sobretudo o próprio paciente tenha segurança quanto ao seu efeito (SANTORO, 1988).

A Farmacopéia (1988) sugere para contagem de microrganismos viáveis totais diferentes métodos, entre eles: método de filtração por membrana, método de contagem em placas e método dos tubos múltiplos. As técnicas empregadas devem ser assépticas na amostragem e na execução do teste.

Já para a pesquisa e identificação de microrganismos patogênicos são usados meios de enriquecimento e meios seletivos para crescimento dos quatro principais patógenos. São eles: *Pseudomonas aeruginosa* (ágar cetrimida), *Staphylococcus aureus* (ágar sal manitol vermelho de fenol ou Vogel-Johnson), *Salmonella* (ágar verde brilhante) e *Escherichia coli* (ágar Mac Conkey).

Os métodos clássicos de identificação bacteriana são baseados nas características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos (DESVIGNES et al., 1973; PALMIERI et al., 1988; MARTINEZ-BERMUDEZ, 1991). Estes métodos requerem o isolamento e a identificação dos contaminantes microbianos, dispensando tempo excessivo, e requerendo grandes quantidades de amostras (ORTH, 1989). Eles são lentos, nem sempre específicos, não diferenciam ou diferenciam pouco gênero e espécie (JIMENEZ et al., 2000).

O desenvolvimento e a aplicação de métodos rápidos têm resultado em uma alta qualidade e um rápido diagnóstico de patógenos (CROTCHFELT et al., 1997; FUNG, 1994). A aplicação de novas tecnologias para monitoramento microbiológico de produtos e matérias-primas farmacêuticas faz-se necessária para melhorar a rapidez, a sensibilidade, a exatidão e serem mais efetivas (VAN DER ZEE; HUIS, 1997).

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a obtenção de grandes quantidades de trechos específicos do DNA bacteriano, facilitando as análises (HENEGARIU et al., 1997). Além disso, o desenvolvimento de métodos para recuperação de bactérias patogênicas em amostras farmacêuticas tem sido muito importante, pois, durante a produção, os microrganismos estão sujeitos ao processo de

destruição ou de redução de seu número. Também, a presença de conservantes no produto acabado prejudica o crescimento do microrganismo (ORTH et al., 1996; UNDERWOOD, 1998).

Jimenez e colaboradores (2000) compararam os métodos clássicos com a técnica de PCR para identificação bacteriana em produtos farmacêuticos. Os resultados deste estudo mostraram que o crescimento e a identificação de bactérias e fungos necessitam 5-8 dias. Já pela técnica de PCR a identificação de bactérias e fungos foi obtida após 27 horas, demonstrando que esta técnica é mais eficiente que o método padrão para detectar baixos níveis de contaminação por bactérias e fungos em amostras farmacêuticas.

Nos últimos dez anos, a microbiologia passou por uma revolução devido à diminuição de custo de análise e ao acesso fácil da seqüência completa do DNA. Há pouco tempo atrás, levaria meses e até anos para a clonagem e o seqüenciamento de um gene marcador. Hoje isto pode ser feito em até 10 minutos através de busca na internet no banco de dados público para genomas. Esta nova tecnologia tem sido utilizada para explorar a vasta diversidade microbiana e marcar a variação genética que pode ocorrer entre espécies bacterianas (HALL, 2007).

3 PROPOSIÇÕES

No presente trabalho pretendeu-se investigar a possível presença de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Rhodococcus equi* em medicamentos tópicos usualmente empregados no tratamento de infecções secundárias em pacientes imunocomprometidos, apontando novos parâmetros para o controle de qualidade de medicamentos destinados a este grupo de pacientes. Para tanto foram empregadas técnicas convencionais e novas técnicas de identificação (baseadas em biologia molecular), as quais foram propostas e padronizadas, podendo-se também comparar seus resultados com as metodologias convencionais, como forma de validar a aplicação dessas novas metodologias no controle de qualidade microbiológico de fármacos e medicamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Núcleo Controle de Qualidade, e no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, ambos da UNIFAL-MG.

4.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as seguintes bactérias da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Bacillus cereus* ATCC 10987; *Micrococcus luteus* ATCC 9341 que pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG. A cepa de *Rhodococcus equi* ATCC 33701 foi adquirida junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (IAL-SP).

4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A recuperação de *B. cereus* e *M. luteus* foi feita por meio de repiques das culturas pertencentes ao Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG, para *Brain Heart Infusion* (caldo BHI).

R. equi foi recuperado de cultura liofilizada seguindo o protocolo enviado pelo IAL-SP, onde foram adicionados 0,5 mL de caldo nutritivo no interior da ampola. Após a ressuspensão da cultura, o material foi transferido para caldo BHI.

Os caldos contendo as bactérias foram incubados por 24-48 horas, a 35-37°C. Após o crescimento, as culturas foram estocadas entre 4 e 8°C. Repiques quinzenais foram realizados para ágar caseína de soja.

A água ultrapura foi obtida em aparelho de Milli – Q.

4.3 PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Foram adquiridas 18 amostras de medicamentos tópicos comercializados em drogarias na cidade de Alfenas, sendo 6 de cada um dos seguintes fármacos: ácido fusídico (Roche[®]), aciclovir (EMS[®] e Medley[®]) e associação neomicina-bacitracina (Altana[®]).

4.4 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS VIÁVEIS TOTAIS E PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS

Foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV, 1988. Este método foi empregado para verificar a qualidade microbiológica das amostras comerciais utilizadas neste trabalho, quer pela análise quantitativa, quer pela análise qualitativa, definida pela pesquisa de células viáveis de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que devem estar ausentes em todos os produtos farmacêuticos não estéreis.

4.5 PADRONIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL E MOLECULAR PARA A PESQUISA DE MICRORGANISMOS OPORTUNISTAS

Para realização dos testes em amostras farmacêuticas, foi necessário padronizar as metodologias convencional e molecular.

4.5.1 Determinação da Curva de Crescimento

Para padronização da concentração do inóculo, foi confeccionada curva de crescimento para *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi*.

Para cada um dos microrganismos foi feito um pré-inóculo adicionando-se, separadamente, uma colônia característica de cada bactéria a 50 mL de caldo BHI. Este foi incubado a 37°C por 10 horas. Após o crescimento, 5 µL de cada cultura foram transferidos para 3 frascos contendo 50 mL de caldo BHI, os quais foram incubados a 37°C. O crescimento de cada bactéria foi monitorado de hora em hora por meio da coleta de duas alíquotas da cultura microbiana sendo uma para a contagem das colônias (UFC/mL), e outra para a medida da absorvância no comprimento de onda de 600 nm feita em espectrofotômetro (Shimadzu UV 1601 PC). Os dados obtidos foram plotados em gráficos.

4.5.2 Determinação do Inóculo Bacteriano

Inicialmente, cada bactéria foi cultivada separadamente, em 50 mL de caldo BHI, o qual foi incubado por 10 horas a 37°C. Uma alíquota de 5 µL foi transferida para erlenmeyer contendo 50 mL de caldo BHI, incubado novamente a 37°C. O material permaneceu incubado até que o crescimento bacteriano (medido pela variação da absorvância do meio) atingisse a concentração de 70 UFC/g.

4.5.3 Enriquecimento e Contaminação Proposital dos Cremes

Dez gramas de cada creme foram transferidos para 300 mL de caldo BHI, onde foi adicionado 50 μ L de polissorbato 80 para inativação dos conservantes presentes nos cremes. Cada suspensão foi então colocada em banho aquecido a 45°C até completa dissolução.

Primeiramente, contaminaram-se os medicamentos com volume de cultura pura, de cada microrganismo, equivalente a 70 UFC/g, conforme descrito anteriormente. Incubou-se a mistura a 37°C por 24 horas.

4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS NAS AMOSTRAS CONTAMINADAS PROPOSITAMENTE

Para a pesquisa dos patógenos oportunistas foram transferidos 10 g de cada amostra previamente contaminada para frascos contendo 300 mL de caldo BHI adicionados de 3% de polissorbato 80. Cada suspensão foi então colocada em banho aquecido a 45°C até completa dissolução (FARMACOPÉIA, 1988).

A seguir, cada diluição foi distribuída em três placas de Petri, em volume de 1 mL por placa, adicionando-se em cada placa, 15-20 mL de ágar Casoy liquefeito a 45°C. Após resfriamento e solidificação, as placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas.

O número de colônias de bactérias crescidas após 48 horas foi determinado com auxílio de contador de colônias Phoenix CP 600.

Para a identificação destes patógenos, foram utilizadas metodologias descritas no Manual Merck de Microbiologia (1994), em Kloos e Musselwhite (1975) e em Rabagliati et al. (2005).

Após o enriquecimento, as bactérias foram isoladas e identificadas conforme descrito a seguir:

- *B. cereus*: o enriquecimento foi feito em caldo BHI seguido de incubação a 37°C por 24 horas e plaqueamento seletivo em Cereus Selective Agar (Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine-Agar) [Merck®]. Após incubação a 37°C foram tomadas de três a cinco colônias sugestivas de *B. cereus* repicadas para ágar nutriente inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas para realização de provas bioquímicas com kit de provas API 20® (Biomerieux).
- *M. luteus*: o enriquecimento foi feito em caldo BHI seguido de incubação a 37°C por 24 horas e o plaqueamento seletivo foi realizado em ágar nutriente. Após incubação por 24 horas a 37°C foram selecionadas de três a cinco colônias sugestivas de *M. luteus* para identificação bioquímica através da coloração de Gram, e das provas da catalase e da coagulase.
- *R. equi*: o enriquecimento foi feito em caldo BHI seguido de incubação a 37°C por 24 horas e o plaqueamento seletivo foi realizado em ágar sangue. Após incubação por 24 horas a 37°C foram selecionadas de três a cinco colônias sugestivas de *R. equi*, transferidas para ágar nutriente, e após crescimento de 24 horas a 37°C foi realizada a identificação bioquímica com o kit de provas bioquímicas API Coryne® (Biomerieux).

4.7 PESQUISA DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS PELO MÉTODO MOLECULAR

Esta etapa envolveu a coleta de amostras dos cremes aciclovir, ácido fusídico e neomicina-bacitracina enriquecidos, inativados e contaminados no tempo zero. Retirou-se, então, uma alíquota de 1,5 mL para extração do DNA.

4.7.1 Extração do DNA Genômico

Três métodos de extração de DNA genômico de *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi*, a partir de cultura pura, foram testados neste trabalho: o método proposto por Bolano e colaboradores (2001), o método convencional com fenol-clorofórmio, e o método do aquecimento proposto por Jimenez e colaboradores (1999).

Optou-se pela extração através do método com fenol-clorofórmio descrito a seguir.

Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos, 1,5 mL da cultura pura crescida em caldo BHI a 37°C por 24-48 horas. Descartou-se o sobrenadante. Foram acrescentados 500 µL de TENTS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 200 mM NaCl; 2% triton X-100; 1% SDS). Para *M. luteus*, porém houve necessidade de acrescentar 1000 µL de TENTS para melhor extração. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1). Agitou-se em agitador automático por 2 minutos. Foi adicionado 500 µL de etanol absoluto e o tubo foi incubado a -20°C por 1 hora. Centrifugou-se (13000 rpm, 15 minutos) e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 500 µL de TE (10 mM Tris, pH 8,2; 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNAase A na concentração de 50 µg/mL. Incubou-se a 37°C por 30 minutos. Foi feita nova extração com fenol/clorofórmio. Centrifugou-se (13000 rpm, 15 minutos) e a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo. Adicionou-se 20 µL de NaCl 5 M e 500 µL de etanol absoluto. Incubou-se o tubo a -20°C por 1 hora. Centrifugou-se

(13000 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado. Secou-se a temperatura ambiente e ressuspendeu-se em, no máximo, 50 μ L de TE.

4.7.2 Quantificação do DNA Genômico

Após extração do DNA genômico foi realizada eletroforese para verificação da qualidade e quantificação do mesmo.

Montou-se a fôrma com os pentes. Adicionou-se 100 mL de gel de agarose 0,8% fundido e corado com brometo de etídeo (1 μ g/ μ L). Após polimerização por 30 minutos, foram aplicados no gel o marcador de concentração λ /Hind III (Invitrogen) e as amostras, utilizando-se 4 μ L de amostra para 2 μ L de tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 60 volts por 60 minutos. O gel foi analisado em transluminador sob luz UV (254nm), obtendo-se imagens com auxílio do sistema digital Kodak (modelo EDAS-290). A quantificação das amostras foi realizada pela comparação da concentração das amostras com o marcador λ /Hind III. Apenas DNAs com qualidades satisfatórias foram empregados nos testes de PCR.

4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As bactérias em estudo foram detectadas em reações da PCR utilizando-se iniciadores específicos para cada bactéria.

Antes de iniciar os testes de amplificação, os iniciadores liofilizados foram solubilizados com água ultrapura estéril e diluídos posteriormente para uma concentração de trabalho de 0,01 ng/μL.

A temperatura média (TM) de cada iniciador foi calculada através da seguinte fórmula: $TM = \{[(A+T) \times 2] + [(C+G) \times 4]\} - 5$.

A amplificação foi realizada em termociclador modelo 9700 da Applied Biosystems.

As reações foram feitas com 4 pMol de cada iniciador para *B. cereus* e *R. equi* e 6 pMol de cada iniciador para *M. luteus*, 10 nMol de cada desoxinucleosídeos, 5 μL de 10 x tampão de PCR, 0,2 U de *Taq* polimerase e 9 ng do DNA de cada bactéria, completando-se o volume da reação para 50μL com água ultra pura estéril.

A seguir são descritas as condições da PCR específicas para detecção de cada microrganismo:

A) *Bacillus cereus*

Para a detecção de *B. cereus* utilizou-se os iniciadores *BC1* (5'-ATTGGTGACACCGATCAAACA – 3') e *BC2r* (5'-TCATACGTATGGATGTTATTC– 3') que amplificam um fragmento de 344 pb da região *gyrB* (DE CLERCK et al., 2004). As condições da PCR consistiram de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 53°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão do DNA, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

B) *Rhodococcus equi*

Os iniciadores *COX-F* (5'-GTCAACAACATCGACCAGCGCG– 3') e *COX-R* (5'-CGAGCCGTCCACGACGTACAG– 3'), que amplificam um fragmento de 959 pb da região *choE*, foram utilizados para a identificação desta bactéria (LANDRON et al., 2003). As condições da PCR foram: 95°C por 5 minutos para desnaturação, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

C) *Micrococcus luteus*

Os iniciadores *ML--ISR-R* (5'-GCCAAGGCATCCACC- 3') e *ML-ISR-F* (5'-GAGGAAGGTGGGGATGACGT- 3') que amplificam um fragmento de 790 pb da região 16S-23S do rDNA, foram utilizados para a identificação desta bactéria (HAGA et al., 2003). As condições da PCR foram 5 minutos a 94°C para denaturação, seguida de 30 ciclos de 94°C por 2 minutos, 52°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

Em cada reação de PCR foi feito um controle negativo contendo uma alíquota da solução do meio de cultura de enriquecimento, sem inoculação, submetida à metodologia de extração de DNA. Este controle permitiu detecção de possíveis contaminantes em reagentes e materiais (tubos, ponteiras, micropipetas) utilizados nos processos de extração de DNA e da PCR. Cada reação também apresentou um controle denominado branco da reação, que continha todos os reagentes da PCR exceto DNA.

4.7.4 Eletroforese do Produto de PCR

Para a identificação das bactérias, os produtos de PCR das amostras foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e analisados quanto à ausência ou presença de banda e sua posição no gel, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.8 CERTIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DO PRODUTO DE PCR

Confirmado o tamanho do produto de PCR de cada bactéria, esses foram purificados empregando-se o Kit *GFX™ PCR DNA and gel band purification* da Amersham Biosciences (27-9602-01). Os produtos foram clonados utilizando-se o *Kit p-*

GEM-T Easy Vector Sys I da Promega (A1360). Os procedimentos foram realizados conforme os protocolos abaixo segundo recomendações dos fabricantes.

4.8.1 Purificação do Produto de PCR a Partir de Gel de Agarose

Com o auxílio de bisturi limpo e estéril, cortou-se a fatia de agarose contendo a faixa de DNA a ser purificado. Transferiu-se a banda cortada para um tubo de 1,5 mL e realizou-se a pesagem.

Para cada 10 mg de fatia de gel de agarose, foram adicionados 10 μ L de *capture buffer*. A mistura do tubo foi homogeneizada e agitada vigorosamente e após, foi incubada por 5 minutos a 60°C ou até que a agarose fosse completamente dissolvida. Depois a amostra foi brevemente centrifugada para que se concentrasse no fundo do tubo. Posteriormente foi transferida para coluna de GFX (tubo com filtro) e, incubada a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugou-se por 1 minuto a 14000 rpm. O filtrado foi descartado. Acrescentou-se 500 μ L de *wash buffer* à coluna e incubou-se por 5 min a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm. O filtrado foi descartado e centrifugou-se a mistura novamente por 1 minuto a 14000 rpm. A coluna GFX foi colocada em tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionou-se 30 μ L de água ultrapura estéril (pré-aquecida 37°C). Incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 14000 rpm por 2 minutos.

4.8.2 Clonagem

Para a realização da clonagem, 5 μ L de *2X ligation buffer*, 1 μ L de *pGem easy vector* (50 ng), produto de PCR, 1 μ L de T4 DNA ligase e água ultrapura suficiente para completar 10 μ L foram adicionados em tubos de polipropileno de 0,5 mL e

incubados por 1 hora a temperatura ambiente. O volume de inserto (μL) foi definido mediante cálculos recomendados pelo fabricante, segundo a fórmula a seguir:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{razão molar inserto:vetor}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} = \text{ng do inserto}$$

4.8.3 Preparo de Células Quimiocompetentes

As células quimiocompetentes foram preparadas pelo método químico com CaCl_2 (SAMBROOK, RUSSELL, SAMBROOK, 2001).

Foi repicada uma colônia de *E. coli* DH5 α para 10 mL de caldo *Luria Bertani* (LB) e incubada por 16-18 horas a 37°C. Transferiram-se 100 μL da cultura pura para erlenmeyer (de 250 mL de capacidade) contendo 30 mL de caldo LB. Incubou-se a 37°C com agitação (200 rpm) por 2-3 horas até atingir uma densidade óptica entre 0,3-0,5 em 600 nm. Esta cultura foi transferida para um tubo estéril com capacidade de 30,0 mL e mantida no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 350 rpm por 10 minutos a 15°C e o sobrenadante foi desprezado. As células foram ressuspensas em 15 mL de 50 mM CaCl_2 gelado e mantidas por 15 minutos no gelo. Centrifugou-se a cultura sob as mesmas condições citadas anteriormente e desprezou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 6 mL de 50 mM CaCl_2 gelado contendo 10% de glicerol. Estas foram distribuídas em alíquotas de 50 μL em tubos de polipropileno estéreis. Verificou-se a viabilidade das células plaqueando-as em meio LB sem ampicilina e meio LB com ampicilina.

4.8.4 Transformação das Células Competentes com Vetor Clonado

As células quimiocompetentes foram transformadas por choque térmico em banho aquecido a 42°C (SAMBROOK; RUSSELL; SAMBROOK, 2001).

Esperaram-se descongelar totalmente os tubos contendo as células quimiocompetentes. Foram adicionados 2 µL do plasmídeo clonado aos 50 µL da suspensão de células. Os tubos foram mantidos no gelo por 30 minutos e depois incubados em banho aquecido a 42°C por 2 minutos exatamente. A cada tubo foi adicionado 1 mL de caldo LB previamente aquecido a 37°C. Incubou-se por uma hora a 37°C com agitação de 200 rpm. Após a realização da clonagem, efetuou-se a transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α. As células transformadas foram plaqueadas em meio contendo 40 µL de Xgal (20 mg/mL) , 4µL IPTG (200 mg/mL) e ampicilina (70 µg/mL). Foi confeccionada uma placa controle contendo somente LB. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

4.8.5 Seleção das Colônias Transformadas

A seleção das colônias transformadas foi feita através da observação em placas de Petri contendo meio LB. As colônias escolhidas foram aquelas que apresentaram coloração branca (a colônia de bactéria possui o plasmídeo que teve a enzima beta-galactosidase destruída). Outro importante instrumento utilizado na seleção das colônias foi o antibiótico. As bactérias utilizadas neste experimento não foram resistentes ao antibiótico ampicilina. No entanto, o plasmídeo utilizado possuía o gene de resistência à ampicilina. Deste modo, apenas as bactérias possuindo plasmídeos em seu interior eram resistentes à ampicilina, crescendo na placa de seleção.

Foram selecionadas, portanto, duas colônias brancas de cada tratamento. Deste modo as etapas posteriores foram realizadas em duplicata.

4.8.6 Extração dos Plasmídeos

Os plasmídeos foram extraídos utilizando-se Kit de extração *AccuPrep® Plasmid Extractuion Kit* da BIONNER. Este procedimento foi realizado centrifugando-se 3 mL de meio LB com células de *E. coli* DH5 α transformadas, crescidas por no máximo 16 horas. Ao pellet foram adicionados 250 μ L de *ressuspension buffer* (gelado) e sua ressuspensão foi feita no agitador. Foram então, adicionados 250 μ L de *lysis buffer*, a mistura foi delicadamente invertida por algumas vezes e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 350 μ L de *neutralization buffer*, novamente o material foi invertido por algumas vezes e incubado por 5 minutos a 4°C.

A mistura foi centrifugada por 7 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para o *biding column tube* (2 mL) e centrifugado por 60 segundos, 12000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o líquido do tubo. Foram adicionados 700 μ L de etanol 80 % e posteriormente o material foi centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm, 4°C, então o líquido sobrenadante foi descartado. Centrifugou-se novamente por 1 minuto 13000 rpm, 4°C para completa remoção do etanol 80%. A *biding column tube* foi colocada em tubo de polipropileno de 1,5 mL e foram adicionados 100 μ L de *elution buffer*. O tubo de polipropileno foi incubado por 1 minuto e centrifugou-se por 2 minutos a 13000 rpm, para completa eluição.

4.8.7 PCR de Inseto

O plasmídeo extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose para confirmação de sua qualidade e quantificação de sua concentração.

As condições da PCR para confirmar a presença dos fragmentos clonados foram descritas anteriormente e são específicas para detecção de cada microrganismo.

Foi realizada a PCR de inserto utilizando programa de PCR característico de cada bactéria.

4.8.8 Seqüenciamento dos Plasmídeos

Os plasmídeos foram seqüenciados utilizando-se o kit da *Applied Biosystems* – *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* em termociclador modelo 9700. Foi utilizado o programa constituído de 40 ciclos de 96°C/10 seg; 52°C/20 seg; 60°C/4 min.

O DNA seqüenciado foi submetido à eletroforese em seqüenciador automático 3100 Genetic Analyzer ABI PRISM. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório do Genoma no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

4.8.9 Análise das Seqüências Obtidas

As seqüências geradas foram comparadas àquelas depositadas no GenBank¹ do NCBI através de Blastn e Blastx para a validação do método.

4.9 AVALIAÇÃO DOS CREMES EM EMBALAGEM ORIGINAL

Após a análise dos produtos contaminados propositalmente, quer pela metodologia de identificação bioquímica, quer pela metodologia molecular, buscou-se a aplicação destas metodologias para a pesquisa dos três patógenos oportunistas em

estudo, em produtos que ainda não tinham sido abertos e utilizados, em suas embalagens originais.

As embalagens foram assepticamente limpas com álcool 70°GL e levadas para o fluxo laminar. A seguir, 1 grama de cada amostra foi retirado e análise qualitativa (pesquisa dos três patógenos em estudo) foi desenvolvida conforme descrito anteriormente.

Paralelamente, a técnica de PCR foi também empregada para a pesquisa de *E. coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, nesses produtos. Para tanto se utilizou a metodologia descrita por TERCETI et al., 2006.

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

5 RESULTADOS

Pela metodologia convencional, pode ser observado que a contagem total de microrganismos viáveis totais encontrada nas amostras analisadas (Tabela 2) estava de acordo com a Resolução ANVISA nº 481 de 23 de setembro de 1999 (até 10^3 UFC/g). Também não foram encontrados *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* nas amostras analisadas.

Tabela 2 – Média da pesquisa de bactérias viáveis totais, feita em triplicata, encontradas em aciclovir, ácido fusídico e neomicina-bacitracina que não foram contaminados propositalmente, após incubação por 48 horas a 37°C, pela metodologia clássica.

	aciclovir	DRP(%)*	ácido fusídico	DPR (%)*	neomicina- bacitracina	DPR (%)*
UFC/g	28	2,52	20	1,93	23	2,05

DPR: Desvio padrão relativo

5.1 PADRONIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL E MOLECULAR PARA A PESQUISA DE MICRORGANISMOS OPORTUNISTAS

As curvas de crescimento das culturas puras de *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi* estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3 respectivamente.

Pode-se observar que *B. cereus* apresenta fase *lag* de crescimento entre 0 e 4 horas, fase exponencial entre 4 e 8 horas, e a fase estacionária a partir de 8 horas (Figura 1). Para *M. luteus* (Figura 2) observa-se que a fase *lag* encontra-se entre 0 e 5 horas, a fase exponencial entre 5 e 11 horas e a fase estacionária a partir de 11 horas. Já a bactéria *R. equi* apresenta fase *lag* entre 0 e 7 horas, fase exponencial entre 7 e 12 horas, não sendo possível, nos experimentos realizados determinar a fase estacionária de crescimento. Observa-se, contudo, que a maior taxa de crescimento desta bactéria pode ser observada a partir de 9 horas (Figura 3).

Face aos resultados das curvas de crescimento determinou-se o número de unidades formadoras de colônias de cada bactéria no tempo exponencial de crescimento, em triplicata. Na Tabela 3 estão expressas as médias das contagens obtidas.

5.1.1 Determinação do Inóculo Bacteriano

Considerando-se os resultados das curvas de crescimento, foi padronizado o tempo para retirada de alíquota das três bactérias em estudo, a partir de cultura pura: 4 horas de crescimento para *B. cereus*, 5 horas para *M. luteus* e 7 horas para *R. equi*. A Tabela 4 apresenta o número de UFC/g encontrada no tempo zero de contaminação.

5.1.2 Enriquecimento e Contaminação Proposital dos Cremes

Os resultados da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) presentes nos cremes contaminados isoladamente com *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi*, estão apresentados na Tabela 5. Pode-se observar que foi possível recuperar de modo satisfatório as bactérias que haviam sido adicionadas propositalmente nos três cremes.

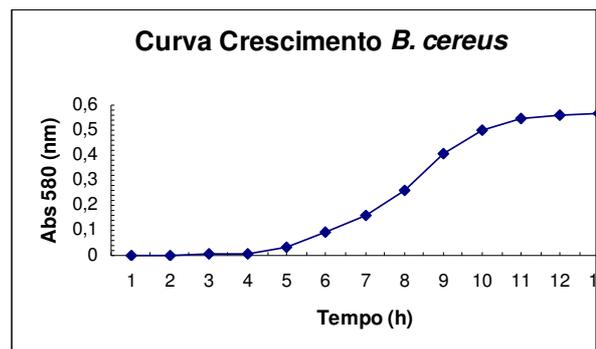


Figura 1 - Curva de crescimento da amostra de *B. cereus* ATCC 10987.

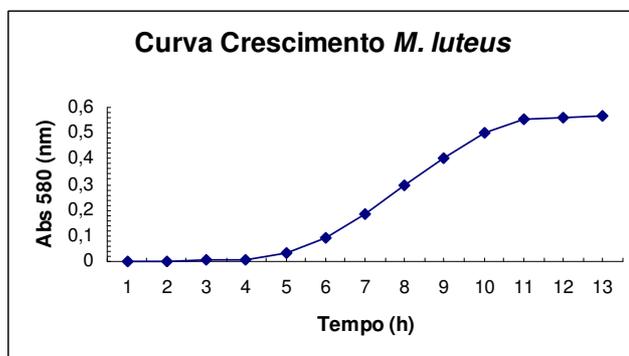


Figura 2 - Curva de crescimento da amostra de *M. luteus* ATCC 9341

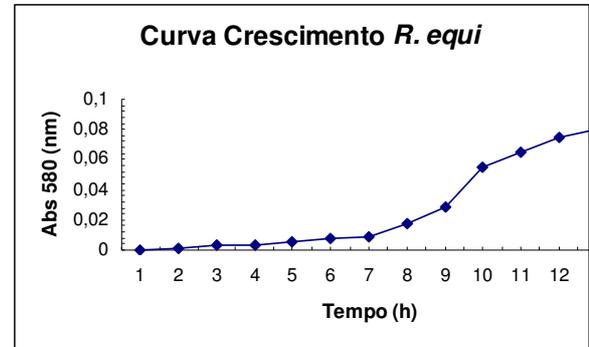


Figura 3 - Curva de crescimento da amostra de *R. equi* ATCC 33701.

Tabela 3 - Média do número de UFC de cada bactéria no tempo exponencial de crescimento.

Microrganismo	Diluição de contagem	UFC	Diluição
CC 10987	1	7,01 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷
	2	7,01 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷
	3	7,01 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷
	4	7,01 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷
CC 9341	1	7,01 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷
	2	7,01 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁷

	x	x
	1	1
	0	0
	7	-
		8
	7	2
	,	,
	2	0
	0	9
ATCC 33701	x	x
	1	1
	0	0
	6	-
		7

DPR: Desvio padrão relativo

Tabela 4 - Número de UFC de *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi* encontrado após plaqueamento de cultura pura encontrada no tempo zero de contaminação.

	T ₀
<i>B. cereus</i> ATCC 10987	65
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	79
<i>R. equi</i> ATCC 33701	69

Tabela 5 - Média da recuperação de *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi* em Aciclovir, Ácido Fusídico e Neomicina-Bacitracina após incubação por 48 horas a 37°C, realizada em triplicata.

Cremes	<i>B. cereus</i>	DPR (%)	<i>M. luteus</i>	DPR (%)	<i>R. equi</i>	DPR (%)
Aciclovir	45	3,14	70	2,45	78	3,45
Ácido Fusídico	51	2,45	45	3,54	45	2,98
Neomicina-Bacitracina	36	2,95	33	2,68	73	3,69

DPR: Desvio padrão relativo

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE PATÓGENOS OPORTUNISTAS NAS AMOSTRAS CONTAMINADAS PROPOSITAMENTE

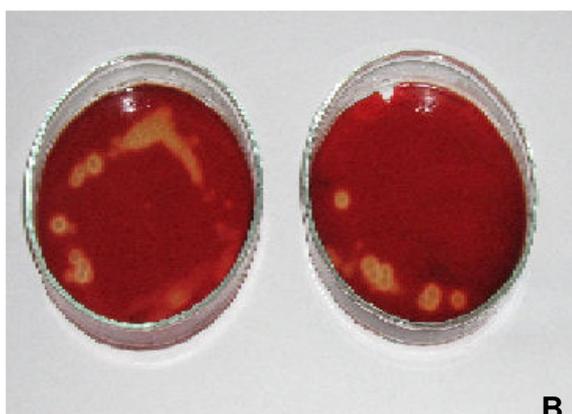
Após a inoculação das amostras contaminadas nos meios seletivos foi possível observar as características morfológicas das colônias das bactérias nos diferentes meios. No meio Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine-Agar (MYP) (Figura 4A) foram observadas colônias secas com coloração rosada-púrpura, características de *B. cereus*. No meio ágar sangue, apresentado na Figura 4B pôde-se perceber o aparecimento de colônias irregulares, arredondadas, semi-transparentes, brilhosas, com bordas cremosas, com coloração marrom-claro características de *R. equi*. A Figura 4C apresenta o ágar nutriente com características de *M. luteus*, onde se observam colônias amarelas brilhantes.

A Figura 5 (A e B) apresenta os resultados da identificação bioquímica das bactérias *B. cereus* e *R. equi*. A Figura 5A mostra a identificação de *B. cereus* por meio dos testes urease (URE), triptofano desaminase (TDA), indol (IND), acetoína (VP), gelatinase (GEL), fermentação da glicose (GLU) e produção de NO₂, cuja positividade indica 81% de confiabilidade para identificação de *B. cereus* (Biomerieux, API 20E®). Na

Figura 5B, observa-se os resultados dos testes nitrato (NIT), pirazina carboxamida (PYZ), ácido piroglutâmico- β -naftilamida (PYRA), 2-naftil-fosfato (PAL), 2-naftil- α D-glucopiranosida (α GLU) e uréia (URE). A positividade destes testes e a presença de bolhas nos testes ESC e GEL (catalase) indicam 76% de confiabilidade para *R. equi* (Biomerieux, API Coryne[®]).

A identificação de *M. luteus* foi feita com base nos seguintes resultados: produção de colônias amarelas em ágar nutriente, cuja análise morfo-tintorial revelou a presença de cocos Gram positivos, teste da catalase positivo e pela reação da oxidase negativa (Figura 5C).

O tempo total para isolamento e identificação bioquímica de patógenos oportunistas nas amostras contaminadas propositalmente foi de 72-96 horas.



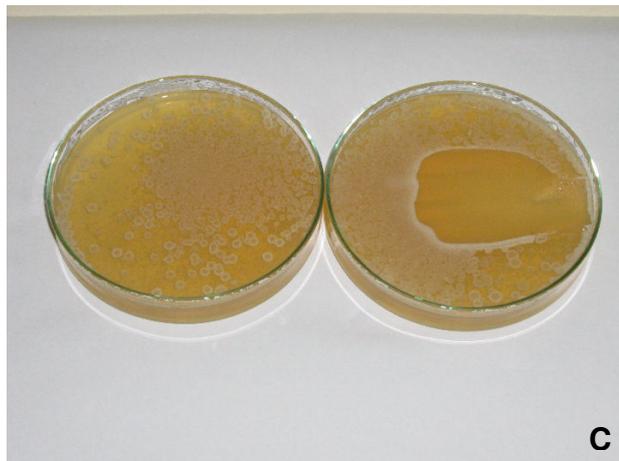
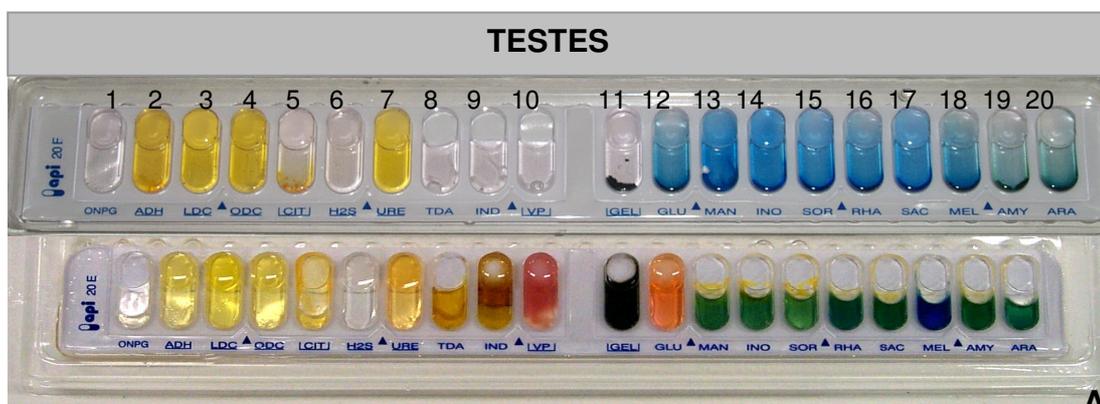


Figura 4 – Morfologia bacteriana das colônias

Figura 4A - Meio MYP com coloração rosada-púrpura, característica de *B. cereus*.

Figura 4B - Meio ágar sangue, apresentando colônias irregulares, arredondadas, semitransparentes, brilhosas, com bordas cremosas, com coloração marrom-claro características de *R. equi*.

Figura 4C - Meio ágar nutriente com características de *M. luteus*, onde se observa colônias amarelas brilhantes.



1

2

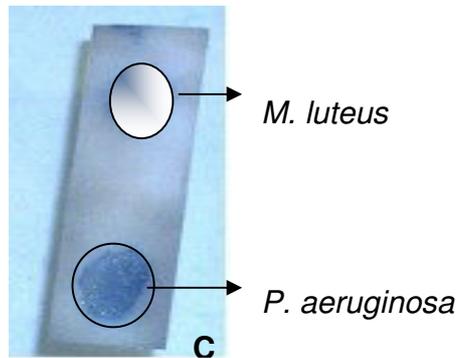


Figura 5 – Identificação das amostras bacterianas.

Figura 5A - Identificação da amostra de *B. cereus* ATCC 10987 pelo kit API 20E. 1: Kit sem contaminação, 2: Kit contaminado.

Figura 5B - Identificação da amostra de *R. equi* ATCC 33701 pelo kit API Coryne. 1: Kit sem contaminação, 2: Kit contaminado

Figura 5C - Identificação da amostra de *M. luteus* ATCC 9341 pela prova da oxidase.

5.3 VARIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO DNA DAS BACTÉRIAS OPORTUNISTAS

Todos os métodos de extração se mostraram favoráveis, apresentando DNA de boa qualidade. Porém, para *M. luteus*, o método do fenol-clorofórmio com aumento de 500 µL de tampão de lise (TENTS), mostrou-se o mais eficiente (Figura 6).

5.4 PESQUISA DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS PELO MÉTODO MOLECULAR

As imagens obtidas dos géis usados para quantificação do DNA genômico de *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi* estão apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9 respectivamente. Pode-se observar que os DNAs apresentam concentração (avaliado pela posição e pela intensidade de brilho da banda no gel) satisfatória para a realização da PCR. Deste modo pode-se determinar para cada bactéria a quantidade de DNA a ser utilizada na reação da PCR.

5.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam a imagem do gel contendo o produto de PCR para *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi*, respectivamente.

Por meio do resultado apresentado na Figura 10 pode-se observar que a PCR foi bem sucedida com o uso dos iniciadores BC1 e BC2r, encontrando-se banda de aproximadamente 344 pb na região *gyrB*, específica para *B. cereus*. Do mesmo modo, o resultado observado para *M. luteus* (Figura 11) mostra uma banda em 790 pb da região 16S-23S do rRNA, específica dessa bactéria. Ainda, na Figura 12 pode ser observada a presença de uma banda de aproximadamente 959 pb da região *choE*, específica para *R. equi*.

O tempo total para pesquisa de bactérias oportunistas pelo método molecular foi de aproximadamente 27 horas.

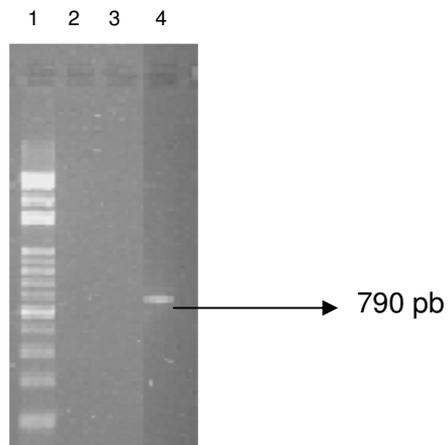


Figura 6- Gel de agarose apresentando variação do método de extração para *M. luteus* ATCC 9341. 1. Marcador de 100 pb; 2: Método proposto por Bolano e colaboradores (2001); 3: Método do aquecimento proposto por Jimenez e colaboradores (1999); 4: Método convencional com fenol-clorofórmio

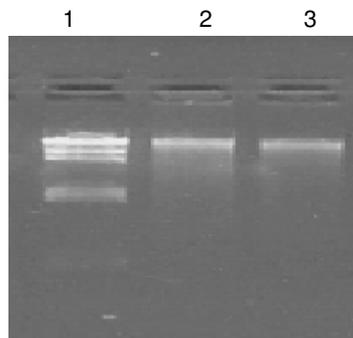


Figura 7- Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA extraído pelo método convencional, da cultura pura de *B. cereus* ATCC 10987. 1: λ Hind III, 2 e 3: *B. cereus*.

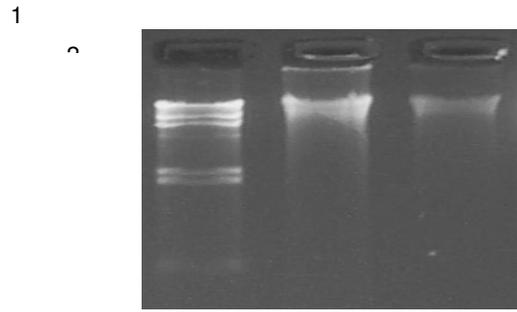


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA extraído pelo método convencional, da cultura pura de *M. luteus* ATCC 9341. **1:** λ Hind III, **2 e 3:** *M. luteus*.

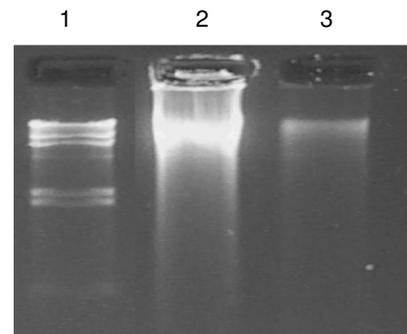


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA extraído pelo método convencional, da cultura pura de *R. equi* ATCC 33701. **1:** λ Hind III, **2 e 3:** *R. equi*.

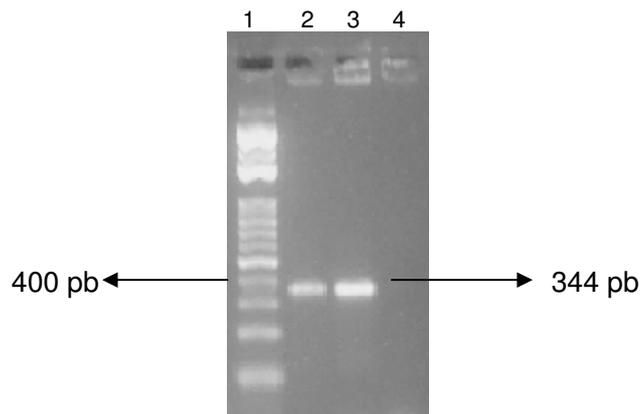


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *B. cereus* ATCC 10987 em cultura pura. **1:** Marcador de 100 pb; **2 e 3:** Amostra de *B. cereus*; **4:** Branco da reação.

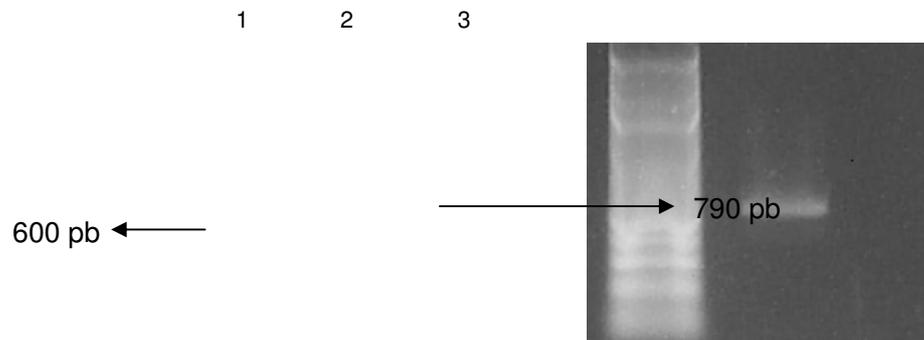


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *M. luteus* ATCC 9341 em cultura pura. **1**: Marcador de 100 pb; **2**: Amostra de *M. luteus*; **3**: Branco da reação.

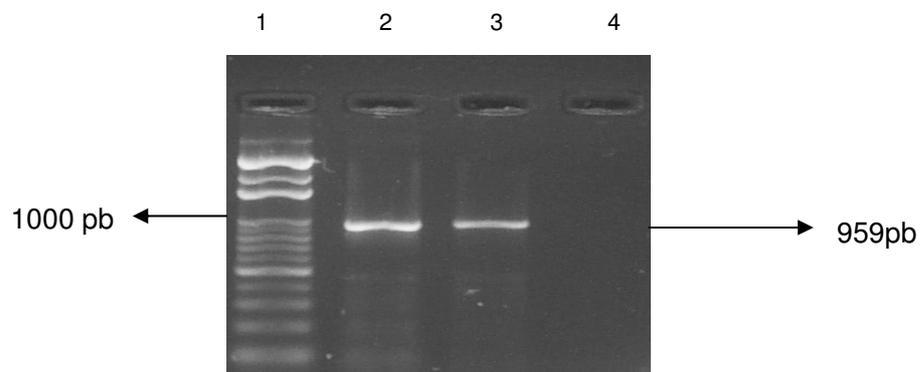


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *R. equi* ATCC 33701 em cultura pura. **1**: Marcador de 100 pb; **2 e 3**: Amostra de *R. equi*; **4**: Branco da reação.

5.4.1.1 CERTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO PRODUTO DE PCR

Para a clonagem foram utilizados 18,15 ng do produto de PCR purificado de *B. cereus*, 47,95 ng do produto de PCR purificado de *R. equi* e 39,5 ng do produto de PCR purificado de *M. luteus*.

5.4.1.2 TRANSFORMAÇÃO

A Figura 13 ilustra a seleção das colônias transformadas com o vetor previamente clonado com o produto de PCR. Para saber quais células possuíam o vetor ligado ao inserto, avaliou-se a coloração das colônias.

As colônias escolhidas foram aquelas que apresentaram coloração branca (a colônia de bactéria possui o plasmídeo que teve a enzima beta-galactosidase destruída). Outro importante instrumento utilizado na seleção das colônias foi o antibiótico. As bactérias utilizadas neste experimento não eram resistentes ao antibiótico ampicilina. Deste modo, apenas as bactérias possuindo plasmídeos em seu interior eram resistentes à ampicilina, crescendo na placa de seleção.

Foram selecionadas, portanto, duas colônias brancas de cada tratamento. Deste modo as etapas posteriores foram realizadas em duplicata.

5.4.1.3 PCR DE INSERTO

A partir das eletroforeses dos DNAs plasmidiais purificados de *B. cereus*, *M. luteus* e *R. equi* foi possível amplificar os insertos que apresentaram o tamanho esperado de 344 pb para *B. cereus*, 790 pb para *M. luteus* e 959 pb para *R. equi*, confirmando a clonagem (Figuras 14, 15 e 16).

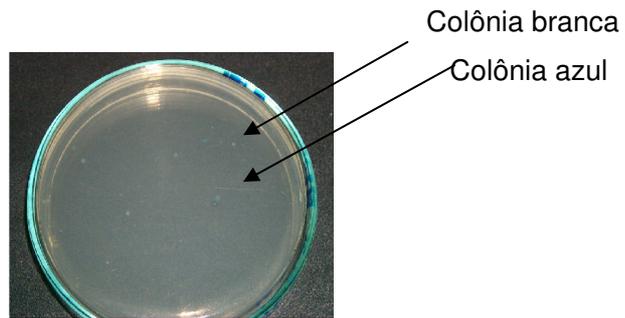


Figura 13 - Seleção das colônias transformadas com o vetor *pGem* previamente clonado com o produto de PCR.

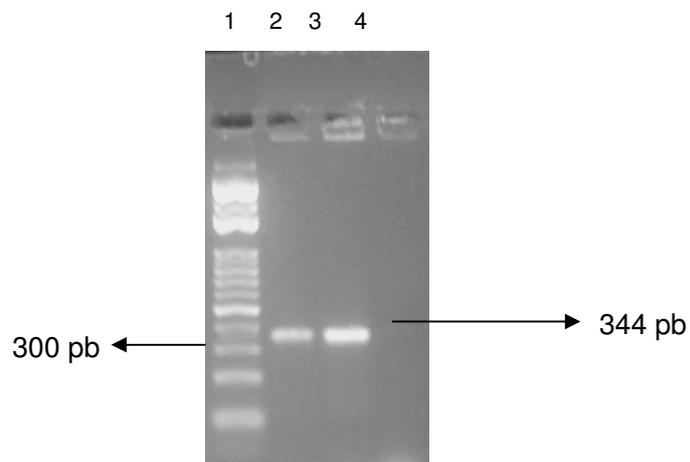


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR amplificado. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** Amostra de DNA de *B. cereus* ATCC 10987 em cultura pura; **3:** Produtos de PCR de cultura pura de *B. cereus*; **4:** Branco da reação.

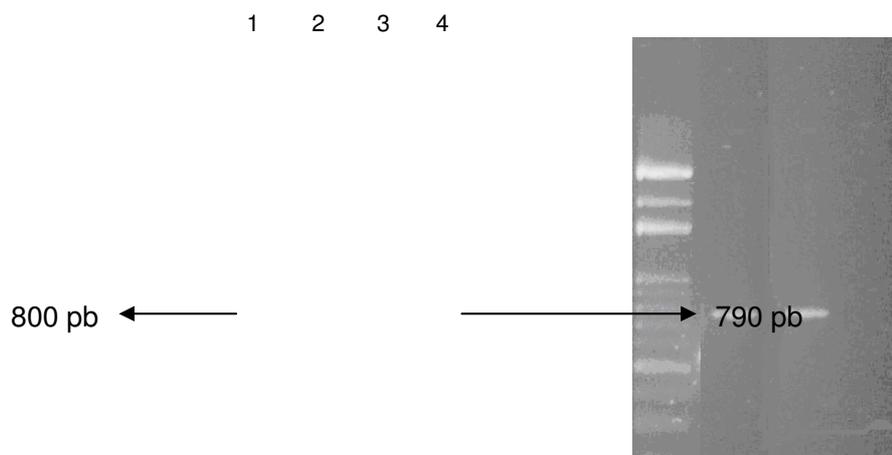


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR amplificado. **1:** Marcador de 100 pb; **2 e 3:** Produtos de PCR de cultura pura de *M. luteus*; **4:** Branco da reação.

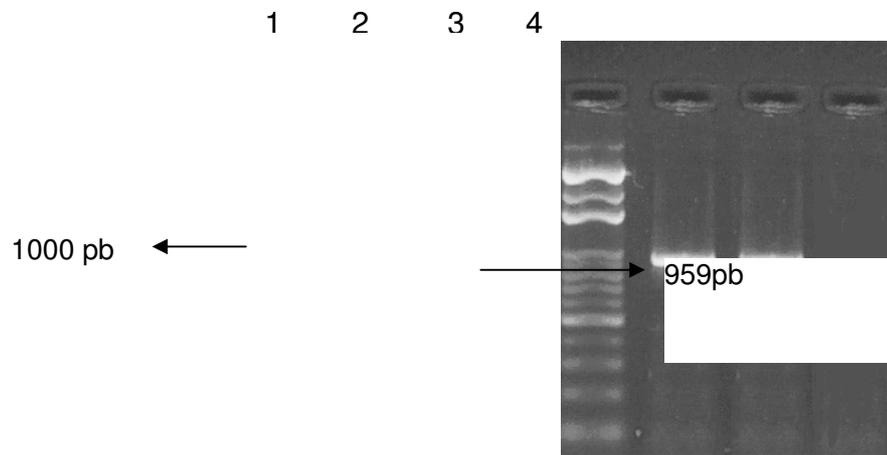


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR amplificado a partir do plasmídeo *Pgem* clonado. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** Controle positivo; **3:** Produtos de PCR de cultura pura de *R. equi*; **4:** Branco da reação

5.4.1.4 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

Os resultados da comparação, pelo Blastn e pelo Blastx, das seqüências obtidas com aquelas do banco de dados de NCBI estão apresentados na Tabela 6.

Verificou-se similaridade significativa ($E.value \leq 0,0$) e alta identidade (> 99%) para todas as seqüências obtidas.

Tabela 6 - Seqüências do banco de dados com alinhamento significativo, comparadas com seqüência de *B. cereus*, *Micrococcus luteus* e *R. equi* provenientes de cultura pura.

Fragmento (bases)	Número de acesso (GenBank)	Programa	Descrição	E value	Identidade máxima
344	AB190226.1	Blastn	<i>B. cereus</i> gyrB gene para gyrase B. cepa: ATCC 14579	0,0	99%
	GBAASO1480.1	Blastx	gyrB <i>Bacillus sp</i> H-03	5e ⁻³¹	99%
790	AB088764.1	Blastn	<i>M. luteus</i> genes 16S rRNA, 16S-23S ISR, 23S rRNA, seqüência parcial e completa. cepa: JCM3347	1e ⁻⁰⁶	100%
	GBAAF25430.1AF214783-1	Blastx	<i>recA</i> proteína	5e ⁻⁸	100%
959	AJ242746.1	Blastn	<i>R. equi</i> , gene corU1, choE, corD1 e corD2.	4e ⁻⁰⁵	100%
	EMBCAA85659.1	Blastx	hidroperoxidase II (HP II)	5e ⁻⁵	100%

6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR NOS PRODUTOS CONTAMINADOS PROPOSITAMENTE

Após a certificação da metodologia em cultura pura das bactérias, esta foi aplicada nos medicamentos de uso tópico adquiridos no comércio de Alfenas.

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam o gel de quantificação do DNA de *B. cereus*, *R. equi* e *M. luteus* recuperados de aciclovir, ácido fusídico e neomicina-bacitracina. Nota-se que os DNAs apresentaram qualidade e concentração satisfatória para a realização da PCR.

As imagens dos géis dos produtos de PCR dos microrganismos contaminantes adicionados aos cremes são mostradas nas Figuras 20 a 22. Observa-se que a identificação molecular foi positiva para as três bactérias.

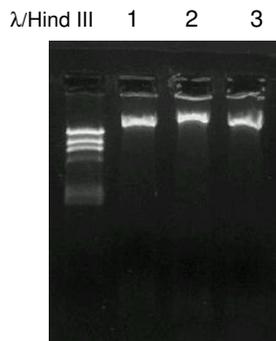


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA recuperado de ácido fusídico (1), neomicina-bacitracina (2), aciclovir (3), contaminados com *B. cereus* ATCC 10987.

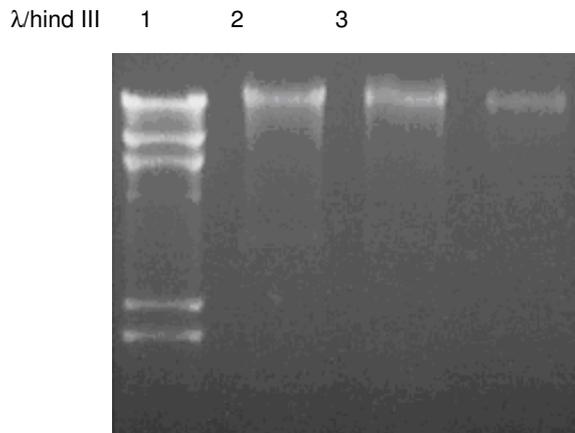


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA recuperado de ácido fusídico (1), neomicina-bacitracina (2), aciclovir (3), contaminado com *M. luteus* ATCC 9341

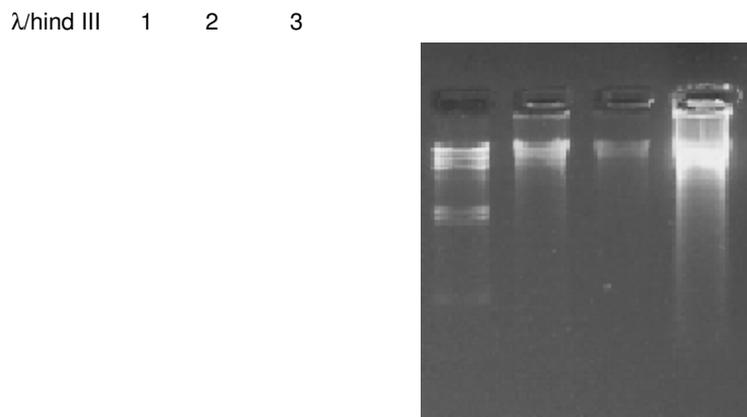


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, do DNA recuperado de ácido fusídico (1), neomicina-bacitracina (2), aciclovir (3), contaminado *R. equi* ATCC 33701

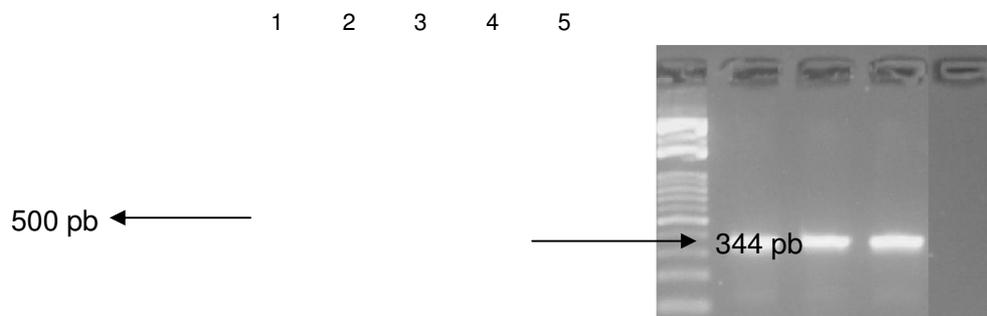


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *B. cereus* ATCC 10987, nos medicamentos contaminados propositadamente. 1: Marcador de 100 pb; 2: ácido fusídico, 3: neomicina-bacitracina; 4: aciclovir; 5: Branco da reação.

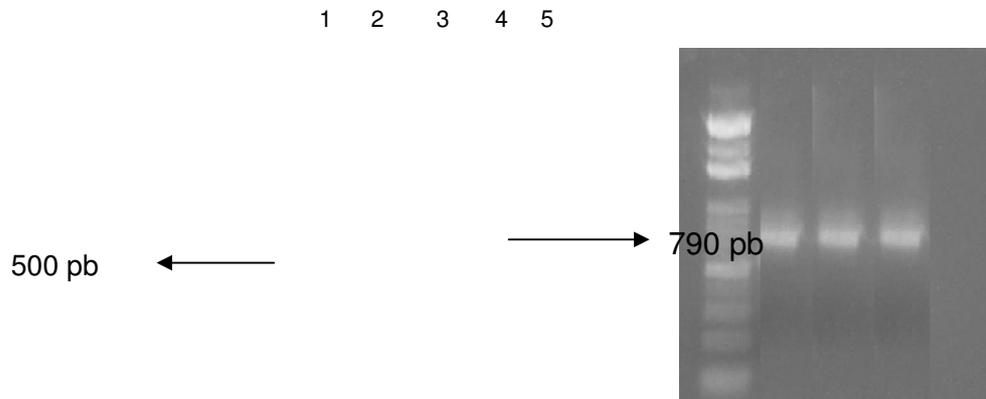


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *M. luteus* ATCC 9341, nos medicamentos contaminados propositadamente. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** ácido fusídico; **3:** neomicina-bacitracina; **4:** aciclovir; **5:** Branco da reação.

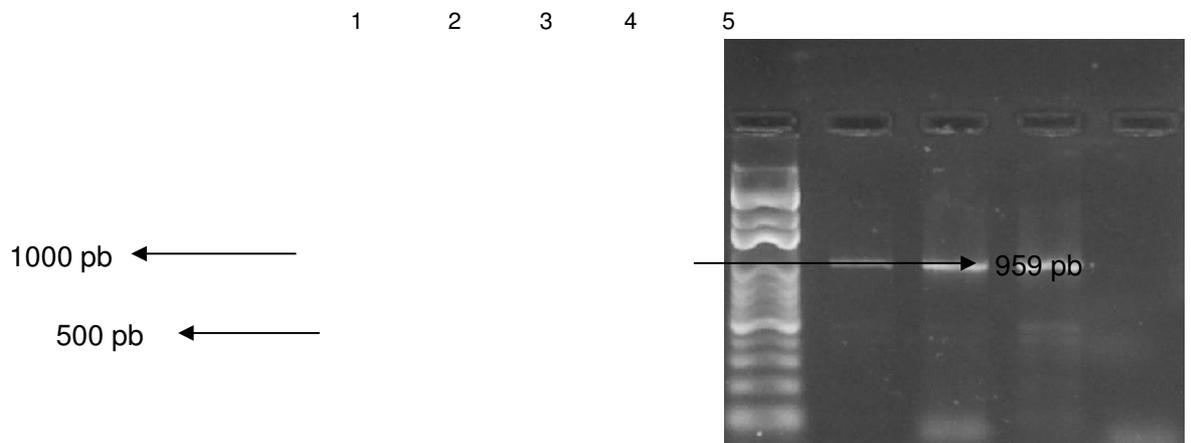


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, do produto de PCR referente à detecção de *R. equi* ATCC 33701, nos medicamentos contaminados propositadamente. **1:** Marcador de 100 pb; **2:** ácido fusídico; **3:** neomicina-bacitracina; **4:** aciclovir; **5:** Branco da r

7 PESQUISA DOS MICRORGANISMOS NOS CREMES EM EMBALAGEM ORIGINAL

Pela metodologia clássica não foram encontrados *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, o que pode ser explicado pelo produto ter sido aberto em condições assépticas e não estar em uso.

Através da PCR também não foi possível detectar nenhum patógeno convencional bem como nenhum dos três microrganismos em estudo, nos cremes em embalagem original.

8 DISCUSSÃO

No presente trabalho buscou-se avaliar a qualidade microbiológica de medicamentos tópicos empregados usualmente no tratamento de infecções da pele.

Inicialmente, procedeu-se à avaliação rotineira incluindo a contagem de microrganismos viáveis totais e a pesquisa e identificação de patógenos conforme determinado na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1988). Os testes realizados demonstraram que todas as amostras dos produtos analisados apresentaram padrão microbiológico satisfatório uma vez que o número de microrganismos viáveis totais encontrado (Tabela 2) está dentro do limite permitido para esse grupo de medicamento e também porque não foram encontrados patógenos bacterianos em nenhuma das amostras. Como foram empregadas amostras comerciais, os resultados obtidos nas análises de rotina simplesmente atestam a qualidade microbiológica satisfatória dos produtos analisados.

Entretanto, em função do possível emprego desses medicamentos por pacientes imunocomprometidos foi pesquisada também a presença de *M. luteus*, *R. equi* e *B. cereus*, os quais, recentemente, têm sido apontados como patógenos oportunistas, causadores de infecções de pele nesse grupo de pacientes (RABAGLIATI et al., 2005; MARCHIORI et al., 2006; KUWABARA et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2006).

Para essa pesquisa empregou-se também, inicialmente, método de identificação baseado em características morfológicas e bioquímicas desses microrganismos. Contudo, uma vez mais, nenhum dos microrganismos citados foi encontrado nas amostras analisadas. Porém, a presença destes em medicamentos foi detectada anteriormente (PALMIERI; CARITO; MEYER, 1988; MARTÍNEZ-BERMÚDEZ, 1991; OKEKE, LAMIKANRA, 2001).

Dado que a metodologia empregada rotineiramente no controle microbiológico de medicamentos e cosméticos inclui técnicas de contagem, isolamento e identificação dos microrganismos que, em geral utilizam métodos baseados nas características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos, e ainda são lentos,

nem sempre específicos, diferem pouco gênero e espécie e foram desenvolvidos para isolamento de microrganismos em amostras clínicas (CASEY et al., 1998), buscou-se também no presente trabalho a padronização e o uso de técnicas de biologia molecular como ferramenta alternativa para o controle de qualidade desses medicamentos.

O desenvolvimento e aplicação de metodologias rápidas, incluindo técnicas de biologia molecular nas áreas de análises clínicas e na indústria de alimentos têm obtido resultados altamente satisfatórios (HILL, 1996; IEVEN, GOOSENS, 1997). Entretanto, o desenvolvimento e a aplicação destas técnicas no controle de qualidade de medicamentos e cosméticos têm sido ainda pouco explorados (TANABE, 2007; SUNAKAWA, FARRELL, 2007). Nos últimos anos foram desenvolvidos importantes trabalhos que analisaram o emprego de técnica de biologia molecular no controle de qualidade microbiológico de medicamentos (JIMENEZ et al., 1999; JIMENEZ, SMALLS, IGNAR, 2000; JIMENEZ, 2001). Contudo, nesses trabalhos, foram pesquisados apenas os patógenos clássicos recomendados na legislação.

Para a avaliação de técnicas de biologia molecular na pesquisa dos patógenos emergentes analisados no presente trabalho, optou-se pela padronização destas colônias com cultura pura de cada um dos microrganismos pesquisados.

Para tanto, curvas de crescimento bacteriano foram desenvolvidas (Figuras 3, 4 e 5) permitindo a quantificação dos inóculos a serem ensaiados. Para fins de padronização dos testes, adotou-se a metodologia de se contaminar propositamente os produtos ensaiados com alíquotas de culturas puras mantidas no laboratório. Assim, cada um dos medicamentos utilizados foi contaminado de modo a permitir a extração de DNA bacteriano para a análise molecular.

Como demonstrado na análise quantitativa (Tabela 2), as amostras dos produtos analisados apresentam naturalmente um pequeno número de bactérias. Assim, para fins de padronização de inóculo, empregou-se para a contaminação das amostras com as cepas bacterianas, uma concentração de 70 UFC/g de produto. Vale dizer que a legislação brasileira, para esse tipo de produto farmacêutico, admite a presença de até 1000 UFC/g de bactérias viáveis (RDC nº 418 de 23/09/1999) excluindo-se os patógenos clássicos. Portanto, esses resultados demonstram que a técnica de PCR empregada na pesquisa dos patógenos oportunistas nesses

medicamentos, é capaz de detectar os microrganismos na concentração ensaiada. Contudo, Jimenez et al. (2000) conseguiram recuperar satisfatoriamente, níveis menores que 10 UFC/g de patógenos clássicos em matérias-primas e produtos acabados, demonstrando que novos estudos são necessários para se determinar qual a quantidade mínima das bactérias oportunistas avaliadas no presente trabalho pode ser detectada por essa técnica.

Patógenos clássicos ou oportunistas, não devem estar presentes em amostras farmacêuticas, por isso houve a necessidade de se realizar o enriquecimento das amostras, visto que estes microrganismos são mais comumente encontrados em alimentos e amostras biológicas (WHITE et al., 1989; GRAY, 2000; DE CLERCK et al., 2004). Além disto, durante a produção do produto farmacêutico, há processos para reduzir o número de microrganismos e o produto final contém, com frequência, conservantes que impedem o crescimento microbiano (ORTH et al., 1996; UNDERWOOD, 1998).

A identificação dos três patógenos oportunistas pela metodologia convencional foi satisfatória quando aplicada nas amostras farmacêuticas contaminadas propositalmente. Kloos e Musselwhite (1975), De Clerck et al. (2004), Rabagliati et al. (2005) já haviam utilizado essa metodologia para pesquisa de *M. luteus*, *B. cereus* e *R. equi* respectivamente, em alimentos. No presente trabalho, sem testes adicionais, os kits API 20[®] e API Coryne[®] (Biomerieux) foram capazes de identificar *B. cereus* e *R. equi* em 72 a 96 horas.

O preparo das amostras para a reação de PCR é um passo crítico da análise. Para determinar a eficiência do preparo de amostras para análise molecular, foram testados três métodos de extração de DNA. Para *B. cereus* e *R. equi*, todos os métodos ensaiados mostraram-se eficientes já que se obteve DNA íntegro (dados não mostrados) e de boa qualidade. Por se tratar de método facilmente reproduzível para a extração do DNA genômico, optou-se em adotar o tratamento com fenol-clorofórmio. Os resultados apresentados nas Figuras 5-7 mostram que com a utilização da metodologia de extração escolhida (fenol-clorofórmio), obteve-se DNA de boa qualidade quando comparado com o marcador λ /Hind III. Contudo, para *M. luteus*, melhores resultados na extração do DNA genômico somente foram observados quando, no método fenol-

clorofórmio, aumentou-se a quantidade do tampão de lise (TENTS) [Figura 4, coluna 4]. Diferenças na estrutura das células entre as diferentes espécies podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com a maior resistência de *M. luteus* em relação à quantidade de tampão de lise necessário para o rompimento das células. Estudo com cepas de *Cryptococcus neoformans* mostrou que a presença de cápsula dificulta a extração de DNA sendo necessário uso de variação do método de extração (TERCETI et al., 2006).

A aceitação de metodologias inovadoras em análise microbiológica é facilitada quando sua execução oferece vantagens em relação às metodologias convencionais. Podem ser considerados facilitadores na aceitação de uma dada metodologia: a facilidade de sua execução, o simples, porém efetivo preparo de amostras, o tempo gasto no desenvolvimento da metodologia, o custo da análise e a obtenção de resultados mais específicos que os métodos convencionais, sem comprometimento da eficácia do resultado (VAN DER ZEE, HUIS IN'T VELD, 1997). No presente trabalho quando comparadas as metodologias convencional e molecular, nota-se claramente que a segunda apresenta grande vantagem em relação à primeira uma vez que o tempo necessário para a correta identificação dos patógenos foi reduzida de cerca de 72-96 horas para apenas 27 horas. A economia de tempo é fator desejável na indústria farmacêutica, pois o crescente desenvolvimento de produtos farmacêuticos requer metodologia mais rápida para fins de controle de qualidade e evolução da performance da produção (JIMENEZ et al., 2000).

Os resultados obtidos a partir de cultura pura para detecção de *M. luteus*, *R. equi* e *B. cereus* por PCR demonstram a eficácia da metodologia utilizada na identificação desses microrganismos (Figuras 8-10). Pode-se concluir também que os iniciadores utilizados neste trabalho (*BC1* e *BC2* para *B. cereus*; *COX-F* e *COX-R* para *R. equi* e *ML-ISR-R* e *ML-ISR-F* para *M. luteus*), mostraram-se adequados para a identificação das cepas pesquisadas, visto que as seqüências complementares de tais iniciadores foram encontradas em todas as amostras contaminadas propositadamente. Este fato é importante, pois se sabe que a aplicação rotineira da PCR requer um marcador específico para cada microrganismo e que ele seja altamente conservado em todas as cepas desta espécie (LANDRÓN et al., 2003). Embora esses iniciadores

tenham sido empregados anteriormente na identificação destes microrganismos em diferentes materiais (MOUNIER et al., 2005; DE CLERCK et al., 2004; HAGA et al., 2003), este trabalho mostra, pela primeira vez, que é possível se realizar a identificação destas bactérias por método molecular, em produtos farmacêuticos.

Pode-se notar, ainda, que o método molecular mostrou 100% de correlação com o método convencional em relação à identificação das espécies, pois foi possível recuperar e identificar as bactérias adicionadas propositalmente aos cremes em ambas às metodologias. Em adição, o seqüenciamento dos produtos de PCR obtidos e a posterior análise das seqüências obtidas com auxílio das ferramentas Blastn e Blastx, validam o método e demonstram claramente a alta especificidade da técnica molecular utilizada.

Pela metodologia convencional ou pela molecular, não foi possível detectar a presença de patógenos (clássicos ou oportunistas), nas amostras em suas embalagens originais. Esse fato pode ser explicado, principalmente, em função do tipo de produto analisado (farmacêutico), pois rotineiramente, tais produtos são submetidos a rigoroso controle de qualidade durante sua fase de produção e ainda, pelo fato de que as amostras analisadas foram ensaiadas em condições assépticas. Entretanto, estudos posteriores empregando medicamentos que já se encontrem em uso por pacientes em tratamento, poderão revelar, com auxílio do método molecular aqui padronizado, a presença dos patógenos oportunistas pesquisados neste trabalho, ou de outros patógenos que se deseje pesquisar, sendo necessário, neste último caso, o uso de iniciadores específicos.

9 CONCLUSÕES

- O método molecular (PCR) é aplicável na detecção de *B. cereus*, *R. equi* e *M. luteus* em amostras farmacêuticas.
- A PCR é capaz de detectar esses microrganismos quando sua quantidade nas amostras for de pelo menos 70 UFC/g de produto.
- O método molecular identifica os microrganismos em aproximadamente 27 horas, enquanto o método convencional requer 72-96 horas para obter-se o mesmo resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2005. 580 p.

ABDELAZIZ, A. A. et al. Microbial contamination of cosmetics and personal care items in egypt-eye shadows, mascaras and face creams. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 14, n. 1, p. 21-28, 1989.

AIDS. Disponível em <<http://www.abcd aids.com.br.htm>>. Acesso em: 03 jun. 2007a.

AIDS. Disponível em <<http://www.aidsportugal.com/article.php>>. Acesso em: 24 maio 2007b.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/trabalhos/bol_prod_farma>. Acesso em: 28 maio 2007.

ANVISA. **Portaria MS nº 518**, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jun. 2007.

ANVISA. **Resolução nº 481** de 23/09/99. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme anexo desta resolução Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jun. 2007.

BALINT, G. A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus acquired immunodeficiency syndrome. **Pharmacol. Therap.**, v. 89, p.17-27, 2001.

BALL, S. C.; SEPKOWITZ, K. Infection due to *Bacillus cereus* in an injection drug user with aids: bacteremia without morbidity. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 1, p. 216-217, 1994.

BEHRAVAN, J. et al. Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in iran. **J. Dermatol.**, v. 44, p. 482-485, 2005.

BELL, K. S. et al. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microb.**, v. 23, p. 72-74, 1996.

BLOOMFIELD, S. F. et al. Microbial quality assurance in pharmaceuticals. **Cosm. Toilet.**, p. 222, 1988.

BENENSON, A. S. **Control of communicable diseases manual**, Washington DC: Amer. Pub. Heal. Assoc., 1995.

BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res.**, v. 1, p. 221-224, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Disponível em: <<http://www.ministeriodasaude.gov.htm>> Acesso em: 28 maio 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.ministeriodasaude.com.br>_Acesso em: 02 jun. 2007.

BRAZZOLA, P. et al. *Brevibacterium casei* in a 18-year-femal with Aids. **J. Clin. Microbial.**, v. 38, n.9, p. 3513-3514, 2002.

CALLEGAN, M. *Bacillus cereus* endophthalmitis, 1998. Disponível em:<<http://www.bacilluscereus-endophthalmitis.htm>>. Acesso em: 28 maio 2007.

CAPDEVILA, J. A. et al. *Rhodococcus equi* pneumonia in patients infected with the human immunodeficiency virus. Report of 2 cases and review of the literature. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 29, n. 6, p.535-541, 1997.

CASEY, W. et al. Use of nonselective preenrichment media for the recovery og enteric bacteria from pharmaceutical products. **Pharm. Technol.**, v. 22, p. 114-117, 1998.

CASTAGNOLA, E. et al. Broviac catheter-relates bacteraemias due to unusual phatogens in children with cancer: Case reports with literature review. **J. Infection**, v. 14, p.1082-1085, 1997.

CHEMLAL, K. *Bacillus cereus* meningitis in a patient with human immunodeficiency virus infection. **Ann. Med. Interne.**, v. 146, n. 7, p. 522-524. 1995.

CHEQUER, W. O. et al. Impacto da terapia anti-retroviral, 2001. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br.htm>>. Acesso em: 28 maio 2007.

COOPER, M.S. (Ed.) **Quality control in the pharmaceutical industry**. New York: Academic Press, 1979. 245 p.

CORREA, H. L.; GIANESI I. G. N. **Just in time, MRPII e OPT**: um enfoque estratégico. São Paulo: Atlas, 1994. 186 p.

CROTCHFELT, K. A. et al. Detection of *Neisseria Gonorrhoeae* and *Chlamydia Trachomatis* in genitourinary specimens from men and women by a coamplification PCR assay. **J. Clin. Microbiolol.**, v. 35, p. 1536–1540, 1997.

DE CLERCK, E. et al. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. **App. Environ. Microb.**, v. 70, n. 6, p. 3664-3672, 2004.

DENYER, S. P. Clinical consequences of microbial action on medicines. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N. **Biodeterioration.**, v. 7, p. 146-151. 1988.

DENYER, S. P.; BAIRD, R. M. **Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices**. Taylor e Francis, 2 ed.,2006. 608 p.

DESVIGNES, A. et al. Etude de la contamination microbienne de diverses preparations pharmaceutiques. **Ann. Pharm.**, v. 31, p. 775-785, 1973.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas 2005/2006. 29. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2006.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo : Atheneu, 1998.

FERNANDEZ, S. et al. Recovery of CD4+ T cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes. **J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.**, v. 41, n. 1, p. 1-5, 2006.

FERNANDEZ-RIAL, A. et al. Cavitory lung lesion due to *Rhodococcus equi*: as first manifestation of HIV-L infection. **Eur. J. Internal. Med.**, v. 14, p. 159, 2003.

FUNKE, G.; CARLOTTI, A. Differentiation of *Brevibacterium* ssp. in clinical sepsis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1729-1732, 1994.

GANIR, E. M. et al. Treatment of atopic dermatitis in children: the importance of skin care and environmental control. **Acta. Paediatr. Jpn.**, v. 38, n. 6, p. 702-704, 1996.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GOLUB, B. et al. Lung abscess due to *Corynebacterium equi*-report of the first case in patients with acquired immune deficiency syndrome. **Am. J. Med.**, v. 80, p. 685-688, 1986.

GRAY, J. et al. *Rhodococcus equi* and HIV-1 infection in uganda **J. Infection.**, v. 41, p. 227-231, 2000.

GRUNER, E.; PFYFFER, GRAEVENITZ, A. Caracterization of *Brevibacterium* ssp. in clinical sepsis. **J. Microbiol.**, v. 31, p. 1408-1412, 1993.

HAGA, S. et al. Strutral analysis and genetic variation of the 16S-23S rDNA internal spacer region from *Micrococcus luteus* strains. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 314-318, 2003.

HALL, N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. **J Exp. Biol.**, v. 210, p. 1518-1525, 2007.

HENEGARIU, D. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **BioTech.**; v. 23, n. 3, p. 504-511,1997.

HILL, W. E. The polymerase chain reaction: application for the detection of foodborne pathogens. **Crit. Rev. Food Sci. Nutri.**, v. 36, p. 123-173,1996.

HOFFMAN, N. et al. HIV therapy, 2005. Disponível em: <<http://www.HIVmedice.com.htm>>. Acesso em: 03 jun. 2007.

HULSEWE-EVERS, H. P. M. G HIV-infected patient with A *Rhodococcus equi* pneumonia. **Neth. J. Med.**, v. 57, p. 25–29, 2000.

IEVEN, M.; GOOSENS, H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 242-256, 1997.

ITIN, P. H. et al. Cutaneous manifestation of *P. lilacinus* infection induced. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 39, n. 3, p. 401-409, 1998.

JIMENEZ, L. et al. Molecular detection of bacterial indicators in cosmetic/pharmaceutical and raw materials. **J. Ind. Microb. Biotech.**, v. 22, p. 93-95, 1999.

JIMENEZ, L. Molecular diagnosis of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical products: a review. **J. AOAC Intern.**, v. 84, n. 3, p. 671-675, 2001.

JIMENEZ, L.; SMALLS, S.; IGNAR, R. Molecular detection of bacterial indicators in cosmetic/pharmaceutical samples. **J. Ind. Microb. Biotech.**, v. 21, p. 93-95, 2000.

JURAN, J. M. **Planejando para qualidade**. São Paulo: Pioneira, 1990. 394 p.

KAMBOJ, M.; KAIRA, A.; KAK, V. *Rhodococcus equi* brain abscess in a patient without HIV. **J. Clin. Pathol.**, v. 58, n. 4, p. 423-425, 2005.

KERR, T. Measuring adherence to highly active antiretroviral therapy: implications for research and practice. **Curr. HIV Res.**, v. 2, n. 4, p. 200-205, 2005.

KLOOS, E. W.; MUSSELWHITE M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Appl. Microbiol.**, v. 30, n. 3, p. 381–395, 1975.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, ed. 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KUWABARA, H. et al. Cord blood transplantation after successful treatment of brain abscess caused by *Bacillus cereus* in a patient with acute myeloid leukemia. **Rinsho Ketsueki.**, v. 47, n. 11, p. 1463-1468, 2006.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **The theory and practice of industrial pharmacy**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 855 p.

LANDRÓN, N. et al. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. **J. Clin. Microb.**, v. 41, n. 7, p. 3241-3245, 2003.

LE SCANFF, J. et al. Necrotizing gastritis due to *Bacillus cereus* in an immunocompromised patient. **Infection**, v. 34, n. 2, p. 98-99, 2006.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: two “coryneform” bacteria increasingly recognized as agent of human infection. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, p. 145-153, 1997.

LINTER, K.; GENET, V. A physical method for preservation of cosmetic products. **Int. J. Cosmet. Sc.**, v. 20, p. 103-115, 1998.

MACEDO, J. A. **Métodos laboratoriais: análises físico-químicas e microbiológicas**. 3. ed. Belo Horizonte: CRQ, 2005. 601 p.

MAKI, D.G. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. **American Society for Microbiology**, p. 155-212, 1994.

MALCON, S. The survival of bacteria in toiletries. **Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes**, v. 5, p. 305-314, 1976.

MARCHIORI, E. et al. *Rhodococcus equi* infection in acquired immunodeficiency syndrome. computed tomography aspects. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 5, p. 405-409, 2006.

MARK, H.; BEERS, M. D.; ROBERT BERKOW, M. D. The Merck manual of diagnosis and therapy. 17. ed. section 13, chapter 163, 1999. Disponível em: <<http://www.merck.com>>. Acesso em: 28 maio 2007.

MARKOWITZ, M. Inibidores da protease: o que eles são como funcionam, quando usá-los. **International Association of Physicians in Aids Care**, 1996. Disponível em: <<http://www.iapac.org>>. Acesso em: 20 maio 2007.

MARTINÉZ-BERMUDÉZ, A. et al. Tipos de contaminantes microbianos de matérias primas farmacêuticas. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v. 33, p. 153-157, 1991.

MATTOS, S. L.; SANTOS, V. R.; FERREIRA, E.F. Prevalence of mucosal lesions in HIV infected patients at the specialized reference center for infectious and parasitic diseases (Belém-Pará-Brasil). **Rev. Bras. Patol. Oral**, v. 3, n. 1, p. 7-16, 2004.

MCCAUGHEY, C.; DAMANI, N. N. Central venous line infection caused by *Brevibacterium epidermidis*. **J. Infect.**, v. 23, n. 2, p. 211-221, 1991.

MOUNIER, J. et al. Surface microflora of four smer-ripened cheeses. **Appl. Envir. Microb.**, v. 71, n. 11, p. 6489-6500, 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. Opportunistic infections and other complications of AIDS. Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/daids/therapeutics/geninfo/geninfo.htm>>. Acesso em: 03 jun. 2007.

NEVES, R. A. et al. Herpes zoster peripheral ulcerative keratitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Cornea**, v. 15, n. 5, p. 446-450, 1996.

O'DAY, D. M. et al. The problem of *Bacillus* species infection with special emphasis on the virulence of *B. cereus*. **Ophthalmology**, v. 88, p. 833-838, 1981.

OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in tropical developing country. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, p. 922-928, 2001.

OKSTAD, O. A. et al. The *bc1* DNA repeat element is specific to *Bacillus cereus* group and exhibits mobile element characteristics. **J. Bact.**, v. 186, n. 22, p. 7714-7725, 2004.

ONYANCHA, O. B.; OCHOLLA, D. N. An informetric investigation of the relatedness of opportunistic infections to HIV/AIDS. **Infor. Proces. Manag.**, v. 41, p. 1573-1588, 2005.

ORTH, D. S. Microbiological considerations in cosmetic formula development and evaluation: microbiological quality of a product. **Cosmet. Toilet.**, v. 104, p. 49-64, 1989

ORTH, D. S.; DUMATOL, C.; ZIA, S. House organisms, dealing with the bug in the plants. **Cosmet. Toilet.**, v. 111, p. 59-70, 1996.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: medicamentos utilizados en las enfermedades de transmisión sexual y la infección por el HIV**. Ginebra: OMS, 1998. p. 33-40.

PALMIERI, M. J.; CARITO, S. L.; MEYER, R. F. Comparison of rapid NFT and API 20E with conventional methods for identification of gram negative nonfermentative bacilli from pharmaceuticals and cosmetics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 2838-3241, 1988.

PEIXOTO JUNIOR, M. M. et al. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA. **Revista Pharmacia Brasileira**, Brasília, ano 9, n. 47, mar./abr./maio, p. 69-73, 2005.

PETRICK, I. K.; PÄRSCH, J. I. **MERCK – microbiology manual**, 1994, 407 p.

PINNA, A. et al. *Bacillus cereus* keratitis associated with contact lens wear. **Amer. Acad. Ophthal.**, v. 108, n. 10, p. 1830-1834, 2001.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

RABAGLIATI, B. et al. Pneumonia cavitada por *Rhodococcus equi* em paciente imunocomprometido no infectado por virus de imunodeficiencia humana. Caso clínico y revisión. **Rev. Chil. Infect.**, v. 22, n. 2, p.155-160, 2005.

REINERT, R. R. et al. Recurrent bacteremia due to *Brevibacterium casei* in an immunocompromised patient. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, p. 1082-1085, 1995.

ROWAN, N. J.; ANDERSON, J. G. Growth and enterotoxin production by diarrhoeagenic *Bacillus cereus* in dietary supplements prepared for hospitalized HIV patients. **J. Hosp. Infec.**, v. 38, p. 139-146, 1998.

ROZSYPAL, H. et al. *Rhodococcus equi* infection in subjects infected with human immunodeficient virus (HIV). **Cas Lek Cesk**, v. 146, n. 2, p. 163-167, 2007.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G. A. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**, 1982. 653 p.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001 v. 1, p. 999.

SANTORO, M. I. R. M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1988, 122p.

SANTOS, N. S. O. et al. **Introdução a virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SECCHI, C. et al. Bacteremia por *Rhodococcus equi* em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, 2006.

SGQ CONSULTORIA. ISO 9001-2000: Um modelo para gestão do negócio. Disponível em <<http://www.iso9000.com.br/publica0.htm>>. Acesso em: 28 maio 2007.

SMEENK, G.; SEBENS, F. W.; HOUWING, R. H. Use and adverse reactions of local antibiotics and disinfectants on the skin. **Ned. Tijdschr. Gen.**, v. 143, n. 22, p. 1140-1143, 1999.

SMITH, K. J. et al. Micrococcus folliculitis in HIV. **Brit. J. Dermat.**, v. 141, p. 558-561, 1999.

SPENCE, R. A. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. **Science**, v. 267, p. 988, 1995.

SUGENG, M. W. et al. Characteristics of bacterial skin infections in children compared to adults at a tertiary dermatologic center. **Int. J. Dermatol.**, v. 38, n. 8, p. 582-586, 1999.

SUNAKAWA, K.; FARRELL, D.J. Mechanisms, molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 6, n. 1, p. 3, 2007.

SZCZERBA, I. Gram-positive Cocci as an opportunistic infection factor. **Pol. Merkur. Lekarski.**, v. 18, n. 106, p. 462-464, 2005.

TANABE, S. et al. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 71, n. 7, p. 1663-1667, 2007.

TERCETI, M. S. et al. Diagnóstico molecular de *Pseudomonas aeruginosa* contaminante de creme lanete. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 21, 2006. **Anais...**, Águas de Lindóia, 2006.

TERCETI, M. S. et al. Detecção molecular de *Escherichia coli* contaminante em creme lanete e creme não iônico. In: SEMANA DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 3, 2006. **Anais...**, Alfenas-MG, 2006.

TERCETI, M.S. et al. Utilização da PCR na detecção de *Salmonella* sp. em creme lanete. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DE ALFENAS (Jica), 12, 2006. **Anais...**, Alfenas-MG, 2006.

TREMEWAN, H. C. Tetanus neonatorum in New Zealand. **N. Z. Med. Jour.**, v. 45, p. 312-312, 1991.

TREVEJO, R. T. et al. Important emerging bacterial zoonotic infections affecting the immunocompromised. **Vet. Res.**, v. 36, p. 496-506, 2005.

UNAIDS AIDS epidemic update 2006. Disponível em: <<http://www.unaids.org>>. Acesso em: 03 jun. 2007.

UNDERWOOD, E. Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry. In: HUGO, W. B. **Pharmac. Microb.**, 6 ed. Oxford: Blackwell, 1998. p. 339-354.

VAN DER ZEE, H.; HUIS IN'T VELD, J. H. H. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. **J. AOAC Int.**, v. 80, p. 934-940, 1997.

West Penn Allegheny Health System for Patients and public Health). Disponível em:<[http://www.asri.edu/patients/health/index.cfm?hera=5A\\$zeus=5A03\\$htop=true](http://www.asri.edu/patients/health/index.cfm?hera=5A$zeus=5A03$htop=true)> Acesso em: 03 jun. 2007.

WHITE, W.; NIVEN, L.; BELL, N.D.S. Microbial growth in small-volume pharmaceuticals. **J. Parent. Sci. Technol.**, v. 43, n. 5, p. 208-212, 1989.

WILKINSON, J. D. Fusidic acid in dermatology. **Br. J. Dermatol.**, v. 139, supl. 53, p. 37-40, 1998.