

HAROLDO LUIZ JORDELINO DA LUZ

**ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE BACTEREMIA PELO STREPTOCOCCUS BOVIS
EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

JOINVILLE

2009

HAROLDO LUIZ JORDELINO DA LUZ

**ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE BACTEREMIA PELO STREPTOCOCCUS BOVIS
EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Saúde e Meio Ambiente da
Universidade da Região de Joinville,
como requisito parcial para obtenção
do grau acadêmico de Mestre.**

**Orientador: Professor Doutor Mauro
de Souza Leite Pinho**

**Co-orientador: Professor Doutor
Paulo Condeixa de França**

JOINVILLE

2009

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

L979a Luz, Haroldo Luiz Jordelino da
Análise da incidência de bacteremia pelo streptococcus bovis em pacientes com câncer colorretal / Haroldo Luiz Jordelino da Luz; orientador Dr. Mauro de Souza Leite Pinho – Joinville: UNIVILLE, 2009.

75f. : il. ; 30 cm

Orientador: Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente –
Universidade da Região de Joinville)

1. Streptococcus bovis. 2. Câncer colorretal. 3. Bacteremia. 4 Saúde e Meio ambiente - Dissertação - Mestrado. I. Pinho, Mauro de Souza Leite. II. Título.

CDD 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, por me fazerem reaprender aquelas coisas boas da infância e da adolescência que esquecemos com o passar dos anos.

À minha amada esposa Alessandra, pelo companheirismo, compreensão, amizade e amor, sem os quais nada disso seria possível

Aos meus pais Zelinda e Haroldo, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Doutor Mauro de Souza Leite Pinho, Professor da Disciplina de Anatomia e da Disciplina de Clínica Cirúrgica da Universidade da Região de Joinville – Univille, preceptor da residência médica em Coloproctologia do Hospital Municipal São José, Joinville/SC. Consagrado coloproctologista, bom amigo e dileto orientador, cujo apoio e humildade me fizeram acreditar na cátedra e em “ser” médico.

Ao Professor e Doutor Paulo Henrique Condeixa de França, Professor da Universidade da Região de Joinville – Univille, pela amizade, paciência, co-orientação e participação essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor e Doutor Ricardo Lemos, médico, cirurgião do aparelho digestivo, preceptor da residência médica em Cirurgia Geral do Hospital Municipal São José, Joinville/SC e Professor Coordenador da Disciplina de Clínica Cirúrgica da Universidade da Região de Joinville – Univille, companheiro na elaboração da cadeira de Gastroenterologia, irmão, por compartilharmos dos mesmos princípios fraternais.

À Professora Lúcia Martins Teixeira, pela colaboração essencial no fornecimento das amostras de *S. bovis*.

À bióloga Leslie Ecker Ferreira, pesquisadora da Universidade da Região de Joinville – Univille, pela amizade e participação ativa na pesquisa da biologia molecular.

Às estagiárias e bolsistas do Laboratório de Saúde I da Univille, pelo imenso apoio e participação essencial na pesquisa da biologia molecular.

À Direção do Centro Hospitalar Unimed de Joinville/SC, pela permissão em coletar amostras de sangue e realizar as hemoculturas nas suas dependências.

Às Direções dos Hospitais São José e Hans Dieter Schmidt em Joinville/SC, pela permissão em coletar amostras de sangue.

À Universidade da Região de Joinville (Univille) pela oportunidade de ingressar na docência, freqüentar o Programa de Pós-Graduação em Nível de

Mestrado em Saúde e Meio Ambiente e permitir utilização de seus laboratórios no desenvolvimento desta pesquisa.

LISTA DE APÊNDICES

- A. Ficha Cadastral dos Pacientes
- B. Termo de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE ANEXOS

- A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Univille
- B. Aprovação da aplicação da pesquisa no Centro Hospitalar Unimed
- C. Procedimento padrão de coleta de hemoculturas no Centro Hospitalar Unimed de Joinville
- D. Técnica de eletroforese em gel de agarose praticada no Laboratório de Biologia Molecular da Univille
- E. Extração/Purificação de DNA Genômico Microbiano com emprego de Lisozima a partir de cultura em meio sólido - Laboratório de Biologia Molecular da Univille, Joinville
- F. Extração/Purificação de DNA Genômico Microbiano de amostra clínica com emprego de Lisozima - Laboratório de Biologia Molecular da Univille, - Joinville
- G. Certificado e identificação das cepas de *S. bovis* provenientes do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ

LISTA DE TABELAS

1. *Streptococcus bovis* e câncer colorretal
2. Sexo e frequência dos pacientes
3. Reagentes para PCR utilizados na pesquisa
4. Ciclagem térmica
5. Resultados das hemoculturas e PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Reação em cadeia de polimerase
2. Eletroforese em gel de agarose
3. (A) Pesquisa de seqüências gene *SodA* no “GenBank”
(B) Definição de seqüências “consenso” do Grupo *S. bovis*.
4. Programa Primer3 para geração e simulação de primers compatíveis.
5. Programa BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) para pesquisa de similaridade.
6. Frasco do sistema de detecção microbiana BacT /ALERT® da BIOMÉRIEU,INC. usado para hemocultura
7. Frasco estéril para biologia molecular
8. Incubadora automática BacT/Alert® 120 para hemoculturas
9. Cuba para eletroforese em gel de agarose
10. Transiluminador MiniBis Pro da Bio-Imaging Systems
11. Detecção das cepas padrão pelos *primers* planejados
12. Teste dos *primers* planejados: 1) detecção cepa *S. bovis*,
2) sangue periférico humano colonizado por *S. bovis* e
3) sangue periférico humano não colonizado
13. Detecção de *S. bovis* pelos *primers* de Sasaki et al.(2004).
14. Detecção de *S. bovis* pelos *primers* planejado de acordo com a concentração de DNA
15. Comparação da capacidade de detecção dos *primers* planejados (1,2 e 3) e *primers* Sasaki et al.(4,5 e 6).

LISTA	DE	ABREVIATURAS	E	SÍMBOLOS
A		Adenina		
ATCC		American Type Culture Collection		
BLAST		<i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i>		
pb		Par de Bases		
C		Citosina		
CCUG		Culture Collection University of Göteborg		
CLSI		<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>		
CO ₂		Gás carbônico		
DNA		Ácido Desoxirribonucléico		
dNTPs		Trifosfatodesoxinucleotídeos		
<i>E. coli</i>		<i>Escherichia coli</i>		
EDTA		<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>		
EUA		Estados Unidos da America		
Ferm.		Fermentação		
G		Guanina		
Glucu.		Glucuronidase		
h		Hora		
HCl		Ácido Clorídrico		
Hidrol.		Hidrolise		
IMPPG		Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes		
min.		Minutos		
mL		Mililitro		
mM		Milimolar		
<i>mRNA</i>		RNA mensageiro		
NY		New York		

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PYR	pyrrolidonyl-aminopeptidase
RNA	Ácido Ribonucléico
<i>rpm</i>	Rotação por Minuto
rRNA	RNA ribossômico
SOD	Superoxido dismutase
SodA	Gene regulador da enzima superóxido Dismutase manganês dependente
SodAint	Segmento interno do gene regulador da enzima superóxido dismutase manganês dependente
<i>S.bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
tRNA	RNA transportador
T	Timina
Taq	DNA polimerase Enzima DNA polimerase de <i>Thermus Aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
T _m	temperatura média de hibridização
Tris	<i>Triethylammonium</i>
U	Unidade
Univille	Universidade da Região de Joinville
U	Uracila
° C	Grau Celsius
Kg	Kilograma
™	Marca Comercial
®	Marca Registrada
µg	Micrograma

μL

Micro litro

%

Por Cento

RESUMO

Uma íntima associação entre a bacteremia pela bactéria *Streptococcus bovis* e o câncer colorretal tem sido demonstrada por vários autores há mais de trinta anos. A partir destes estudos, estima-se que 25% a 80% dos pacientes portadores de endocardite bacteriana pelo *S. bovis* apresentam concomitantemente tumores colorretais, incluindo desde neoplasias benignas como adenomas até adenocarcinomas invasivos. Alguns autores sugerem a ocorrência de uma bacteremia silenciosa por *S. bovis* em pacientes portadores de tumores colorretais, mas nenhum estudo foi realizado até o momento para analisar esta hipótese. A detecção de segmentos específicos de DNA bacteriano tem sido utilizada em microbiologia como alternativa à cultura convencional para aumentar a sensibilidade diagnóstica. OBJETIVOS: Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um par de iniciadores (primers) capazes de amplificar o DNA do *S. bovis* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e analisar a hipótese de que os indivíduos portadores de carcinoma colorretal apresentam a ocorrência de bacteremia por este microorganismo. MÉTODOS: Foi desenvolvido e testado um par de primers capaz de amplificar um fragmento interno do gene *sodA* do *S. bovis*. Posteriormente, foram colhidas amostras de sangue de 30 pacientes portadores de câncer colorretal as quais foram analisadas para a presença de *S. bovis* através de pesquisa por PCR e por hemocultura automatizada. RESULTADOS: Os primers específicos para *S. bovis* mostraram-se adequados e confiáveis para o estudo proposto. Não foi identificada a presença de *S. bovis* nas amostras de sangue de pacientes por ambos os métodos utilizados. CONCLUSÃO: A ausência de positividade no presente estudo não confirma a hipótese da existência de uma bacteremia silenciosa em pacientes portadores de tumores colorretais.

Palavras-chave: câncer colorretal; *Streptococcus bovis*; reação de polimerase em cadeia, bacteremia.

ABSTRACT

There seems to be no controversy regarding the association between *Streptococcus bovis* infection and colorectal cancer. It has been reported a 25% to 80% incidence of colorectal neoplasms in patients with *S. bovis* endocarditis and it has been suggested a possible frequent silent *S.bovis* bacteremia in colorectal cancer patients, but no study has been performed so far to support this hypothesis. Detection of specific segments of bacterial DNA has been used in microbiology to increase sensitivity as an alternative for conventional culture. AIM OF THE STUDY: To develop a specific PCR diagnostic assay to investigate the prevalence of silent *S.bovis* bacteremia in a series of colorectal cancer patients. METHODS: Blood samples from thirty consecutive colorectal cancer patients were analysed by both PCR and culture to detect the presence of *S.bovis* bacteria. RESULTS: Primers showed a high reliability in experimental tests but no *S.bovis* was detected in any blood sample by both methods. CONCLUSIONS: The lack of demonstration of bacteremia by *S.bovis* in present series by both conventional culture and PCR technique cannot support the hypothesis of the existence of a transient and clinically silent bacteremia of colorectal cancer patients.

Keywords: colorectal cancer; *Streptococcus bovis*, polymerase chain reaction, bacteremia.

SUMÁRIO

LISTA DE APENDICES	iv
LISTA DE ANEXOS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
SUMÁRIO	xiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Rastreamento do Câncer Colorretal.....	3
1.2 <i>Streptococcus bovis</i>	4
1.3 <i>Streptococcus bovis</i> e tumores colorretais	6
1.4 Detecção bacteriana por hemocultura automatizada.....	9
1.5 Detecção bacteriana através pesquisa de fragmentos de DNA.....	10
1.5.1 Reação em cadeia de polimerase.....	10
1.5.2 Eletrofore em Gel de Agarose.....	13
2. PACIENTES E PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	15
2.1 Desenvolvimento de primers específicos para <i>S.bovis</i>	15
2.1.1 Planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	15
2.1.2 Teste de especificidade dos <i>primers</i> planejados.....	19
2.2 Pesquisa de <i>S bovis</i> em portadores de câncer colorretal.....	19
2.2.1 Critérios de exclusão.....	19
2.2.2 Critérios de inclusão	19
2.2.3 Registros dos pacientes – Ficha cadastral.....	20
2.2.4 Coletas de sangue	20
2.2.5 Hemoculturas	21
2.2.6 Extração do DNA bacteriano.....	26
2.2.6.1 Das cepas de <i>S. bovis</i>	26

2.2.6.2	Das amostras clínicas.....	26
2.2.7	Reação em cadeia de polimerase (amplificação das amostras).....	26
2.2.10	Eletroforese em gel de agarose(análise do produto amplificado).....	28
3.	RESULTADOS.....	30
3.1	Casuística.....	30
3.2	Resultados dos testes com o par de <i>primers</i> planejado para <i>S.bovis</i>	30
3.2.1	Definição de gradiente de temperatura e Tm (°C).....	30
3.2.2	Determinação da temperatura de pareamento (Ta°C) ótima para o par de <i>primers</i> planejado.....	31
3.2.3	Determinação da capacidade de detecção pelos <i>primers</i> planejados em PCR.....	31
3.2.4	Determinação da capacidade de detecção de <i>S.bovis</i> pelos <i>primers</i> Sasaki.....	31
3.2.5	Detecção de fragmentos de <i>S. bovis</i> pelo par de <i>primers</i> planejado	31
3.3	Pesquisa de <i>S bovis</i> em portadores de câncer colorretal	32
3.3.1	Isolamento e identificação bacteriana em hemocultura automatizada.....	32
3.3.2	Amplificações das amostras dos pacientes por PCR	32
	DISCUSSÃO.....	37
4.	CONCLUSÕES.....	40
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
	APENDICES.....	48
	ANEXOS.....	

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal tem uma incidência variável nos diversos países, predomina nos mais ricos e industrializados, sendo a quarta neoplasia maligna mais comum e a segunda causa de morte por câncer nos Estados Unidos (HAWLEY *et al.*, 2004).

No Brasil é um dos cinco tumores malignos mais freqüentes e a sua incidência varia bastante entre as diferentes regiões, ocorrendo com uma maior prevalência na região Sul e Sudeste (HABR-GAMA, 2005).

As altas taxas de mortalidade desta neoplasia justificam a implementação de políticas públicas de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento, com atenção destacada nas regiões onde se observam as mais altas taxas de mortalidade (NEVES *et al.*, 2005).

Vários estudos têm sugerido que populações de risco sejam submetidas a procedimentos como pesquisa de sangue oculto nas fezes e retossigmoidoscopia flexível para rastreamento de lesões precursoras e diagnóstico precoce do câncer (SEGNAN *et al.*, 2005). Em uma abrangente revisão sistemática, no entanto, Towler *et al.*, (1998) questionaram a validade da utilização destes métodos em grande escala devido à sua baixa relação custo-benefício.

Torna-se, portanto necessária a definição de novos métodos capazes de oferecer uma maior efetividade no diagnóstico precoce do câncer colorretal.

A associação da bactéria *Streptococcus bovis* com o câncer colorretal tem sido demonstrada por vários autores. A partir destes estudos, estima-se que 25% a 80% dos pacientes portadores de endocardite bacteriana pelo *S. bovis* apresentam concomitantemente tumores colorretais, incluindo desde neoplasias benignas como adenomas até adenocarcinomas invasivos, tornando necessária uma rigorosa investigação diagnóstica nestes pacientes (DARJEE, *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

- A) Desenvolver um par de *primers* específicos para a detecção de bactérias do “Grupo *Streptococcus bovis*” de interesse médico;
- B) Detectar a presença de bactérias do “Grupo *S. bovis*” em sangue pacientes portadores de tumores colorretais pelo método de hemocultura em sistema automatizado.
- C) Detectar a presença de fragmentos de bactérias do “Grupo *S. bovis*” em sangue pacientes portadores de tumores colorretais pelo método de reação em cadeia de polimerase.
- D) Comparar os resultados obtidos da detecção de bactérias do “Grupo *S. bovis*” em pacientes portadores de tumores colorretais mediante sistema automatizado de hemocultura e reação em cadeia da polimerase.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Rastreamento do câncer colorretal

O câncer colorretal é comum em países desenvolvidos, sendo a terceira maior causa de câncer no mundo em ambos os sexos. O risco aumenta após os 40 anos e sobe exponencialmente dos 50 para os 55 anos de idade, constatando-se que nove entre 10 pessoas com câncer colorretal tenham mais de 50 anos (BRASIL, 2008).

Segundo Walsh *et al.* (2003) o câncer colorretal é a segunda causa de morte por câncer nos Estados Unidos, sendo estimadas em 2001 cerca de 56.700 mortes.

Ele é a quarta causa mais importante de mortes por câncer no País e cerca de metade de doentes morrem em menos de cinco anos após tratamento (BIN, 2002).

O número de casos novos estimados para o Brasil em 2008 foi de 26.990 casos. Valores que correspondem a um risco estimado de 13 e 15 casos por 100 mil, para homens e mulheres respectivamente (BRASIL, 2008).

A detecção precoce dos pólipos adenomatosos e de cânceres localizados é possível pela pesquisa de sangue oculto e utilização de métodos endoscópicos (BRASIL, 2008).

Considerando-se que nos países avaliados a incidência desta doença é cerca de dez vezes superior aos níveis registrados no nordeste brasileiro, por exemplo, e que os resultados obtidos em estudos controlados com o sangue oculto são freqüentemente superiores aqueles obtidos na sua utilização em larga escala, observa-se então que o custo benefício pode ser bastante reduzido, tornando-se bastante questionável a utilização deste para rastreamento populacional (TOELER *et al.*, 1998).

Embora a colonoscopia seja hoje considerada como o método de referência em pacientes de risco comprovado, apresenta algumas desvantagens como a necessidade de sedação do paciente, a preparação

previa do cólon necessária e as complicações como lesões de mucosa e sangramento (NICR, 2004).

Em uma análise mais ampla, Pignone *et al.* (2002) sugerem que a estratégia mais eficaz considerando-se a relação custo-benefício seja da realização de colonoscopia e retossigmoidoscopia flexível alternando-se a cada cinco anos associados à pesquisa anual de sangue oculto nas fezes.

1.2 *Streptococcus bovis*

O *Streptococcus bovis* é um coco gram-positivo, não-enterococo do grupo D de Lancefield, gama (sem hemólise) ou alfa hemolítico, que se caracteriza por apresentar algumas das reações fisiológicas seguintes: Teste da bile esculina positivo, teste de tolerância a NaCl 6,5% negativo, hidrólise de arginina negativa, teste de hidrólise de piruvato e *PYR* (pyrrolidonyl-aminopeptidase) negativos (BRASIL, 2004; FACKLAM, 1971; RUOFF *et al.*, 1984).

Segundo relatos de Klein *et al.* (1977, 1979) o organismo está presente no intestino de animais e em 10% até 16% dos humanos, podendo ser isolados em cultura de fezes de 56% dos pacientes com neoplasia colônica.

A bactéria é causa reconhecida de endocardite em idosos, de meningite e septicemia atípica em recém nascidos. A bacteremia por *S. bovis* vem sendo relatada como ligada principalmente a neoplasias colônicas e em menor frequência outras neoplasia do trato gastrointestinal e carcinoma orofaríngeo (TENG *et al.*, 2001).

A identificação das cepas do *S. bovis* foi baseada em seu fenótipo. Os biótipos I e II são designados para as culturas designadas manitol positiva ou manitol negativa respectivamente. O biótipo II inclui dois diferentes fenótipos de acordo com a presença (biotipo II. 2) ou ausência (II. 1) de α -glucuronidase (SCHLEGEL *et al.*, 2004).

A classificação atual do chamado "*Streptococcus bovis Group*" está descrita na revisão taxonômica e de nomenclatura compilada por Facklam (2002).

Em Tafe *et al.* (2007) destaca-se que os estudos genéticos com 16S rRNA e métodos de hibridização de DNA propiciaram o esclarecimento sobre as espécies e subespécies do *S. bovis* que culminaram na classificação corrente de interesse médico que pode ser resumida da seguinte maneira:

- A. *Streptococcus gallolyticus*, biotipo I com fermentação de manitol, hidrólise de amido e de esculina positivas;
- B. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Pasteurianus*, biotipo II. 2 com hidrólise de esculina e β -glucuronidase positivas;
- C. *Streptococcus infantarius* subsp. *Infantarius*, biotipo II. 1 com hidrólise de amido presente, hidrólise de esculina variável e β -glucuronidase negativa;
- D. *Streptococcus infantarius* subsp. *Coli (lutetiensis)*, biotipo II. 1 com hidrólise de amido variável, hidrólise de esculina presente e β -glucuronidase negativa.

1.3 *Streptococcus bovis* e tumores colorretais.

O *S. bovis* é agente causal de 5% a 14% dos casos de endocardite. Também foi documentado como agente de infecções do sistema nervoso central e infecções abdominais e osteomielite (YANG e PEI, 2006; TAFE et al., 2007).

Desde a década de 70, vários estudos (Tabela 1) têm demonstrado uma correlação entre a presença de *S. bovis* e câncer colorretal..

Murray e Roberts em 1978 encontraram 10 pacientes com bacteremia por *S. bovis* dos quais, dois pacientes apresentavam carcinoma do cólon.

Klein et al. (1979) realizaram estudo prospectivo em 29 pacientes com septicemia por *Streptococcus bovis*, destes dois apresentavam adenocarcinomas e cinco adenomas vilosos com carcinoma.

Reynolds et al.(1983) revisando prontuários de 19 pacientes com bacteremia por *S. bovis* encontraram um paciente com adenocarcinoma retal e um com adenocarcinoma de colon.

Beeching et al. (1985) revisaram 12 pacientes com bacteremia causada por *S.bovis* encontraram um paciente com adenoma viloso retal, um com adenoma tubo viloso de sigmóide, um com adenocarcinoma de colon ascendente e um paciente com adenocarcinoma de colon transverso.

Em 1990 foi publicado primeiro estudo em literatura cirúrgica sobre a associação de *S. bovis* com patologia colônica. Numa análise retrospectiva de 92 pacientes com hemoculturas positivas para *S.bovis*, foram encontrados sete adenocarcinomas colorretais (ZARKIN et al. 1990).

Na França foram revisados de 1980 até 1991 foram identificados 53 pacientes com endocardite infecciosa por *S. bovis*, destes sete apresentavam carcinomas colorretais incluindo cinco pólipos vilosos malignos e dois tumores invasivos (BALLET et al. 1995).

Kupferwasser et al. (1998) encontraram 22 pacientes infectados por *S. bovis* dos quais dois tinham cânceres de cólon.

Fagundes et al. (2000) no Brasil apresentam em seu trabalho quatro doentes com endocardite bacteriana, três deles comprovadamente por *S. bovis*

e um muito provavelmente também. Desses, dois tiveram adenocarcinomas e um adenoma viloso.

Herrero *et al.* (2002) revisando casos de endocardite por *S. bovis* ocorridos na Clínica Mayo de 1975 a 1985 encontraram 14 pacientes, dos quais quatro apresentaram as seguintes neoplasias colônicas: dois adenocarcinomas de sigmóide e um adenocarcinoma de cólon ascendente.

Lee *et al.* (2003), em estudo sobre associação de bacteremia por *Streptococcus bovis* e algumas patologias, encontraram carcinoma de cólon em 11% dos 37 pacientes avaliados.

Gold *et al.* (2004) em análise retrospectiva de 45 casos de bacteremia por *S. bovis* encontraram neoplasia colônica em 16 pacientes, dos quais três eram câncer colorretal invasivo.

Em 2006 foi publicada uma análise retrospectiva em hospital de Miami, Florida(EUA), de 1992 a 2002, apresentando 46 pacientes com hemoculturas positivas para *S. bovis*. Foram encontrados três casos com carcinoma de colon (ALAZMI *et al.*, 2006).

A ligação entre *S. bovis* e câncer Colorretal ainda não é bem entendida, o que pode ter sido causado pela inabilidade em identificar a bactéria com precisão (TAFE *et al.*, 2007).

Tabela 1 – *Streptococcus bovis* e câncer colorretal

Autor	Ano	Pacientes com <i>S. bovis</i>	Casos câncer colorretal
Murray & Roberts	1978	10	02
Klein <i>et al.</i>	1979	29	05
Reynolds <i>et al.</i>	1983	19	02
Beeching <i>et al.</i>	1985	12	04
Zarkin <i>et al.</i>	1990	43	07
Ballet <i>et al.</i>	1995	53	07
Kupferwasser <i>et al.</i>	1998	22	02
Fagundes <i>et al.</i>	2000	04	02
Herrero <i>et al.</i>	2002	14	03
Lee <i>et al.</i>	2003	37	04
Gold <i>et al.</i>	2004	45	03
Alazmi <i>et al.</i>	2006	46	03

1.4 Detecção bacteriana através da hemocultura automatizada

A detecção rápida e segura de microorganismo no sangue é uma das funções mais críticas no laboratório de microbiologia (KARAHAN et al., 2006).

A hemocultura tem como objetivo detectar microorganismos viáveis no sangue. A introdução dos sistemas automatizados para detecção de bacteremia tem proporcionado maior rapidez no diagnóstico e tratamento dos pacientes (DAL FORNO *et al.*, 2005).

Os sistemas automatizados de hemocultura reduzem o tempo para obtenção de culturas positivas e a necessidade de manipulação de espécimes, obtendo ainda uma taxa falso positiva de cerca de 1,10% (KARAHAN et al., 2006).

Os principais sistemas utilizados hoje são de monitorização contínua, incluem o Bact/Alert (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), BACTEC geração 9000 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.), DIFCO ESP(Difco), Vital(bioMérieux vitek), Bio Argos (Diagnostics Pasteur) e o.a.s.i.s (Unipath) (REIMER et al., 1997; DAL FORNO et al., 2005).

Dois dos sistemas, o BACTEC serie 9000 e o Bact/Alert são extensamente usados. São completamente automatizados e monitoram o crescimento de organismos medindo a produção de CO₂ com um sensor colorimétrico (Bact/Alert) ou por fluorescência (BACTEC) (REIMER et al., 1997; KARAHAN et al., 2006).

Os sistemas permitem o acondicionamento de até 10 mL de sangue por frasco. Recomenda-se que o volume de coleta seja de 10 a 30 mL, distribuídos pelo numero de frascos conforme sua capacidade e a proporção de ml de sangue para cada 10 ou no mínimo cinco mL de caldo (DAL FORNO et al., 2005).

Ainda segundo trabalho de Dal Forno et al.(2005) o volume de sangue é uma variável crítica para a positividade do exame.

A porcentagem de cultivos positivos diminui significativamente quando são cultivados menos de 10 mL por frasco (DAL FORNO et al., 2005).

1.5 Detecção bacteriana através da pesquisa de fragmentos de DNA

1.5.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA utilizando a Reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) abriu grandes e novas perspectivas para a análise e detecção de agentes infecciosos (ZAHA *et al.*, 2001), sendo possivelmente o avanço técnico mais importante em genética molecular na década de 1980 (EISENSTEIN, 1990).

Em outubro de 1985, Randy Saiki apresenta “PCR’s applications in diagnostics” no encontro da Sociedade Americana de Genética Humana. Em dezembro do mesmo ano aparece na revista *Science* o primeiro artigo descrevendo a utilização do método. Em maio de 1986 Kary Mullis apresenta a PCR no “Cold Spring Harbor Symposium” com grande sucesso (FORE JR *et al.*, 2006).

A descoberta inicial da reação em cadeia de polimerase foi atribuída a Kary Mullis, vencedor do prêmio Nobel de química em 1993. Trabalhando na Cetus Corporation, em 1983 ele elaborou o processo capaz de criar bilhões de cópias de um segmento de DNA em algumas horas. A teoria do método foi publicada na revista *Methods of Enzymology* em 1987 (FORE JR *et al.*, 2006).

A importância do procedimento está na habilidade de amplificar o DNA por meio de uma reação simples, tornando possível a clonagem de seqüências específicas, com vários tamanhos de bases de forma rápida (EISENSTEIN, 1990).

A PCR consiste na imitação, *in vitro*, do processo de duplicação do DNA. Uma ou mais fitas de DNA servem como molde (*template*) e tem uma dada seqüência demarcada por oligonucleotídeos ou “*primers*” (cerca de 20 pares de bases), que se anelam por hibridação, as suas seqüências complementares indicando o início e o fim do fragmento desejado, que passa a ser copiado, através do acréscimo, em ambas as fitas de DNA molde, de nucleotídeos complementares presentes na reação, sob ação de uma enzima

polimerase termorresistente, proveniente da bactéria *thermus aquaticus* (BAREA, 2001), conforme demonstrado na Figura 1.4.

Desta forma, este procedimento trata-se da síntese enzimática *in vitro* de cópias de DNA na presença de uma DNA polimerase. A reação baseia-se no *anelamento* e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos ou “*primers*” (moléculas de DNA de fita simples) que complementam a seqüência da fita dupla alvo da amplificação (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2004).

Na primeira etapa (*desnaturação*) a fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 95° C, para quebrar as ligações tipo ponte de hidrogênio, que mantém as fitas unidas. Esta etapa forma uma fita de DNA complementar. Na segunda etapa (*anelamento ou pareamento*) a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60° C, nela dois pequenos primers são anelados, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “*Primer*” com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo (EISENSTEIN, 1990; CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2004).

Na terceira etapa (*extensão*) a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase de *Thermus Aquaticus* (Taq DNA polimerase) e os Desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) realizem a *extensão* a partir de cada terminal 3’ dos *primers*, utilizando como molde a seqüência alvo. O ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes, onde amplificação segue uma progressão geométrica e depois de apenas 20 ciclos, são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo (EISENSTEIN, 1990; CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2004;).

Os componentes da reação são: *Taq* DNA polimerase, Solução tampão, Trifosfatodesoxinucleotídeos (dNTPs), iniciador (*primer*), molde alvo de DNA e um termociclador (CURY *et al.*, 2005).

A otimização da PCR exige ajuste de vários parâmetros (temperatura, concentração de sais, duração do ciclo e outros), porém os iniciadores (primers) são fatores primordiais, pois eles indicam onde as novas fitas de DNA começarão. A especificidade da ligação do *primer* depende de seu comprimento e aqueles entre 18 e 24 nucleotídeos são mais específicos sob condições padrão (WATSON *et al.*, 2009).

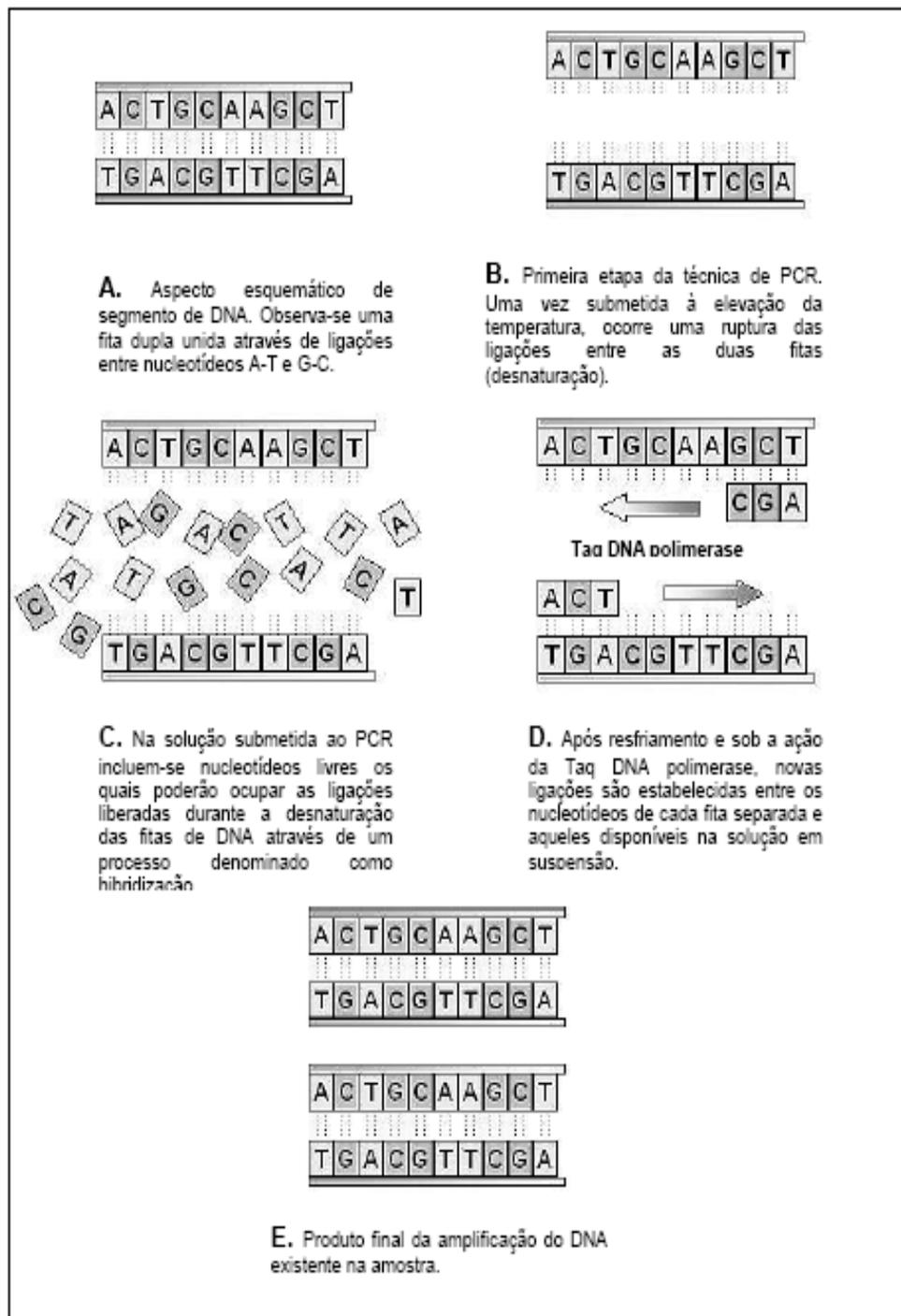


Figura 1 - Princípio da reação em cadeia de polimerase (PCR). (Extraído de Pinho. M., *Biologia Molecular do Câncer – Fundamentos para a Prática Médica*. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, 2005).

1.5.2 Eletroforese em Gel de Agarose

Proteínas e fragmentos de ácidos nucléicos produzidos por *enzimas de restrição* podem ser analisados por eletroforese. Estes segmentos de DNA apresentam carga elétrica negativa, uma vez colocados sobre uma lamina de gel onde seja aplicada uma corrente elétrica, deverão apresentar migração em direção ao pólo positivo (PINHO, 2005; WATSON et al., 2009).

A velocidade da migração no gel depende de tamanho, carga e forma dos fragmentos, sendo que os fragmentos de menor tamanho movem-se mais rápido do que os maiores. No final da eletroforese, a posição de cada fragmento no gel deverá corresponder ao seu peso molecular, formando o que chamamos de *Bandas*, como observado na figura 1.5 (PINHO, 2005; WATSON et al., 2009).

Fragmentos de DNA variando de 100 a milhares de pares de bases podem ser separados em um gel de agarose a 1%. A utilização de corantes de DNA, como o brometo de etídio e a iluminação do gel corado com luz ultravioleta são avanços na técnica (WATSON et al., 2009).

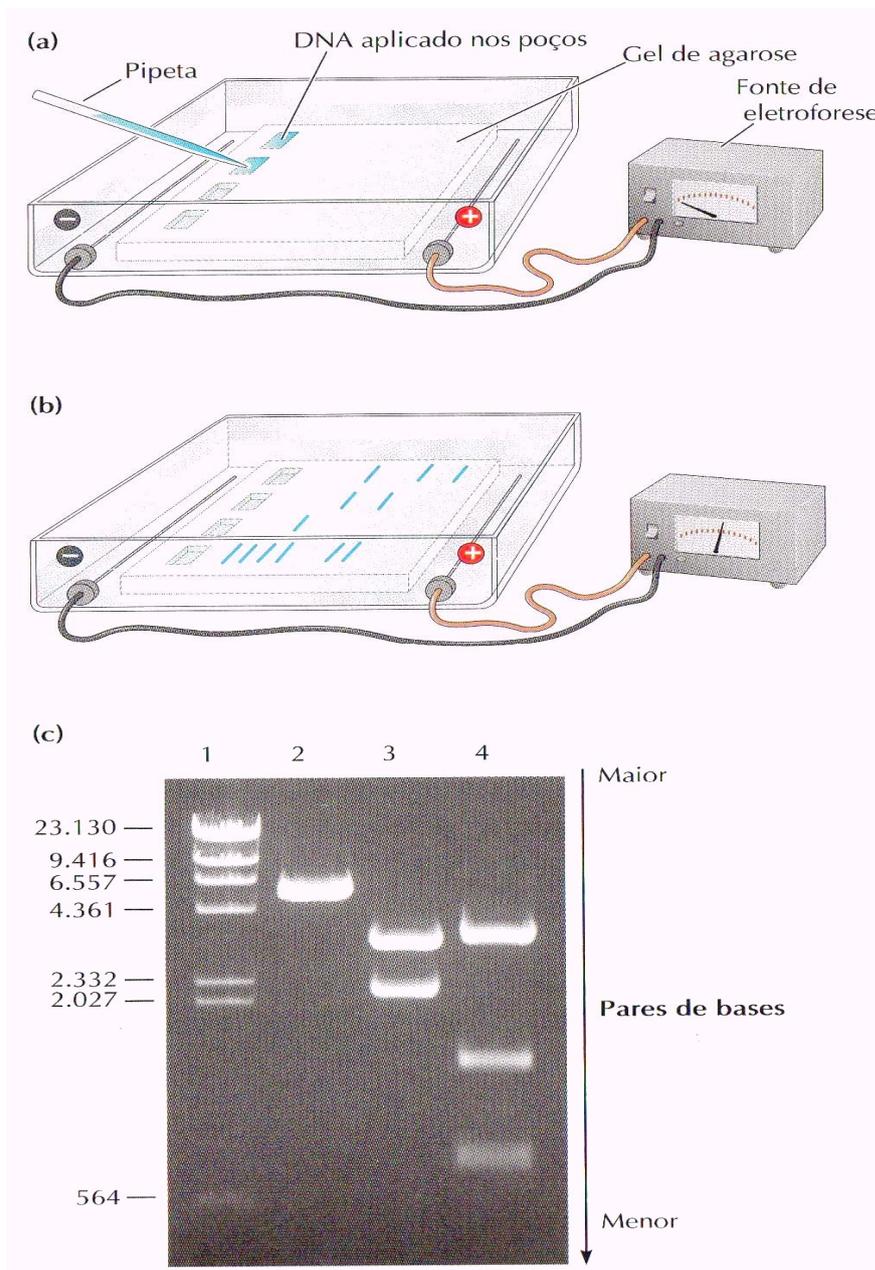


Figura 2 – Eletroforese em Gel de Agarose. (a) Fatia de agarose é cortada com ranhuras para colocar amostra, (b) a corrente é ligada e as moléculas de DNA (carregadas negativamente) movem-se em direção ao eletrodo positivo, (c) gel é removido do tanque e corado com brometo de etídio (Extraído de WATSON et al. DNA recombinante: genes e genomas. Rio de Janeiro: Artmed, p.78, 2009).

2 PACIENTES E PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da região de Joinville, Joinville/SC (Folha de aprovação no anexo A).

Todos pacientes foram devidamente esclarecidos e consentiram oficialmente por escrito em participar da pesquisa (Termo de consentimento esclarecido no apêndice B).

Os dados foram coletados no período de 27 de fevereiro a 14 de setembro de 2008.

2.1 Desenvolvimento de *primers* específicos para *S. bovis*

2.1.1 Planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Todas as seqüências completas ou parciais relativas ao gene *sodA* (“manganese-dependent superoxide dismutase gene”) disponíveis no “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> ; National Center for Biotechnology Information), da espécie mencionada (*Streptococcus bovis* Group), foram reunidas e alinhadas para a definição de seqüências representativas (seqüências “consenso”) através da utilização dos programas BioEdit 7.0.9 (Figura 3) e CLUSTAL W.

O programa de acesso livre Primer3 (Figura 4) (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) foi empregado para a geração e simulação de “primers” compatíveis com a estratégia de detecção mencionada, segundo parâmetros (número de bases em cada oligonucleotídeo, tamanho pretendido para o produto da amplificação, temperatura ótima de fusão, entre outros) pré-definidos. Os oligonucleotídeos candidatos foram verificados quanto a possibilidade de pareamentos inespecíficos, através da pesquisa de similaridade com todas as seqüências depositadas no “GenBank”, empregando-se a ferramenta BLAST (Figura 5) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Os *primers* foram desenhados pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Univille e foram sintetizados por indústria especializada (Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo, SP).

O par de *primers* planejado e sintetizado foi o seguinte: **Forward** – 5' ATYGATRCAGAAACAATGACA3' e **Reverse** – 5'TGTTGGTTCTTGTTTTTCAGG3', sendo **R**= A/G e **Y**= C/T; com *amplicon* (distância entre *primers*) de 234 bp (pares de bases).

(A)

(B)

Figura 3 - (A) Pesquisa das seqüências completas ou parciais relativas ao gene *sodA* no “GenBank” e (B) Definição de seqüências “consenso” do Grupo *S. bovis* pelo programa BioEdit 7.0.9

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>; National Center for Biotechnology Information

Primer3 Input 0.4.0 (primer3-web/htdocs/input-040.htm) - Windows Internet Explorer

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

perspectivas

Primer3 Input 0.4.0 (primer3-web/htdocs/input-0...

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence. [Primer3plus interface](#) [More primer/oligo tools](#) [dis...](#)
[Old \(0.3.0\) interface](#) [ca](#)

Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable se etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#): NONE

Pick left primer, or use left primer below: Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below: Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on

[Sequence Id:](#) A string to identify your output.

[Targets:](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATC primers must flank the central CCCC.

[Excluded Regions:](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) w ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

[Product Size Ranges:](#) 150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000

Figura 4 - Programa Primer3 para geração e simulação de primers compatíveis.

Fonte: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Pesquisar web...

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI BLAST Home

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

New Designing or Testing PCR Primers? Try your search in [Primer-BLAST](#). (Go)

BLAST Assembled Genomes

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#).

- Human
- Mouse
- Rat
- Arabidopsis thaliana
- Oryza sativa
- Bos taurus
- Danio rerio
- Drosophila melanogaster
- Gallus gallus
- Pan troglodytes
- Microbes
- Apis mellifera

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

nucleotide_blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms:</i> blastn, megablast, discontinuous megablast
protein_blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms:</i> blastp, psi-blast, phi-blast
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - Windows Internet Explorer | Modo Protegido: Ativado | 100%

Projeto Bovis Apresentação Bovis... Proposta Bovis Mes... Sem título - Paint PT 17:51

Figura 5 – Programa BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) para pesquisa de similaridade.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

2.1.2 Teste de especificidade dos *primers* planejados

Os *primers* planejados foram testados para a pesquisa em cepas de *S. bovis* cedidas pela Prof. Lucia Martins Teixeira do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (certificado encontra-se no anexo G).

As amostras fornecidas foram: Cepa SS – 1224 derivada da ATCC 9809 – *Streptococcus gallolyticus gallolyticus*, cepa SS – 1631 derivada da CCUG 35224 – *Streptococcus gallolyticus gallolyticus* e a cepa SS – 1744 derivada da HDP 90246 – *Streptococcus infantarius coli*.

Foram realizados PCR e eletroforese em gel de agarose para teste dos *primers* com as amostras (cepas de *S. bovis*) do IMPPG.

2.2. Pesquisa de *S. bovis* em portadores de câncer colorretal

2.2.1 Critérios de exclusão:

- a) Pacientes fazendo uso atual ou até uma semana antes do exame de medicamentos antibióticos, corticosteróides, imunossupressores e quimioterápicos;
- b) Pacientes em vigência de qualquer processo infeccioso ou febril;
- c) Pacientes com lesões de pele no local de punção venosa para a coleta do sangue;

2.2.2 Critérios de inclusão:

- a) Todos os pacientes portadores de câncer colorretal a serem submetidos a cirurgia no Centro Hospitalar Unimed de Joinville, Hospital Regional Hans Dieter Schmidt e Hospital Municipal São José, no período de 27 de fevereiro a 14 de setembro de 2008;

- b) Todos os pacientes que aceitaram, de livre e espontânea vontade, participar do estudo e assinaram o termo consentimento livre e esclarecido.

2.2.3 Registros dos pacientes – Ficha cadastral

O médico examinador preencheu a ficha cadastral dos 30 pacientes (modelo no apêndice A) antes da coleta do material(sangue). Na ficha constavam os dados de identificação, local da internação do paciente e tipo e localização da neoplasia.

2.2.4 Coletas de sangue:

Para as coletas de sangue foram utilizados: digluconato de clorexidina degermante, digluconato de clorexidina alcoólica a 0,5%, material estéril para curativo, luvas de procedimento, garrote, seringas e agulhas descartáveis. A técnica de coleta foi a padronizada no Centro Hospitalar Unimed e prevista em procedimento operacional padrão (Anexo C).

Os materiais perfuro-cortantes foram descartados em recipiente adequado de acordo com os protocolos das unidades hospitalares.

Foi coletada uma amostra de 20 mL de sangue de cada paciente, durante a sua internação hospitalar no período de pré-operatório. Cada amostra foi dividida em dois frascos, sendo 10 mL para o frasco de hemocultura e os outros 10 ml para o frasco da pesquisa de DNA bacteriano. Os frascos foram identificados com etiquetas adesivas coladas na parte externa.

Os frascos para a deposição do material coletado para biologia foram os de hemocultura do Sistema de Detecção Microbiana BacT /ALERT® SA BIOMÉRIEUX, INC.(Figura 6). O material para biologia molecular foi acondicionado em frascos estéreis com tampa de fechamento hermético (Figura 7).

Após a coleta, os frascos foram acondicionados em recipiente adequado para armazenamento e transporte. Aqueles referentes à hemocultura foram encaminhados imediatamente para ao laboratório de análises clínicas do Centro Hospitalar Unimed-Joinville/SC, enquanto os restantes foram levados ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville, Joinville/SC – Univille.

2.2.5 Hemoculturas

O meio de cultivo utilizado para a realização das culturas de sangue foi o *Aerobic Blood Culture Media* ou Bact/Alert SA sem inibidor de antibióticos Biomerieux (figura 7), o qual é comercializado em frascos estéreis, descartáveis, e identificados com um código de barras. Além do meio de cultivo, os frascos possuem em seu interior um sensor colorimétrico de cor verde que tem sua cor alterada na presença de Dióxido de Carbono, produzido pelo crescimento bacteriano.

A formulação do meio consiste da digestão pancreática da caseína, da digestão da soja pela papina, do polianeto sulfonato de sódio, do hidrócloro de piridoxina e de outros complexos de aminoácidos e substratos de carboidratos em água purificada, preparada em uma atmosfera de CO₂ no oxigênio sob vácuo.

As amostras (sangue) ao serem coletadas de maneira padronizada (Anexo C) eram encaminhadas imediatamente ao laboratório em seringas estéreis, não sendo necessário refrigerá-las.

Ao receber a amostra os técnicos do laboratório procediam então a identificação do frasco de cultura, inoculação da amostra no mesmo e inserção do frasco no equipamento Bact/Alert.

Antes do manuseio dos frascos, estes eram examinados com o intuito de observar indícios de danos ou deterioração do meio de cultura (descoloração). O meio de cultura contido nos frascos, para estar nas condições adequadas, deve estar límpido, sem opalescência, turbidez ou excesso de pressão gasosa, que são possíveis sinais de contaminação.

Após examinar os frascos, realizava-se a identificação do mesmo com os dados do paciente e em seguida, procedia-se a inoculação da amostra no frasco, removendo a tampa plástica do mesmo e desinfecção do septo de borracha com algodão embebido em álcool 70%.

A amostra era transferida para um recipiente estéril, e homogeneizada. Após este procedimento aspirava-se cerca de 10 ml da mesma com seringa e agulha estéreis e inoculava-se a mesma no frasco com o meio de cultura utilizando técnica asséptica, em câmara de fluxo laminar. Após inoculação da amostra no frasco o mesmo era homogeneizado manualmente.

Os frascos, após a inoculação, foram incubados e processados automaticamente no Sistema de Detecção Microbiana Bact/Alert 120 Biomerieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), durante 05 dias a 37°C(Figura 8). Este equipamento, com capacidade de incubação simultânea para 120 frascos, realiza leituras automáticas, em intervalos de 10 minutos, nos sensores de todos os frascos verificando se houve mudança de cor nos mesmos, o que indica crescimento bacteriano.

Após 05 dias de incubação, caso não fosse detectada a produção de Dióxido de Carbono no interior dos frascos de cultura, o equipamento Bact/Alert 120 Biomerieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) produzia, em sua tela, um aviso de que no seu interior havia um frasco de cultura **Negativo**. Os técnicos do laboratório acessavam o programa do equipamento com uma senha específica e selecionavam o comando de “Garrafas Negativas”. Ao abrir a porta do gabinete de incubação do equipamento Bact/ALERT® 120 Biomerieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) uma luz verde acende-se ao lado do frasco indicando que aquele frasco não teve crescimento bacteriano. O frasco era retirado, e através da leitura de seu código de barras, identificado o paciente do qual foi colhida aquela amostra. Após estes procedimentos o resultado do exame de cultura para sangue era reportado como **Negativo**.

Se durante os 05 dias de incubação houvesse crescimento bacteriano, o sensor permeável a gases existentes no fundo do frasco alterava sua cor de azul esverdeado para amarelo. A mudança detectada pelo Bact/ALERT® 120 Biomerieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), o qual emitia

um sinal sonoro e um aviso na tela do equipamento de que havia um frasco **Positivo** dentro do equipamento. O processo de retirada do frasco da incubadora é semelhante ao descrito acima para os frascos Negativos.



Figura 6 - Frasco do sistema de detecção microbiana BacT /ALERT® da BIOMÉRIEU, INC. utilizado para hemocultura.



Figura 7 – Frasco estéril com fechamento hermético para biologia molecular



Figura 8 - Incubadora automática BacT/Alert® 120 do CHU/Joinville

2.2.6 Extração do DNA Bacteriano

2.2.6.1 Das Cepas de *S. bovis*

Para padronização da técnica molecular desenvolvida, utilizaram-se cepas padrão do microrganismo (ATCC 9809 - *Streptococcus gallolyticus gallolyticus*, CCUG 35224 - *Streptococcus gallolyticus gallolyticus*, HDP 90246 - *Streptococcus infantarius coli*) adquiridas da coleção de culturas do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro(Anexo G).

Procedeu-se, dessa maneira, a extração de DNA genômico microbiano, das cepas padrão conforme instruções do fabricante do kit “Qiamp DNA Mini Kit” (Qiagen), com emprego de lisozima a partir de cultura em meio sólido com os procedimentos padrão (Anexo E).

2.2.6.2 Das Amostras Clínicas

Procedeu-se, dessa maneira, a extração de DNA genômico microbiano, das amostras clínicas conforme instruções do fabricante do kit “Qiamp DNA Mini Kit” (Qiagen), com emprego de lisozima com os procedimentos padrão (Anexo F).

2.2.8 Reação em cadeia de polimerase (amplificação das amostras)

A presença de bactérias nas amostras de sangue foi detectada através da seqüência de DNA ribossomal subunidade *sodA* presente.

As reações de PCR, usadas para amplificação da seqüência correspondente ao DNA ribossomal da subunidade *sodA*, foram feitas usando um termociclador LGC XP Cyclor (Bioer technology, CHEM LABOR, S. L., Astúrias, Espanha), no processo de desnaturação, anelamento e extensão (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Reagentes para PCR utilizados na pesquisa

Reagente	Por reação	Concentração final
Buffer 10x (Invitrogen)	5,0 µL	1x

dNTP's 10 mM	1,0 µL	0,2mM
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen) 2,0mM	2,0 µL	
Primer F 10 pmoles/ µL (Invitrogen) 10pmoles	1,0 µL	
Primer R 10 pmoles/ µL (Invitrogen) 10pmoles	1,0 µL	
Taq DNA polimerase 5U/ µL (Invitrogen)	0,2 µL	1U
DNA	3,0 µL	3,0 µL
H ₂ O grau de Biologia Molecular	36,3 µL (para 50 µL)	
Buffer 10x (Invitrogen): 200mM Tris-Hcl (pH 8.4)	500mM KCl	

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular da Univille

Tabela 3 – Ciclagem térmica

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	
Desnaturação inicial	94	3 min	
Desnaturação	94	30 seg	} 40 Ciclos
Pareamento	55	30 seg	
Extensão	72	30 seg	
Extensão final	72	7 min	

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular da Univille

2.2.9 Eletroforese em gel de agarose(análise do produto amplificado)

O produto resultado da amplificação de aproximadamente 234 bp correu em gel 1,0 % agarose (Invitrogen) por 1 hora em cuba horizontal de

eletroforese(figura 8) com 100 mL tampão TBE ((80 mM Tris-HCl; 113 mM Acido Bórico; 2,5 mM EDTA). O gel foi submetido a 100 Volts e 80 mA nesse período de tempo.

A imersão do gel numa solução de numa solução com 0,5µg/mL de brometo de etídio e posterior observação em transiluminador sob luz ultravioleta (transiluminador MiniBis Pro da Bio-Imaging Systems - figura 9) possibilitou a visualização das bandas(padrão indicativo da presença de DNA).

Estas bandas foram comparadas com um padrão de peso molecular(**M**) que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de bases.

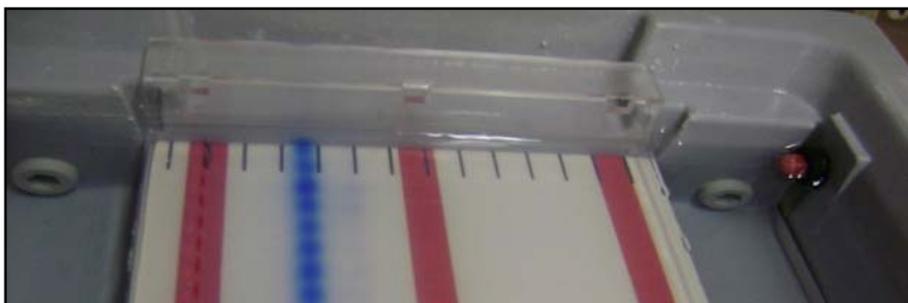


Figura 9 – Cuba para eletroforese em gel de agarose



Figura 10 – Transiluminador MiniBis Pro da Bio-Imaging Systems

3 RESULTADOS

3.1 Casuística

Foram coletadas 30 amostras de sangue em 30 pacientes consecutivos de ambos os sexos(Tabela 03) com diagnóstico histológico de câncer colorretal no período pré-operatório. A idade média foi $58,9 \pm 12,11$ anos. A mediana foi de 61 anos, sendo a menor idade 36 anos e a maior 83 anos.

Tabela 4 – Sexo e Frequência

Sexo	Número	Frequência (%)
Feminino	19	63,3
Masculino	11	36,7
Total	30	100

3.2 Resultados dos testes com o par de *primers* planejado para *S.bovis*

3.2.1 Definição de gradiente de temperatura e T_m (°C)

A T_m correspondente a temperatura na qual 50% dos primers encontram-se hibridizados com a fita molde foi de $59,1^\circ\text{C}$ para *primer forward* e $57,8^\circ\text{C}$ para *primer reverse*.

As reações de amplificação foram feitas em um gradiente de temperatura para pareamento dos *primers* planejados. As seguintes temperaturas foram usadas: 45°C , $48,2^\circ\text{C}$, $52,1^\circ\text{C}$, $53,6^\circ\text{C}$, $55,4^\circ\text{C}$ e $57,3^\circ\text{C}$ (Figura 10).

3.2.2 Determinação da temperatura de pareamento (T_a °C) ótima para o par de *primers* planejado

O par de primers foi testado em termociclador para avaliação da temperatura ótima de anelamento (T_a °C), com os gradientes de temperatura de 45°C a 57,3°C, sendo que 55°C foi considerada a temperatura ótima de pareamento.

3.2.3 Determinação da capacidade de detecção pelos *primers* planejados em PCR

Na figura 11 está ilustrada a capacidade de detecção do par de *primers* planejado. Foram testados a cepa padrão (item 1), o sangue humano contaminado com a cepa padrão (item 2) e sangue humano não Contaminado (item 3).

3.2.4 Determinação da capacidade de detecção de *S. bovis* pelos *primers* Sasaki

O *primer* de Sasaki et al.(2004) foi utilizado para comparação no trabalho por também utilizar SodA para detecção do “*Streptococcus bovis* Group”.

A figura 12 ilustra o resultado dos testes da capacidade de detecção dos *primers* Sasaki.

3.2.5 Detecção de fragmentos de *S. bovis* pelo par de *primers* planejado

As figura 13 ilustra a sensibilidade do par de *primers* planejados na amplificação das cepas padrão com diferentes concentrações de DNA. A figura 14 mostra a comparação entre a capacidade de detecção dos *primers* planejados e dos *primers* Sasaki.

3.3 Pesquisa de *S bovis* em portadores de câncer colorretal

A localização mais freqüente foi em região retossigmoide(43,33%). Colon descendente, sigmóide, retossigmoide e reto corresponde a 76,66% dos casos ou seja a presença dos tumores em colon esquerdo foi significativamente mais freqüente que no colon direito.

3.3.1 Isolamento e identificação bacteriana em hemocultura automatizada

Os resultados das hemoculturas estão expressos na tabela 6 e demonstram que 28 amostras(93,33%) não obtiveram crescimento de microorganismos e duas (6,67%) obtiveram crescimento de *Escherichia coli* e *Aerococcus viridans*.

3.2.2 Amplificações das amostras dos pacientes por PCR

Não foram obtidos resultados positivos na detecção de *S. bovis* pela técnica de PCR em nosso trabalho.

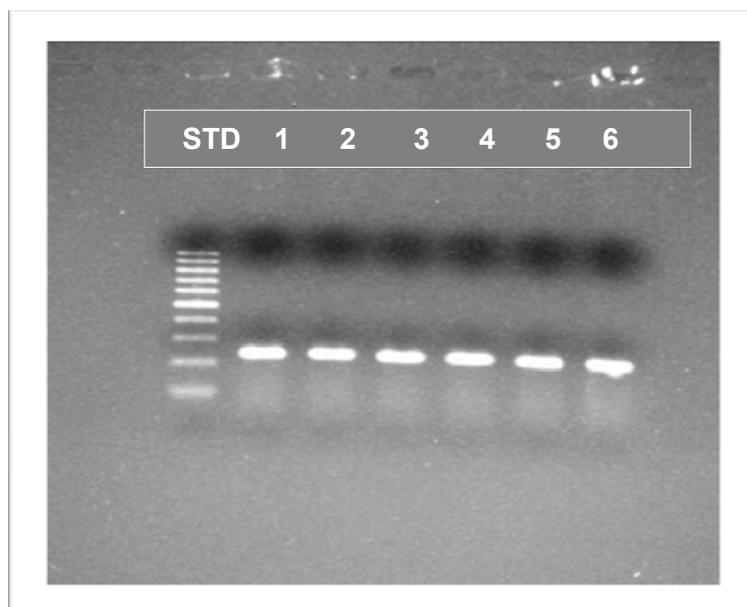
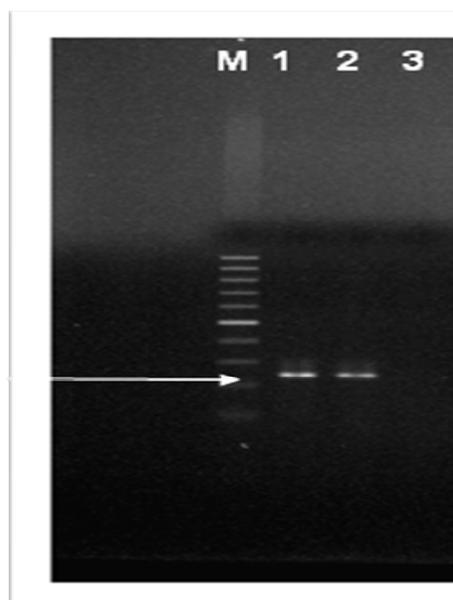


Figura 11 - Amplificação das cepas padrão pelos *primers* planejados (gradiente de temperaturas em °C) sendo: **1)** 45°C, **2)** 48,2°C, **3)** 52,1°C, **4)** 53,6°C, **5)** 55,4°C e **6)** 57,3°C



. Figura 12 – Teste dos *primers* planejados:

1. Detecção da cepa padrão *S. bovis*,
2. Detecção de sangue humano colonizado “*in vitro*” com *S. bovis*.

3. Sangue humano não colonizado.

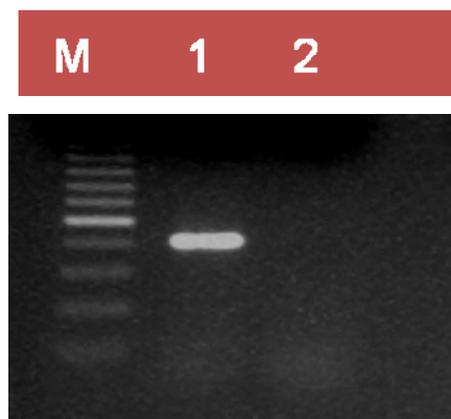


Figura 13 – Amplificação com primers de Sasaki et al.(2004),(1) *S. gallolyticus*, (2) controle negativo e (M) marcador de peso molecular.

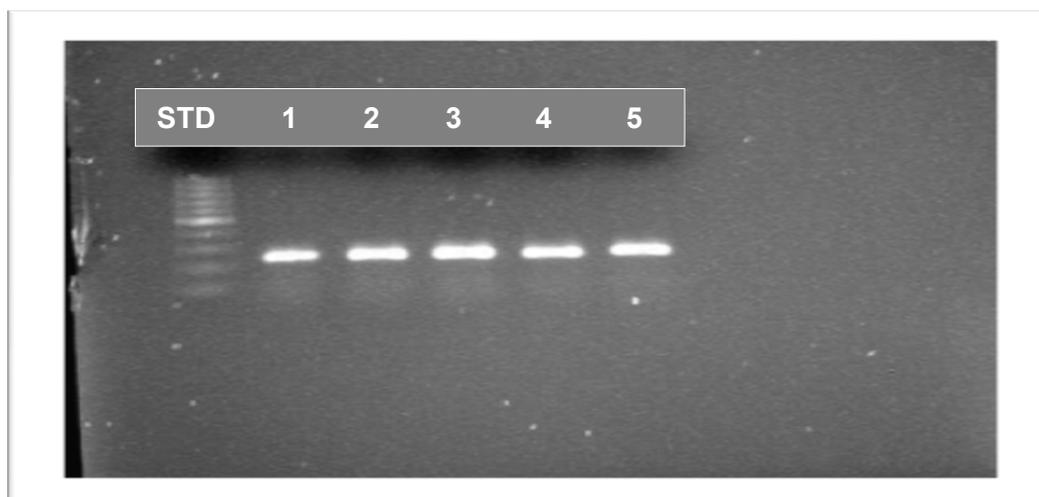


Figura 14 - Amplificação em PCR de acordo com a concentração de DNA das cepas padrão de *S. bovis* utilizando o par de *primers* planejado: 1) 575 ng/μl, 2) 2875 ng/μl, 3) 143 ng/μl, 4) 71 ng/μl e 5) 35 ng/μl.

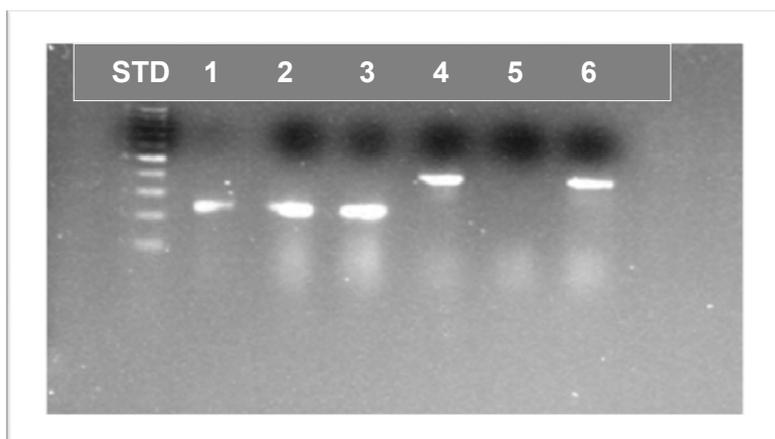


Figura 15 – Detecção das cepas padrão pelos *primers* planejados: (1) 9809 - *S. gallolyticus*, (2) 1744 – *S.infantarius* e (3) 1631-*S. gallolyticus*. Detecção das cepas padrão pelos primers Sasaki et al., 2004: (4) 9809 - *S. gallolyticus*, (5) 1744 – *S.infantarius* e (6) 1631-*S. gallolyticus*

Tabela 6 - Resultados de hemoculturas e PCR além dose dados relacionados aos pacientes da análise da incidência de bacteremia por *Streptococcus bovis* em pacientes com neoplasia colorretal, Joinville, 2008

N	Idade	Sexo	Hospital	Hemocultura	Bactéria	PCR	Tipo Câncer	Localização
1	40	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
2	65	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	Sigmóide
3	36	M	CHU	negativo		negativo	Adenocarcinoma	reto
4	51	F	CHU	negativo		negativo	Adenocarcinoma	transverso
5	70	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
6	67	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	sigmoide
7	57	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
8	64	F	CHU	negativo		negativo	Adenocarcinoma	transverso
9	50	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
10	68	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	sigmoide
11	33	F	HMSJ	positiva	<i>E. coli</i> *	negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
12	62	F	HMSJ	positiva	<i>A. viridans</i> *	negativo	Adenocarcinoma	transverso
13	50	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
14	71	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	descendente
15	75	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	reto
16	40	M	CHU	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
17	59	M	HRHDS	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
18	56	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	reto
19	72	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	sigmoide
20	48	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
21	73	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
22	47	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	sigmoide
23	54	F	HRHDS	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
24	62	M	HRHDS	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
25	60	F	CHU	negativo		negativo	Adenocarcinoma	ascendente
26	65	F	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	ascendente
27	43	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	Sigmóide
28	83	F	CHU	negativo		negativo	Adenocarcinoma	transverso
29	63	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	retossigmoide
30	71	M	HMSJ	negativo		negativo	Adenocarcinoma	transverso

N nº de identificação das amostras * *Escherichia coli* **Aerococcus viridans*

DISCUSSÃO

Tem-se verificado nos últimos anos um grande aumento no interesse sobre o papel das bactérias como potencial agente cancerígeno. Motivado não só pela freqüente coexistência entre doenças infecciosas e neoplásicas, mas também pela grande melhora da tecnologia aplicada ao diagnóstico microbiológico.

Várias bactérias parecem estar envolvidas em um mecanismo similar de carcinogênese consistindo de uma infecção crônica que afeta genes que controlam o ciclo celular com conseqüente distúrbio proliferativo geralmente incluindo comprometimento da apoptose (BEEBE, KONEMAN, 1995; MAGER, 2007).

Evidências sobre este mecanismo ligam o *Helicobacter pylori* ao câncer gástrico, a *Salmonella typhi* ao câncer de vesícula e a *Chlamidia pneumoniae* ao câncer do pulmão. A recuperação de determinadas espécies bacterianas a partir de hemocultura pode indicar a presença de uma neoplasia não diagnosticada (BEEBE, KONEMAN, 1995).

Foi demonstrada uma relação entre câncer colorretal e *S. bovis* infecção em diferentes locais. A maioria dos relatos desta associação refere-se a bacteremia sintomática e endocardite (Tabela 1). Porém, autores descrevem a associação de *S. bovis* com infecções locais, como a meningite, endoftalmite, abscesso no pescoço, infecção em artroplastia de joelho ou abscesso esplênico sugerem uma possível papel de disseminação hematogênica (WEITBERG et al., 1981; BELINKIE et al., 1983; GOUMAS et al., 1997; APSINGI et al., 2007; BLEIBEL et al., 2007).

O interesse expresso neste trabalho em pesquisar a presença de bacteremia assintomática por *S. bovis* em pacientes com carcinoma colorretal é justificado pela verificação na literatura médica de vários trabalhos explorando a existência de uma ligação entre ambos (Tabela 1).

Zarkin et al. (1990) fizeram uma análise retrospectiva sobre esta associação, incluindo 92 pacientes com bacteremia por *S. bovis* com e sem endocardite, apresentando 58% e 46% de patologia colônica positiva,

respectivamente. Um paciente do último grupo tinha um carcinoma cólon diagnosticado quatro anos após o episódio de bacteremia.

Robbins e Klein (1983) relataram caso semelhante em que um carcinoma cecal invasivo foi encontrado dois anos após um episódio de endocardite por *S.bovis* em indivíduo que havia realizado uma avaliação completa anteriormente que havia mostrado apenas um pólipó adenomatoso no sigmóide, o qual foi ressecado.

Ambos os casos apoiam Darjee e Gibb (1993) na sugestão de que *“nos pacientes com lesões valvulares cardíacas a bacteremia poderia levar a endocardite, mas na maioria dos pacientes, a bacteremia seria transitória e clinicamente silenciosa”*.

Ellmerich et al.(2000) sugeriram que as proteínas da parede celular do *Streptococcus bovis* atuam como um promotor da carcinogênese química induzida em um modelo animal através de uma interação direta com células da mucosa colônica.

Os resultados obtidos por Ellmerich et al. (2000) apóiam os resultados obtidos anteriormente por Klein et al.(1979) relataram um aumento da prevalência de *S. bovis* em culturas fecais de pacientes com carcinoma de cólon, em comparação com controles.

No entanto, ainda há controvérsias sobre o papel do *S. bovis* local na carcinogênese colorretal.

Estudos prospectivos mostraram taxas semelhantes de *S. bovis* fecal em pacientes com câncer e grupos controles e não puderam demonstrar a colonização seletiva por *S.bovis* em neoplasias colorretais (POTTER et al.,1998).

Em 2008, foi publicado um extenso estudo sobre presença fecal de *S.bovis* em 986 indivíduos livres de câncer e 62 pacientes com câncer colorretal, o qual não encontrou aumento de risco para neoplasias colorretais nos casos em que houve positividade para *S. bovis* nas fezes. Além disso, o estudo citado sugeriu que a bacteremia por *S.bovis* pode não ocorrer necessariamente sincronicamente com o seu aumento no colon, mas, independentemente deste (HUANG et al., 2008).

As técnicas rotineiras de identificação dos estreptococos baseadas em testes fenotípicos não permitem uma identificação inequívoca destes microrganismos. Foram desenvolvidas nos últimos anos para complementar e melhorar a identificação de estreptococos, algumas tecnologias baseadas em ácidos nucléicos, como hibridização de DNA ou a amplificação de regiões específicas do DNA (POYART et al., 1998).

Como as hemoculturas convencionais não poderiam ser eficazes para demonstrar um número muito baixo de bactérias translocadas ou até mesmo mortas, decidimos utilizar uma técnica de biologia molecular, a PCR, para aumentar a sensibilidade para detectar DNA de *S. bovis*.

Em 1998, Poyart e seus colaboradores descrevem técnica de PCR baseada em primers para caracterizar um fragmento interno (*SodAint*) dos genes que codificam a enzima superóxido dismutase dependente de manganês de vários estreptococos. A análise filogenética desses fragmentos *SodAint* caracterizam uma árvore evolucionária (Figura 3.3) com topologia semelhante aquela construída pelas seqüências 16S rRNA (POYART et al., 1998).

Sasaki et al.(2004) avaliaram o uso do método de PCR para identificação do *S. gallolyticus* com um par de *primers sodA*. Os autores desenvolveram método baseado em PCR para identificação do *S. gallolyticus* baseado um primer de oligonucleotídeos para ampliar seqüência parcial de *sodA* com amplicon específico de 408 pares de bases.

Com o objetivo de obter a identificação de bactérias do “Grupo *S. bovis*” de interesse médico, foi proposto, no presente estudo o desenho de um par de *primers* direcionado ao gene *SodA*.

Um par de *primers* foi especialmente planejado, desenvolvido e sintetizado para o estudo. Nosso par de *primers* é capaz de identificar subespécies do grupo *S.bovis* (*S. gallolyticus* e *S. infantarius*) e a sua capacidade de detecção em testes *in vitro* mostraram uma alta confiabilidade, mesmo para concentrações bacterianas muito baixas.

Neste sentido o par de *primers* desenvolvido pode constituir-se em alternativa plenamente viável e confiável para identificação bacteriológica e taxonômica do “Grupo *Streptococcus bovis*” em amostras clínicas de sangue.

4 CONCLUSÕES

- A) Foi desenvolvido um par de *primers* para a detecção de bactérias do “Grupo *Streptococcus bovis*” de interesse médico.
- B) A especificidade e eficácia do par de *primers* foram testadas e comprovadas utilizando a técnica da reação em cadeia de polimerase;
- C) No nosso estudo não foi possível detectar bactérias do “Grupo *Streptococcus bovis*” em pacientes portadores de tumores colorretais pelo método de hemocultura em sistema automatizado;
- D) No nosso estudo não foi possível detectar a presença de fragmentos de bactérias do “Grupo *Streptococcus bovis*” em pacientes portadores de tumores colorretais pelo método de reação em cadeia de polimerase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAZMI, W.; BUSTAMANTE, M.; O'LOUGHLIN, C. et al. The association of *Streptococcus bovis* bacteraemia and gastrointestinal diseases: A retrospective analysis. Digestive Diseases and Sciences. Miami, v.51, n.4, p.732-736, 2006.

APSINGI, S.; KULKARNI, A.; GOULD, K.F., MACCASKIE, A.W. Late *Streptococcus bovis* infection of knee arthroplasty and its association with carcinoma of colon: a case report. Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Newcastle, v. 15, p.761-2, 2007.

BALLET, M.; GEVIGNEY, G.; GARE, J.P.; DELAHAYE, F.; ETIENNE, J.; DELAHAYE, J.P. Infective endocarditis due to *Streptococcus bovis*, a report of 53 cases. Eur. Heart J. Lyon Montchat, v.16, p.1975-1980, 1995.

BAREA, Jaqueline Alves. Extração de DNA de material de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Medica) – Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

BEEBE, J.L., Koneman EW. Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. Clin. Microbiol. Rev. Denver, v.9, n.3, p.336-56, 1995.

BEECHING, N. J.; CHRISTMAS, T. I.; ELLIS-PEGLER, R. B.; NICHOLSON, G. I. *Streptococcus bovis* Bacteraemia Requires Rigorous Exclusion of Colonic Neoplasia and Endocarditis .Quarterly Journal of Medicine. Auckland, v.56, n.22, p.439-450, 1985.

BELINKIE, S.A.; NARAYANAN, N.C.; RUSSEL, J.C.; BECKER, D.R. Splenic abscess associated with *Streptococcus bovis* septicemia and neoplastic lesions of the colon. Dis Colon Rectum .v.26, p.823-4, 1983.

BIN, F.C. Rastreamento para câncer colorretal. Revista da Associação Médica Brasileira. São Paulo, v.48, n.4, p.286-288, 2002.

BLEIBEL, W.; D'SILVA, K.; ELHORR, A. et al. Streptococcus bovis endophthalmitis: A unique presentation of colon cancer. Digestive Diseases and Sciences. Dorchester, v.52, p.2336-2339, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [on-line]. Manual de Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica Modulo V. 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 18.06.2007.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [on-line]. Principais Síndromes Infecciosas, Modulo I. 2004. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 18.06.2007.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer [on-line], 2008. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2008. Acesso em 22.10.2008.

BIN, F.C. Rastreamento para câncer colorretal. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2002, vol. 48, no. 4, pp. 286-286, 2002.

CECCATO-ANTONINI, S.R., MENEGHIN, S.P., URASHIMA, A.S. Técnicas de Biologia Molecular [on-line]. Apostila de Curso de Extensão da Universidade Federal de São Carlos. 2004, 56p. Disponível em http://www.cca.ufscar.br/lamam/download/apostilacurso_molecular.pdf Acesso em 18.07.2007.

CURY, P.R., FURUSE, C., ARAUJO, N.S. Técnica e aplicação da polymerase em cadeia na área odontológica. Revista Odontológica de Araçatuba. Araçatuba, v.26,n.2,p.34-39, Julho/Dezembro, 2005.

DAL FORNO, N.L.F.; CAMPOS, A.S.; ROSA, L.C.; GODOY, L.P.; NOAL, A.L.; HÖRNER, R. Influência do volume de sangue no exame de hemocultura utilizando sistema automatizado em Hospital de Ensino. RBAC, Rio de Janeiro, v.37, n.1, p. 79, 2005.

DARJEE R. e GIBB A. P. Serological investigation into the association between *Streptococcus bovis* and colonic cancer. Alberta, v. 46, p.1116-1119, 1993.

EISENSTEIN, B.I. The Polymerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The New England Journal of Medicine. Boston, v.322, n.3, p.178-183, 1990.

ELLMERICH, S., SCHOLLER, M., DURANTON, B., GOSSÉ, F., GALLUSER, M., KLEIN J.P. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. Carcinogenesis. Strasbourg, v.21, n.4, p.753-6, 2000.

FACKLAM, R. R. Recognition of Group D Streptococcal Species of Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. Applied Microbiology. Atlanta, June, p.1131-1139, 1971.

FACKLAM, R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin. Microbiol. Rev. Atlanta, v.15, n4, p.613-630, 2002.

FAGUNDES, J.J.; NOUJAIN H.M.; COY C.S.R.; AYRISONO M.L.S.; GÓES J.R.N.; MARTINUZZO W.R.G; COSTA A.M.; MEDEIROS R.R.; LEONARDI L.S. Associação entre endocardite bacteriana e neoplasias - relato de 4 casos. Revista Brasileira de Coloproctologia. Campinas, v.20, p.95-95, 2000.

FORE JR, Joe; WIECHRES, I.R.; COOK-DEEGAN, R. The effects of business practices, licensing, and intellectual property on development and dissemination of the polymerase chain reaction: case study. Journal of Biomedical Discovery and Collaboration. Boston, v.1, n.7, p. 1-17, 2006.

GOLD, J.S.; BAYAR, S.; SALEM, R.R. Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. Arch. Surg. 2004;139:760–765.

GOUMAS, P.D.; NAXAKIS, S.S.; RENTZIS, G.A. et al. Lateral neck abscess caused by *Streptococcus bovis* in a patient with undiagnosed colon cancer. J. Laryngol. Otol. Patras, V. 111, P.666-8, 1997.

HABR-GAMA, Angelita. Colorectal cancer: the importance of prevention. *Gastroenterology*. São Paulo, v. 42, n. 1, 2005.

HAWLEY, S.T. VERNON, SW, LEVIN, B., VALLEJO, B. Prevalence of colorectal cancer screening in a large medical organization. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*. Feb; 13(2):314–319, 2004.

HERRERO, I.A.; ROUSE, M.S.; PIPER, K.E.; ALYASEEN, S.A.; STECKELBERG, J.M.; PATEL, R. Reevaluation of *Streptococcus bovis* Endocarditis Cases from 1975 to 1985 by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. Rochester, v.40, n.10, p. 3848-3850, 2002.

HUANG, C.; CHANG, S.; SHEN, M. et al. *Streptococcus bovis* fecal carriage is not associated with an increased risk of colorectal neoplasm. *J. Soc. Colon. Rectal Surgeon*. Taipei, v.19, p.71-77, 2008.

KARAHAN, Z.C.; MUMCUOGLU, I.; GURIZ, H.; TAMER, D.; BALABAN, N.; AYSEV, D.; AKAR, N. PCR evaluation of false-positive signals from two automated bloodculture systems. *J. Med. Microbiol.*, London, v.55, n.1, p.53-537, 2006.

KLEIN, R. S.; RECCO, R. A.; CATALANO, M. T.; EDBERG, S. C.; CASEY, J. I.; STEIGBIGEL, N. H. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N. Engl. J. Med*. New York, v.297, p.800–802, 1977.

KLEIN, R. S.; CATALANO, M. T.; EDBERG, S. C.; CASEY, J. I.; STEIGBIGEL, N. H. *Streptococcus bovis* septicemia and carcinoma of the colon. *Ann Intern Med*. New York, v.91, p.560–562, 1979.

KUPFERWASSER, I.; DARIUS, H.; MULLER, A. M.; MOHR-KAHALY, S.; WESTERMEIER, T.; OELERT, H.; ERBEL, R.; MEYER, J. Clinical and morphological characteristics in *Streptococcus bovis* endocarditis: a comparison

with other causative microorganisms in 177 cases. *Heart*.6 Torrance, v.80, p.276–280, 1998.

LEE, R.A.; WOO, P.C.Y.; TO, A.P.C.; LAU, S.K.P.; WONG, S.S.Y.; YUEN, K. Geographical difference of disease association in *Streptococcus bovis* bacteraemia. *Journal of Medical Microbiology*. Hong Kong, v.52, p. 903-908, 2003.

MAGER, D.L..Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *Journal of translational Medicine*. Boston, v. 4, p.01-18, 2006.

MURRAY, H. W.; R. B. ROBERTS. *Streptococcus bovis* bacteremia and underlying gastrointestinal disease. *Arch. Intern. Med.*, v. 138, p.1097-1099, 1978.

NATIONAL INSTITUTE OF CANCER RESOURCES (NICR). Colorectal Cancer Screening: Questions and Answers [on-line] Reviewed: 06/09/2004. Disponível em: <http://www.cancer.gov>. Acesso em: 17 jun. 2007.

NEVES, F.J.; MATTOS, I. E.; KOIFMAN, R.J.. Colon and rectal cancer mortality in Brazilian capitals, 1980-1997. *Arq. Gastroenterology*, São Paulo, v. 42, n. 1, 2005.

PINHO. M. *Biologia molecular do câncer – fundamentos para a prática médica*. Livraria e Editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, p. 55-71, 2005.

PIGNONE, M., SAHA S., HOERGER T., MANDELBLATT, J. Cost-effectiveness Analyses of Colorectal Cancer Screening: A Systematic Review the U. S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 137:96-104, 2002.

POTTER, M.A.; CUNLIFFE, N.A.; SMITH M.; MILES, R.S. et al. A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. *J. Clin. Pathol*. Edinburgh, v.51, p.473–474, 1998.

POYART, C.; QUESNE, G.; COULON, S.; BERCHE, P.;TRIEU-CUOT, P. Identification of Streptococci to Species Level by Sequencing the Gene

Encoding the Manganese-Dependent Superoxide Dismutase. J. Clin. Microbiol. Paris, v.36, p.41-47, 1998.

REIMER, L.G.; WILSON, M.L.; WEINSTEIN, M.P. Update on detection of bacteremia na fungemia. Clinical Microbiology Review. Salt Lake City, v.10, n.3, p.444-465, 1997.

REYNOLDS, J.G.; SILVA, E.; McCORMACK W.M. Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with bowel disease. J. Clin. Microbiol. Boston, v.17, n.4, p.696-7, 1983.

ROBBINS, N.; KLEIN, R.S.. Carcinoma of the colon 2 years after endocarditis due to *Streptococcus bovis*. Am J Gastroenterol 1983;78:162-3.

RUOFF, K. L.; FERRARO, M. J.; HOLDEN, J.; KUNZ, L.J. Identification of *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius* in clinical laboratories. J. Clin. Microbiol. Boston, v. 20, p.223-226, 1984.

SASAKI, E.; OSAWA, R.; NISHITANI, Y.; WHILEY, R.A. Development of diagnostic PCR assay targeting the Mn-Dependent Superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus gallolyticus*. Journal of Clinical Microbiology. London, v.42, n.3, p.1360-1362, 2004.

SCHELEGEL, L., GRIMONT, F., AGERON, E., GRIMONT, P.A., BOUVET, A. New group D Streptococcal Species. Indian Journal of Medical Research.119 (Suppl).may, pp. 252-256, 2004.

SEGNAN, N. *et al.* Randomized Trial of Different Screening Strategies for Colorectal Cancer: Patient Response and Detection Rates. Journal of National Institute of Cancer, n.5, p.247-357, v. 97, 2005.

TAFE, L.; RUOFF, K. *Streptococcus bovis*: Answers and questions. Clinical Microbiology Newsletter. Lebanon, v.29, n.7, p.49-55, 2007.

TENG, L.J.; HSUEH, P.R.; HO, S.W.; LUH, K.T. High prevalence of inducible erythromycin resistance amonh *Streptococcus bobis* isolates in Taiwan. Taipei, vol. 45, n.12, p.3362-3365, 2001.

TOWLER, B., IRWIG L., GLASZIOU, P., KEWENTER, J., WELLER, D., SILAL, C. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemocult. *BMJ*, 317: 559–565, 1998.

YANG, L.; PEI, Z. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World journal of gastroenterology*. New York. v.12, n.42, p.6741-6746, 2006.

WATSON, J. D. DNA recombinante: genes e genomas. 3ª edição, Porto Alegre, artmed, 496p., 2009.

WEITBERG, A.B.; ANNESE, C., GINSBER, M.B. *Streptococcus bovis* meningitis and carcinoma of the colon. *Johns Hopkins Med. J. Boston*, v.148, p.260-1, 1981.

ZAHA, A. et al. Técnicas de DNA Recombinante in: *Biologia Molecular Básica*. 3ª ed. Porto Alegre:Mercado Aberto, 336p., 2001.

ZARKIN, B. A.; LILLEMOE, K. D.; CAMERON, J.L.; EFFRON, P.N.; MAGNUSON, T.H.; . PITT, H.A. The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Ann. Surg. Baltimore*, v.211, n.6, p.786-791, 1990.

APÊNDICE A – Ficha Cadastral dos Pacientes**FICHA CADASTRAL - GRUPO ESTUDO**

1) Identificação do Paciente

<ul style="list-style-type: none">• Nome: _____
--

CPF: _____ Doc. Identidade: _____ Órgão Exp.: _____ UF: _____

Data Nascimento: ____/____/____ Sexo: _____ Estado Civil: _____

Endereço (Rua, n.º, bairro, complementos):

Telefones para contato: () _____

CEP: _____ - _____ Município: _____

2) Local de Internação do Paciente

<ul style="list-style-type: none">• () Hospital Regional Hans Dieter Schmidt• () Centro Hospitalar UNIMED• () Hospital Municipal São José• () Outros

3) Tipo e localização da Neoplasia _____

Data: _____

Assinatura do paciente e/ou responsável: _____

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Conforme Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 (Conselho Nacional de Saúde)

Eu, _____, aceito livremente participar da pesquisa “**Análise da incidência de bacteremia pelo Streptococcus bovis em pacientes portadores de câncer colorretal**”, em hospitais da cidade de Joinville, sob responsabilidade do pesquisador Professor Haroldo Luiz Jordelino da Luz, do Departamento de Medicina da Universidade da Região de Joinville/UNIVILLE. Este estudo tem como objetivo de analisar a hipótese de que pacientes portadores de tumores colorretais apresentam uma maior ocorrência de translocação para a corrente sangüínea de bactérias *S. bovis* quando comparados à população em geral.

.Minha participação neste estudo se resume a responder às perguntas estabelecidas pelos pesquisadores do estudo e doação de quantidade limitada de sangue (cerca de 30 ml coletados de maneira asséptica em sangue periférico). Demais informações pertinentes ao estudo e que o pesquisador responsável julgar necessário também poderão ser respondidas por mim para garantir o bom desenvolvimento do estudo.

Estou ciente de que o pesquisador responsável pelo estudo prestará esclarecimentos sobre todos os procedimentos a serem realizados e que esta pesquisa não trará nenhum risco à minha integridade física ou moral. As informações obtidas neste estudo serão úteis cientificamente para possibilitar o desenvolvimento de novos estudos, e poderão ser divulgadas em publicações e congressos, porém, sem a identificação dos participantes. O material recolhido para exames não poderá de maneira alguma ser usado para objetivos genéticos. Em qualquer momento do estudo poderei solicitar maiores esclarecimentos sobre o seu desenvolvimento e serei prontamente atendido pelo pesquisador responsável. Minha participação é, portanto, voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem qualquer ônus ou consequência para mim.

. Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo do pesquisador responsável. Meu tratamento e acompanhamento médico independem de minha participação neste estudo.

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento pela participação no estudo.

Para outras informações ou esclarecimentos, entrar em contato com o Professor Haroldo Luiz Jordelino da Luz através dos números: (47) 91637978 ou (47) 34258995. Para reclamações, entrar em contato através do número (47) 34619039.

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDA QUANTO AOS SEUS DIREITOS, ESCREVA PARA: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVILLE. ENDEREÇO: CAMPUS UNIVERSITÁRIO – BOM RETIRO – CAIXA POSTAL 246 – CEP 89.223-251 - JOINVILLE, SC.

Data: ____ / ____ / 2007, Joinville, SC.

Assinatura do participante ou responsável

Pesquisador responsável

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Univille

Universidade da Região de Joinville - **UNIVILLE**
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação PRPPG
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Fone: (47) 3461-9156 comitetica@univille.edu.br

Joinville, 29 de novembro de 2007

OFÍCIO N. ° 108/2007 - PRPPG/ COEP

Para Haroldo Luiz Jordelino da Luz
Aluno do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Turma VI
UNIVILLE

Apresentamos a seguir o parecer do Projeto de Pesquisa: **“ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE BACTEREMIA POR *STREPTOCOCCUS BOVIS* EM PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL”**, de sua autoria, sob processo n° 035/07, com data de entrada no Comitê de Ética em Pesquisa em 06 de setembro de 2007.

O referido projeto foi analisado e, verificou-se que atende plenamente aos parâmetros descritos na Resolução 196/96 e suas complementares, dessa forma está **aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE.

Atenciosamente,



Mariluci Neis Carelli

Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE

Membros do Comitê de Ética em Pesquisas da UNIVILLE:

Carlos J. Serapião, Cléia Aparecida C. Giosole; Dina Carazzai Condeixa, Eleide Abril G. Findlay; Elzira Munhoz, Daniela de Abreu Santos; Lucinda Clarita Boehm, Marco Fabio Mastroeni, Mariluci Neis Carelli, Maristela Adamovski, Nelma Baldin; Paulo Henrique C. de França.

ANEXO B - Aprovação da aplicação da pesquisa no Centro Hospitalar Unimed


Rua: Orestes Guimarães, 905 - (47) 441-9555
89204-060 - América Joinville - Santa Catarina
www.chu-joinville.com.br

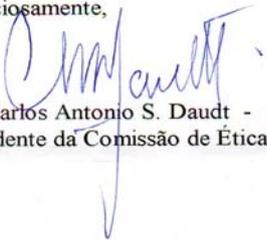
Joinville, 28 de janeiro de 2008.
CHU - CEM-001/2008

Ilmo. Sr.
Dr. Haroldo Luiz Jordelino da Luz
Clínica Médica/ Endoscopia Digestiva
Joinville - SC

Prezado Dr. Haroldo,

Recebemos correspondência da Direção Técnica e Clínica, solicitando análise e parecer sobre o projeto de pesquisa, para obtenção do Título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente.

A Comissão de Ética Médica analisou o Projeto e de acordo com o Ofício N° 108/20078 - PRPPG/COEP e parecer recebido do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, aprova a aplicação da pesquisa, no Centro Hospitalar Unimed, com a devida supervisão e seguindo as normatizações desta Instituição.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Antonio S. Daudt - CRM - 6772
Presidente da Comissão de Ética Médica - CHU

c.c.: Diretoria do CHU

ANS - n.º 321273

ANEXO C - Procedimento padrão de coleta de hemoculturas no Centro Hospitalar Unimed de Joinville

	<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRAO</p> <p align="center">Código POP-LAB-132</p>	<p>Número: 2943 Emissão: 29/01/2006</p> <p>Versão: 1.00</p>
<p>Tarefa: COLETA DE HEMOCULTURAS</p>		
<p>Executante(s): TECNICO DE ENFERMAGEM E AUXILIAR DE ENFERMAGEM</p>		
<p>1. RESULTADOS ESPERADOS</p>		
<p>1.1 Realizar coleta venosa do paciente e inocular as garrafas de hemocultura sem haver contaminação da amostra.</p>		
<p>2. MATERIAIS / EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS</p>		
<p>2.1 Clorexidina alcoólica; 2.2 Solução degermante; 2.3 Gaze estéril; 2.4 Garrafas de hemocultura; 2.5 Garrote; 2.6 Seringas; 2.7 Agulhas; 2.8 Algodão; 2.9 Adesivo/curativo; 2.10 Alcool 70%.</p>		
<p>3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES</p>		
<p>3.1 Este tipo de procedimento é realizado com maior frequência nos clientes internos do CHU; 3.2 Ao receber uma chamada para coleta interna anotá-la na planilha de chamadas, registrando o horário da chamada e o horário em que o coletador saiu para deslocar-se ao local da coleta; 3.3 Chegando ao local verificar a prescrição médica e caso esteja prescrito hemocultura localizar o paciente chamando-o pelo nome; 3.4 Preparar os materiais necessários para coleta, identificado-os com nome do paciente e número de amostra; 3.5 Colocar o braço do paciente em posição confortável e que permita um bom acesso ao local da coleta; 3.6 Explicar ao paciente o procedimento que será realizado; 3.7 Calçar luvas e garrotear o braço do paciente para avaliar a melhor veia para a punção; 3.8 Soltar o garrote e realizar assepsia do local utilizando gazes estéreis e solução degermante; 3.9 Completar a assepsia com gaze estéril e clorexidina alcoólica; 3.10 Trocar o par de luvas e garrotear novamente o braço do paciente. ATENÇÃO: Não tocar o local onde foi realizada a assepsia; 3.11 Realizar a punção conforme o POP-LAB-130; 3.12 Aspirar pelo menos 05 mL de sangue para cada amostra de hemocultura solicitada; 3.13 Realizar desinfecção da tampa da garrafa de hemocultura com algodão embebido em álcool 70%; 3.14 Inocular a amostra de sangue picando o ápice da garrafa com a agulha e apertando o embolo da seringa.</p>		
<p>4. CUIDADOS ESPECIAIS</p>		
<p>4.1 Informar-se sempre quanto a utilização ou não de antibióticos pelo paciente, pois disto dependerá a escolha da garrafa de hemocultura; 4.2 Utilizar a garrafa de tampa azul para paciente adultos, a garrafa amarela para pacientes infantis e a garrafa verde para aqueles que estão em uso de antibióticos; 4.3 NÃO REALIZAR A COLETA EM PACIENTES DURANTE O PICO FEBRIL;</p>		



	<p align="center">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRAO</p> <p align="center">Código POP-LAB-132</p>	<p>Número: 2943 Emissão: 29/01/2006</p> <p align="center">Versão: 1.00</p>
<p>4.4 Quando houver solicitação de mais de uma amostra de hemocultura colhe-las com um intervalo de 15 minutos de uma para a outra e em sítios de coleta diferentes;</p> <p>4.5 Não escrever ou colar etiquetas sobre o código de barras da garrafa de hemocultura;</p> <p>4.6 Dar baixa na prescrição médica comprovando que o material foi coletado.</p>		
<p>5. CONTROLES / NÃO CONFORMIDADES</p> <p>5.1 As não conformidades devem ser sempre reportadas a Bioquímica coordenadora do laboratório que registrará as mesmas em planilha própria.</p>		
<p>7. BIOSSEGURANÇA / SEGURANÇA LABORAL</p> <p>7.2 Utilizar todos os EPIs recomendados para a tarefa: luvas de procedimento;</p> <p>7.3 Comunicar qualquer acidente de trabalho a coordenação do setor.</p>		
<p>Elaborador: AMANDA NUNES</p>	<p>Revisor: SANDRA RIBEIRO DE C. GANSKE</p>	<p>Aprovador: ENIO RIEGER</p>



ANEXO D - Técnica de eletroforese em gel de agarose praticada no Laboratório de Biologia Molecular da Univille

1. Matriz - Gel de Agarose a 1%
 2. Voltagem - 100 volts
 3. Corante – Brometo de etídio
 4. Visualização – Luz Ultravioleta
-
1. Correr em gel de 1% de agarose por 1 hora a 100 volts o produto resultante da amplificação;
 2. Corar com corante intercalante brometo de etídio;
 3. Visualizar sob luz ultravioleta;
 4. O surgimento de bandas em gel de agarose é indicativo de presença de DNA.

ANEXO E - Extração/Purificação de DNA Genômico Microbiano* com emprego de Lisozima a partir de cultura em meio sólido - Laboratório de Biologia Molecular da Univille, Joinville

“QIAMP DNA MINI KIT (QIAGEN)” * Indicado inclusive para gram-positivos

Responsável: _____

Data: _____

Projeto (SIGLA): _____

Amostras: _____

Nome do arquivo da foto da eletroforese: _____

Amb = temperatura ambiente / Empregar máscara nas ações marcadas com números vermelhos.

Ação	V (μ L)	T($^{\circ}$ C)	t	Rot(rpm)	Visto
1. Separar 2 tubos Eppendorf (1,5mL) para cada amostra.					
2. Separar 1 coluna e 2 tubos de coleta para cada amostra.					
3. Separar os componentes do kit que serão empregados (<i>Lisozima</i> , <i>Buffer AL</i> , <i>Buffer AW1</i> , <i>Buffer AW2</i> e <i>Buffer AE</i>) e dispor sobre a bancada de extração, segundo a ordem em que serão utilizados. Equilibrar todos os componentes à temperatura ambiente para a subsequente utilização. Obs: no caso do kit ainda não tiver sido utilizado, preparar os reagentes <i>Qiagen Proteinase K</i> , <i>Buffer AW1</i> e <i>Buffer AW2</i> segundo instruções do manual do fabricante. * <i>Lisozima</i> armazenada no freezer e <i>Proteinase K</i> na geladeira.					
4. Pré-aquecer o termobloco a 37°C.					
5. Marcar as tampas dos tubos Eppendorf e colunas com as identificações das amostras.					
6. Coletar com auxílio de alça de platina células da bactéria desejada.					
7 Suspender o pellet em solução de lisozima (20mg/ml).	180				
8. Incubar em termobloco		37	30min		
9. Devolver a lisozima para o freezer.					
10. Adicionar <i>Proteinase K</i>	20				
11. Adicionar <i>Buffer AL</i> e vortexar	200				
12. Devolver a <i>Qiagen Proteinase K</i> para geladeira.					
13. Incubar em termobloco		56	30min		
14. Incubar em termobloco		95	15min		
15. Centrifugar (spin)					
16. Incubar em termobloco		70	10min		
17. Centrifugar (spin)					
18. Adicionar Etanol (96-100%) e vortexar.	200	Amb	15seg		
19. Centrifugar (spin).		Amb		Maxima	
20. Transferir o conteúdo (\approx 800 μ L) de cada tubo para as respectivas colunas contidas em tubos de coleta.					
21. Centrifugar		Amb	1min	8000	
22. Descartar os tubos de coleta e transferir as colunas para novos tubos de coleta.					
23. Adicionar <i>Buffer AW1</i> às colunas.	500	Amb			
24. Centrifugar		Amb	1min	8000	
25. Descartar os tubos de coleta e transferir as colunas para novos tubos de coleta.					
26. Adicionar <i>Buffer AW2</i> às colunas.	500	Amb			
27. Centrifugar		Amb	4min	14000	
28. Descartar os tubos de coleta e transferir as colunas para tubos Eppendorf previamente identificados.					
29. Adicionar <i>Buffer AE</i> às colunas e incubar.	100	Amb	1min		
32. Centrifugar		Amb	1min	8000	
33. Descartar as colunas					
34. Utilizar o material extraído logo em seguida ou manter os tubos a -20°C.					

ANEXO F - Extração/Purificação de DNA Genômico Microbiano de amostra clínica com emprego de Lisozima - Laboratório de Biologia Molecular da Univille, - Joinville

“*QIAMP DNA MINI KIT (QIAGEN)*” * *Indicado inclusive para gram-positivos*

Responsável: _____

Data: _____

Projeto (SIGLA): _____

Amostras: _____

Nome do arquivo da foto da eletroforese: _____

Amb = temperatura ambiente / Empregar máscara nas ações marcadas com números vermelhos.

Ação	V (μL)	T(°C)	t	Rot(rpm)	Visto
1. Separar 2 tubos Eppendorf (1,5mL) para cada amostra.					
2. Separar 1 coluna e 2 tubos de coleta para cada amostra.					
3. Separar os componentes do kit que serão empregados (<i>Lisozima, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2 e Buffer AE</i>) e dispor sobre a bancada de extração, segundo a ordem em que serão utilizados. Equilibrar todos os componentes à temperatura ambiente para a subsequente utilização. Obs: no caso do kit ainda não tiver sido utilizado, preparar os reagentes <i>Qiagen Proteinase K, Buffer AW1 e Buffer AW2</i> segundo instruções do manual do fabricante. * <i>Lisozima</i> armazenada no freezer e <i>Proteinase K</i> na geladeira.					
4. Pré-aquecer o termobloco a 37°C.					
5. Separar as amostras (sangue total) a serem processadas. Deixar que descongelem em suporte sobre a bancada.					
6. Marcar as tampas dos tubos Eppendorf e colunas com as identificações originais das amostras.					
7. Checar se as amostras encontram-se completamente descongeladas e homogêneas. Centrifugar as amostras.	1000	Amb	10min	7500	
8. Descartar sobrenadante e suspender o pellet em solução de lisozima (20mg/ml).'	180				
9. Incubar em termobloco		37	30min		
10. Devolver as amostras ao estoque e a lisozima na geladeira.					
11. Adicionar <i>Proteinase K</i>	20				
12. Adicionar <i>Buffer AL</i> e vortexar	200				
13. Incubar em termobloco		56	30min		
14. Devolver a <i>Qiagen Proteinase K</i> a geladeira.					
15. Incubar em termobloco		95	15min		
16. Centrifugar (spin)					
17. Incubar em termobloco		70	10min		
18. Remover os tubos do termobloco e centrifugar (spin).		Amb			máxima
19. Adicionar Etanol (96-100%) e vortexar.	200	Amb	15seg		
20. Centrifugar (spin).		Amb			máxima
21. Transferir todo o volume de cada tubo para as respectivas colunas contidas em tubos de coleta.					
22. Centrifugar		Amb	1min	8000	
23. Descartar os tubos de coleta e transferir as colunas para novos tubos de coleta.					
24. Adicionar <i>Buffer AW1</i> às colunas.	500	Amb			
25. Centrifugar		Amb	1min	8000	
26. Descartar os tubos de coleta e transferir as colunas para novos tubos de coleta.					
27. Adicionar <i>Buffer AW2</i> às colunas.	500	Amb			
28. Centrifugar		Amb	3min	14000	
29. Descartar os volumes contidos nos tubos de coleta e reposicionar as colunas nos mesmos tubos.					
30. Centrifugar		Amb	1min	14000	
31. Descartar os tubos de coleta e transferir as colunas para tubos Eppendorf previamente identificados.					
32. Adicionar <i>Buffer AE</i> às colunas e incubar.	200	Amb	1min		
33. Centrifugar		Amb	1min	8000	
34. Descartar as colunas					
35. Utilizar o material extraído logo em seguida ou manter os tubos a -20°C.					

ANEXO G- Certificado e identificação das cepas de *S. bovis* provenientes do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ.



UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
Departamento de Microbiologia Médica

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2008

Drs. Paulo H. Condeixa de França & Mauro Pinho
Laboratório de Biologia Molecular, Dpto de Medicina
Universidade da Região de Joinville / UNIVILLE
Campus Universitário Bom Retiro, Joinville SC, Brasil
Caixa Postal 246; CEP: 89201-972
Fone: 55-47-34619197; 55-47-34619112 ou 55-47-99363758

Em resposta a sua recente solicitação, estamos enviando as amostras abaixo relacionadas:

SS - 1224 derivada da ATCC 9809 -- *Streptococcus gallolyticus gallolyticus**
SS - 1631 derivada da CCUG 35224 -- *Streptococcus gallolyticus gallolyticus**
SS -1744 derivada da HDP 90246 -- *Streptococcus infantarius coli**

* Identificação conforme nosso sistema de caracterização e nomenclatura

Cordialmente

Lúcia Martins Teixeira
Prof. Titular
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes-IMPPG
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde - Bloco I
Av. Carlos Chagas Filho, 373
Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ 21941-902

Tel/Fax: 55 21 25608344 - Ext.132

email: imt2@micro.ufrj.br
luciamt2@globo.com
lucia@pesquisador.cnpq.br