Entrevista - Área Micro-organismo

Por: Maíra Halfen Teixeira Liberal Med. Vet. PhD Microbiology-University of Surrey, Uk (PESAGRO-RIO / CEPGM). Editora Técnica Científica Área de Micro-organismos.



Dalia dos Prazeres Rodrigues



Graduada em Biologia pela Universidade Gama Filho (1974), Me. em Medicina Veterinária - Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Alimentos de Origem Animal - Universidade Federal Fluminense/UFF (1983) e Dr. em Ciências (Bacteriologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (1993). É Pesquisadora em Saúde Pública pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, ocupando os cargos de Chefe do Laboratório de Enterobactérias e Coordenadora do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfeçções Bacterianas (CGLAB/SVS/MS). Tem experiência na área de Bacteriologia Aplicada, desenvolvendo projetos dentro das linhas de pesquisa: Etiologia das enteroinfeçções bacterianas; Monitoramento e caracterização molecular da resistência antimicrobiana; Caracterização feno e genotípica dos mecanismos de patogenicidade de enteropatógenos; Animais Silvestres, Aquáticos e sua Relevância em Saúde Pública; Subtipagem de patógenos das famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Aeromonadaceae circulantes na cadeia alimentar.

1. O Laboratório de Enterobactérias (LABENT) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), sob sua Chefia, atua no diagnóstico laboratorial de enteropatógenos bacterianos presentes na cadeia alimentar pertencentes às famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Staphylococcaceae. Qual é o principal objetivo do Laboratório, e que estratégia técnica tem sido adotada para a interação com o Setor Agropecuário e Industrial, responsáveis pela produção e comercialização dos alimentos?

Resposta:

O Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) tem como objetivo principal a avaliação de enteropatógenos bacterianos ocorrentes na cadeia alimentar. Atua, assim, no reconhecimento do papel destes organismos como agentes etiológicos em diferentes nosologias, realizando a caracterização das espécies circulantes, veiculação nos ecossistemas relacionados, determinação dos diferentes fatores de virulência, monitoramento e caracterização de sua resistência antimicrobiana e utilização de diferentes métodos de subtipagem que permitam, através da manutenção da totalidade de informações, o reconhecimento quanto a introdução de cepas com características emergentes e/ou exóticas.

Em seu conjunto, estas atividades são relevantes para a saúde pública e sanidade animal, por permitirem ofertar subsídios a ser adotados na prevenção e controle destes patógenos.

Segundo a OMS (2016), é estimado que 600 milhões - quase uma em cada dez pessoas no mundo pode desenvolver quadro clínico após consumo de alimentos contaminados, com taxa de mortalidade de 420.000/ano. Esta casuística é particularmente relevante em crianças <5 anos representando 40% das doenças de origem alimentar, com 125.000 mortes/ano.

Através do diagnóstico conclusivo, o Laboratório dá suporte para outras instituições como laboratórios e universidades públicas e privadas, instituições e indústrias que atuam na produção

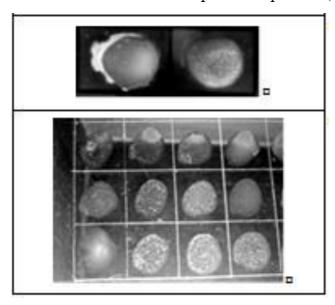


Figura 1. Soro aglutinação, em lâminas.

de alimentos. Estas atividades permitem analisar o papel dos alimentos de origem animal e seus subprodutos na disseminação de enteropatógenos, permitindo através das atividades de diagnóstico conclusivo ofertar informações para o aprimoramento das linhas de produção no sentido de reduzir os fatores de risco do processo.

Realizando uma contínua produção de antissoros, o Laboratório atende suas próprias necessidades de infraestrutura e distribui estes insumos para laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, atividade fundamental para o diagnóstico conclusivo de enteropatógenos.

2. Dentre as famílias bacterianas estudadas no LABENT, qual tem sido a mais prevalente em casos de surtos de enteroinfecções, quais as espécies / sorovares mais isolados, e quais as classes de antimicrobianos tem se mostrado mais eficazes para esses grupos específicos?

Resposta:

Entre as cepas recebidas se considerarmos os últimos anos, a prevalência de *Salmonella* spp. é reconhecidamente a mais elevada, entre os isolados no Laboratório e as recebidas para identificação conclusiva. Em nosso meio existem falhas no saneamento e oferta de água de qualidade, os quais representam fatores que dificultam seu controle, porém é importante ter ciência de que a Salmonelose é uma das zoonoses mais complexa, tendo sido declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização de Agricultura Alimentar (FAO) como a zoonose mais comum e importante desde 1950. Seu controle deve ser permanente, tendo em vista a emergência de novos sorovares e reemergência de outros, tanto nos países emergentes quanto nos industrializados. A elevada casuística está diretamente relacionada ao caráter zoonótico, à capacidade de implantação, propagação e permanência em diversos nichos ecológicos. Atualmente, são reconhecidos 2679 sorovares distintos capazes de infectar o homem e animais de sangues quente e frio.

Na cadeia epidemiológica, os animais, particularmente os de produção ocupam o ponto central na epidemiologia das Salmoneloses entéricas, representando reservatórios de importância sanitária e difícil controle. Alguns resultados apontados na literatura sugerem que a duração do estado de portador depende do sorotipo, cepa, idade do animal e outros fatores de risco.

Além das características de endemicidade, morbidade e dificuldade no controle da disseminação de *Salmonella* spp., o ponto de urgência clínica e epidemiológica tem sido a emergência de cepas resistentes a antibióticos de diversas classes especialmente pelo risco potencial de infecções extra intestinais que acometem grupos mais sensíveis da população.

Geralmente as infecções resultam em uma gastrenterite, mas pode ocorrer a disseminação da bactéria além do trato intestinal, e causar uma infecção sistêmica.

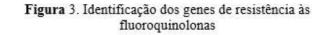
Atualmente este gênero é reconhecido como um dos principais patógenos implicados em doenças de transmissão alimentar, assumindo importância mundial pela ocorrência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos. Este é um problema impactado pelo uso imprudente de drogas antimicrobianas na medicina humana e na produção animal. Estes fármacos são utilizados muitas vezes sem controle no tratamento de infecções no homem, plantas e animais, bem como profilaticamente para prevenir infecções sendo administradas em baixas doses na alimentação animal, para melhoria da taxa de crescimento e conversão alimentar. Uma consequência indesejável é o potencial desenvolvimento de resistência antimicrobiana em patógenos de origem alimentar e subsequente transmissão ao homem, através dos alimentos. O que observamos dada a existência de um Programa de Monitoramento da Resistência estabelecido em nosso Laboratório como rotina, iniciado na década de 90 com a reintrodução da cólera estendendo-se a seguir para outros enteropatógenos.



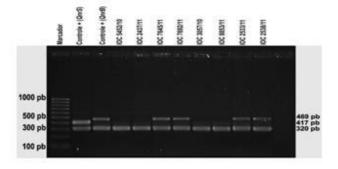
Figura 2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

O perfil atual aponta aumento no percentual de resistência a cefalosporinas e fluoroquinolonas entre os sorovares de maior prevalência, como por exemplo, em *S. enteritidis* e *S. typhimurium* de origem humana e alimentar. *S.* Heidelberg está entre os sorovares mais comumente detectado nas fontes animais, alimentar e ambiental, sendo preocupante dada a circulação de cepas multirresistentes e seu envolvimento em quadros invasivos. Esta ocorrência aponta um quadro extremamente preocupante especialmente quando observamos resistência a esses fármacos em cepas.

Esta assertiva pode ser corroborada quando observamos os índices de resistência às Fluoroquinolonas e Cefalosporinas, entre a totalidade de cepas nos últimos três anos com média de 7,8% e 27%, respectivamente.



QnrA, QnrB, QnrS por PCR-Multiplex em Salmonella spp.



3. Qual a metodologia utilizada para avaliar as características fenotípicas e genotípicas das bactérias enviadas para classificação, e daquelas isoladas dos casos clínicos enviados para diagnóstico?

Resposta:

Ela se dá através da utilização de métodos clássicos e moleculares. As metodologias clássicas são utilizadas para a identificação do agente etiológico em espécimes clínicos, assim como na caracterização conclusiva de cepas pertencentes aos gêneros/espécies das diferentes famílias de Enterobactérias isoladas de fonte humana (de origem comunitária, bem como daqueles envolvidos em surtos de Doenças de Transmissão Alimentar). Isolados de diferentes espécies animais (de produção, silvestres aquáticos ou terrestres, de companhia), alimentares, isolados do meio ambiente e matéria prima/rações também são analisados. No monitoramento da suscetibilidade aos antimicrobianos empregando drogas utilizadas nas áreas humana e veterinária; e na determinação de fatores de virulência através de testes de toxicidade ou de sua expressão fenotípica.



Figura 4. Meios de triagem: 1: Meio de Costa & Vernin; 2: Agar TSI; 3: Agar Lysina Ferro



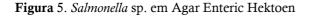




Figura 6. *Salmonella* sp. *Escherichia coli* em Agar MacConkey

São empregados diferentes métodos moleculares, visando a análise de características e diversidade genética em cepas isoladas de diferentes fontes incluindo, caracterização de seu perfil plasmidial, utilização de técnicas de PCR para caracterização da virulência e resistência antimicrobiana. São também utilizados métodos de subtipagem, visando o monitoramento dos

clones em diferentes fontes e regiões do país, os quais representam ferramentas essenciais para o reconhecimento de espécies ou sorovares circulantes, permitindo detectar a emergência e/ou reemergência de alguns e introdução daqueles com características exóticas.

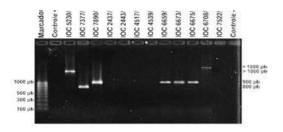


Figura 7. Identificação da região variável do Integron

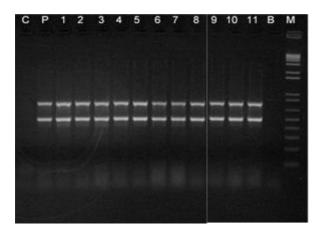


Figura 8. Amplificação por PCR dos genes de virulência *hil*A e *sip*A em *Salmonella* Enteritidis

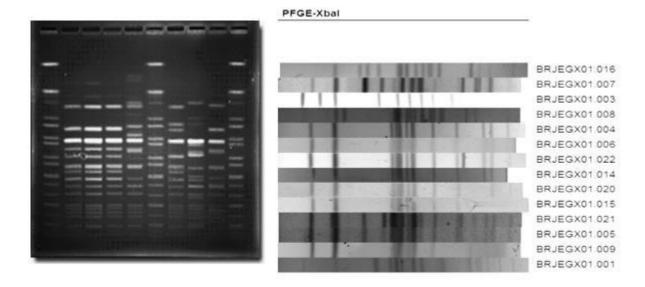


Figura 9. Digestão por XbaI de DNA genômico em Salmonella spp. através da PFGE

4. Como é feita a interação com outras Instituições de Pesquisa Nacionais e Internacionais, uma vez que o LABENT atua também como Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (CGLAB/SVS/MS), sob sua Coordenação?

Resposta:

O Laboratório promove diversas atividades de cooperação com diferentes instituições nacionais e internacionais, parcerias já estabelecidas e que vem permitindo o desenvolvimento conjunto de diferentes projetos. No contexto da Fiocruz, desenvolve atividades em conjunto com outros Laboratórios do IOC e com diversas Unidades da Fundação, como a Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), o Instituto Nacional de Infectologia (INI), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o Instituto Fernandes Figueira (IFF) e Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz/PE.

No Brasil, ainda promove parcerias com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS); VIGIAGUA/CGVAM/Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador (DSAST/SVS/MS); Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Programa Nacional de Sanidade Animal (MAPA),. Tem parcerias firmadas com diversas universidades estaduais e federais, como a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Universidade Federal Fluminense, Universidade Federal do Norte Fluminense, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Ceará, além da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO / CEPGM), e laboratórios de redes privadas de diagnóstico.

Internacionalmente, o Laboratório do IOC é um importante parceiro da Organização Pan Americana de Saúde (OPS/OMS) e participa de programas de controle externo de qualidade, como EQAS/WHO (Danish Veterinary Laboratory, da Dinamarca); Canadian Science Centre for Human and Animal Health, Canadá; International Federation for Enteric Phage Typing-London, do Reino Unido; Rede PULSENET e Global Foodborne Network, ambas iniciativas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Tais atividades permitem o fortalecimento da cooperação com diferentes instituições e países, como Health Canada; Centers for Disease Control and Prevention, dos EUA; National Institute of Cholera & Enteric Diseases, na Índia; INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, da Argentina; Universidad Mayor de San Simon, da Bolívia; Instituto Nacional de la Salud, na Colômbia; e o Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, da Venezuela.

O Laboratório atua, ainda, na formação de recursos humanos, investindo sempre na formação e renovação de sua equipe. Participa de diversos programas de ensino, promovendo o aprendizado de bolsistas do programa de estágio curricular da Fiocruz, e de estudantes de vocação e iniciação científica. Seus pesquisadores desenvolvem, ainda, atividades de docência e orientação em cursos de pós-graduação, além de participarem do intercâmbio e formação de profissionais oriundos de diferentes instituições públicas e privadas, através de estágios de aperfeiçoamento e cursos de atualização em parceria com instituições públicas ou privadas.

5. Fale-me sobre o histórico da Coleção de Enterobactérias da FIOCRUZ e do acervo nela preservado

Resposta:

Originalmente designada "Coleção de Enteropatógenos Bacterianos" dentro de um conjunto de coleções bacterianas associadas, na atualidade é designada "Coleção de Enterobactérias – CENT" a qual é filiada à *World Federation for Culture Collections*, WFCC, sob o

registro WDCM: 1074 e fiel depositária no Conselho de Gestão de Patrimônio Genético – CGEN.

Historicamente teve sua origem nos trabalhos pioneiros e por iniciativa dos pesquisadores Genésio Pacheco, Gobert A. Costa e Milton T. Mello. Podemos considerar que teve embrionariamente seu fomento com o Laboratório de Enterobactérias, o qual iniciou suas atividades no final da década de 1920, realizando a caracterização de diferentes enteropatógenos em quadros disentéricos, ocorridos na cidade do Rio de Janeiro e daquelas resultantes de suas atividades de pesquisa.

Estas atividades, fomentadas pelos pesquisadores, tiveram como intuito organizar linhagens isoladas e adquiridas pelos mesmos tendo deste modo estabelecido a coleção de culturas em 1930. Foi enriquecida em meados dos anos 40 a partir de estudos sobre a peste murina e na década de 60 com várias linhas de atuação na família Enterobacteriaceae e Vibrionaceae desenvolvendo projetos de pesquisa em parceria com outras instituições.

O reconhecimento da qualidade destes serviços se deu através da criação de Centros de Referência Nacional para Diagnóstico Laboratorial de Cólera (1972), recredenciado em 1991 e para febre tifóide (1985) pelo Ministério da Saúde. Consequentemente, o acervo da CENT constitui um banco genético que representa parte fundamental da história da saúde pública do Brasil.

Na atualidade atua como Laboratório de Referência Nacional em Enteroinfecções Bacterianas integra a iniciativa da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) no diagnóstico de enteropatógenos para a Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. No início dos anos 2000, como Laboratório de Referência passou a atuar como Referência Nacional para a rede PULSENET do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC/WHO) para a subtipagem de microorganismos patogênicos.

Ao longo desses anos, configurou-se como uma coleção de pesquisa de referência do Laboratório de Enterobactérias, sendo reconhecida pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no ano de 2001. A coleção está localizada no Pavilhão Rocha Lima, 3º andar sendo denominada Coleção de Enterobactérias (CENT), na qual exerço a função de curadora.

A CENT tem como finalidade: preservar, adquirir, identificar, autenticar e fornecer culturas de bactérias de interesse para a Biotecnologia. Esta é resultante da realização de estudos básicos e aplicados em espécies das famílias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Aeromonadaceae, bem como outros grupos bacterianos de importância em Saúde Pública e Sanidade Animal.

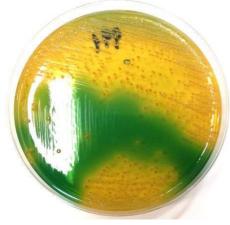


Figura 10 *Vibrio cholerae* O1 em Agar TCBS



Figura 11. *Aeromonas hydrophila* em Agar GSP

Na atualidade a CENT possui um acervo com cerca de 200 mil isolados pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Aeromonas* e centenas de representantes de outros grupos de Gram-negativos e ainda algumas centenas de Gram positivos.

As cepas são preservadas de duas formas: em *Skim Milk* a -70°C e em Agar Nutriente Tamponado à temperatura ambiente (±25°C). Ambas as formas de armazenamento são utilizadas para cepas mantidas na área física do Laboratório de Enterobactérias-LABENT/IOC, situado no Pavilhão Rocha Lima. E em face ao elevado número que compõe o acervo um percentual complementar está preservado à temperatura ambiente em Agar Nutriente Tamponado em sala do Pavilhão 108. Ambos estão localizados no Campus da Fiocruz em Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ.

6. Descreva-me a finalidade da Coleção de Enterobactérias e as atividades de prestação de serviços a ela relacionadas.

Resposta:

A CENT representa um centro de conservação e distribuição de material biológico autenticado, funcionando atualmente como depósito de linhagens selvagens, com características emergentes ou exóticas, assim como daquelas resultantes de suas atividades de pesquisa e diagnóstico do Laboratório de Enterobactérias (LABENT) incluindo o Monitoramento da Resistência Antimicrobiana de Enteropatógenos de Origem Comunitária, do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) e da coordenação da Rede de Rede PULSENET/CDC/WHO.

Anualmente destas atividades resultam em uma média de sete mil cepas. Destas um percentual de 5 a 10% é avaliado quanto a diferentes características feno e genotípicas, de acordo com sua relevância em sanidade animal e saúde pública. O acervo identificado em nível de espécie e/ou sorovar que apresente características de relevância é mantido em Agar Nutriente Tamponado à temperatura ambiente, condição que permite sua viabilidade por período superior a 20 anos e entre elas um grupo é mantido a -70°C.

Possui também acervo de cepas padrão, utilizadas na produção de antígenos e antissoros, empregados na identificação de patógenos das famílias Enterobacteriaceae e Vibrionaceae, além de padrões para o controle de diferentes tipos de atividade diagnóstica, clássica e/ou molecular. Estes são obtidos através de aquisição ou permuta, de coleções de culturas nacionais e internacionais.

Do total de cepas, além das linhagens selvagens, resultantes de suas atividades de pesquisa, são incorporadas aquelas recebidas de diferentes tipos de laboratório, onde foram avaliadas para a pesquisa de características específicas, incluindo métodos feno ou genotípicos. As solicitações quanto à análise são feitas mediante o preenchimento e envio do Formulário para Solicitação de Identificação, Autenticação e Depósito, que pode ser obtido através do e-mail: cent@fiocruz.br.

Graças a tal acervo, inúmeras linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas, tanto nas áreas básicas como aplicadas, com interfaces na Biotecnologia. De modo semelhante, de acordo com solicitação são fornecidas cepas para instituições de pesquisa e universidades para o desenvolvimento de dissertações e teses nos cursos de pós-graduação em nível de Mestrado e Doutorado.

O acesso aos dados do acervo existente é obtido a partir de uma ação onde o MCT apoiou o desenvolvimento e a implementação do Sistema de Informação de Coleções de Interesse

Revista RG News 4 (1) 2018 - Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos

Biotecnológico – SICOL. Lançado em 2002, reúne informações sobre coleções de culturas de microrganismos num sistema de informação *on-line*, pelo qual, de forma dinâmica, o usuário pode integrar os dados de linhagens de microrganismos disponíveis nas coleções nacionais, e cruzar esses dados com informações de diretórios taxonômicos, literatura científica e bancos de dados genômicos (*GenBank*), agregando valor ao material biológico disponível nas coleções brasileiras, estando na atualidade em um processo de remodelação.

Alguns aspectos importantes que vou apontar são de que as cepas são fornecidas a partir da requisição de um cliente, não são comercializadas ou cedidas como empréstimo. As cepas não são fornecidas para particulares, apenas para instituições reconhecidas, seguindo as normas vigentes de biossegurança.

A solicitação deve ser feita mediante o preenchimento e envio do Formulário de Material Microbiológico que pode ser obtido através do e-mail: cent@fiocruz.br. Outra atividade oferecida pela CENT inclui os serviços de depósito de isolados clínicos recebidos de diferentes tipos de laboratórios. As categorias de depósitos são: Depósito aberto (acervo de acesso público), quando não há restrição quanto à distribuição; Depósito restrito (fornecido com autorização do depositante); e Depósito fechado (depósito confidencial), quando há restrição por parte do depositante.

Muito obrigada Dalia por aceitar esta entrevista, com certeza você realiza um trabalho extremamente relevante e, para mim foi uma honra poder efetivar esta com você! Maira.