

Testes diagnósticos

Cristiane Guzzo
Departamento de Microbiologia
ICB-USP

Filogenia, Taxonomía & Sistemática

▶ Filogenia – Árvore Filogenética

- Relação evolutiva entre os microorganismos

▶ Taxonomia

- Caracteriza, nomeia e posiciona os organismos em grupos (baseou-se principalmente em aspectos fenotípicos)
- Atualmente é Polifásico: fenótipo + genótipo + filogenético

▶ Sistemática Microbiana

- Estudo da diversidade e as relações entre microorganismos

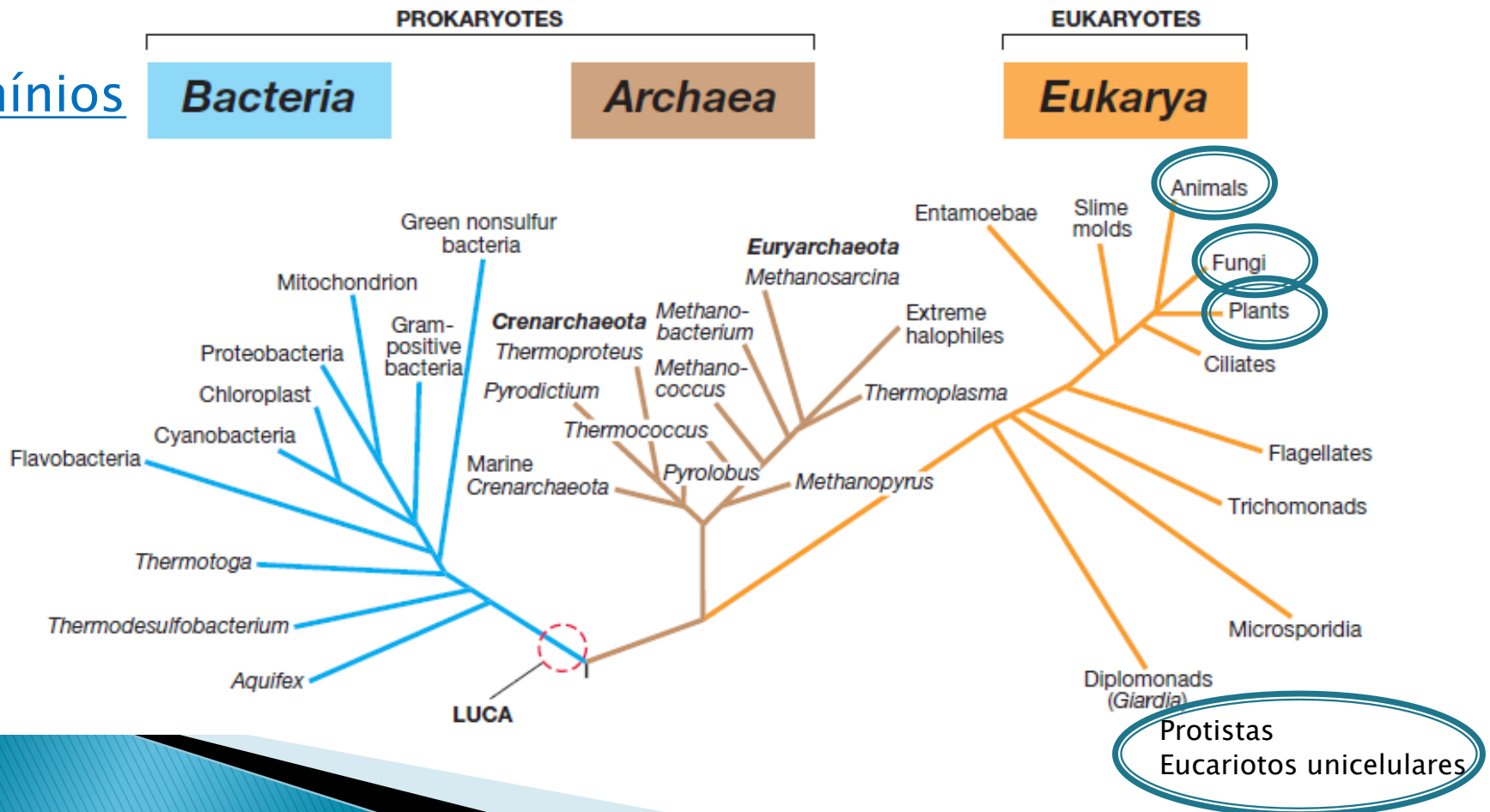
Análise Evolutiva – Árvore Filogenética

- ▶ Woese – RNA ribossômial (SSU rRNA) – 16S (procarioto) ou 18S (eucarioto)
 - Distribuídos Universalmente
 - Função constante entre os organismos vivos
 - Modificam lentamente – altamente conservados
 - Tamanho adequado para análise evolutiva

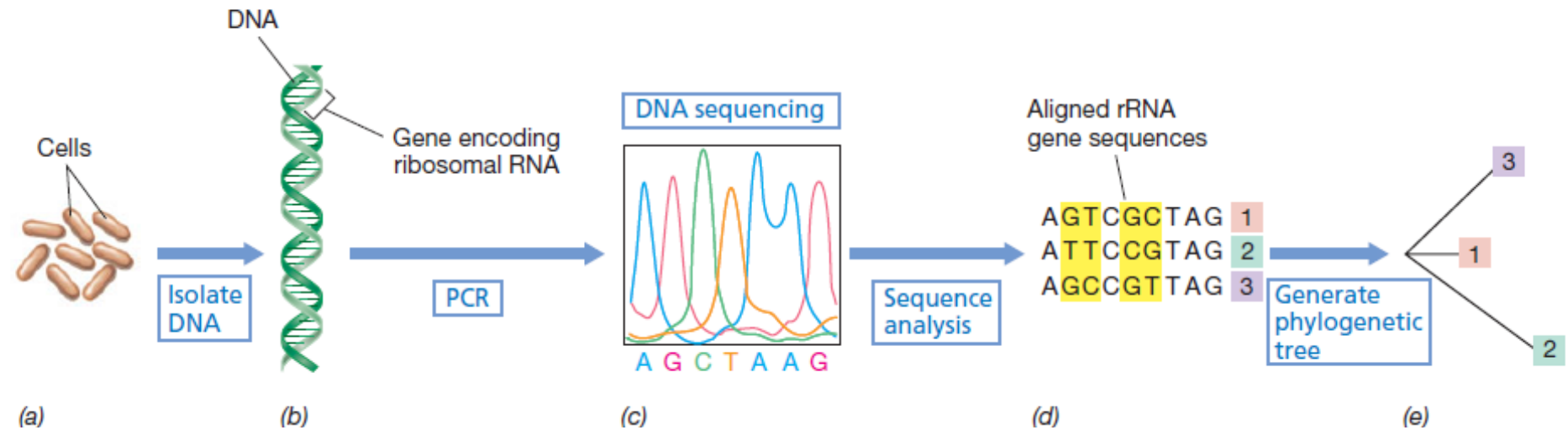
Filogenia Microbiana

Antigamente os seres vivos eram agrupados em: Plantas, animais, fungos, protistas e bactérias

Domínios



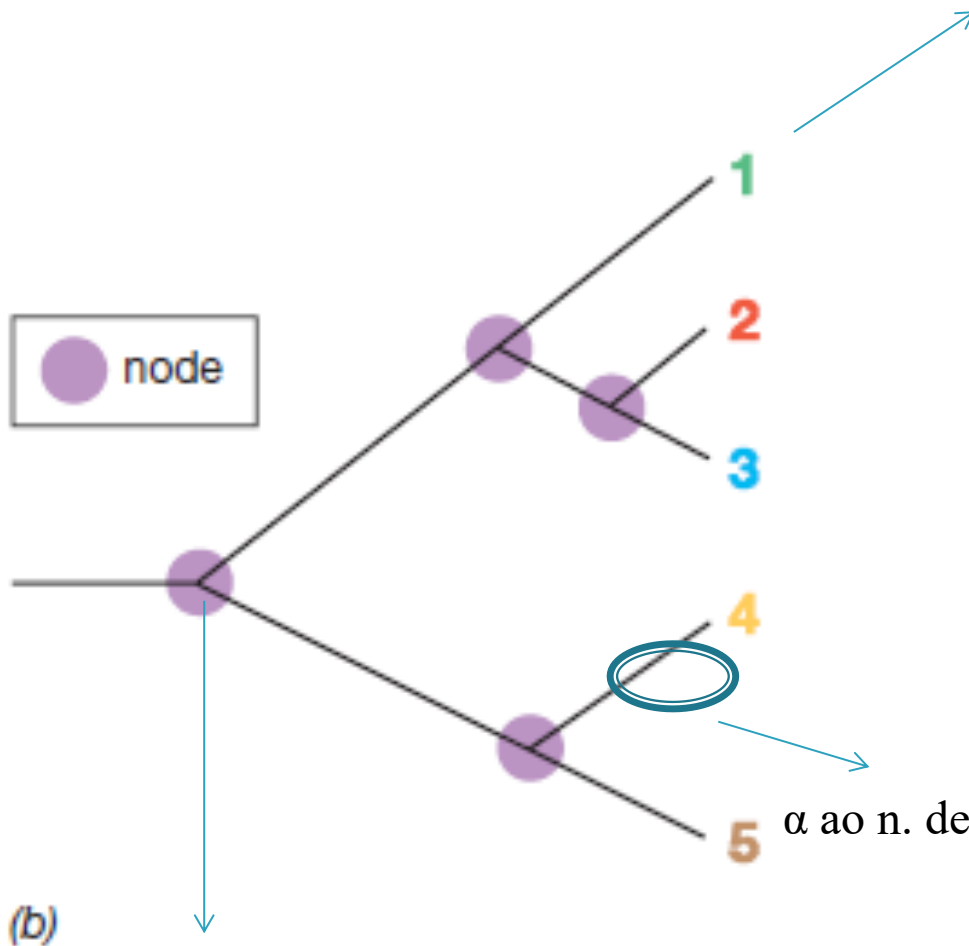
Filogenia Microbiana



- ▶ Assim são construídas as ÁRVORES FILOGENÉTICAS
(Wose estabeleceu que existem 3 domínios - *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaria*)

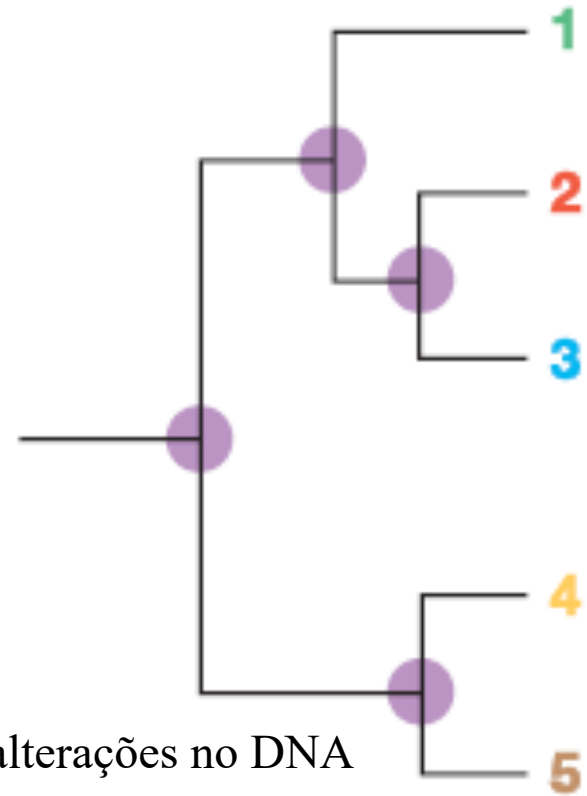
Árvore Filogenética

Ramos - linhagens individuais



(b)

Nó
Ancestral em comum que divergiu



(c)

ED Distância Evolutiva

Organismo	Seqüência	Análise
A	C ₁ G ₂ U ₃ A ₄ G ₅ A ₆ C ₇ C ₈ U ₉ G ₁₀ A ₁₁ C ₁₂	De A → B ocorrem três diferenças, em um total de doze; assim $\frac{3}{12} = 0,25$
B	C ₁ C ₂ U ₃ A ₄ G ₅ A ₆ G ₇ C ₈ U ₉ G ₁₀ G ₁₁ C ₁₂	
C	C ₁ C ₂ A ₃ A ₄ G ₅ A ₆ C ₇ G ₈ U ₉ G ₁₀ G ₁₁ C ₁₂	
D	G ₁ C ₂ U ₃ A ₄ G ₅ A ₆ U ₇ G ₈ U ₉ G ₁₀ G ₁₁ C ₁₂	

(a) Alinhamento de seqüências e análise

Distância evolutiva

E_D	A	→	B	0,25
E_D	A	→	C	0,33
E_D	A	→	D	0,42
E_D	B	→	C	0,25
E_D	B	→	D	0,33
E_D	C	→	D	0,33

(b) Cálculo da distância evolutiva

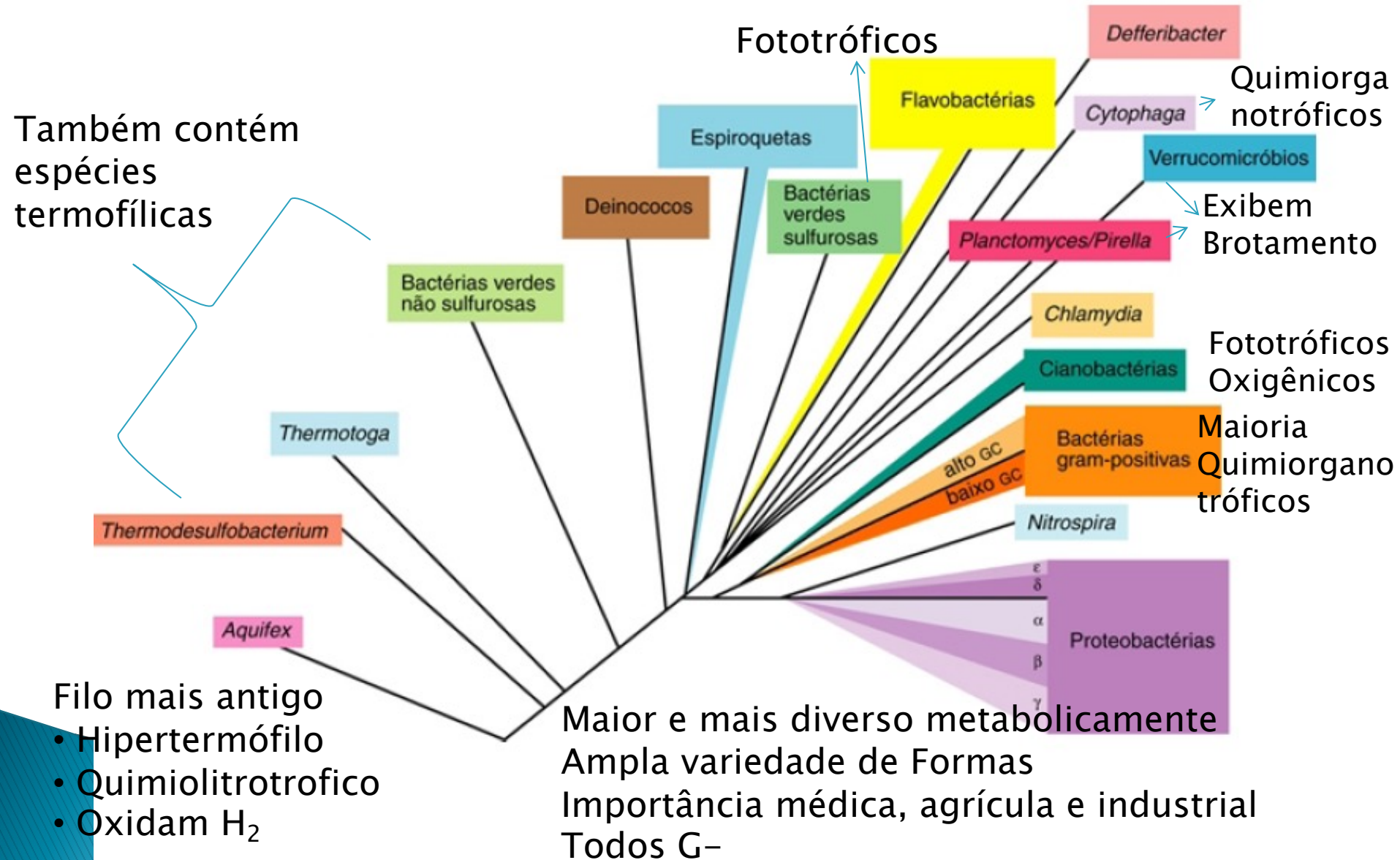
Análise Evolutiva – árvore Filogenética

- ▶ Outros genes podem auxiliar na filogenia
 - Fator TU de alongação da síntese proteica
 - Hsp60 – choque térmico
 - tRNA sintetases (vários)
- ▶ Relógios Moleculares
 - Correlaciona o número de modificações no DNA com o tempo.
 - O problema é que velocidade de mutação não é constante entre os três domínios
 - Correlações diretas e confiáveis são difíceis
 - Medidas relativas são mais confiáveis

Filogenia Microbiana

- ▶ Muitos genes comuns nos três Domínios, apesar de terem divergidos a milhares de anos (ter vindo de transferência horizontal) – Promiscuamente transferidos entre populações primitivas
- ▶ Ao longo do tempo foi bloqueado a transferência horizontal irrestrita
 - ▶ Exemplo: endonucleases
- ▶ Gerou diferentes espécies
- ▶ Usar a filogenia para auxiliar na Identificação e na Classificação (Taxonomia)

Domínio de *Bacterias* & Metabolismo



Identificação e Classificação

- FISH
- Fenótipo
- Técnica de FAME
- Análise Genotípica
 - Ribotipagem
 - Hibridização DNA-DNA
 - rep-PCR

Assinaturas nas sequências de rRNA são usadas para a Identificação e Classificação

- ▶ Algumas sequencias são **específicas** e algumas são **genéricas**

	Localização	ARCHAEA	BACTERIA	EUKARYA
CACYYG	315	0	>95	0
AAACUCAA	910	3	100	0
AAACUUAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCYYCR	1110	0	>95	0
UCCCUG	1380	>95	0	100
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

FISH – Fluorescent in situ Hybridization

- ▶ Sonda é ligada a um corante fluorescente
- ▶ Aplicar diretamente em células em cultura ou no ambiente natural
- ▶ Usada em diagnóstico clínico de pacientes (identificação do patógeno)

Fotografia de Contraste de fase

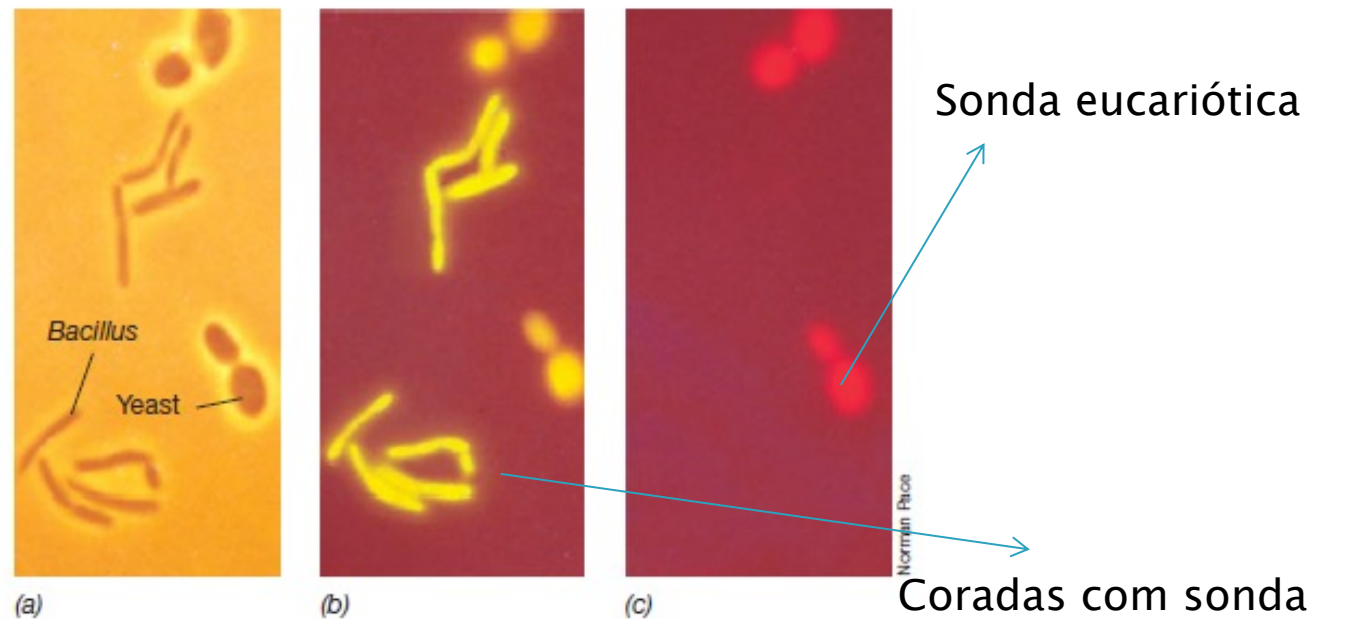


Figure 16.17 Fluorescently labeled rRNA probes: Phylogenetic stains. (a) Phase-contrast photomicrograph of cells of *Bacillus mega-*

Árvaro filogenética de uma comunidade microbiana


- ▶ Amplificar e sequenciar a SSU rRNA de uma população microbiana e gerar uma árvore filogenética – Importante para ecologia

Sistemática e Taxonomia – FENÓTIPO

- ▶ Muitos fenótipos são usados para caracterizar os organismos

Table 16.2 *Some phenotypic characteristics of taxonomic value*

Category	Characteristics
Morphology	Colony morphology; Gram reaction; cell size and shape; pattern of flagellation; presence of spores, inclusion bodies (e.g., PHB, ^a glycogen, or polyphosphate granules, gas vesicles, magnetosomes); capsules, S-layers or slime layers; stalks or appendages; fruiting-body formation
Motility	Nonmotile; gliding motility; swimming (flagellar) motility; swarming; motile by gas vesicles
Metabolism	Mechanism of energy conservation (phototroph, chemoorganotroph, chemolithotroph); utilization of individual carbon, nitrogen, or sulfur compounds; fermentation of sugars; nitrogen fixation; growth factor requirements
Physiology	Temperature, pH, and salt ranges for growth; response to oxygen (aerobic, facultative, anaerobic); presence of catalase or oxidase; production of extracellular enzymes
Cell lipid chemistry	Fatty acids ^b ; polar lipids; respiratory quinones
Cell wall chemistry	Presence or absence of peptidoglycan; amino acid composition of cross-links; presence or absence of cross-link interbridge
Other traits	Pigments; luminescence; antibiotic sensitivity; serotype; production of unique compounds, for example, antibiotics

^aPHB, poly- β -hydroxybutyric acid ( Section 3.10).

^bFigure 16.19

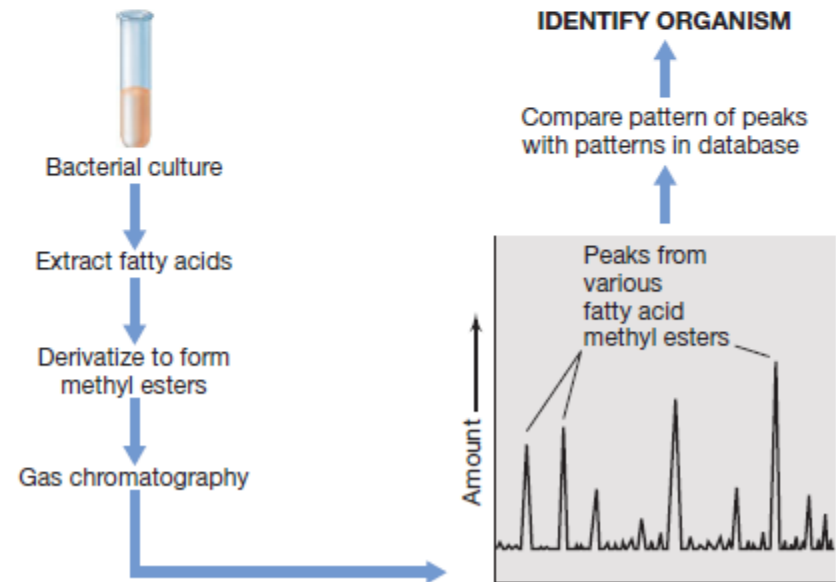
Análise dos ácidos graxos nas membranas –FAME

- ▶ Técnica de FAME – Fatty acid methyl ester
- ▶ Amplamente usado em laboratório clínico
- ▶ Pode identificar **uma espécie bacteriana em particular**
- ▶ Padronização nos experimentos, pois temperatura e outros fatores modificam o resultado

Classes of Fatty Acids in *Bacteria*

Class/Example	Structure of example
I. Saturated: tetradecanoic acid	
II. Unsaturated: omega-7-cis hexadecanoic acid	
III. Cyclopropane: cis-7,8-methylene hexadecanoic acid	
IV. Branched: 13-methyltetradecanoic acid	
V. Hydroxy: 3-hydroxytetradecanoic acid	

(a)



(b)

Análise Genotípica

- ▶ Com a era genômica, vários genomas foram sequenciados e depositados em banco de dados públicos
- ▶ Análise comparativa destas sequências podem ser usadas para a taxonomia
- ▶ Alguns métodos genotípicos:

Table 16.3 *Some genotypic methods used in bacterial taxonomy*

<i>Method</i>	<i>Description/application</i>
DNA–DNA hybridization	Genome-wide comparison of sequence similarity. Useful for distinguishing species within a genus
DNA profiling	Ribotyping (Section 16.9), AFLP, rep-PCR (Figure 16.21). Rapid method to distinguish between species and strains within a species
Multilocus sequence typing	Strain typing using DNA sequences of multiple genes (Figure 16.22). High resolution, useful for distinguishing even very closely related strains within a species
GC ratio	Percentage of guanine–cytosine base pairs in the genome. If the GC ratio of two organisms differs by more than about 5%, they cannot be closely related, but organisms with similar or even identical GC ratios may be unrelated. Not much used now in taxonomy because of poor resolution
Multiple-gene or whole genome phylogenetic analyses	Application of cladistic methods to subsets of genes or to whole genomes from the organisms to be compared. Yields better phylogenetic picture than single-gene analyses

Ribotipagem

- ▶ DNA genômico
- ▶ Digestão com enzimas de restrição
- ▶ Padrão das bandas (Finger print)
- ▶ Hibridização com uma sonda marcada de rRNA (16S da rRNA)
- ▶ Rápido e específico
- ▶ **Descriminação entre espécies**
- ▶ Padrão das bandas (mapa de restrição para plasmídeo) é o ribotipo

*Lactococcus
lactis*
*Lactobacillus
acidophilus*
*Lactobacillus
brevis*
*Lactobacillus
kefir*



Carl A. Batt

Hibridização DNA-DNA

Organisms to be compared:

Organism 1

Organism 2

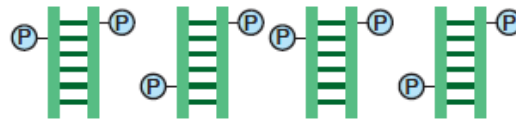
Genomic DNA

DNA preparation

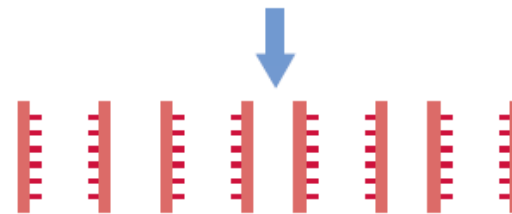
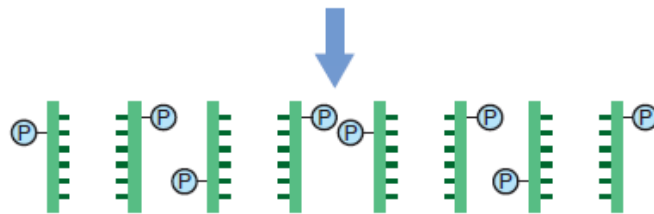
Shear and label ($-P$)

Genomic DNA

Shear DNA



Heat to form single strands

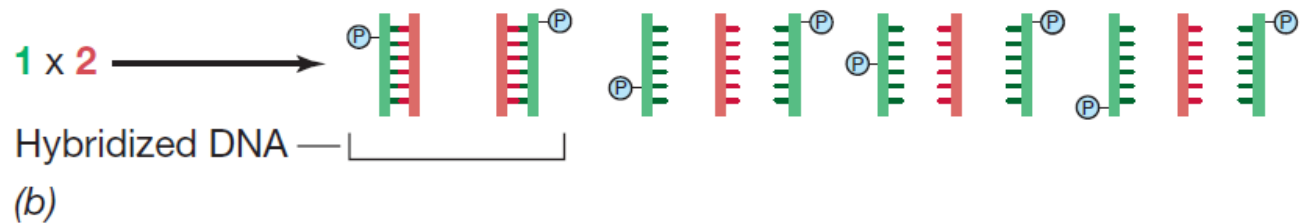
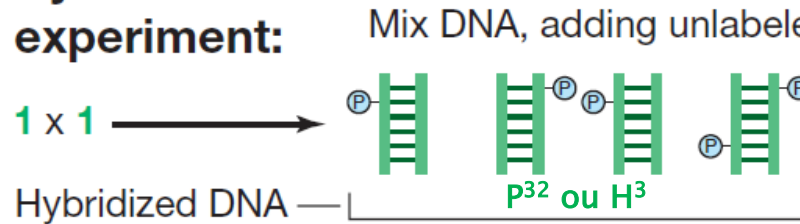


(a)

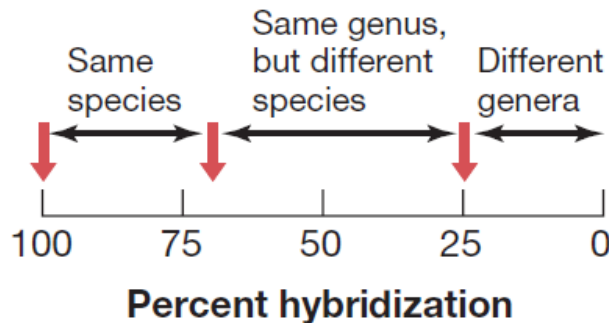
Hibridização DNA-DNA

- 1- Marcado
- 2- Digerido (frag. Pequenos)
- 3- Aquecido
- 4- Misturado
- 5- Resfriado
- 6- DNA dupla fita não hibridizado é separado
- 7- Mede a radioatividade e compara com um controle (100%)

Hybridization experiment:



Results and interpretation:

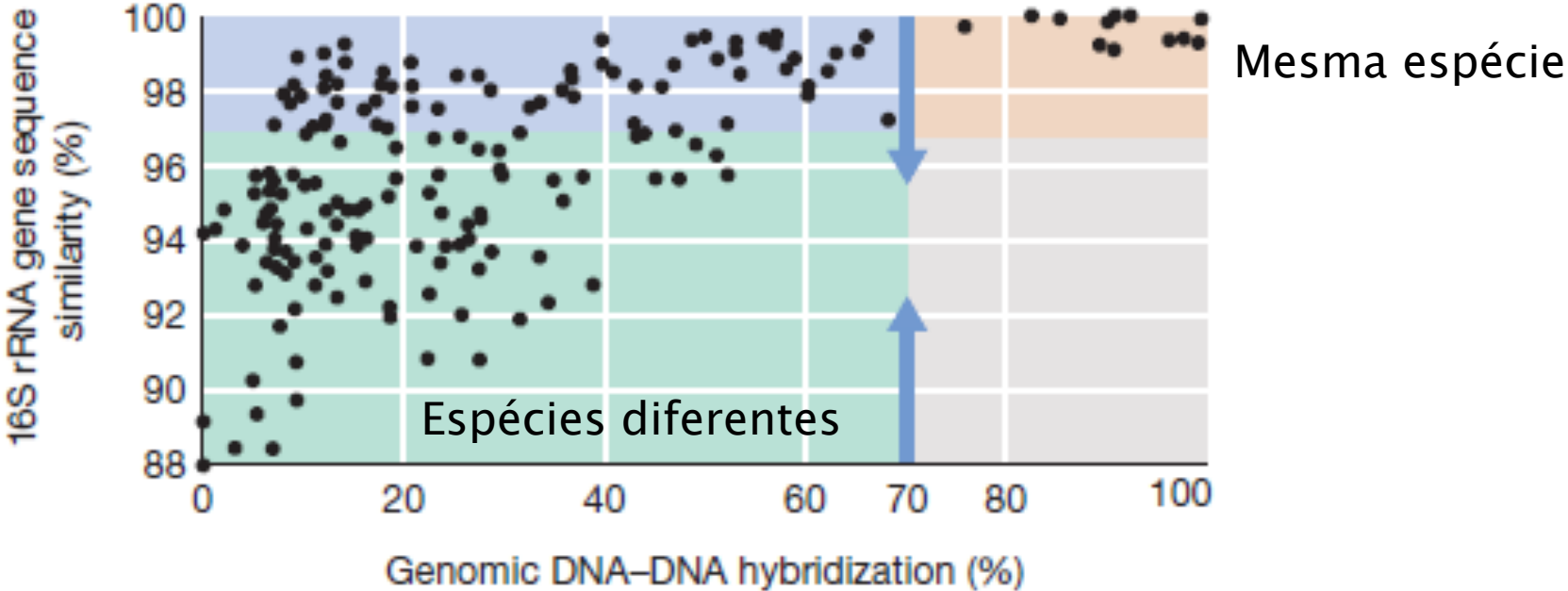


1 x 1
100%
↓
Same strain (control)

1 x 2
<25%
↓
1 and 2 are likely different genera

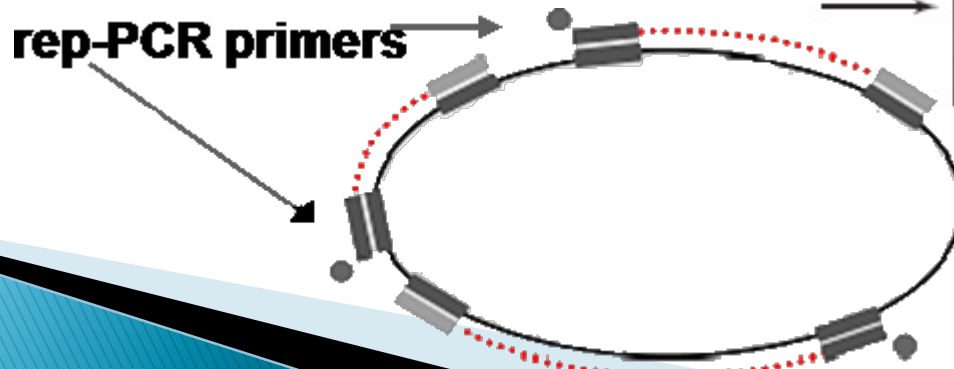
Diferenciação entre espécies

Contraditória

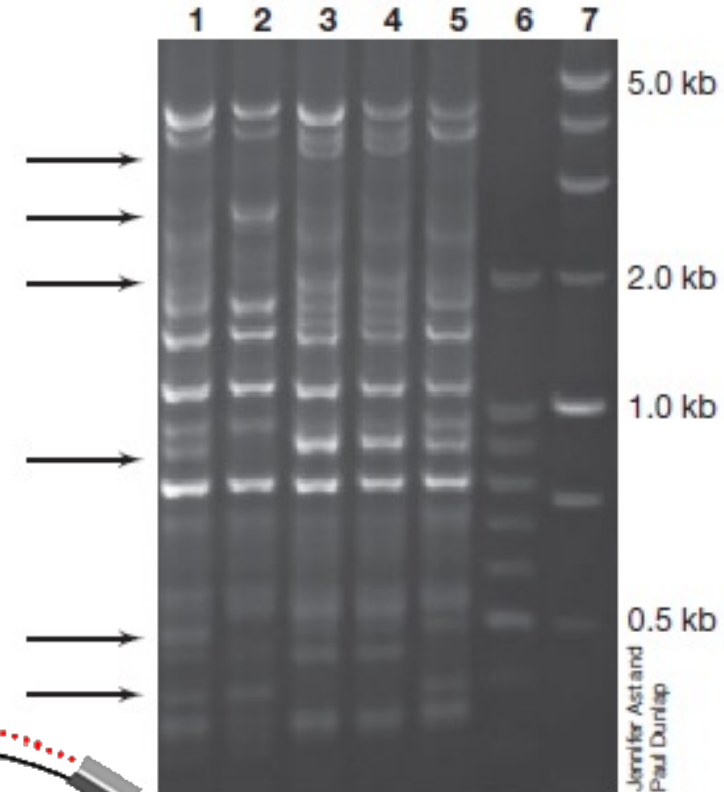


Identificação pelo perfil das Bandas rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic PCR*)

- ▶ Análise de similaridade genotípica entre genomas
- ▶ Avalia a presença de variações na sequência de DNA ao longo de todo o genoma
- ▶ Baseia-se em fragmentos altamente conservados e repetitivos ao longo do genoma
- ▶ PCR com um par de primers específicos e verifica o padrão de bandas
- ▶ Distinguir entre linhagens



5 linhagens diferentes
Digitais do Microorganismo



Outros métodos

- ▶ Sorologia – Teste de aglutinação
 - Anticorpo conhecido – testa contra um organismo desconhecido.



+

-

Outros métodos

- ▶ **Teste Bioquímico rápido** (atividade enzimática) – Exemplo para teste de bactérias entéricas (**família Enterobacteriaceae**)
- ▶ A mudança de cor é um indicativo que houve reação química e a formação de produtos ácidos por exemplo (indicadores de pH)

Produção de acetoína
 Teste **Voges-Proskauer** – conversão de ác. Pirúvico em acetoína

Mede a utilização de substratos ou a formação de produtos metabólicos.
 Detecta a presença de enzimas específicas

- Metabolização
- Hidrólise
- Produção
- Descarboxilação

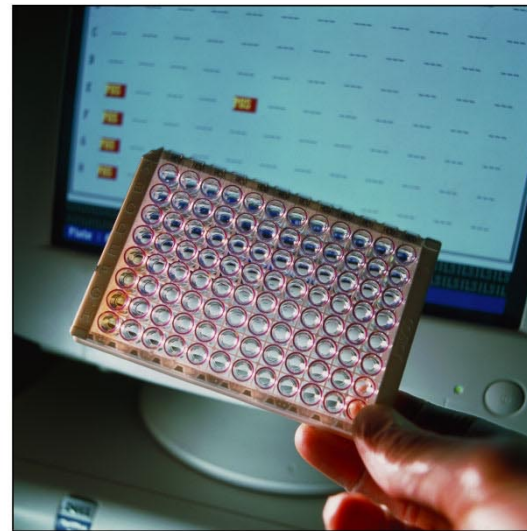
ID Value	Organism	Atypical Test Results	Confirmatory Test
32143	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sorbitol ⁻	-
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Urea ⁺	+
32161	<i>Enterobacter cloacae</i>	None	V-P ⁺
32162	<i>Enterobacter cloacae</i>	Citrate ⁻	

Outros métodos

- ▶ Ensaio de ELISA.
- ▶ Placa com diferentes anticorpos aderidos.
- ▶ Incuba com um organismo desconhecido



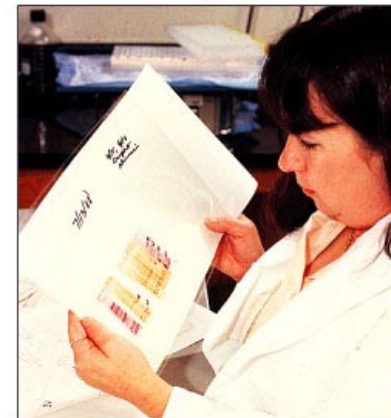
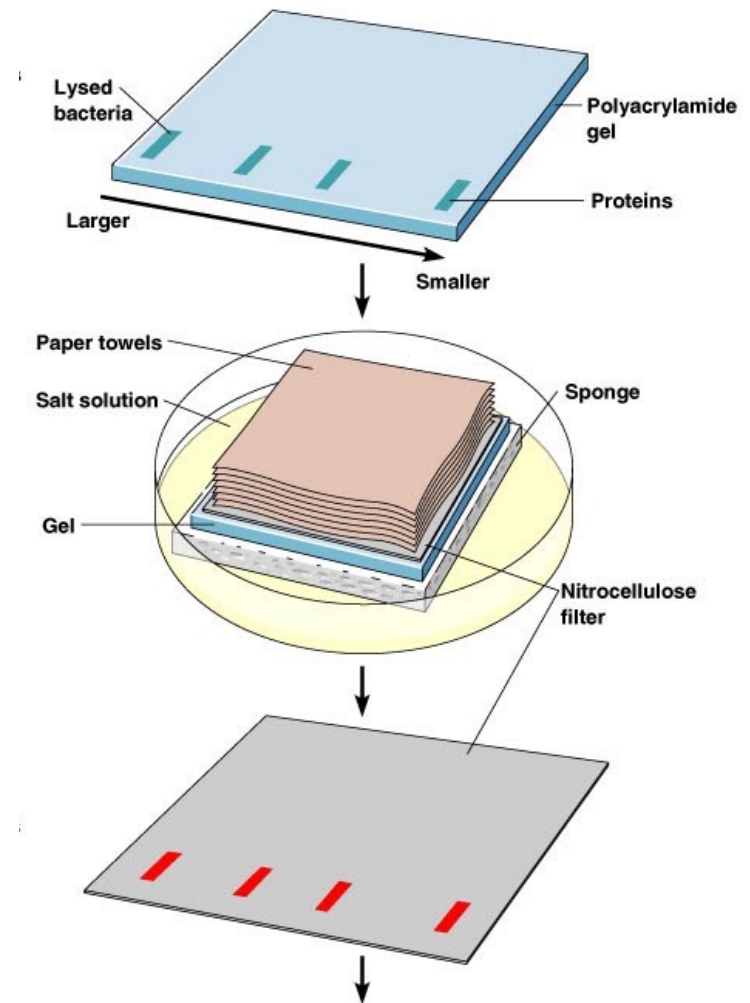
(a)



(b)

Outros Métodos

- ▶ Western Blotting
- ▶ Usa o soro do paciente



Tu

Tuberc

Tuberc
or pur
about
for tub
exposi
PPD t
by me
tive) a
cedure
injec
at dete
rare, t
high p
vaccin
cases.
promi

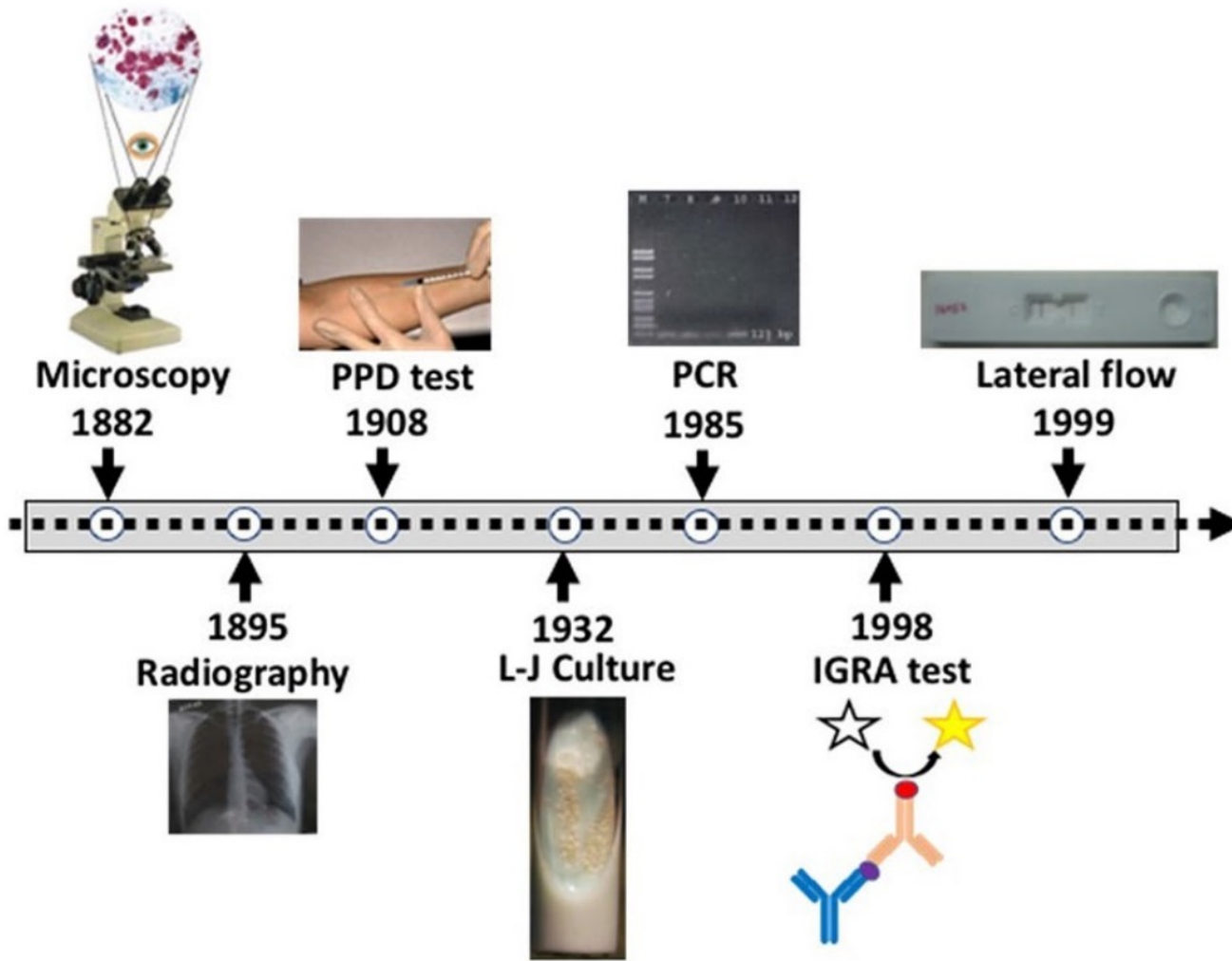


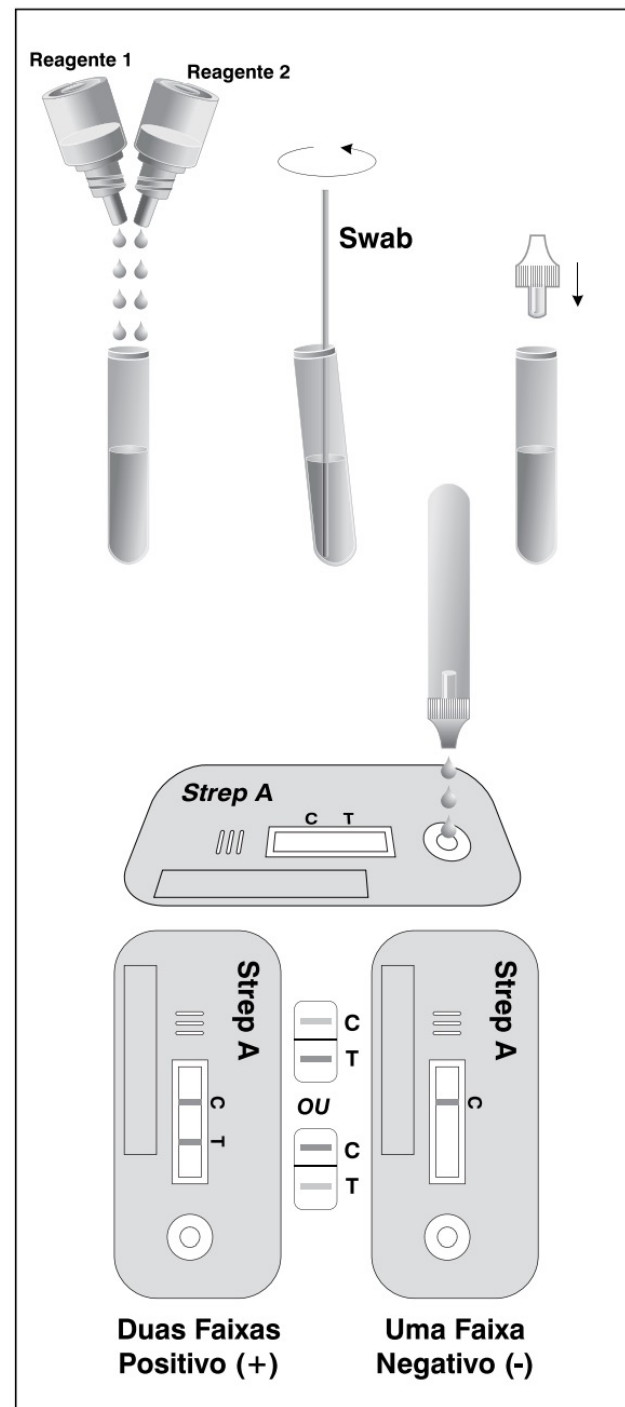
Fig. 1 Milestone on the evolution of tuberculosis diagnostic assays. The dotted line indicates the time line but not in scale. *IGRA* interferon-gamma release assay, *L-J* Lowenstein–Jensen, *PCR* polymerase chain reaction, *PPD* purified protein derivative. (Color figure online)

Testes Rápidos antígeno ou sorológico IgM ou ICC

PRINCÍPIO

O STREP A – TESTE RÁPIDO implica na extração química do antígeno do estreptococo do grupo A, seguida pela utilização da tecnologia de imunoensaio de fase sólida para a detecção qualitativa do antígeno extraído. No procedimento do teste, uma amostra da garganta é coletada em swab e os antígenos de estreptococos são extraídos com o Reagente 1 e o Reagente 2. O extrato é adicionado na cavidade da amostra, que migrará pela membrana por ação de capilaridade e interagirá com os reagentes impregnados nesta membrana. Se o estreptococo do grupo A estiver presente na amostra, ele reagirá com o conjugado de cor, o qual se ligará ao anticorpo impregnado na membrana para formar uma faixa visível na janela Teste (T). A presença de duas faixas, uma na janela Teste (T) e outra na janela Controle (C), indica um resultado positivo, enquanto que a ausência da faixa na janela Teste (T) indica um resultado negativo.

O
de
ge.



Teste diagnósticos

- ▶ Hemocultura;
 - Crescimento de microrganismos no sangue;
- ▶ Hemograma – mede a resposta imunológica por uma infeção bacteriana
 - Aumento dos níveis de leucócitos (leucocitose) – indício de uma infeção;