



29º Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil

"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"

A Implantação da Análise do Microbioma em Laboratórios Clínicos



Declaro conflito de interesse:

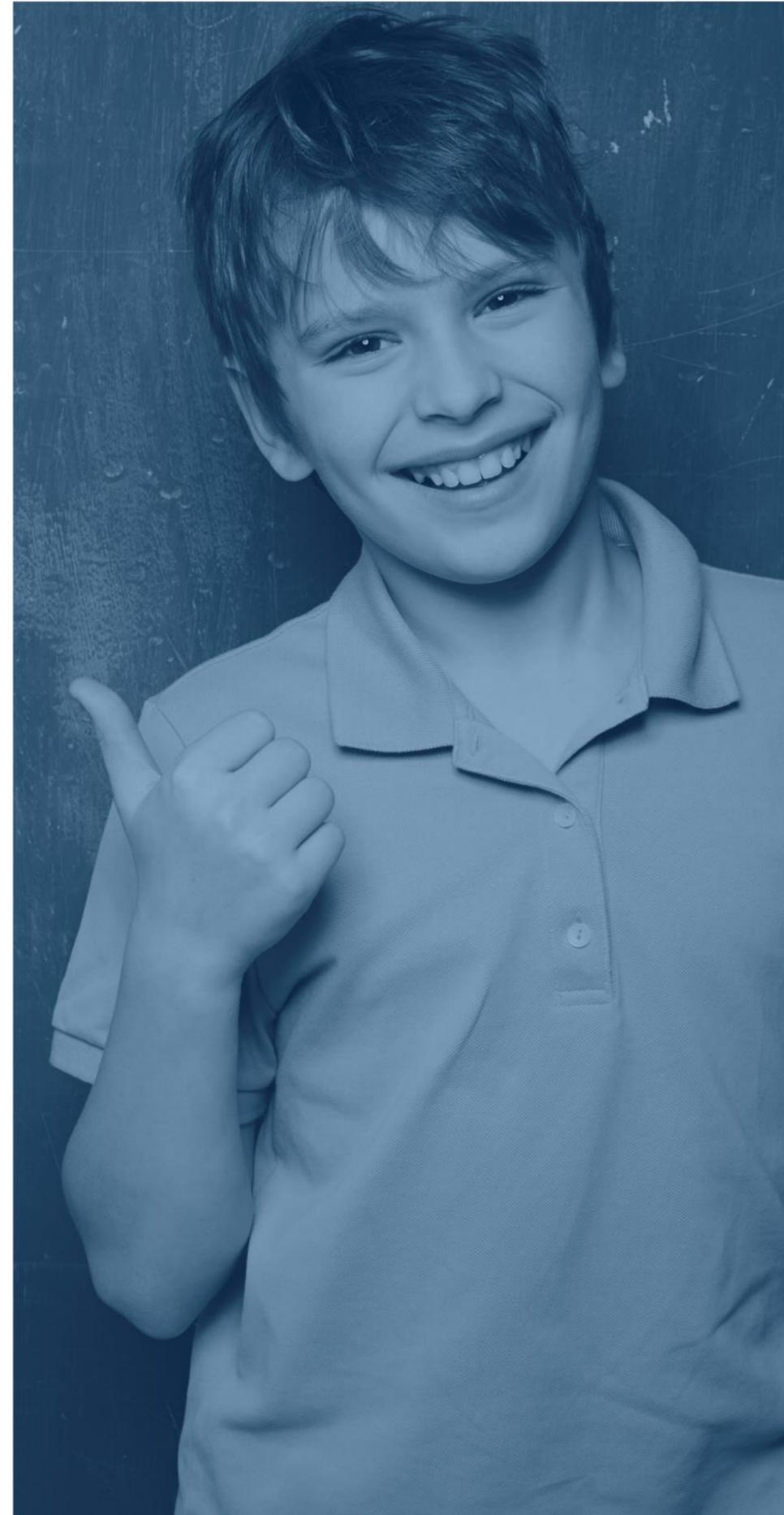
Gestor da Microbiologia Clínica

Ghanem Laboratório Clínico

Joinville - SC

O GHANEM em Números

- 45 anos;
- Mais de 50 Unidades de Atendimento;
- 280 mil exames/mês;
- 40 mil clientes/mês;
- 280 profissionais;
- 7 cidades de Santa Catarina (litoral e região Norte do Estado).





Anda triste? Meio deprê? Chegou a hora de tomar um Yakult cheio de lactobacilos vivos. OK, não é bem assim. Mas uma experiência inédita encontrou conexões entre o nosso estado de humor e as bactérias que moram no nosso intestino – e descobriu que essas colônias microscópicas de estimacão são responsáveis por muito mais do que uma simples mãozinha na digestão.

Microbiota do trato gastrointestinal

Complexa comunidade de microrganismos comensais, mutualistas e patogênicos, que atua na manutenção de funções fisiológicas e vem sendo descrito pela comunidade científica como moduladores importantes para a saúde humana.

Microbioma do trato gastrointestinal

Conjunto de genomas dos microrganismos que compõe a microbiota intestinal. Trabalhos científicos vem catalogando os microrganismos e relacionando-os às funções e disfunções do organismo. Pode ser muito diferente entre os indivíduos, considerando a composição de espécies, sua diversidade e abundância e está diretamente relacionada com os hábitos de vida de cada pessoa (por exemplo, alimentação).

Disbiose

Desequilíbrio ou uma má adaptação da comunidade de microrganismos em um determinado ambiente.

Em humanos, muitos microrganismos mutualistas e comensais são importantes na manutenção da homeostasia metabólica, regulação de respostas imunes, entre outras inúmeras correlações.

O desequilíbrio destas relações pode ser caracterizado como uma **disbiose**.

De forma geral, um **organismo saudável** apresenta uma **grande diversidade microbiológica**, enquanto que a sua **diminuição** pode estar associada com a **disbiose**.

A queda da diversidade pode resultar no estabelecimento, aumento e fixação de microrganismos patogênicos.

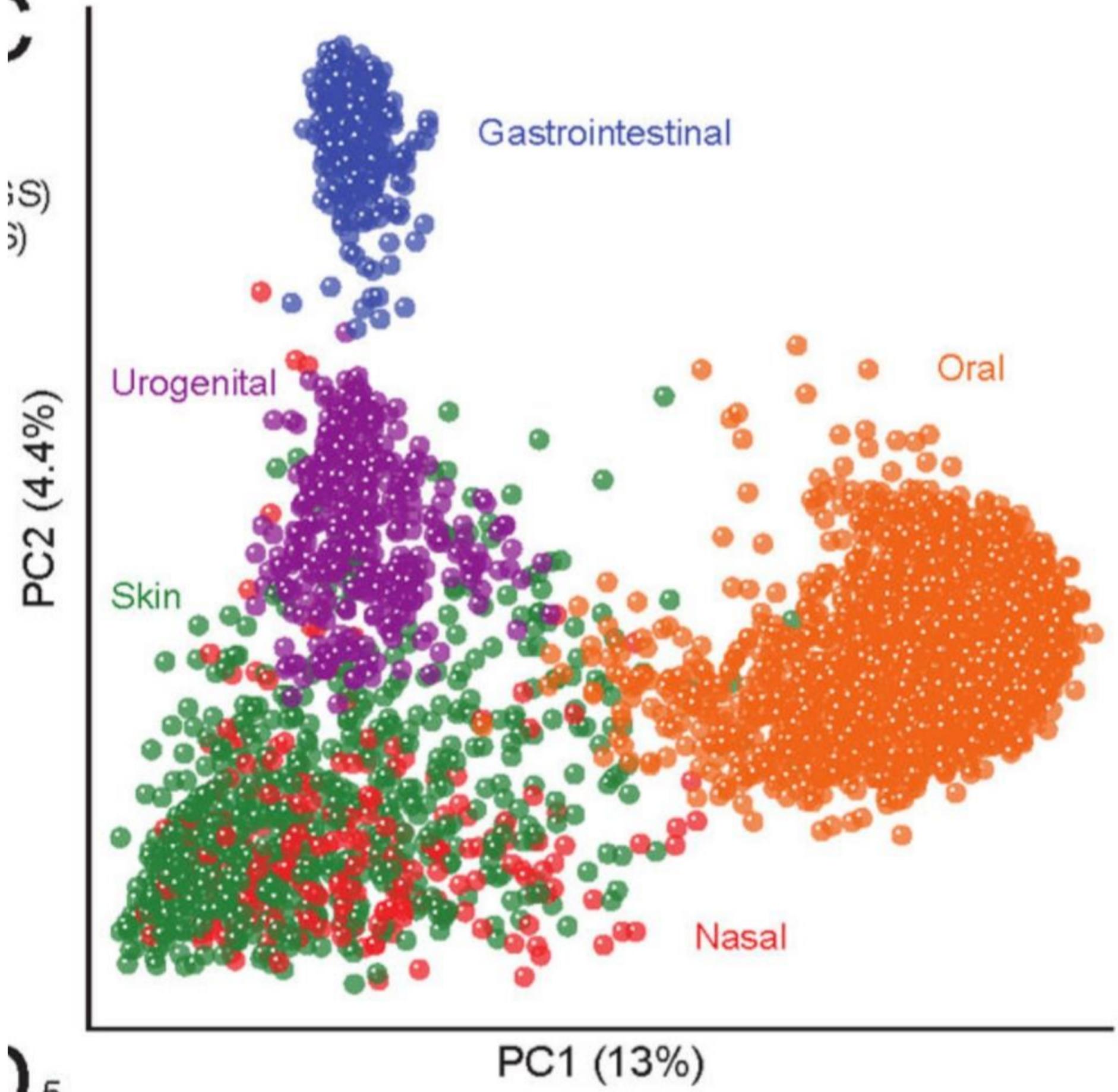
Microbiota intestinal saudável:

- Envolvida na produção energética a partir de componentes da dieta.
- Síntese de vitaminas.
- Resistência à colonização por microrganismos patogênicos.

Microbiota intestinal disbiótica:

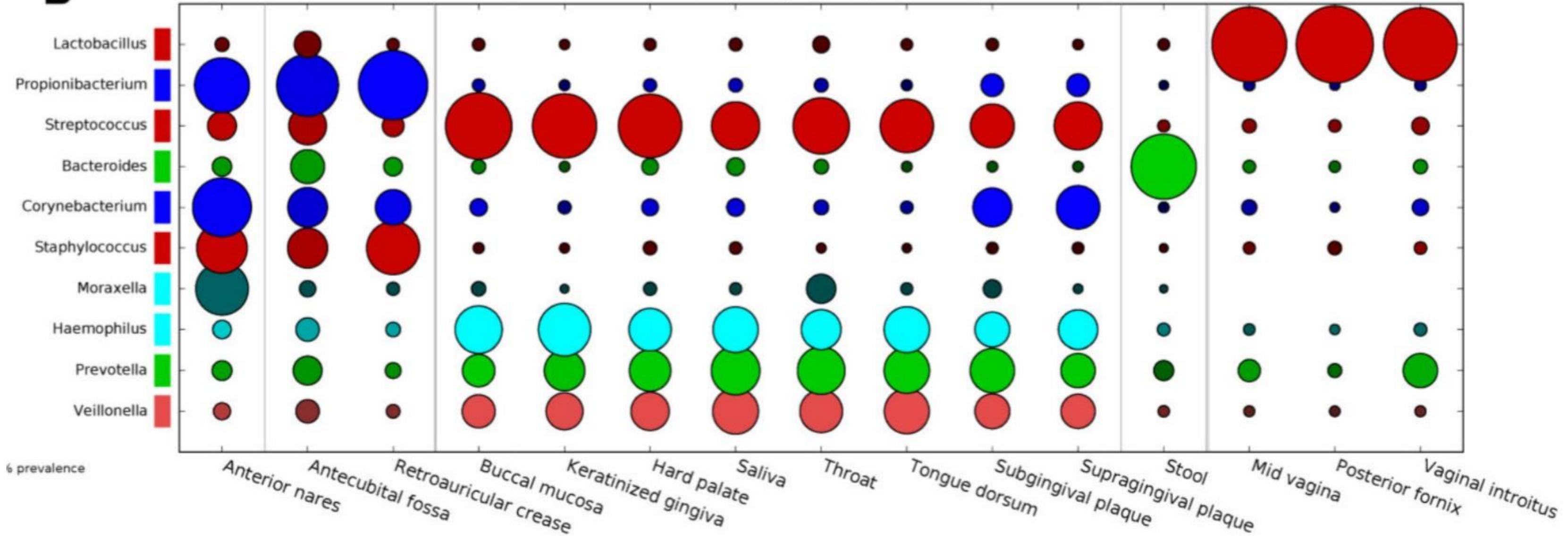
- Associação com infecções por microrganismos patogênicos específicos.
- Envolvidas em condições de desequilíbrio gastrointestinal, como doenças inflamatórias do intestino, síndrome metabólica e síndrome do intestino irritável (SII).
- Não resistente à colonização por microrganismos patogênicos.

Diferentes sítos
Diferentes microbiomas

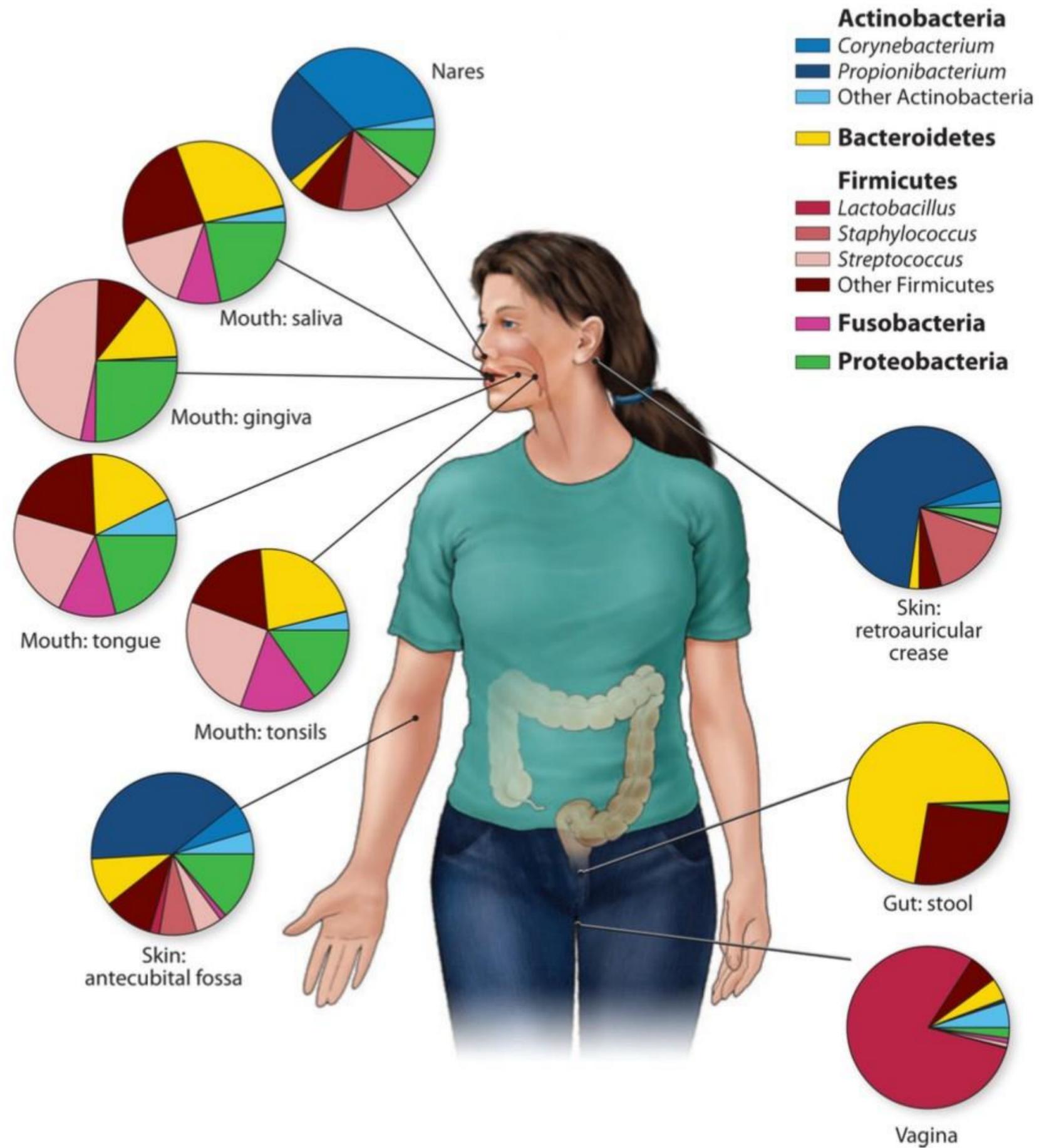


B

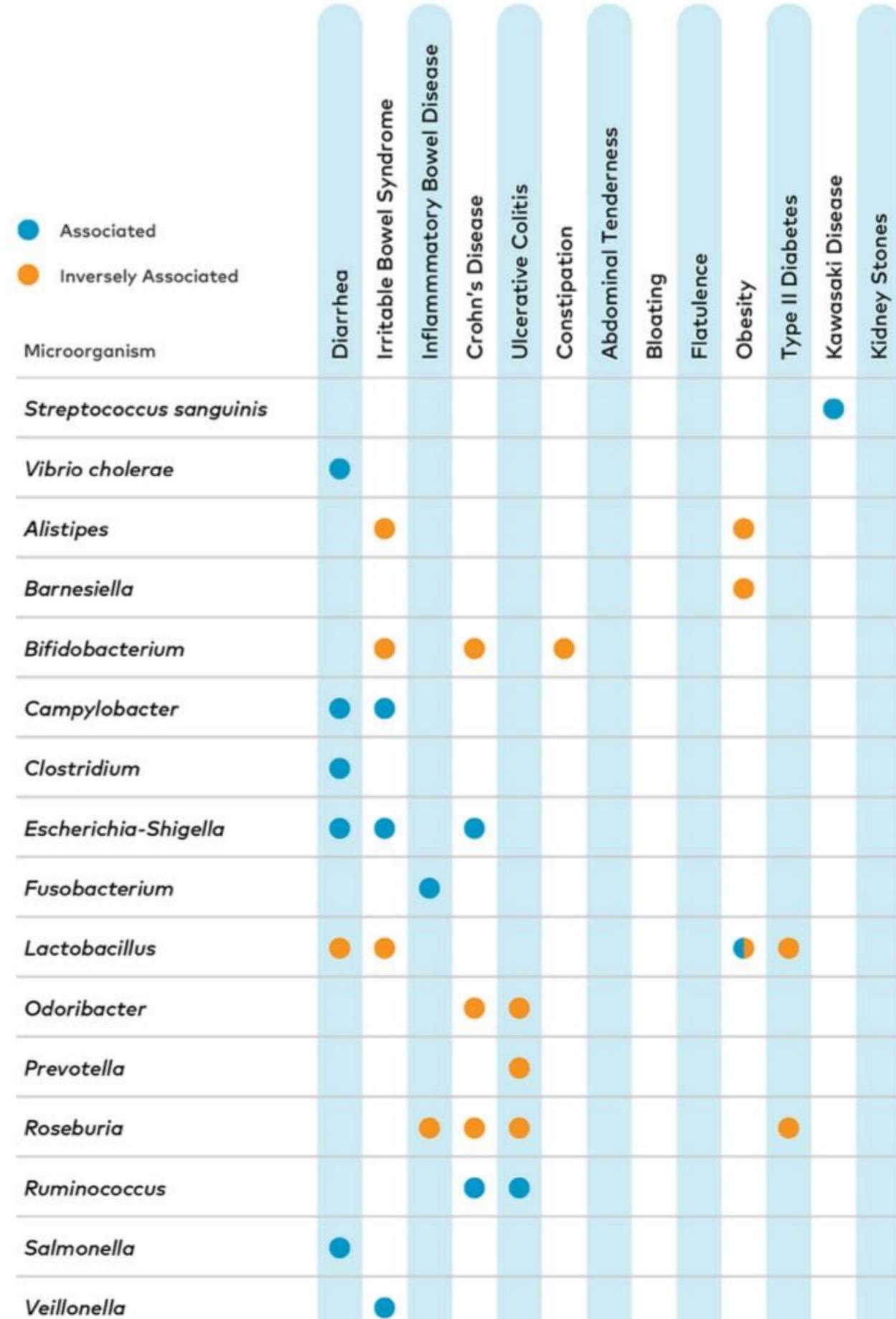
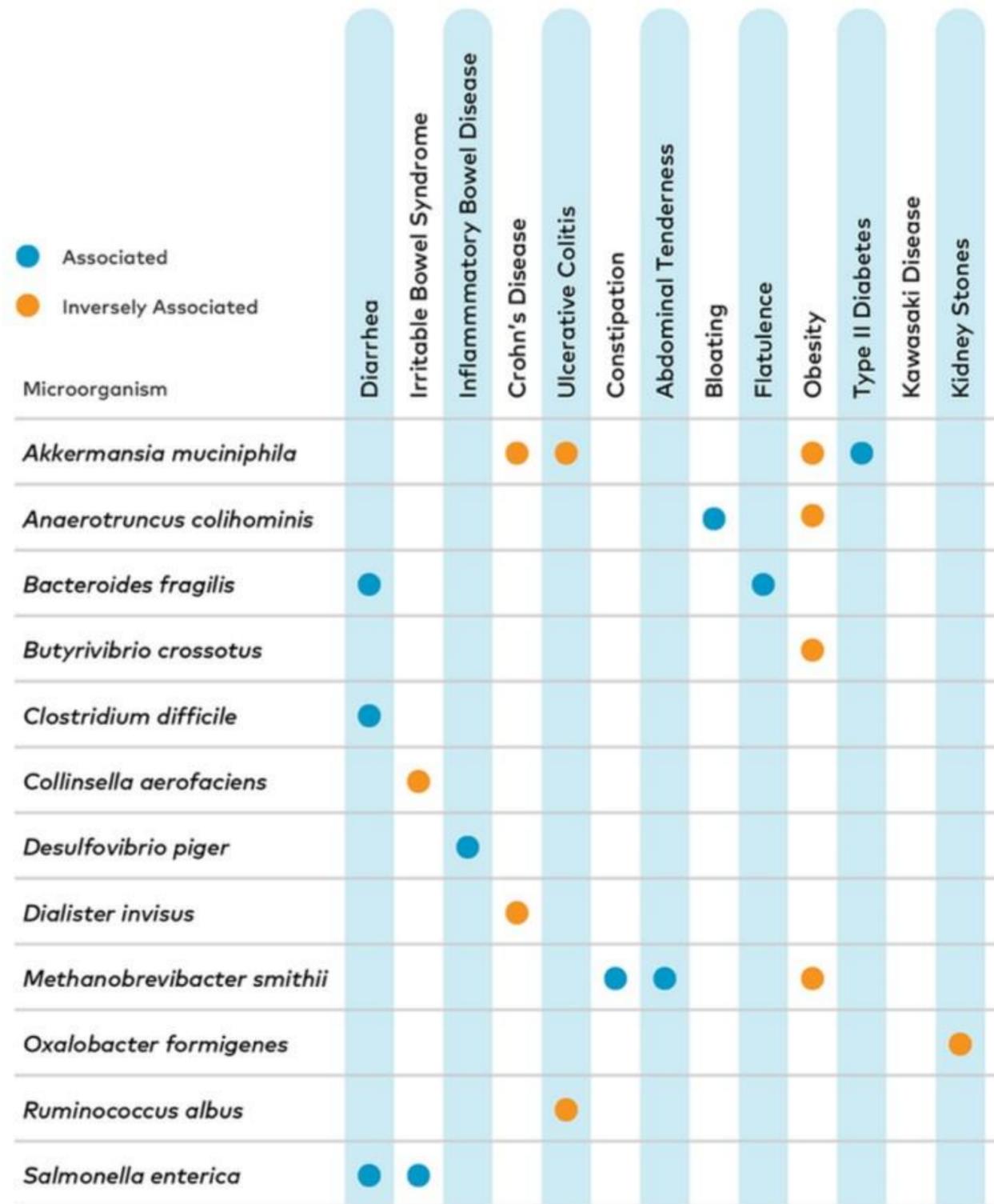
Abundant genera (16S data)



Microbioma



Microbiota do trato gastrointestinal e sua correlação com diversas condições



Quais são os microrganismos associados a condições específicas? Escolha de um grupo de microrganismos mais relevantes para essas condições.

Implicated Microbiota ^a	Changes in Microbiota Presence/Function	References ^b
Allergies		
<i>Lactobacillus</i> spp. ↓	early colonization with <i>Lactobacillus</i> associated w/decreased allergies	Round et al., 2011
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ↓	early colonization with more diverse microbiota	Round and Mazmanian, 2009
<i>Clostridium difficile</i> ↓	might prevent allergies	
<i>Helicobacter pylori</i> ↓	<i>H. pylori</i> tolerance mediated by Tregs that suppress asthma	Arnold et al., 2011
Celiac's disease		
<i>Bacteroides vulgatus</i> ↑	higher diversity (Shannon-Wiener index) in Celiac's disease patients versus controls	Elinav et al., 2011
<i>Escherichia coli</i> ↓		
<i>Clostridium coccooides</i> ↓		
Gastric Cancer		
<i>H. pylori</i> ↑	important element in carcinogenic pathway for developing gastric adenocarcinomas	Lathrop et al., 2011
Austim		
Bacteroidetes ↑	increased bacterial diversity in feces of autistic children compared to controls	Robinson et al., 2010
Proteobacteria ↑		
Actinobacteria ↓		
Firmicutes ↓		
Obesity		
Bacteroidetes ↓	significant changes in gut microbiota are associated with increasing obesity	Ley et al., 2005; Pflughoeft and Versalovic, 2011
<i>Lactobacillus</i> ↑		
Firmicutes/Bacteroidetes ratio ↓		Ley et al., 2005
<i>Methanobrevibacter smithii</i> ↓		Turnbaugh et al., 2009b

Anorexia		
<i>Methanobrevibacter smithii</i> ↑	Bacteroidetes, Firmicutes, and Lactobacillus similar to lean patients, though <i>M. smithii</i> significantly increased	Armougom et al., 2009; Pflughoeft and Versalovic, 2011
IBD—Crohn's Disease		
<i>Bacteroides ovatus</i> ↑	less diversity in patients with Crohn's disease compared to healthy patients	Dicksved et al., 2008
<i>Bacteroides vulgatus</i> ↑		
<i>Bacteroides uniformis</i> ↓		
IBD (General)		
Bacteroidetes ↓	IBD associated with overall community dysbiosis rather than single causal bacterial species	Spor et al., 2011; Perry et al., 2006
<i>Lachnospiraceae</i> ↓		
<i>Actinobacteria</i> ↑		
<i>Proteobacteria</i> ↑		
<i>Clostridium leptum</i> ↓		
<i>Clostridium coccoides</i> ↓		
<i>Faecalibacterium prasnitzii</i> ↓		
Firmicutes/Bacteroidetes ratio ↓		
<i>Bifidobacteria</i> ↓		
Type 2 Diabetes		
Firmicutes ↓	shifts in gut microbiota associated with increases in plasma glucose concentrations	Brown, 2000
<i>Clostridia</i> ↓		
<i>Bacteroides-Prevotella</i> ↑ versus <i>Clostridia coccoides-Eubacterium rectale</i> ↓		
<i>Betaproteobacteria</i> ↑		
Bacteroidetes/Firmicutes ratio ↑		

Microbiota do trato gastrointestinal e sua correlação com diversas condições

Distribuição na população “saudável”

Muitos dos microrganismos alvos estão presentes em abundância em indivíduos saudáveis. Por isso há importância em se criar um padrão populacional - intervalo aceitável.

- *Clostridium difficile*: abundância relativa de 0 a 0,18% na população saudável. Ou seja, colonização assintomática por *C. difficile* não é incomum em indivíduos saudáveis > correlação clínica.
- Alguns microrganismos alvos são especialmente abundantes: *Prevotella* (63%),
- *Bifidoacterium* (49%)
- Outras não estão presentes em indivíduos saudáveis, denotando a sua alta patogenicidade e ocorrência rara: *Vibrio cholerae*

A utilização da composição da microbiota como uma ferramenta para o diagnóstico clínico de condições crônicas ainda é um grande desafio.

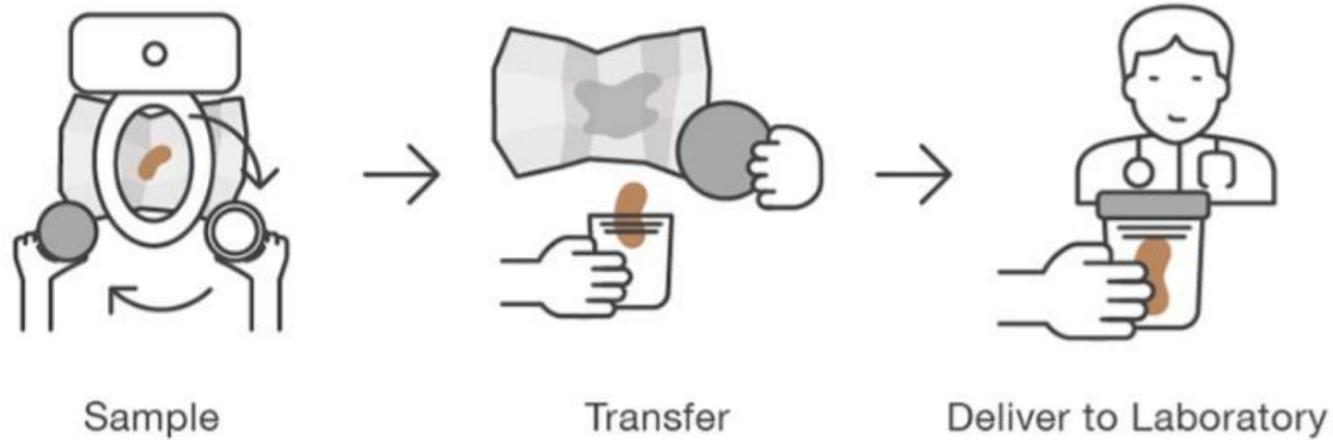
- **Ampla variabilidade inter individual associada a fatores como localização geográfica, dieta, genética e diferentes estilos de vida > desafio em determinar o que é uma microbiota intestinal saudável.**
- **A maioria dos estudos de microbioma intestinal comparam um grupo controle com um grupo com a condição, porém com número de indivíduos ainda baixo para a detecção acurada de pequenas, porém reais, diferenças na composição da microbiota.**

**Microbiota do trato gastrointestinal:
A importância da identificação acurada**

- **Métodos clássicos de microbiologia** são menos eficazes em detectar os desequilíbrios da microbiota intestinal, principalmente pela dificuldade de cultivo de muitos microrganismos
- **Método NGS (Sequenciamento de nova geração)** permitiu solucionar esse problema - acesso à composição sem a necessidade do cultivo celular. Vem expandindo amplamente o conhecimento sobre a composição do microbioma.

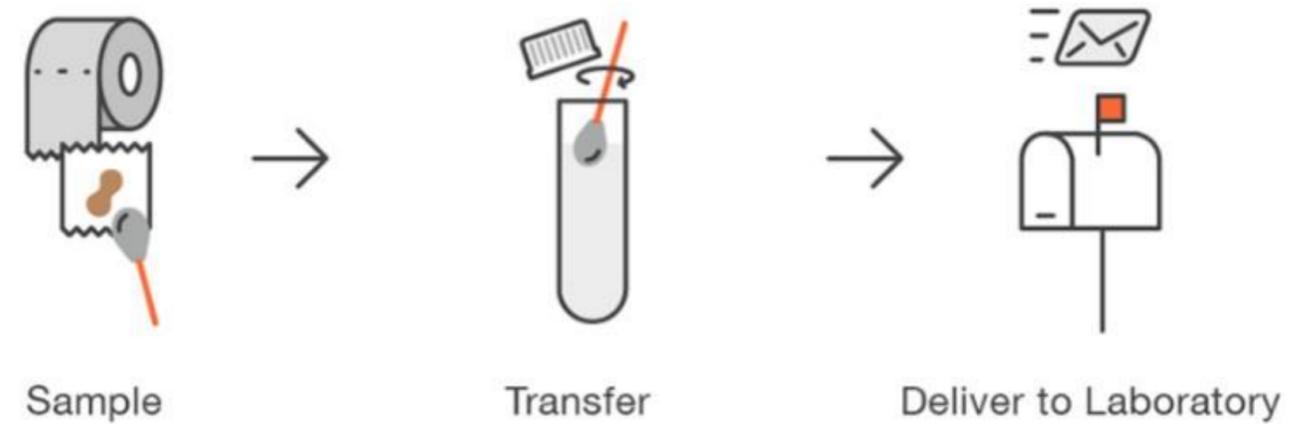
Traditional Clinical Microbiology

SAMPLE

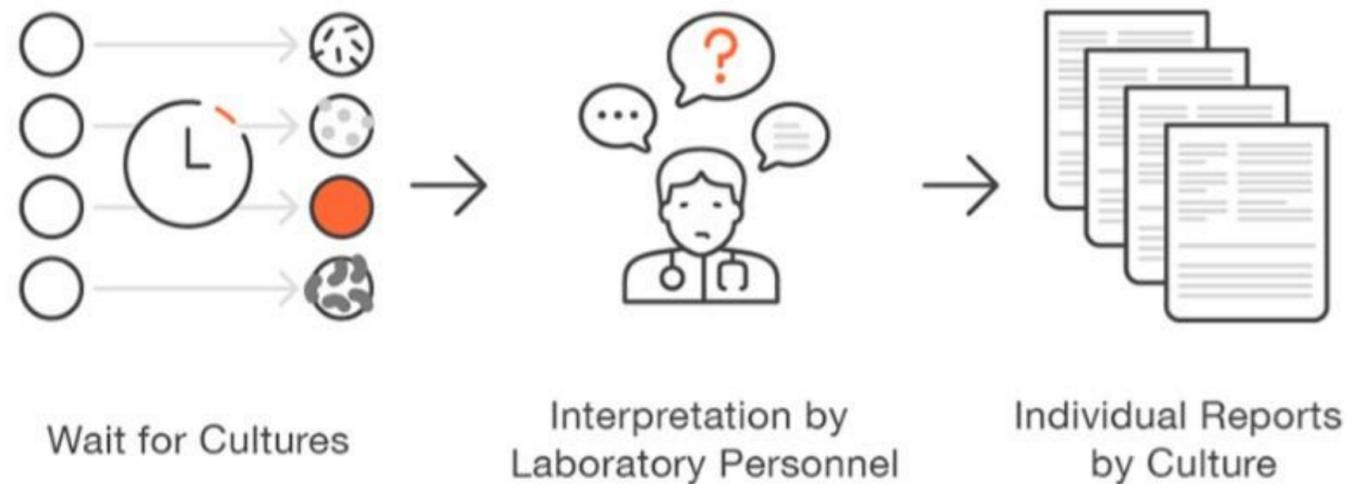


16S rRNA Sequencing

SAMPLE



PROCESS



PROCESS



Microbiologia Clássica

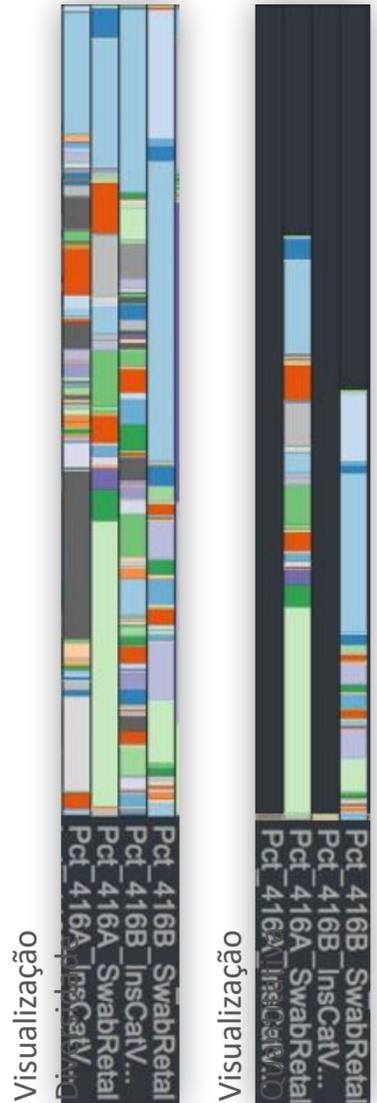
- Identificação baseada em análises fenotípicas e bioquímicas.
- Baixa escalabilidade, necessidade de meios de cultura e ensaios específicos.
- Alto custo financeiro, de tempo e espaço para identificação de diversas espécies em paralelo para uma mesma amostra.



X

DMD | Microbioma

- Utiliza marcadores de DNA para a identificação a nível de espécie.
- Identificação de centenas de espécies em uma análise única, com custo único.
- Possibilita o processamento de centenas de amostras em paralelo.



Diagnóstico Microbiológico Digital DMD | Microbioma

O Diagnóstico Microbiológico Digital - DMD - é uma tecnologia que consiste em protocolos de biologia molecular e computacionais, com o propósito de oferecer a identificação acurada, sensível e específica de microrganismos em diferentes amostras biológicas.

Com essa tecnologia é possível chegar à identificação de microrganismos por meio da análise de DNA diretamente da amostra, sem a necessidade de etapas de cultivo.

Por meio do DMD, amostras com baixas quantidades ou alta diversidade de microrganismos, como amostras ambientais, podem ser analisadas com sucesso. Algo novo e impossível de ser alcançado com as técnicas convencionais de microbiologia.



Processamento e
manipulação do DNA

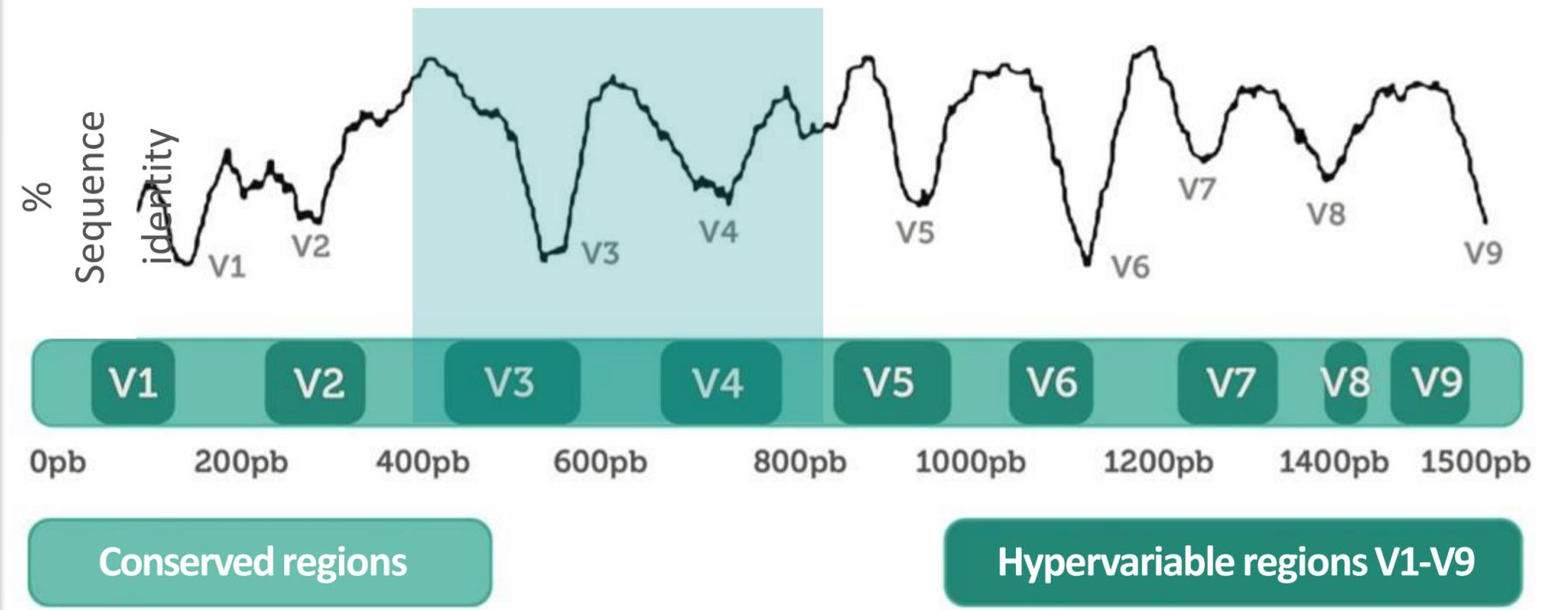
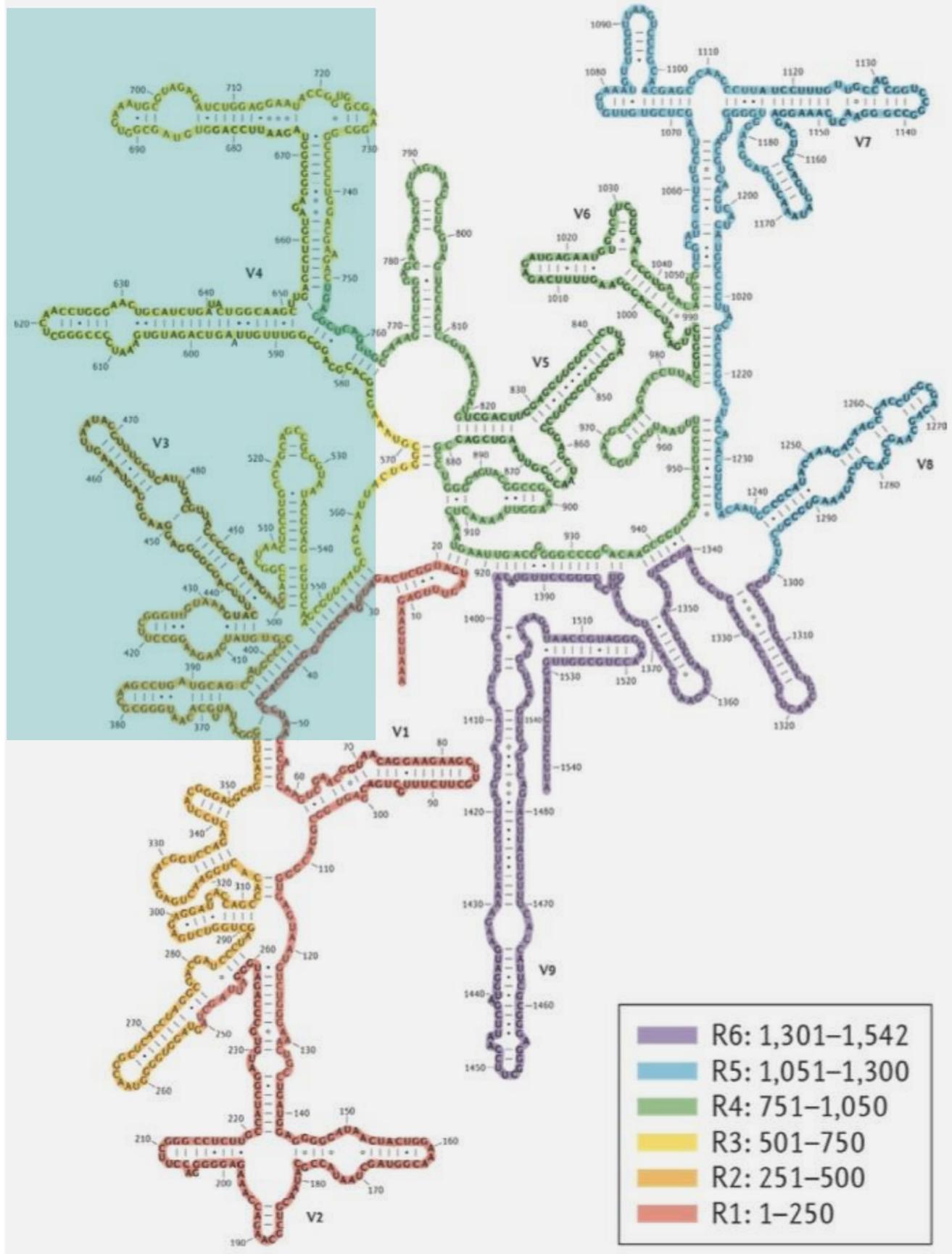


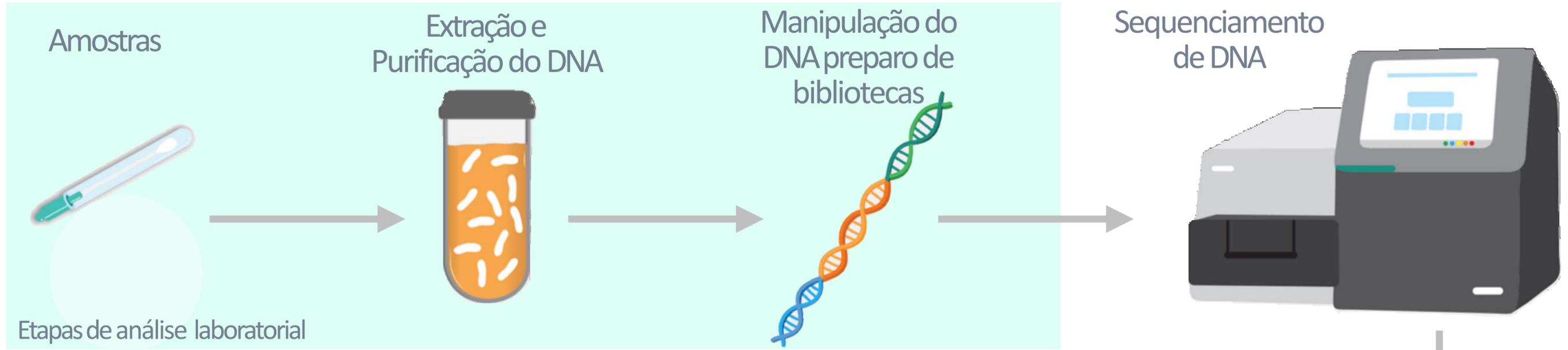
Sequenciamento de alto
desempenho



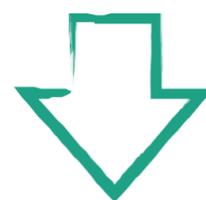
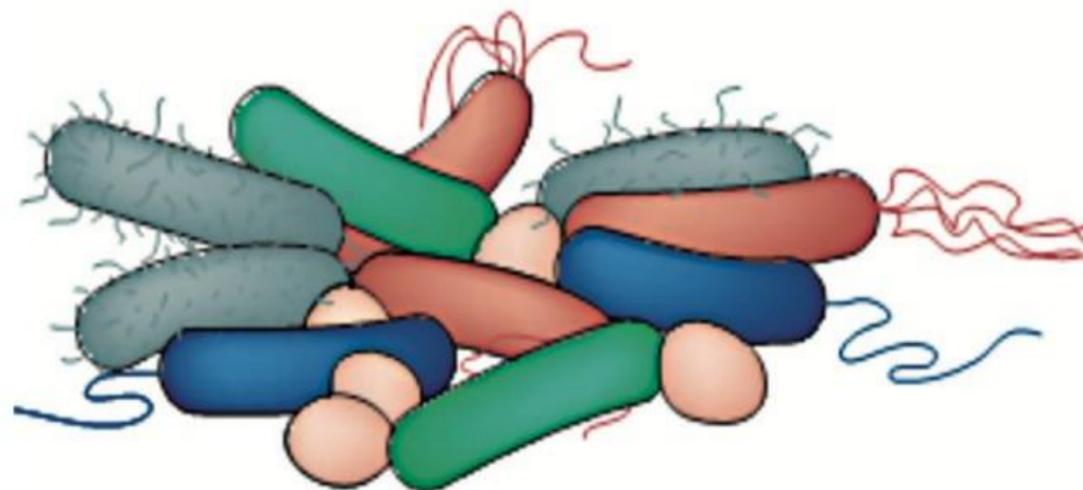
Algoritmos de
bioinformática e bancos de
dados de referência
acurados

Marcadores moleculares 16S rRNA





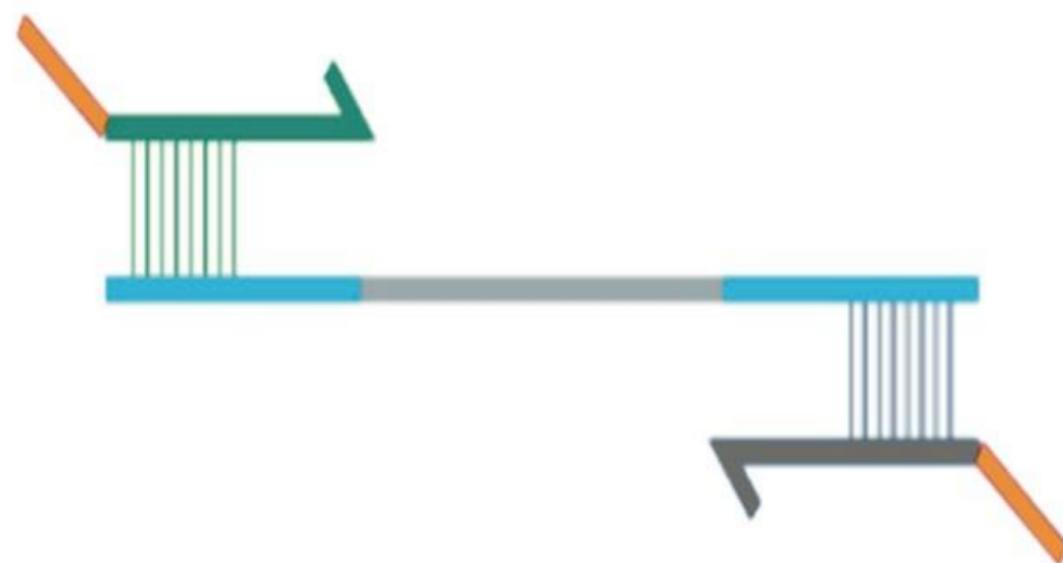
**MICROORGANISMOS - FEZES -
MICROBIOTA INTESTINAL**



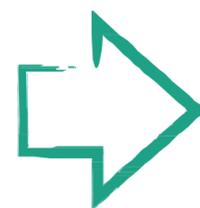
EXTRAÇÃO DIRETA DE DNA



AMPLIFICAÇÃO DE GENES MARCADORES ESPECÍFICOS



PCR com
primers universais
16S rRNA



Sequências de
diferentes espécies
presentes na amostra

IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS DA AMOSTRA

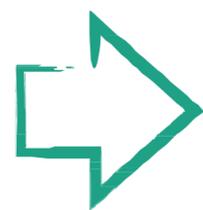
G A T T A C A

G A T T A C A

G A T T T C A

G A T T T C A

G A T T T C A

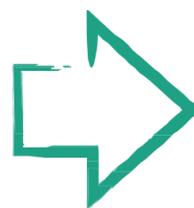


Análise das sequências de
DNA e suas variações



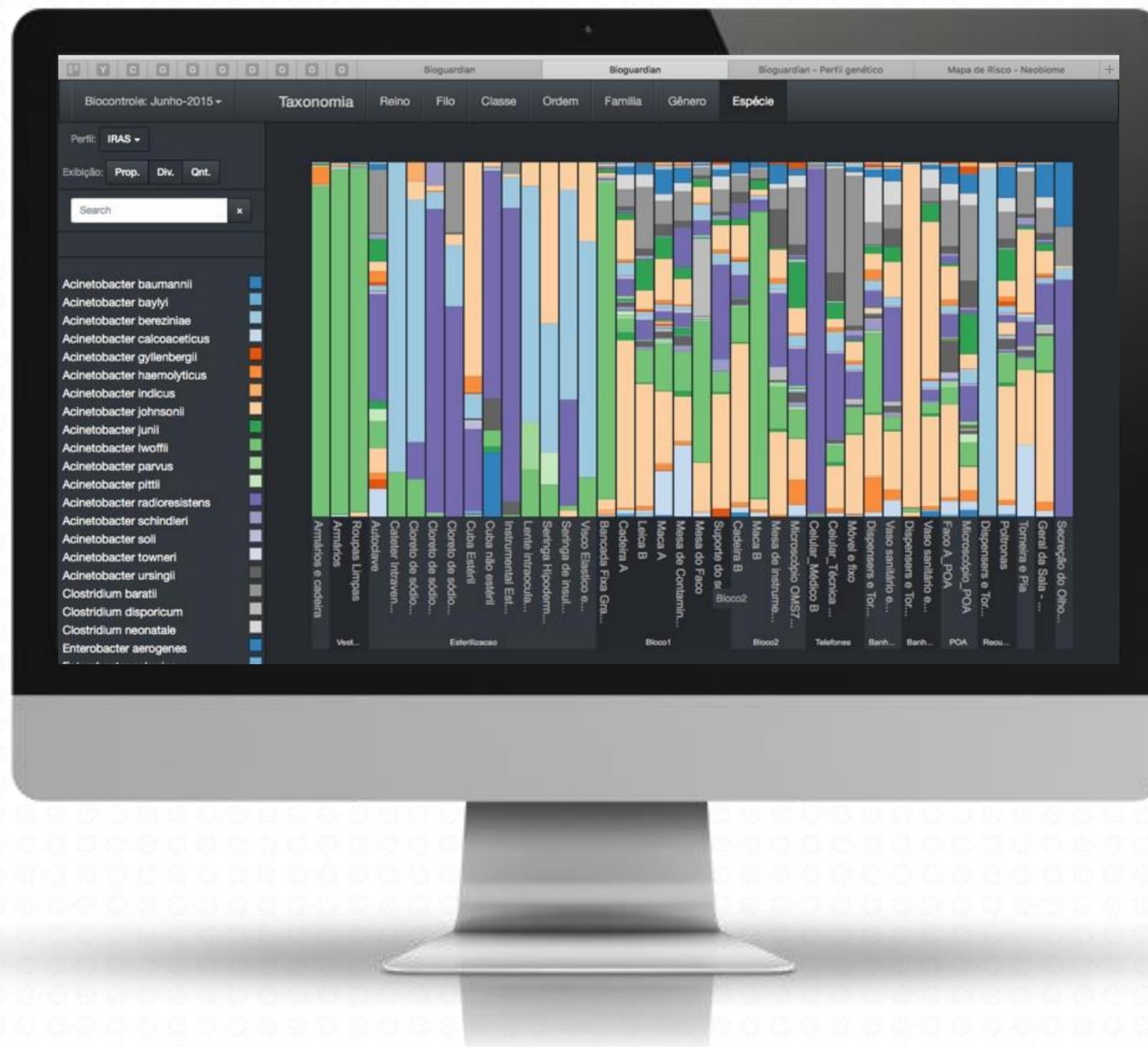
TAXONOMIA

CLASSIFICAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE DE MICRO-ORGANISMOS



O **Neobiome** é uma plataforma analítica integrada ao DMD que permite a ampla análise das espécies de microrganismos identificadas (bactérias e fungos), bem como genes de resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência.

O **Neobiome** possui ferramentas que permitem a mineração de dados, a visualização qualitativa e quantitativa dos resultados e filtros para avaliar de forma facilitada as informações mais relevantes, permitindo que os profissionais tenham acesso a valiosas informações sobre o perfil microbiológico das amostras.





Cada **barra vertical** representa uma **amostra** analisada e cada **cor** representa um tipo de **micro-organismo** identificado nessa amostra em particular. A interface do software é simples e interativa, permitindo que se realize análises detalhadas

Probiome

Investigação do microbioma intestinal humano em um indivíduo e sua relação com fatores que alteram a diversidade da microbiota.

Antimicrobianos

Infeções
(*Clostridium difficile*)

Uso de probióticos e prebióticos

Mudanças de estilo de vida

Dietas

Quimioterapia

Distúrbios agudos

Você está em uso de terapia com antimicrobianos? NÃO SIM, data de início: _____

Você está em uso de terapia com quimioterápicos? NÃO SIM, data de início: _____

Você está em uso de alguma terapia medicamentosa que não consta nos itens acima e que julga importante ser relatada? Se sim, descreva abaixo o medicamento e a data de início de seu uso.

Você está realizando terapia acompanhada por profissional da nutrição ou médico com alguma dieta específica? NÃO SIM. Se SIM, qual foi a data de início da dieta? _____

Faça uma breve descrição sobre o tipo de dieta que está utilizando:

Você passou por alguma mudança drástica de estilo de vida recentemente? Por exemplo, adoção de dieta vegetariana, realização de cirurgia bariátrica e etc. NÃO SIM.

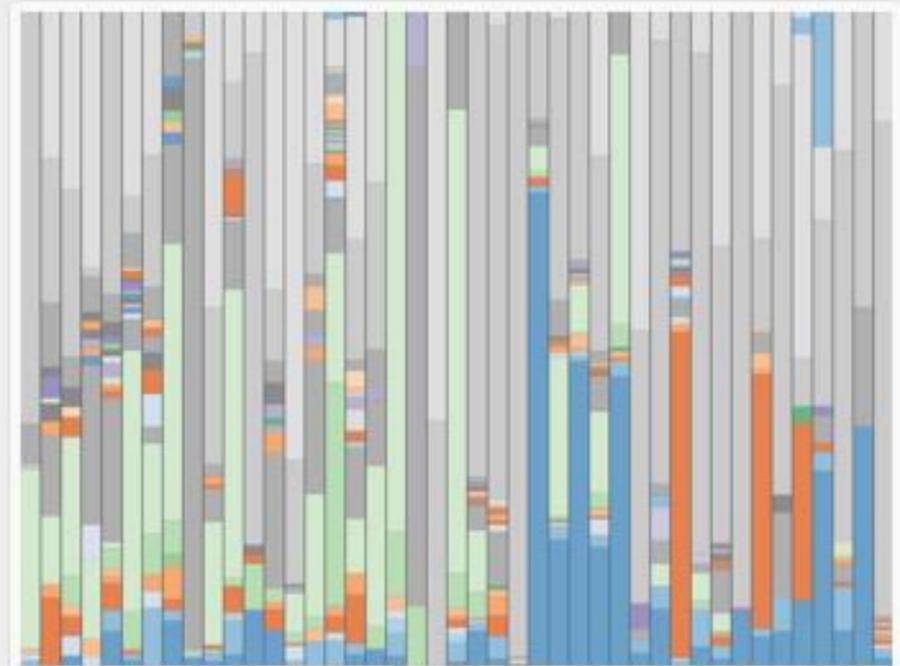
Se SIM, qual foi a data de início da mudança no estilo de vida? _____

Faça uma breve descrição sobre a mudança de estilo de vida adotada:

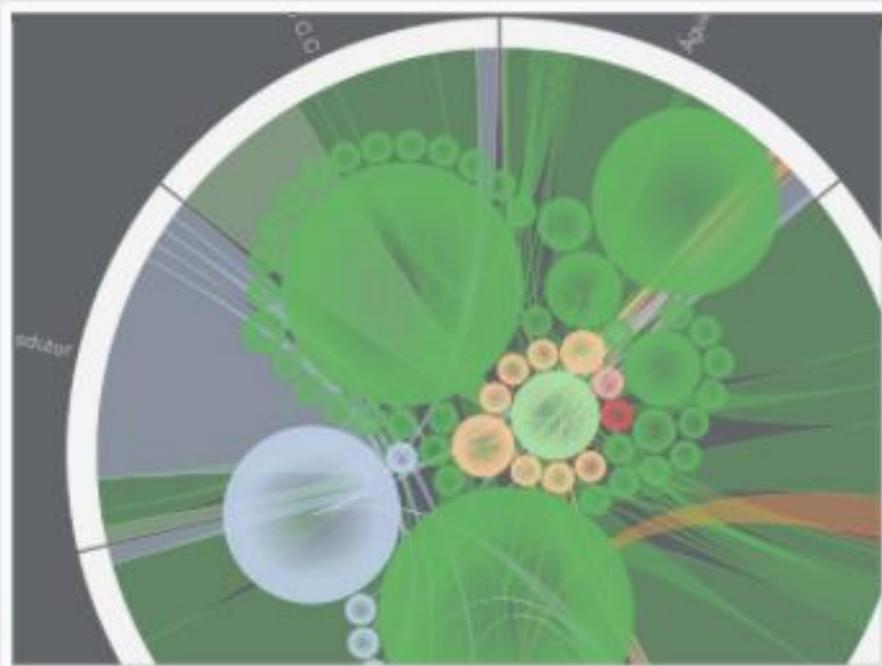
Tabela 1. Proporção do número de sequências de DNA referentes às espécies bacterianas identificadas no Microbioma Intestinal.

Espécie bacteriana identificada	Proporção da espécie bacteriana na amostra (%)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	25,1
<i>Roseburia faecis</i>	15,2
<i>Prevotella copri</i>	11,5
<i>Gemmiger formicilis</i>	10,9
<i>Blautia faecis</i>	7,8
<i>Bacteroides massiliensis</i>	7,5
<i>Eubacterium rectale</i>	6,5
<i>Bacteroides vulgatus</i>	4,9
<i>Eubacterium siraeum</i>	3,4
<i>Roseburia intestinalis</i>	1,6
<i>Megasphaera elsdenii</i>	1,4
<i>Alistipes putredinis</i>	1,4
<i>Fusicatenibacter saccharivorans</i>	1,3
<i>Dorea formicigenerans</i>	1,2

Análise de microbioma intestinal [Sair](#)



Perfil microbiológico



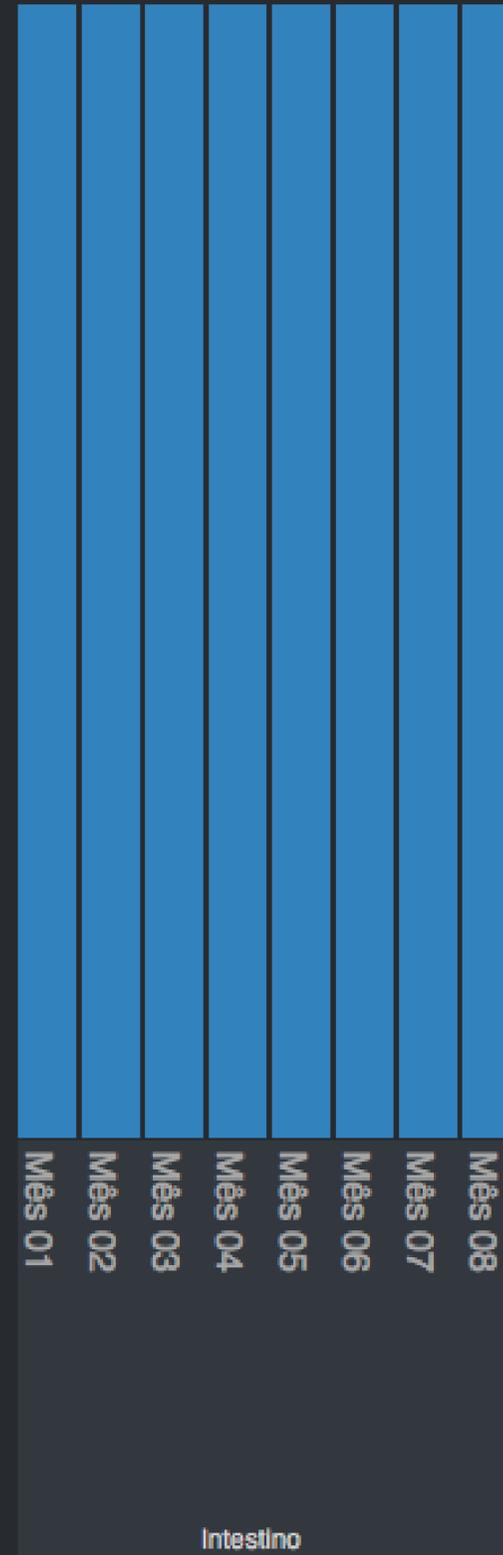
Perfil genético

Perfil: **Geral** ▾

Exibição: **Prop.** **Div.** **Qnt.**

Search x

Bacteria ■

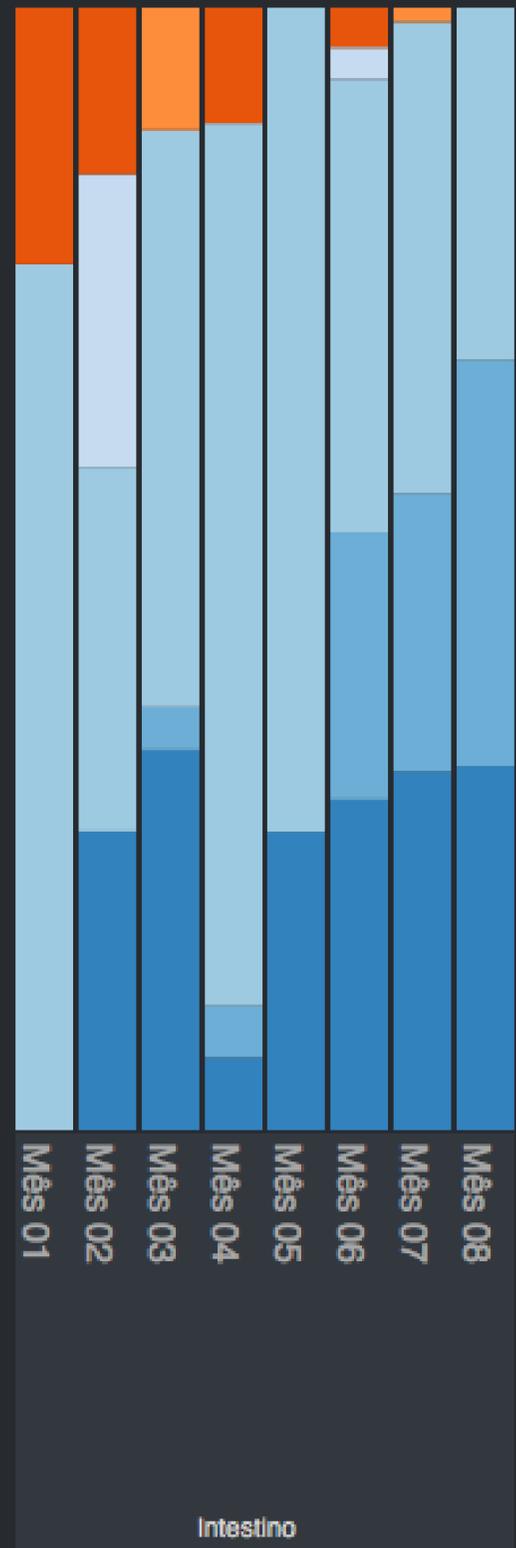


Perfil: Geral

Exibição: Prop. Div. Qnt.

Search

- Actinobacteria
- Bacteroidetes
- Firmicutes
- Fusobacteria
- Proteobacteria
- Verrucomicrobia



Perfil: Geral ▾

Exibição: Prop. Div. Qnt.

Search

x

Actinobacteria



Bacilli



Bacteroidia



Clostridia



Erysipelotrichia



Fusobacteriia



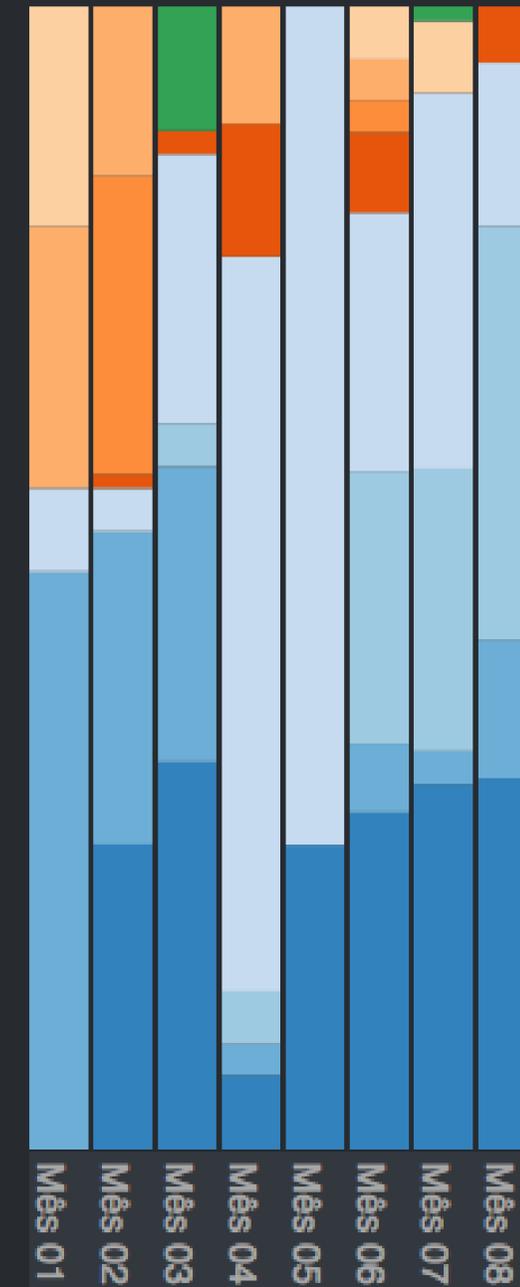
Gammaproteobacteria



Negativicutes



Verrucomicrobiae



Intestino

Perfil: Geral ▾

Exibição: Prop. Div. Qnt.

✕

Bacteroidales ■

Bifidobacteriales ■

Clostridiales ■

Coriobacteriales ■

Enterobacteriales ■

Erysipelotrichales ■

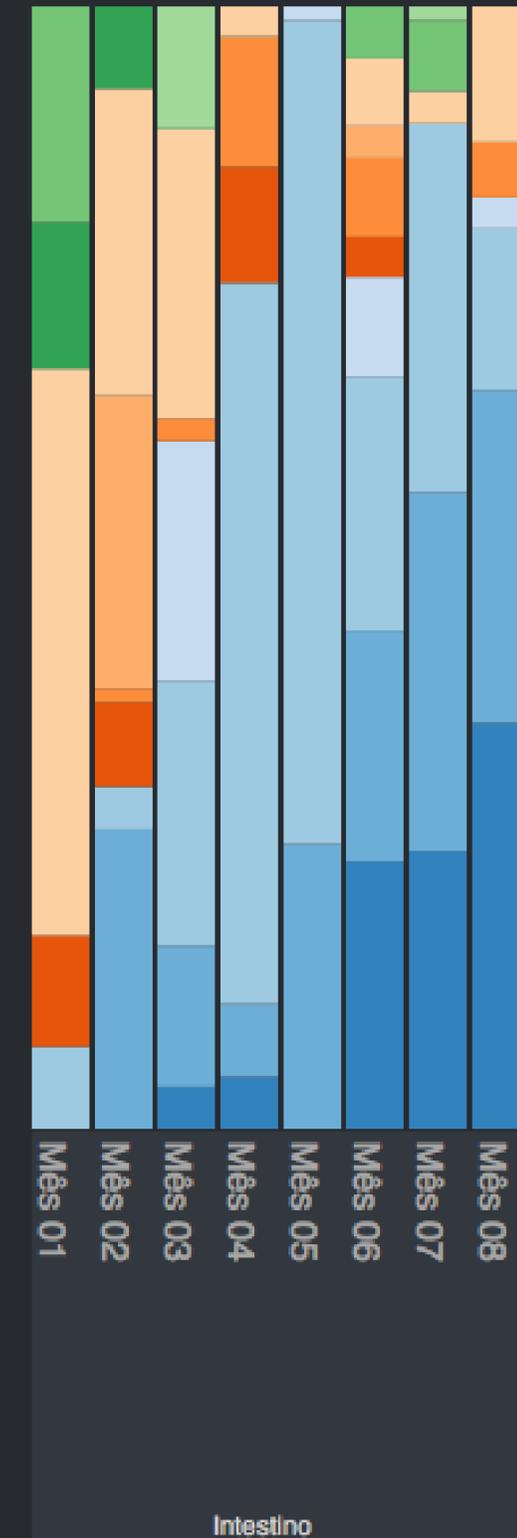
Fusobacteriales ■

Lactobacillales ■

Pasteurellales ■

Selenomonadales ■

Verrucomicrobiales ■



Perfil: Geral ▾

Exibição: Prop. Div. Qnt.

Search

x

[Clostridium] glycyrrhizinilytic...

[Clostridium] hathewayi

[Clostridium] hiranonis

[Ruminococcus] gnavus

[Ruminococcus] torques

Aggregatibacter segnis

Akkermansia muciniphila

Anaerostipes hadrus

Bacteroides caccae

Bacteroides dorei

Bacteroides fragilis

Bacteroides ovatus

Bacteroides stercoris

Bacteroides thetaiotaomicron

Bacteroides uniformis

Bacteroides vulgatus

Bifidobacterium adolescentis

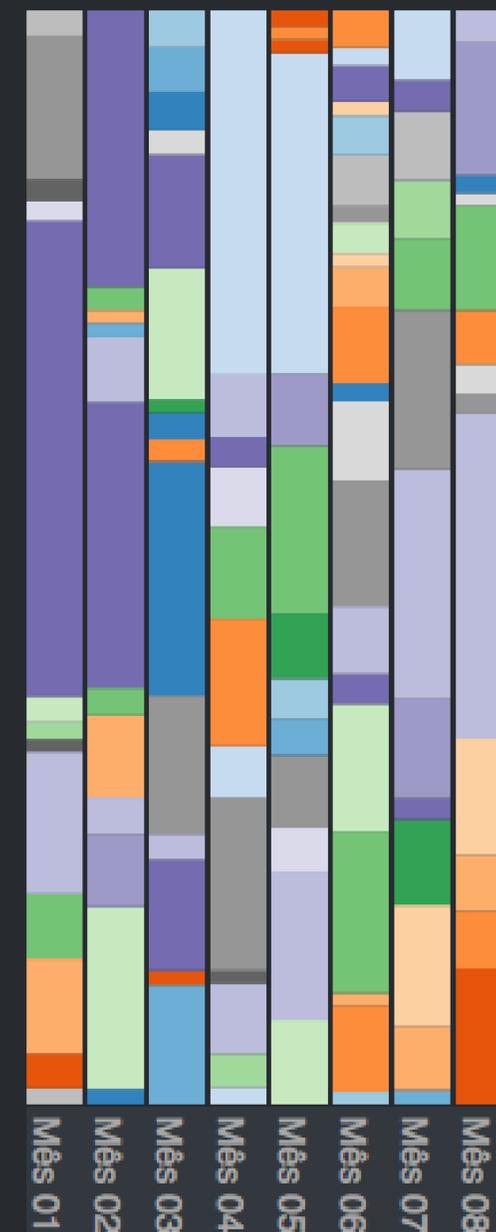
Bifidobacterium bifidum

Bifidobacterium breve

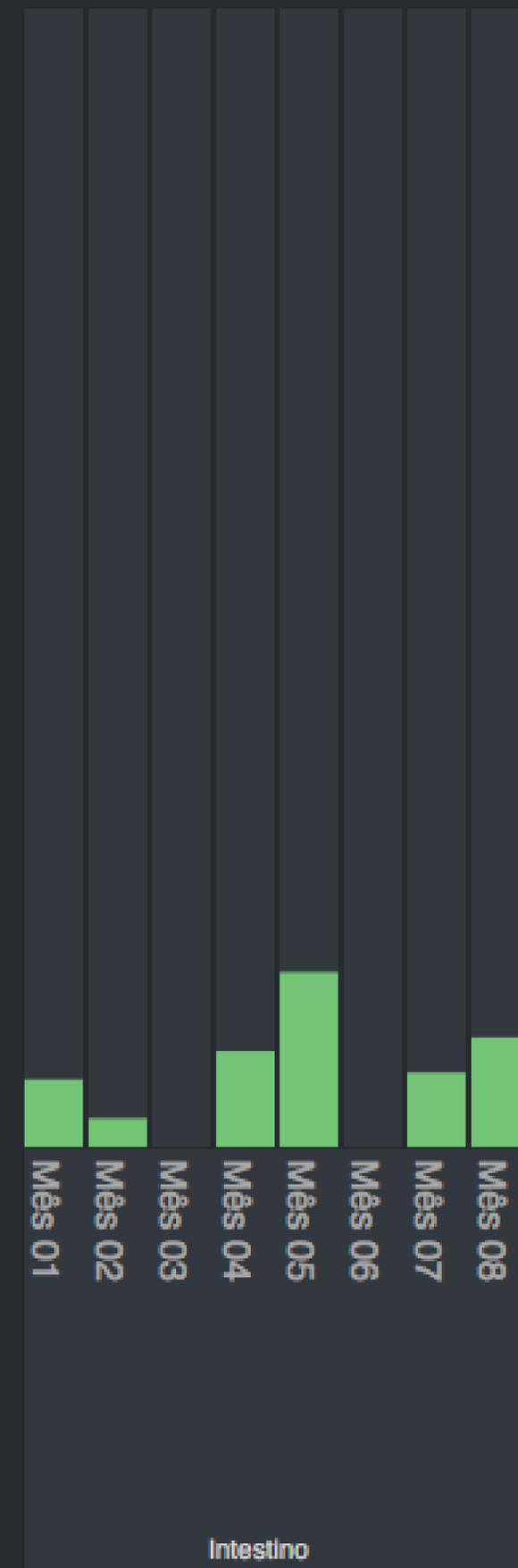
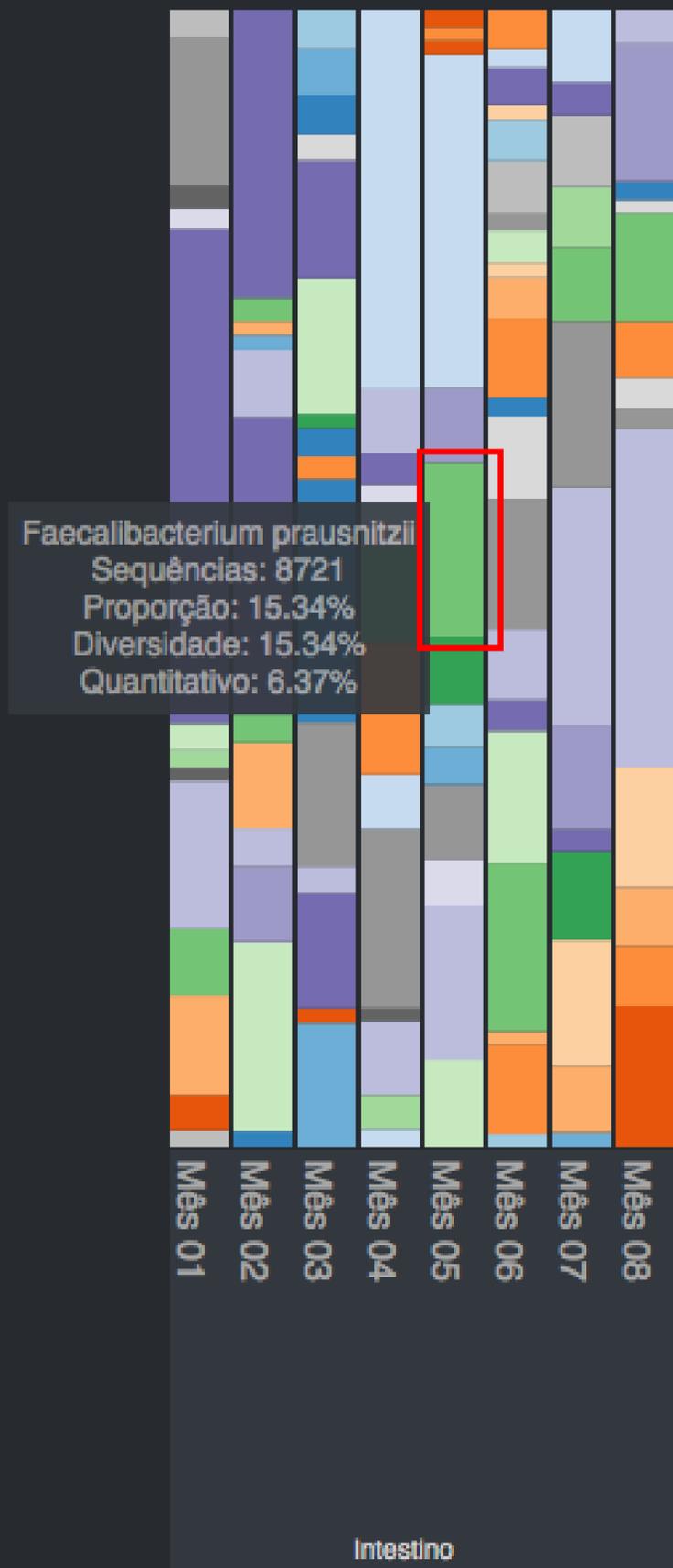
Bifidobacterium longum

Bifidobacterium pseudocaten...

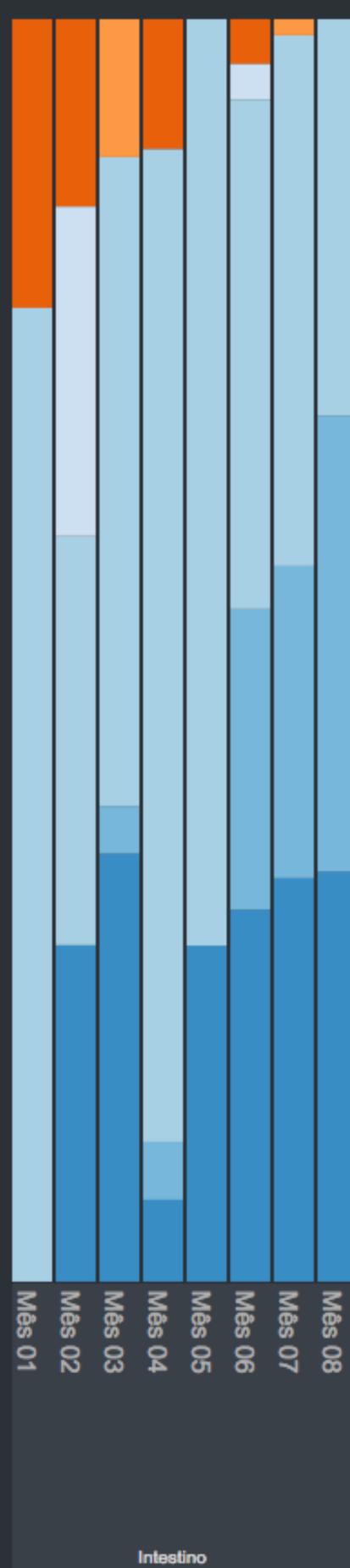
Blautia hansenii



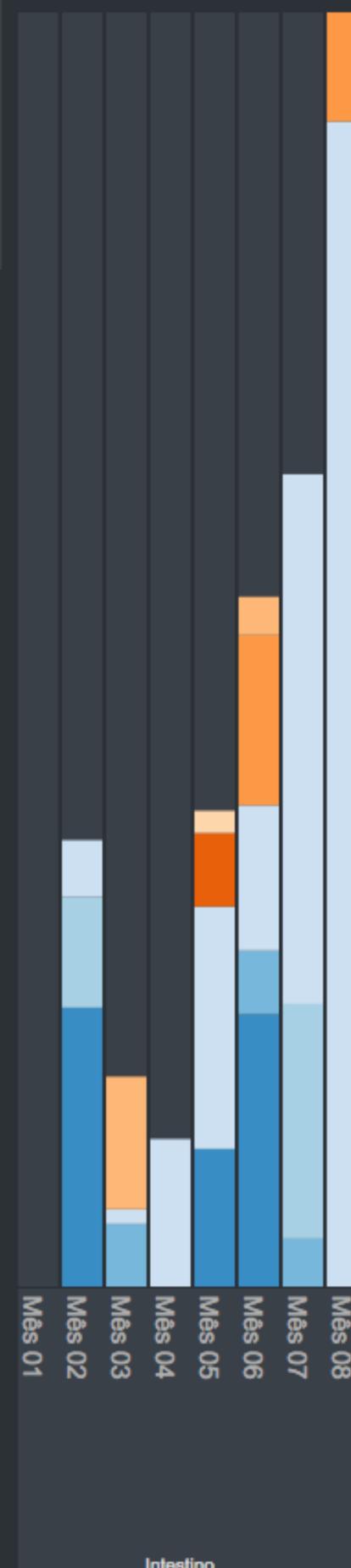
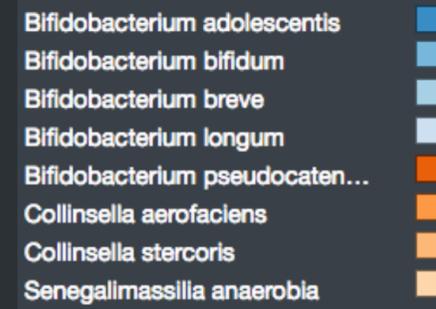
Intestino



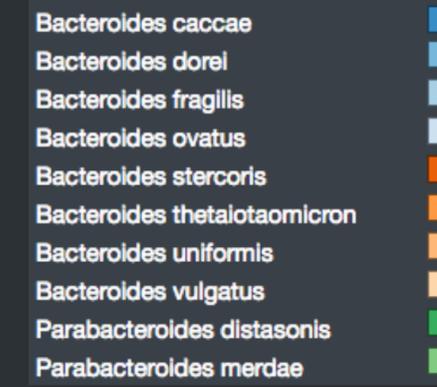
Estudo de microbioma intestinal -
acompanhamento ao longo de
tratamento acoplado ao uso de
probióticos



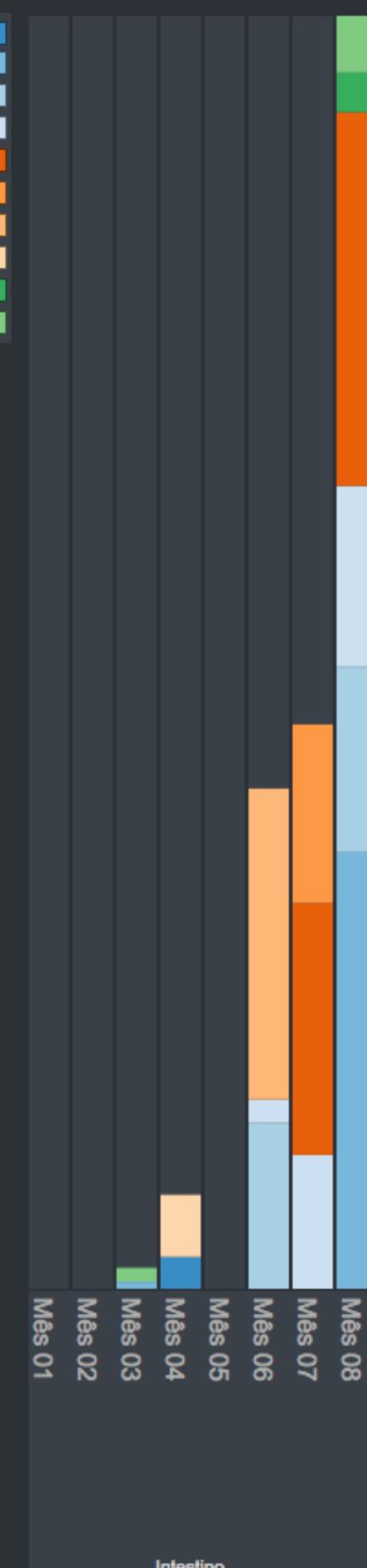
Filo: Actinobacteria



Intestino



Filo: Bacteroides



Intestino

Afinal, a análise do microbioma é uma realidade distante?

- **Não, do ponto de vista tecnológico**
- **Não, do ponto de vista financeiro**
- **Talvez, do ponto de vista científico (interpretação dos resultados) → ainda temos muitas perguntas e um longo caminho a percorrer**

Obrigado!

acosilveira@furb.br

consultormicrobiologia@grupoghanem.com.br

alessandrocosilveira@gmail.com