



FIOCRUZ

Concurso Público Fiocruz 2023

Pesquisador em Saúde Pública

Prova Discursiva

PE51

Microbiologia Básica e Molecular aplicada a Bactérias e Protozoários causadores de Zoonoses

Espelho de Resposta

Pontuação de cada Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 3, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

Questão 01

Como é de amplo conhecimento na comunidade científica, iniciativas de vigilância genômica têm sido extremamente importantes para programas de controle de doenças causadas por vírus, como SARS-CoV-2 e Arboviroses. Recentemente, tem sido demonstrado uma grande plasticidade genômica de protozoários parasitos de importância médica. Em parasitos do complexo *Leishmania donovani*, este fenômeno tem sido observado tanto em isolados de laboratório quanto naqueles de campo. Por exemplo, foram detectadas alterações genômicas de um mesmo isolado mantido em diferentes hospedeiros (Dumetz et al., 2017). Além disso, isolados de diferentes regiões geográficas possuem padrões de diversidade distintos (Franssen et al., 2020) e, em uma mesma área endêmica, populações do parasito podem, ao longo do tempo, ser substituídas por outras geneticamente distintas (Valdivia et al., 2022). Tendo em vista este cenário, responda as questões abaixo.

- 1 Discuta como iniciativas de vigilância genômica envolvendo sequenciamento de nova geração (NGS) poderiam contribuir para o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral (PVCLV) no Brasil.
- 2 Descreva brevemente as etapas metodológicas que você proporia, desde o isolamento do parasito de hospedeiros mamíferos até a obtenção de reads NGS.
- 3 Cite e descreva brevemente duas análises bioinformáticas que você julga serem importantes para alcançar seus objetivos e em quais etapas do programa de controle elas poderiam ser aplicadas.
- 4 O PVCLV do Brasil incorporou ações de vigilância e controle em municípios sem registro de casos autóctones de leishmaniose visceral humana ou canina (Ministério da Saúde, 2006). Discuta o racional desta estratégia e cite três ações práticas que você proporia para contribuir para a vigilância e o controle da LV nessas áreas.

Espelho respostas

1- Exemplos de aplicações:

Reconstrução epidemiológica para inferência de redes de transmissão

Estudo de fluxo gênico entre populações de diferentes hospedeiros

Redesenho de抗ígenos aplicados ao diagnóstico e a vacinas

Identificação de variantes associadas a falhas terapêuticas

Identificação de variantes associadas à progressão da doença

2- O candidato deve mencionar as técnicas parasitológicas usadas no isolamento do parasito. Cultivo. Extração de DNA. Análise de qualidade do DNA extraído. Construção das bibliotecas de sequenciamento. Sequenciamento do DNA por técnicas NGS.

3- Exemplos:

Estudo de genomas de isolados de campo em diferentes contextos, como por exemplo isolados obtidos de diferentes áreas endêmicas do país, ou estudos temporais em uma mesma área. Isolados associados à resistência ao tratamento quimioterápico. Isolados obtidos de pacientes ou cães com diferentes evoluções clínicas.

Análises: filogenéticas/filogenômicas; estudos de associação com diferentes formas clínicas e/ou resistência terapêutica; identificação de polimorfismos em抗ígenos aplicados ao diagnóstico e a vacinas, seguido de redesenho dos抗ígenos.

4- Racional: Incorporar os estados e municípios sem ocorrência de casos humanos ou caninos nas ações de vigilância e controle, a fim de evitar ou minimizar os problemas referentes à doença em novas áreas.

Possíveis ações práticas:

- Levantamento entomológico para verificar a ocorrência de *L. longipalpis* e/ou *L. cruzi*, em áreas sem ocorrência de LV, consideradas vulneráveis, ou seja, vizinhas a áreas com registro de casos, que possuem fluxo migratório intenso ou que fazem parte do mesmo eixo viário de municípios com casos de LV.

- Inquérito sorológico de cães em áreas receptivas (com ocorrência dos vetores acima citados).

- Em cão reativo em área receptiva, confirmar parasitológico e espécie de *Leishmania* circulando na área.

- Considerando a transmissão autóctone no cão, realizar busca ativa de cães com suspeita clínica.

- Treinar profissionais para diagnóstico precoce e tratamento

- Desenvolver atividades de educação e saúde junto à população

- Eutanásia ou tratamento de cães com diagnóstico positivo com milteforan

- Uso de estatística e modelagem geoespacial para estimar a probabilidade de uma região sem casos autóctones confirmados se tornar um foco de leishmaniose visceral, caso haja a introdução do parasito na região.

Questão 02

- a) Fornecer o conceito de sequência de inserção e descrever como é seu mecanismo de inserção em um genoma; descrever que as sequências de inserção são capazes de corromper/interromper sequências gênicas da bactéria ao se inserir na região codificadora de proteínas de um gene ou na sua região promotora (ou do seu operon), levando assim ao surgimento de pseudogenes ou genes com alterações em sua expressão gênica, respectivamente; descrever que as sequências de inserção podem também levar a rearranjos gênicos, deleções e duplicações por mecanismos de recombinação que devem ser brevemente descritos; descrever que outros mecanismos genéticos que contribuem para modulação de conteúdo gênico em bactérias que não estão sujeitas a transferência horizontal de genes como a *Y. pestis* e o complexo *M. tuberculosis* são as *frameshifts* causadas por indels (inserções e deleções) e mutações sem sentido (do inglês, *nonsense*) que levam ao truncamento gênico e formação de pseudogenes.
- b) Descrever parâmetros de qualidade normalmente avaliados por software de controle de qualidade como, por exemplo, FastQC, e como devem ser interpretados. Esses parâmetros incluem: presença de adaptadores, número total de sequências e bases [em relação ao tamanho esperado do genoma (cobertura)], qualidade da sequência por base (escala de phred), escores de qualidade por sequência, percentual de GC, nível de duplicação de sequências, conteúdo de N por base, distribuição do tamanho da leitura, sequências duplicadas, sequências super-representadas, *matching pairs* (no caso de sequenciamento *paired-end*), cobertura, dentre outras. Descrever análises para verificar contaminação com outras bactérias, pelo uso de ferramentas como Kraken, por exemplo. Percentual de leituras mapeadas contra genoma de referência e percentual do genoma de referência mapeado. Trimagem por qualidade, se necessário, com avaliação de parâmetros de qualidade antes e após a trimagem.
- c) Definir CRISPRi; descrever que CRISPRi usa um sistema de CRISPR-Cas modificado, explicando o que é a dCas (do inglês, *dead Cas*, Cas morta cataliticamente); descrever a necessidade de um RNA guia complementar à sequência promotora e/ou codificante do gene alvo que se deseja reprimir; descrever que ocorre a ligação e bloqueio da região alvo pela dCas, reduzindo ou silenciando a expressão gênica; descrever que é possível ajustar a regulação gênica para os níveis desejados.