



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Concurso Público para provimento efetivo de vagas no cargo de
Professor da Carreira de Magistério Superior

Edital UFRJ nº 54, de 30 de janeiro de 2024 (Consolidado com
seus editais de retificação) Versão inicial publicada no DOU em:
02/02/2024 | Edição: 24 | Seção: 3 | Página: 71 a 80, código
MC-055 – área Bacteriologia Médica, do Departamento de
Microbiologia Médica – Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes – CCS – UFRJ.

PROVA ESCRITA

CANDIDATO: 150349

Questão 01: Métodos fenotípicos e genotípicos moleculares aplicados à identificação, diagnóstico e epidemiologia de bactérias patogênicas. (Tópico 03)

Dentro do domínio Bacteria há diversas classes e grupos de microrganismos relevantes quanto aos seus mecanismos de causar doença no hospedeiro humano. Dentro estes grupos, podemos destacar bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, ácido-álcool resistentes e agentes zoonóticas. Logo, compreende-se ainda mais claramente, o processo infeccioso dependente de diversas etapas para o seu estabelecimento que culminam na superação de barreiras do hospedeiro tais como a barreira quimicamente do epitélio, as respostas imunes inata e adaptativa, bem como os desdobramentos da resposta celular e humoral e secreção de enzimas antimicrobianas (e.g., lisozima que cliva a ligação ~~beta~~ B-1,4 da parede celular), entre outras. Assim resumidamente, podemos ~~atribuir~~ descrever o processo infeccioso através de algumas etapas sequenciais, sendo estas: (i) exposição ao patógeno (e.g., exposição ~~em~~ à água e alimentos contaminados, contato próximo, inalação de aerossóis, ~~etc.~~ etc.); (ii) a adesão, mediada por estruturas de superfície como pili, fimbrias, flagelo, sistemas de secreção, adesinas e fimbrias (e.g., Opa e Opc em *Neisseria* ~~entre~~ spp.); (iii) a colonização e invasão (e.g., formação de biofilme, produção de toxinas); e (iv) a ~~adesão~~ e a evasão da resposta imune e multiplicação no

no tecido do hospedeiro (e.g., resistência à fagocitose e à deposição de complemento por antígenos capsulares como em K. pneumoniae, entre outros).

Logo, o correto diagnóstico de um patógeno é crucial durante a intervenção terapêutica (e.g., terapia antimicrobiana), à prevenção e ao controle dentro da abordagem integrada de Saúde Única. Assim, há diversos métodos fenotípicos e moleculares que podem ser empregados durante o diagnóstico. Quanto aos métodos fenotípicos na identificação, estes podem ser dependentes de cultivo ou realizados a partir do material coletado. Quanto aos métodos diretos, podemos citar o exemplo do microscópio óptico, operado em tempo direto, aliado a colorações diferenciais como a coloração de Gram para distinguir entre patógenos Gram-positivos (e.g., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Corynebacterium spp., Actinidium spp., Bacillus spp., entre outros) e Gram-negativos (e.g., gêneros Escherichia, Shigella, Salmonella, Bacillus, Brucella, Pseudomonas, Vibrio, Yersinia, Klebsiella, Tarantobacter, etc.). Semelhante a isso, a coloração de Ziehl-Neelsen ou Auramina-Rodamina é fundamental para a identificação de ~~micobactérias~~ micobactérias (e.g., M. tuberculosis, M. leprae, M. avium e seu complexo, M. abscessus e M. kansasii).

No entanto, etapas de identificação bioquímicas adicionais são necessárias, além do exame ao microscópio. Tais etapas recaem sobre a identificação e detecção de vias relacionadas ao metabolismo bioenergético (e.g., respiração aeróbia ~~ou~~ respiração anaeróbia) e a diversidade de vias fermentativas. Algumas ~~reações~~ reações típicas para micobactérias ~~incluem~~ aliada à detecção de enzimas específicas (e.g., urease, produção de H_2S , triptofanase para produção de indol, entre outras).

Logo, quanto à identificação biológica. No entanto, alguns achados clínicos podem ser identificados por observação direta sem a necessidade de métodos bioquímicos e moleculares (e.g., ~~baseados~~ baseados em detecção de ácidos nucleicos ou no perfil de proteínas expressas). Um exemplo é a coleta de exudato purulento de uretra, masculina ou feminina, e coloração de Gram para a identificação de diplococos

Crom-negativas associadas a PMNs (polimorfonucleares), resultando na identificação de Neisseria gonorrhoeae, agente etiológico de gonorréia.

Diante disso, voltaremos aos métodos fenotípicos e moleculares, uma vez que estes precisam obedecer 2 princípios: especificidade para o patógeno, evitando falsos positivos, bem como a sensibilidade, evitando falsos negativos. Em ~~uma~~ sequência, podemos citar provas bioquímicas úteis para alguns patógenos. Para micobactérias, por exemplo, a redução do nitrato a nitrito (e.g., acetato final de elition durante a respiração anaeróbia) é fundamental para distinguir M. tuberculosis (nitrato positivo; agente etiológico de tuberculose pulmonar e extra pulmonar) de micobactérias não tuberculosas (e.g., M. avium complexo ou M. ~~Kan~~ Kansaii; nitrato-negativo).

Para bactérias Gram-negativas, podemos citar a capacidade de usar citrato (e.g., P. aeruginosa; através do ciclo de Krebs) como única fonte de carbono, geralmente retornando resultados positivos para P. aeruginosa, K. pneumoniae, entre outros. Outra enzima relevante é a detecção de urease, capaz de hidrolisar a ureia em amônia + bicarbonato. Patógenos urease positivos são Helicobacter pylori (i.e., ulcera gástrica e câncer de estômago) e Proteus mirabilis (infecção do trato geniturinário). Para Gram-positivas, podemos citar a prova de coagulase, diferenciando estafilococos coagulase positiva (e.g., S. aureus) e demais estafilococos coagulase negativa.

Assim, é importante lembrar que estes exemplos citados acima são dependentes de cultivo, em que tais microrganismos, após a coleta, são crescidos em: (i) meios de enriquecimento (e.g., agar sangue); (ii) seletivos, para inibir o crescimento de espécies indesejadas (e.g., agar manitol-sol e a seleção de S. aureus); e (iii) diferenciais, evidenciando uma característica fenotípica (e.g., viragem do meio agar manitol-sol em S. aureus devido à subprodutos de fermentação). Somado a isso, tais provas bioquímicas, ~~tais métodos não sendo mentais~~, mas podem ser ou mais podem ser encontradas em sua forma ~~em~~ miniaturizada, como as tiras de teste API (analytical profile index).

Além de tais métodos, podemos citar relevantes procedimentos moleculares para o diagnóstico e epidemiológico molecular. Tais métodos são altamente aplicados uma vez que ajudam a ditar medidas de controle e prevenção em Saúde Pública e Única através de diferentes métricas, como a incidência, prevalência, o número de reprodução básico (R_0), ~~entre~~ entre outros. Dentre estes métodos, podemos destacar aqueles baseados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos, tais como PCR, qPCR, FISH, ARFLP, sequenciamento, entre outros; e (ii) aqueles baseados na detecção e quantificação de proteínas, como MALDI-TOF MS, HPLC, ~~o~~ eletroforese bidimensional, western-blot, entre outros. Por fim, para este grupo, podemos citar métodos de imunológicos como ELISA, imunofluorescência, imunocromatografia por teste rápido, teste de aglutinação, uma vez que são baseados na detecção de antígenos bacterianos.

Quanto aos métodos de detecção de ácidos nucleicos, o material de escolha é naturalmente o DNA. Técnicas como PCR e qPCR ~~são~~ podem ser utilizadas, por exemplo, para a detecção de genes *VanA* e *VanB* (e.g., amplicons entre 500 a 600 bp) para a detecção de resistência à vancomicina em Enterococcus (VRE). Também podem ser utilizados para a detecção de fatores de virulência, como o gene *ruc* (ruche) de S. aureus, responsável por dígito NEDs de natofitas. Técnicas como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ~~destaca~~ são responsáveis pela genotipagem de patógenos em análises histológicas, ~~o~~ Tal princípio recai sobre a hibridização de um sonda de DNA (fluorescente) ao gene do rRNA 36S expresso, permitindo a identificação específica do patógeno. Tais ensaios já foram empregados para a detecção de micobactérias como o M. tuberculosis (Mtb) no ambiente de granuloma.

Adicionalmente, tais estratégias de diagnóstico, ~~principalmente~~ devem culminar na etapa final de identificação de um patógeno bacteriano: o antibiograma ou teste de Kirby-Bauer. Tal método, corretamente executado, é fundamental para guiar a terapia antimicrobiana, especialmente

traz medidas e estratégias cruciais tanto em Saúde Pública quanto à
abordagem de Saúde Única (One Health) e prevenção de IRAS (inspeção
relacionada à assistência em saúde) no ambiente nosocomial.

Questão 03: Mecanismos genéticos de evolução de patógenos bacterianos (Tópico 09)

A evolução de patógenos bacterianos é guiada majoritariamente por eventos relacionados à variabilidade genética, como o impacto da transferência vertical e horizontal de genes bem como os mecanismos evolutivos por sua seleção. Tais eventos são cruciais sobre 2 aspectos: (i) a capacidade de enriquecer seu arsenal de virulência ~~genética~~, permitindo uma melhor adaptação ao hospedeiro; e (ii) bem como a capacidade de resistir a anti-microbianos por ~~varios~~ mecanismos genotípicos e fenotípicos, regulados a nível gênico.

Quanto à evolução, podemos citar a seleção natural e a deriva genética como forças importantes para a seleção de patógenos resistentes. A seleção natural é responsável por selecionar o espécime mais apto e adaptável (i.e., maior fitness) a uma determinada pressão seletiva ou gargalo evolutivo, tal como a presença de antimicrobianos. Já a deriva genética seleciona aleatoriamente tais microrganismos, alterando a frequência gênica populacional. Logo, ~~em~~ o ponto de origem, serão abordados mecanismos evolutivos e seu processo de seleção frente a diferentes pressões seletivas. Assim, um mecanismo comum em evolução é a ocorrência de eventos de duplicação e divergência de genes. Um exemplo claro é a evolução das enzimas VanA, VanB e VanC em VRE (*Enterococcus* resistentes à vancomicina). Tais enzimas ~~separam~~ ~~tal~~ ~~evento~~. Os genes que codificam tais enzimas geram alvo deste evento, devido à duplicação do gene que codifica a enzima D-ala - D-ala - ligase, fundamental na ~~bi~~ biossíntese da parede celular. No entanto, estas enzimas VanA e demais evoluíram de forma a substituir um resíduo de D-ala por um D-lac (D-lactato).

Tal modificação é varifosa devido à resistência adquirida à ação de glicopéptidos vancomicina, naturalmente específicos para se ligar ao dipeptídeo D-alc-D-alc. Logo, tal evento de duplicação e divergência ~~o~~ foi responsável por ~~seu~~ selecionar este fenótipo de resistência ao antimicrobiano.

Outro exemplo é a evolução reductiva ou interdependente. Este exemplo é comum em patógenos bacterianos intracelulares obrigatórios como Mycoplasma spp., Rickettsia spp., Chlamydia spp., entre outras. Tais patógenos tiveram seus genomas reduzidos devido à interdependência estabelecida com o hospedeiro, evitando, portanto, vias metabólicas redundantes, economizando energia e recursos. Também, podemos citar a evolução divergente, como no caso de linhagens filogeneticamente próximas. Um exemplo é a adaptação a diferentes nichos do hospedeiro para estabelecerem o processo infeccioso, como em patótipos de E. coli (e.g., EPEC, EHEC, ETEC, UPEC, NMEC, etc.). Tais adaptações partem de um ancestral comum, mas a diversificação dos fatores de virulência permitiu que estes patótipos causem infecções gastrointestinais (e.g., EPEC) como extraintestinais (e.g., UPEC no trato geniturinário).

Também podemos citar a evolução convergente, como em linhagens filogeneticamente distantes de S. aureus (coagulase positiva) e outros estafilococos coagulase negativa ~~em~~ na capacidade de evolução para a resistência à meticilina (e.g., MRSA em S. aureus). Tal evento se deve à evolução e disseminação de uma transpeptidase alternativa, a ~~PBP2a~~ PBP2a, relacionada à resistência ~~de~~ contra alguns fármacos β -lactâmicos durante a síntese da parede.

Logo, a partir de agora, serão abordados eventos relacionados ao fluxo de variabilidade genética como em eventos de transferência vertical de genes (TVG; dominada por eventos mutagênicos a nível cromossomal e plasmidial) além de eventos de transferência horizontal de genes (THG; como conjugação, transdução generalizada e ~~espec~~ espec 7).

ligada, transformação, GTH, vesículas) e impacto de LGMs (elementos genéticos móveis; como plasmídeos, integrons, transposons, *prophages*, sequências de inserção, ICEs, entre outros).

Quanto a eventos mutagênicos, podemos citar o patógeno de prioridade crítica (OMS, 2024) conhecido como *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifamicina (RR-TB). O RR-TB possui uma mutação amplamente disseminada na subunidade β de RNA polimerase: a mutação S531L.

Tal mutação ~~se~~ representa a perda de uma serina (resíduo polar neutro) por uma leucina (resíduo ~~de~~ hidrofóbico alifático) na posição 531. Tal mutação resulta na perda de uma estrutura conhecida como "outlet loop 2", responsável por fornecer uma ligação de hidrogênio que estabiliza o fármaco no bolso da RNA polimerase. Tal mutação leva à perda desta interação intermolecular e é fundamental para a resistência a esta classe de antimicrobianos.

Antes de entrarmos nos mecanismos relacionados à TMB e ao mobiloma bacteriano (i.e., conjunto de LGMs), abordaremos um evento de regulação a nível genético que leva a uma resistência aos lipídeos: a resposta estingente associada a persisters. Podemos, novamente, citar exemplos como persisters de MtB (*M. tuberculosis*) frente à resposta de hipoxia ou demais patógenos Gram-negativos como *V. cholerae* em biofilme (e.g., regulação do repressor HapR e expressão de genes Bep para a formação de biofilme a partir da simbiose de homocil lactonas em *quorum sensing*). Tal fenótipo persisters explica a falha de diversas terapias antimicrobianas, vez que tais persisters, por exemplo, passam a downregular a expressão de alvos para antimicrobianos, como no caso de TB e os fármacos de 1ª linha (isoniazida, rifampina, etambutol e pirazinamida). Tal fenômeno ocorre devido a uma resposta de repressão da tradução, pelo mensageiro (p)ppGpp, e, posteriormente, a repressão da transcrição.

Portanto, voltando aos eventos de TMB, podemos citar casos relevantes como a transformação em bactérias Gram-negativas em estado de



competência (e.g., expressão de sistema ComA e ComE junto ao pilus do tipo IV (4)). Adicionalmente, quanto à transdução, podemos citar o exemplo de transferência de genes *bla* (resistência por expressão de β -lactamases) pelo bacteriófago ϕ 2 ao patógeno *Citrobacter* spp., importante em infecções comunitárias e nosocomiais.

Por sua vez, quanto à conjugação, há formação de um par de acasalamento (i.e., "mating pair") através de expressão de um pilus F (i.e., "fertility"). Há contato entre a bactéria doadora e a receptora. No entanto, o fragmento gênico incorporado é internalizado sob forma de fita simples e estabilizado por SSBs ("single strand binding proteins"). Posteriormente, há recombinação homóloga do fragmento com o material genético de célula receptora, através da resolução da junção de Holliday pelo complexo RecA e RecBCD. Logo, é importante notar que tais eventos estão majoritariamente associados a porções mais plásticas e móveis do genoma bacteriano. Tal fenômeno é responsável, portanto, pela transiência em várias frequências de AMGs ("auxiliary metabolic genes") como os AMRs ("antimicrobial resistance genes"). Alguns exemplos de AMGs/AMRs, passíveis de THG, são: (i) genes *bla* (β -lactamases); (ii) genes *tet* que codificam bombas de efluxo contra tetraciclina; (iii) genes de ~~transporte~~ de multicomplexos de efluxo dependentes de gradientes eletroquímicos, como os transportadores ~~RND~~ ~~RND~~ ~~RND~~ RND ("resistance to modulation") e MFS ("major facilitator superfamily"); entre outros.

Quanto aos demais EGMs, podemos citar as ilhas de patogenicidade em patótipos de *E. coli* e *Salmonella enterica* serovares Typhimurium, por exemplo. Em *Salmonella* ~~sp.~~ Em *S. enterica*, é comum a detecção de 2 ilhas de patogenicidade (PAIs): SP1 e SP2, flanqueadas por ~~os~~ elementos de transposição. Tais PAIs são responsáveis por difrentes eventos durante a patogênese de salmonelose, como a indução de "ruffling" (i.e., ondulação de membrana provocada pelo rearranjo dinâmico da actina) e, posteriormente, a adesão e sobrevivência do patógeno.

Por fim, um mecanismo ~~isto~~ relevante a nível genético pode ser associado à avulsão de *Salmonella* spp.. A proteína flagelina é reconhecida como um PAMP pelo receptor TLR5, presente na superfície de células de imunidade inata. No entanto, esta bactéria consegue evitar a resposta imune através de variações de fase. Ou seja, alternativamente, ocorrem eventos de recombinação na região gênica que codifica a flagelina do flagelo, sendo as proteínas FlgB e FlgC. Oportunamente, estes eventos de recombinação atuam reprimindo ou truncando a região promotora de um gene por vez. Logo, apenas uma flagelina é exposta por vez, atuando o disparo de resposta via TLR, a apresentação de antígenos, estimulação e produção de citocinas para recrutar a imunidade ~~adapta~~ adaptativa.

Por fim tais eventos, relacionados à evolução de patógenos bacterianos, seja pela transmissão vertical ou horizontal, são regionalmente responsáveis por selecionar os microrganismos mais bem adaptados às diversas pressões seletivas que estes encontram no ~~em~~ contexto ambiental, hospitalar ou comunitário.

Questão 02: Bactérias Gram-negativas de importância médica caracterizações fenotípica e molecular, patogenicidade e controle (Tópico 07)

Os patógenos Gram-negativos, tais como BGNs (bacilos Gram-negativos; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) e CGNs (coccos Gram-negativos; *Neisseria* spp.) possuem uma estrutura de parede particular. Possuem uma camada de peptidoglicano ancorada à membrana externa (ME) por lipoproteínas. Na ME, há a presença do LPS ou LOS (lipopolissacarídeo ou lipooligosacárido), uma potente endotoxina que ~~do~~ dispara a resposta imune via TLR4. É composto pelo lipídeo A, o polissacarídeo core e o polissacarídeo O (antígeno O).

Assim, podemos descrever os principais patógenos Gram-negativos

e as doenças causadas por estes, tais como: (i) infecções gastrointestinais (e.g. ~~patógenos~~ patótipos de E. coli, entre outros); (ii) cólera (i.e. Vibrio cholerae); (iii) coqueluche ou pertussis (Bordetella pertussis); (iv) úlcera e câncer gástrico (H. pylori); (v) infecções de feridas, sepsis e do trato respiratório, ~~de bactérias~~ e IRAS (A. baumannii, K. pneumoniae, P. aeruginosa, Aeromonas spp., entre outros); (vi) ~~shigelose~~ shigelose (i.e., diarreia sangüinolenta por S. flexneri); (vii) salmonelose (por Salmonella spp.); (viii) peste e gastroenterites (gêneros Yersinia, com Y. pestis e Y. pseudotuberculosis); (ix) gastroenterite (e.g., ~~por~~ Campylobacter jejuni); (x) gonorréia (N. gonorrhoeae); ~~(xi)~~ (xi) meningite (e.g. N. meningitidis e H. influenzae), entre outras.

Tais patógenos podem ser veiculados por água e alimentos contaminados, como infecção cuja via de transmissão seja, como E. coli, Salmonella spp. ~~de doenças~~ Tais ^{doenças} ~~infecções~~ podem ser classificadas em: (i) infecções (e.g.) ingestão do patógeno viável e este causa doença; (ii) intoxicações (e.g. i.e., ingestão de alimentos e água contendo toxinas) ou (iii) ~~toxicoinfecções~~ toxicoinfecções (e.g. i.e., ingestão do patógeno viável e suas toxinas, em que ambas causam a doença). Medidas de controle e prevenção incluem o tratamento da água, ~~o~~ (e.g., cloração e filtração), acesso à saneamento básico, higienização ~~dos alimentos~~ e cozimento (e.g., quando possível) de alimentos, entre outras.

Quanto a ISTs (infecções sexualmente transmissíveis) podemos citar a gonorréia, causada por diplococos Gram-negativos da espécie N. gonorrhoeae. A transmissão ocorre por contato íntimo com fluidos contaminados. ~~Podemos citar~~ Quanto ao arsenal de virulências, podemos destacar as adesinas ao ~~TCU~~ TCU (trato genitourinário). Podemos citar as adesinas ~~de~~ glicícolinas Opa e Opc (i.e., "opacity related protein"). Tais proteínas apresentam ~~dois~~ motivos RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) que reconhecem e aderem a integrinas do TCU. ~~Logo, quanto ao arsenal de virulências~~

15084

Conforme abordado na questão 02, o processo infeccioso depende de diversas etapas e superação das barreiras do hospedeiro. Tais etapas compreendem a adesão, colonização, invasão, agressão, multiplicação e evasão. Logo, há um arsenal de fatores de virulência que podem ser citados. Assim, podemos citar adesinas como pilus do tipo I e IV, fimbrias, proteínas Opc e Opc, LPS, e LOS, flagelo, ~~for dentro da~~ cápsula, camada límbica, entre outros. Quanto ao potencial de colonização, invasão e agressão e evasão podemos citar: (i) a produção de sideróforos para captura de Fe^{+3} como aerobactina e enterobactina; (ii) ~~o sistema~~ ~~TSS VI~~ (sistema de secreção do tipo IV) ^{TSS VI} responsável por injetar toxinas em outras ~~celas~~ bactérias para competição e patogenicidade; (iii) TSS IV (tipo 4), relacionado à adesão e captura de DNA exógeno para transformação; (iv) flagelo e cápsula para evasão do reconhecimento do sistema imune; (v) hemolisinas e toxinas Cg, toxina estérica e dis perca da aderência, ciclose, aumento de AMPc e abertura de canais de Cl^- no lúmen ínter (Int); e (vii) ~~expressão~~ expressão de bombas de efluxo de ~~fos~~ antimicrobianos e toxinas como RND, MFS, MATE, entre outras; (viii) produção de urease por H. pylori para neutralizar o meio ambiente no piloro do estômago e provocar ulceração péptica.

Logo, ~~además~~ é fundamental entender a ~~a~~ mecanismos de funcionamento destes fatores de virulência, bem como a sua relevância em procedimentos diagnósticos. Para identificação bioquímica, podemos citar: (i) o teste urease positivo ~~pt~~ para H. pylori e Proteus spp.; (ii) a fermentação de lactose em agar MacConkey para E. coli (i.e., colônias verde metálicas); (iii) o uso do abeto no teste abeto de Simmons ~~po~~ que é positivo para Proteus P. aeruginosa; e (iv) produção de H_2S por Salmonella spp. em meio TST (i.e., "triple sugar iron").

Quanto a identificação molecular, podemos citar as

Técnicas de PCR, qPCR, FISH, RFLP, ARFLP, sequenciamento, PFGE
 entre outras. Alguns genes relevantes para a identificação por
 PCR. Quantificações por qPCR são: (i) *invA* em Salmonella;
 (ii) em V. cholerae; (iii) por A e por B em Neisseria spp; (iv)
~~por~~ ~~PCR~~ ~~mol~~ em P. aeruginosa e A. baumannii; ~~em~~ e (v) o gene que
 codifica o rRNA 16S como marcador filogenético.

Logo, ~~em~~ ~~conjunto~~ discutido anteriormente, além das vias de
 alimentos e água contaminados, há também patógenos transmitidos por con-
 tato sexual como N. gonorrhoeae, em que uma medida de eficácia para
 prevenção e controle é o uso de preservativos. Para N. meningitidis, conhecido
 como meningococo, há uma vacina atualmente disponível pelo PNI
 (Programa Nacional de Imunizações) - Outro patógeno que possui
 vacina disponível é o M. influenzae tipo b, prevenido pela vacina Hib.
 Também podemos a prevenção de coqueluche, causada pelo Bordetella
pertussis, um patógeno ~~res~~ resurgente, através da vacina DTP,
 prevenindo o tétano (C. tetani), difteria (C. diphtheriae) e a coquelu-
 che / pertussis (B. pertussis). Curiosamente, B. pertussis é oportuna com
 um patógeno resurgente devido a mudanças na composição vacinal,
 sendo ~~substituídas~~ substituídas as vacinas "celulares" (wP; "whole cell pertussis"), pela
 vacinas "acelulares" de pertussis recombinantes e ~~glicosiladas~~ glicosiladas (aP;
 "acellular pertussis").

No entanto, há diversas outras patógenos Gram-negativas (e.g., pató-
 tipos de E. coli, KPC, A. baumannii) que continuam sem vacinas disponíveis
 para uso na população. Tais dificuldades recaem majoritariamente nas
 estabelecimento de correlatos de proteção robustos, ~~depois~~ devido às particulari-
 dades da resposta imune frente a bactérias Gram-negativas. Há alguns corre-
 latos promissores, mas que ainda necessitam de maior investigação
 tais como: ativação da resposta de células T CD4+ e T CD8+, produção
 de citocinas (e.g., IFN- γ e TNF- α) e produção de anticorpos
 neutralizantes e opsonizantes (IgG).

Outros Além disso, soma-se a gravidade das IRAS (infecções relacionadas a cuidados ou assistência em saúde), sendo responsáveis pela disseminação ~~de~~ de patógenos hospitalares na comunidade.

Tal fenômeno ocorre uma vez que muitos patógenos colonizam de forma assintomática diversos profissionais da área de saúde.

Logo, ~~as~~ falhas na antissepsia, ~~de~~ das mãos e braços, uso incorreto de EPIs (equipamentos de proteção individual) e a formação de biofilme em dispositivos médicos (eg. cateteres, bisturis, entre outros) são ~~as~~ os principais fatores de risco para ~~de~~ transmissão de IRAS. Somado a isso, pacientes sob unidade intensiva (i.e., UTI) geralmente apresentam quadros de imunossupressão, o que favorece a disseminação de patógenos MDR. Assim, podemos destacar: (i) ~~De~~ P. aeruginosa - relevante no contexto clínico de pacientes com FC (fibrose cística); A. baumannii, relevante em infecções por feridas, queimaduras, capacidade de evolução rápida para sepsis e aquisição de genes de resistência; e (iii) KPC (K. pneumoniae produtora de carbapenemase), relevante em infecções do ~~do~~ VRI (trato respiratório inferior) e sepsis.

Assim, os principais desafios ao enfrentamento de patógenos Gram-negativos ~~de~~ recaem sobre as ~~as~~ principais táticas: (i) ~~os~~ fenótipos MDR como A. baumannii e P. aeruginosa resistentes ~~as~~ a cephalosporinas de 3ª geração e carbapenemas, Salmonella spp. e Enterobacteriales resistentes a fluoroquinolonas e ~~as~~ ESBL (produtoras de β -lactamase de espectro estendido) e H. influenzae resistentes à ampicilina; (ii) ~~de~~ dificuldade no avanço de desenvolvimento de novas formulações antimicrobianas devido a aspectos regulatórios e econômico; (iii) impacto das alterações climáticas, alterando a sazonalidade de vetores e patógenos ao passo que aumenta a frequência de eventos de spillover (i.e., transmissão zoonótica); e (iv) baixa disponibilidade de testes rápidos e/ou acessíveis em

regiões endêmicas, prejudicando a diagnóstica, promovendo subnotificações, ~~pois~~ impactando nas diretrizes de Saúde Pública e Saúde Única, ~~pois~~ necessitando de novas abordagens como "Point of care diagnostics"; e (v) dificuldade do estabelecimento de correlatos de proteção para o desenvolvimento de novas imunizantes vacinais tem como a necessidade de novos adjuvantes que ~~possam~~ ajudem ~~na~~ na promoção de respostas ~~de~~ eficazes e duradouras.

Em suma, tais patógenos possuem ~~uma~~ estrutura ~~de~~ uma biologia celular única (e.g. ML e LPS) associada à capacidade de promover diferentes quadros patológicos no hospedeiro humano. Assim, o contínuo ~~o~~ avanço de pesquisas sobre a patogênese, os mecanismos de virulência, a caracterização fenotípica e molecular (e.g. NAATs e MALDI-TOFMS), desde as medidas de prevenção e controle são ~~de~~ mandatórias no contexto One Health.