



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: 296011

1. Métodos fenotípicos e moleculares aplicados a identificação, diagnóstico e epidemiologia de bactérias patogênicas.

A grande diversidade de agentes bacterianos causadores de diferentes tipos de infecções, faz com que se tenha todo um aparato para se realizar sua identificação, assim como se ter uma ferramenta valiosa para estudos e levantamentos epidemiológicos de cada agente bacteriano associado a um tipo de infecção.

A identificação e diagnóstico de uma bactéria, pode ser realizada por métodos fenotípicos e moleculares, onde cada uma das metodologias empregadas favorecem e reforçam a presença do agente bacteriano a uma infecção.

Nos laboratórios de microbiologia, muitos realizam ainda métodos fenotípicos como: colorações, cultura, ensaios biológicos e imunológicos, para a identificação de bactérias.

As colorações são muito empregadas para auxiliar ao médico se há ou não a presença de uma bactéria na amostra clínica analisada, assim como uma caracterização rápida deste agente. As colorações mais empregadas

nos laboratórios são a coloração de Gram, que agrupa as bactérias em dois grupos as Gram positivas que se coram de azul/roxo e as Gram negativas que se coram de rosa/vermelho. A coloração de Ziehl-Neelsen bastante usada em amostras clínicas respiratórias e com suspeita de tuberculose, já casos suspeitos de hanseníase a coloração mais indicada é de Kinyan, por não ser aquecida e o material clínico recebido ser "delicado" (amostras de raspado de linfa).

Cada coloração possui seus reagentes que devem ser empregados sobre um esfregaço na ordem e tempo correto de acordo com o fabricante e a metodologia.

A cultura será realizada de acordo com a amostra recebida e de acordo com o agente bacteriano suspeito. Caso o médico não tenha um provável agente bacteriano, essa amostra será semeada em diferentes tipos de meios, que consegue isolar de forma ampla a bactéria. Para isso, podem ser usados meios não seletivos (que crescem bactérias Gram positivas e Gram negativas), meios seletivos para Gram positivas ou Gram negativas, meios indicadores ou diferenciais (que mostram uma característica de metabolismos, por exemplo o meio de CLFD se altera de verde para amarelo, quando há utilização da lactose, pois este meio contém leucina, lactose e Deficiência em Eletroditos. Deficiência que ajuda a conter o "sularming" produzido pelo gênero Proteus spp) caldos que ajudam o desenvolvimento das bactérias que estão em local com falta de nutrientes.

Atualmente, com o avanço tecnológicos, foram surgindo meios de cultura cromogênicos no mercado. Esses meios ajudam e direcionam para um tipo específico de bactéria, tendo em vista que há uma alteração de cor

específica para cada gênero bacteriano, poupando tempo para a identificação e agilizando a liberação dos resultados para o médico.

A identificação das bactérias também podem ser realizadas através de provas bioquímicas convencionais manuais ou automatizadas. Nos manuais é realizado testes bioquímicos em tubos que podem ficar incubados de 24 horas a 7 dias, dependendo do microrganismo. Nos testes automatizados esses testes são em placas (por exemplo: ID32E Phoenix), onde tem 32 testes bioquímicos para identificar a bactéria, essa quantidade de testes, quando comparado ao manual, aumenta a confiança na identificação, pois alguns dos tubos usados na identificação manual, possuem três a mais provas no mesmo tubo (exemplo: agar TSI - Triple Sugar Iron) este meio permite verificar a fermentação de glicose, sacarose e lactose, produção de gás e produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S).

Há também os testes miniaturizados que podem ser lidos manualmente ou pelo equipamento (exemplo: mini API) que também auxiliam na identificação bacteriana.

Para resistência bacteriana ainda usa-se o método de difusão em agar com discos e automação.

O problema dos métodos fenotípicos é a ~~tema~~ demora do retorno do laboratório com o resultado para o clínico, que muitas das vezes necessita de um resultado rápido para se tomar uma conduta clínica.

Com vista nesse propósito de se agilizar os resultados, os métodos genotípicos foram ganhando espaço dentro do diagnóstico laboratorial. Com técnicas distintas para a identificação bacteriana através da pesquisa e amplificação do DNA bacteriano.

A técnica de Reações em Cadeia de Polimerase (PCR), vem ganhando espaço dentro do diagnóstico laboratorial, sendo de rápidos resultados quando comparado a identificações genéticas.

Com o passar dos anos esta metodologia foi ampliada e melhorada, onde foi desenvolvida variações dessa PCR, como: PCR-multiplex que avalia mais de um fragmento de DNA molde; Nested-PCR que realiza duas amplificações, onde o produto da primeira amplificação é o molde para se realizar a segunda amplificação do DNA; RT-PCR onde uma molécula de RNA que serve de molde para formação do DNA complementar e o Real time-PCR onde o DNA é amplificado e marcado com um fluorocromo, nesta técnica o termociclador (que faz as reações) é acoplado a um computador que monitora e contabiliza toda amplificação, esse PCR, também é chamado de qPCR.

Todos esses PCRs são de rápida execução, o único problema é que ele tem um custo elevado e necessita de profissionais extremamente capacitados para sua execução.

Os estudos epidemiológicos podem ser realizados por testes fenotípicos quanto moleculares, mais com um efeito de evolução gênica, caracterização genética, diversidade e identificações, os moleculares são mais abrangentes. Pois existe uma técnica de tipagem, que conseguem caracterizar e tipificar as bactérias.

A tipagem bacteriana pode ser realizada pelas técnicas de RFLP-PCR onde polimorfismo de fragmentos de restrição são detectados no DNA complementar, polimorfismo em 4 a 6 pares de bases (pb), RAPD-PCR que amplifica randomicamente o polimorfismo do DNA em mais de 50 fragmentos com amplificantes imperfeitos; Ribotipagem usada para avaliar a

evoluções gênicas, usando uma amplificação do DNA, e após hibridizá-las com sonda RNA ribossomal (rRNA). Eletroforese em campo pulsado (PGFE), que amplifica uma sequência pesada de DNA, cerca de 40 kb, que pode se locomover no gel de agarose, desde que o campo eletromagnético ocorra em diferentes direções para percorrer o gel de agarose, e por último a Eletroforese em Multibancos de Enzimas (MEEL), que analisa variabilidade alélica de um gene para produzir de uma enzima.

Com o advento das ciências ômicas, a metagenômica pode ser um aliado forte na determinação epidemiológica de bactérias patogênicas, tendo em vista que a metagenômica tende a caracterizar diferentes materiais genéticos em uma amostra, onde esse material genético é originário de diferentes microrganismos.

A possibilidade de usar a amostra clínica para uma direta identificação e avaliação, poupa tempo por não se fazer necessário o crescimento bacteriano em um cultivo primário. Isso já agiliza bastante. Além também de se permitir avaliar diferentes bactérias causando um mesmo quadro, permitindo a realização de medidas de controle, tratamentos e rápidos diagnósticos.

Atualmente alguns laboratórios estão usando a metodologia de espectrometria de massa (MALD-TOP), que não é caracterizada nem como método fenotípico e nem como método molecular. MALD-TOP tem como princípio a ionização de partículas, que sofre vaporização e passa pelos detectores a uma determinada velocidade, a medida que são registradas pelo detector, este forma um pico (espectro) que é analisado nas bases de dados.

do software e este gera uma identificação. Essa metodologia é rápida e de baixo custo. Viabilizando uma resposta eficiente e eficaz para os clínicos. Assim eles conseguem avaliar e tratar o paciente com agilidade.

2- Bactérias Gram-negativas de importância médica: características fenotípicas e molecular, patogênicas e controle.

Dentro das bactérias Gram negativas de importância médica, temos uma variedade de gêneros, causando diferentes tipos de infecções humanas ou até mesmo em animais.

A Ordem Enterobacterales é a de grande causa de infecções distintas, onde se destaca a Escherichia coli que cause infecções do trato urinário (ITU), infecções gastrointestinais, sepsis, meningite entre outras, assim como a Klebsiella pneumoniae, Enterobacter spp, Salmonella spp e Shigella spp (patógenos importantes em infecções intestinais).

Estas bactérias fazem parte da família Enterobacteriaceae que tem as características de serem além de bacilos Gram negativos, serem anaeróbios facultativos, oxidase negativa (com exceção de Plesiomonas e Aeromonas), fermentadores e por crescerem em diferentes partes do corpo, podendo causar diferentes infecções.

Podemos usar para identificar esta família, provas bioquímicas como fermentação de carboidratos, fonte de carbono como nutriente (litmolo); redução de nitrato a nitrato (exceção: Serratia e Yersinia), produção de indol; produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S); hidrólise de ureia, descarboxilação da lisina, arginina e ornitina; motili-

dade: hidrólise da esculina entre outras.

A família Vibrionaceae tem importância médica devido ao Vibrio cholera sorotipo O1, que foi o responsável pela morte de muitas pessoas em epidemia na África. Essa bactéria é halofílica (afinidade por sal), produz uma potente toxina que é capaz de desidratar o indivíduo em questão de horas. Importante agente das Doenças Transmitidas por Água e Alimentos (DTAs). A identificação é feita por crescimento em meios específicos TCBS (Tiosulfato Citrato Bile Sacarose), fermenta sacarose e usa o citrato como fonte de carbono, são oxidase positivos e na coloração de gram se apresentam como bacilos curvos.

A família Pseudomonadaceae são Gram negativos não fermentadores de importância nosocomial principalmente em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), unidade de queimados. Se destacando Complexo Acinetobacter baumannii, Complexo Burkholderia cepacia e Stenotrophomonas maltophilia. As Pseudomonas aeruginosa são importantes também nos casos de fibrose cística, pois estão causando infecções nesses pacientes a nível pulmonar. São características dessa família: serem bacilos (exceto Acinetobacter são cocobacilos); oxidase positivos ou frequentemente positivos, utilização dos carbonatos por via fermentativa; resistência intrínseca a alguns antimicrobianos; alguns gêneros dessa família pode produzir pigmentos.

Quando falamos de cocos Gram negativos, ganha destaque que as: Neisseria meningitidis (causadora da meningite) e Neisseria gonorrhoeae (causadora da gonorréia). N. meningitidis é de fácil transmissão respiratória, os infectados são isolados para seguir com o tratamento. A gonorréia é classificada como uma Infecção Sexualmente

Transmissível (IST). Ambas são de fácil identificação e diferenciação. Para de oxidase positiva, são capnófilas (precisam de um pouco de gás carbônico para crescer, cerca de 2 a 5% de CO_2); crescem em meios específicos para elas como o Thayer Martin, GC-Leet, Martin-Lewis e agar conda. Sormente a Neisseria meningitidis cresce em agar sangue, mas as duas crescem em agar chocolate; a N. meningitidis fermenta glicose e maltose no meio agar triptose citrato (CTA), a N. gonorrhoeae fermenta somente a glicose em CTA. Ambas são oxidase positiva.

A nível de infecção de trato respiratório se destaca a Neisseria catarrhalis coco Gram negativo, oxidase positiva, cresce bem em agar chocolate e conda, não fermenta glicose em meio CTA, mas fermenta maltose em meio CTA.

Outro gênero importante é Bordetella pertussis causadora da coqueluche, também conhecida como tosse cumprida, afeta o trato respiratório, com febre, sibilo, falta de apetite e cansaço. É caracterizada como cocobacilo, cresce em agar conda, produz urease.

Também responsável por causar meningite em crianças temos o Haemophilus influenzae, e por causar cancro mole (IST) Haemophilus ducreyi. A presença de uma leve hemólise no meio de agar sangue é característica do H. ducreyi, pois o H. influenzae não faz hemólise. Podemos realizar a prova do satelitismo (crescimento H. influenzae próximo do crescimento de Staphylococcus aureus etc hemolítico) em placa de agar sangue. A diferenciação dessas duas espécies se dá pela utilização ou não de fatores X (hemina) e V (NAD) para o crescimento. O H. influenzae cresce na presença dos fatores X e V, o H. ducreyi cresce apenas na presença do fator X.

Quando falamos de caracterizações moleculares, para estas bactérias que foram abordadas nas folhas anteriores, podemos utilizar de forma segura a reação em cadeia de polimerase (PCR), atualmente temos o GeneXpert que é um equipamento que realiza a identificação de bactérias por amplificações. O resultado é preciso e rápido. A liberação do resultado ocorre em pelo menos 2 horas. Neste equipamento pode ser usado a colônia bacteriana já crescida ou a amostra clínica diretamente, em ambos os casos o material é amplificado ^(DNA) e identificado.

É de suma importância para a saúde pública medidas de controle e contêngos para alguns agravos.

Medidas como uso racional de antimicrobianos para não gerar bactérias multirresistentes, tratamentos de água e esgoto hospitalares e comunitários, campanhas de vacinação para os agravos que possuem vacinas. Orientações da população para os cuidados com a saúde se faz necessário.

3- Mecanismos genéticos de evolução de patógenos bacterianos

As bactérias são constituintes de material genético DNA cromossômico, que contém informações importantes para a sua sobrevivência.

Devido ao seu tamanho celular, o material genético (cromossomo), fica delimitado a uma região do citoplasma, todo contido e dobrado. Isso faz com que o DNA não seja tão fácil assim. Por isso, em algumas ocasiões pode haver captura de um fragmento de DNA e ele pode ser inserido ou deletado. Se essa informação for de caráter que favoreça a adaptação da célula bacteriana no ambiente que ela se encontra, esse

é mantida, caso não mantenha a célula adaptada no ambiente que ela se encontra, esta é deletada.

A recombinação gênica pode ocorrer para evoluções da espécie bacteriana, assim como as mutações.

Termos como recombinação gênica a transformação, que é a capacidade da bactéria de transferir para o seu interior DNA (material genético) disperso no meio líquido por outra bactéria; conjugação que é a passagem de plasmídeos (pequenos fragmentos de DNA linear ou circular que se replica de forma autônoma, sem precisar de duplicação do DNA cromossomal) de uma bactéria doadora para uma bactéria receptora, através de um filus ou fímbria F (estrutura proteica oca, que se adere a superfície bacteriana, por onde o plasmídeo é transferido) e o processo de transdução, onde um vírus conhecido como bacteriófago ou fago, injeta seu material genético dentro da célula bacteriana.

As mutações são modificações gênicas em sequências de bases nitrogenadas que podem a ou favorecer a bactéria. As mutações podem ser adquiridas em contato com o ambiente ou induzidas (aparece na presença do agente indutor).

Há também a possibilidade de elementos de transposição "saltarem" para uma sequência do DNA cromossomal se inserindo a ele ou deletando um pedaço para se inserirem. (o pedaço deletado seria a do DNA cromossomal).

Todos esses eventos fazem com que a bactéria, adquira novas informações ao longo do tempo.

Alguns autores acreditam que as bactérias atuais possuem informações de bactérias que habitam o ambiente ao milhões de anos atrás. E exatamente

essas informações junto com a evolução foi passado de geração em geração, permitindo que hoje encontramos bactérias vivendo em diferentes temperaturas das mais baixas as mais elevadas, a resistência aos antimicrobianos crescendo a cada dia pelo processo de seleção natural bacteriana ao uso indiscriminado e descontrolado de antimicrobianos, a crescente presença de fatores de virulência em diferentes tipos bacterianos ou até mesmo dentro do mesmo tipo bacteriano, mas de gêneros diferentes (exemplo: Klebsiella pneumoniae produtora de cápsula = virulente; e as que não produzem cápsula = avirulentas); síntese de enzimas tanto para a nutrição bacteriana, quanto para ação em antimicrobianos, fazendo com que sua atividade bactericida ou bacteriostática seja inibida; alterações estrutural para se manter adaptada a uma nova realidade. Todas essas são artificações para se manterem viáveis. A cada geração uma nova aquisição.

Por isso a preocupação das chamadas "superbactérias", essas bactérias possuem informações adicionais que as fizeram se manterem viáveis e resistentes ao ambiente.

Recentemente vimos essa evolução com o COVID-19, e foi levado em consideração, onde o agente era vírus. Vírus que podem em alguns casos também inserir seu material genético em bactérias. Como temos bactérias produtoras de toxinas após contato com um bacteriófago específico (Corynebacterium diphtheriae), há cepas avirulentas sem produzir toxinas e cepas virulentas com produção de toxina diftérica.

Toda cautela deve ser tomada para evitarmos essas projeções fatais da humanidade frente a infecções bacterianas.

Rastrear de forma correta os agentes bacterianos, identificar, usar medicações específicas e que

combate de forma eficaz se faz necessário nos serviços de saúde.

A limitação de internações, o tratamento correto e direcionado deve ser respeitado, para podermos minimizar ou retardar esse evolução bacteriana que no presente momento aumenta a cada dia, e que já se tornou um risco à saúde pública.