



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.

P R O V A E S C R I T A

CANDIDATO: 559481

11-

MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES APLICADOS À IDENTIFICAÇÃO, DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA DE BACTÉRIAS PATOGENICAS

A unidade taxonômica básica para identificação de bactérias é a espécie. O manual de sistemática de Bergey orienta que a integração de métodos clássicos e moleculares seja utilizada para esta finalidade. Outras subcategorias de identificação podem ocasionalmente serem adotadas, com base em características bioquímicas (biotipo), sorológicas/antigênicas (serotipo) e patogênicas (patotipo).

O diagnóstico correto de infecções causadas por bactérias patogênicas é fundamental para: i) identificar corretamente o agente e implementar a terapia adequada; determinar o prognóstico, a depender da biologia do patógeno identificado; realizar triagem e detectar portadores assintomáticos; contribuir com dados epidemiológicos, promovendo adoção de medidas de prevenção e controle.

Os métodos fenotípicos de identificação levam em consideração as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas dos microrganismos. A cultura permanece sendo padrão ouro para muitos grupos, e apresenta a vantagem de fornecer isolados para uma melhor caracterização bioquímica e testagem para sensibilidade aos antimicrobianos; disponibilizar material com alta pureza e concentração para análises genéticas; disponibilizar isolados que podem ser depositados em coleções biológicas, que futuramente poderão ser utilizados para diversos //

fins. Além disso, seu custo ainda é reduzido quando comparada a outras metodologias. Entretanto, esta técnica pode apresentar sensibilidade reduzida e nem sempre pode ser realizada, visto que algumas bactérias são fastidiosas (Ex: Leptospira spp., Bordetella spp.) e outras não crescem em meio axênico (Ex: Treponema pallidum e Mycobacterium leprae).

Os testes bioquímicos visam identificar características exclusivas de determinados grupos, visto que diferentes bactérias produzem enzimas distintas, utilizam diferentes rotas metabólicas e apresentam variados perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos. Atualmente, sistemas automatizados estão disponíveis, o que fornece maior rapidez e facilidade no processo de identificação. Um exemplo é o sistema VITEK, composto por um suporte sólido com substratos/reagentes conhecidos, que posteriormente é inserido em um aparelho para leitura e interpretação.

Testes imunológicos, baseados na detecção de antígenos e anticorpos também são úteis no diagnóstico. O teste de aglutinação em látex pode fornecer informações rápidas, como por exemplo determinar os grupos antigênicos (Lancefield) dos cocos beta-hemolíticos. Testes que utilizam suporte sólido, como ELISA, Imunofluorescência direta e indireta e testes rápidos imunocromatográficos também podem ser aplicados. É preciso conhecer a biologia do agente para determinar o melhor momento de coleta e interpretar corretamente os resultados dos testes, uma vez que a sensibilidade e especificidade podem ser limitadas.

Exames diretos a partir de amostras biológicas podem ser úteis em alguns casos. O material deve ser devidamente corado (Gram, Ziehl-Neelsen, prata...) e observado no microscópio. Este método é limitado pois a morfologia bacteriana é pouco informativa e torna-se difícil diferenciar patógenos de colonizadores. Pode ser útil por exemplo em caso de gonorréia em homens, onde o encontro de diplococos Gram negativos na secreção uretral pode ser sugestiva de infecção.

Os métodos moleculares revolucionaram a identificação diagnóstica e estudo das bactérias. A técnica de MALDI-TOF (Ionização/dissociação a laser assistida por matriz) trouxe contribuições significativas para microbiologia. A técnica se baseia no perfil de íons de biomoléculas do isolado, fornecendo em pouco tempo o espectro de massa do microrganismo, que é então comparado com um banco via software (Ex: Biotyper (Bruker), que fornece a identificação da bactéria.

Testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos, como a PCR e LAMP, hoje são amplamente utilizadas e seu custo vem se tornando acessível. Variações da PCR, como PCR multiplex e PCR em tempo real (qPCR) também são empregadas. O marcador genético universalmente aceito para identificação bacteriana é o 16S rRNA, mas apesar de sua importância histórica, apresenta resolução taxonômica baixa, e regiões mais variáveis do genoma vem sendo encorajadas para uso como marcador genético.

O sistema CRISPR-Cas que revolucionou a biologia, foi primeiramente aplicado para estudos de edição gênica, mas variantes da técnica já foram

M.

4

559481

desenvolvidos para fins diagnósticos, o chamado CRISPR-Dx. Neste caso, o sistema é programado para reconhecer sequências específicas do patógeno.

As condições utilizadas são isotérmicas e o processo pouco oneroso, sendo promissor para fins diagnósticos, como demonstrado por Ojann e colaboradores (2023).

Para fins epidemiológicos, além da definição da espécie, é importante tipificar a bactéria. Para isso, métodos mais refinados são necessários para distinguir cepas dentro de uma mesma espécie. Neste contexto, ferramentas genéticas são fundamentais, e se dividem em três grupos principais: i) técnicas baseadas em hibridização; ii) técnicas baseadas em perfis de bandas eletroforéticas e iii) técnicas baseadas em sequenciamento.

A hibridização se tornou obsoleta para muitos grupos, mas ainda é muito utilizada para *M. tuberculosis*.

Se baseia no uso de sondas p/ detecção e determinação do número de cópias de ~~sequências~~ inserções sequenciais (IS6110).

Técnicas baseadas em perfis de bandas incluem a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), ainda muito utilizada no sistema de vigilância alimentar PulseNet. Variações da PCR, como PCR-RFLP, AP-PCR e RSS-PCR também fornecem perfis de bandas que servem como "fingerprint", sendo útil no rastreamento de surtos. A técnica de VNTR / MLVA também ^{serviu no} perfil de bandas.

Técnicas baseadas em sequenciamento têm divididas revolucionaram os estudos epidemiológicos. O método de Sanger foi pioneiro e ainda é utilizado até hoje. Seu custo é mais acessível, mas permite sequenciar

até no máximo 1000bp, sendo útil para análise de SLST (single locus sequencing type), baseado em marca-
dos genéticos informativos. É uma análise útil para
laboratórios com poucos recursos e para casos onde
o isolado não é disponível.

Análises de multi locus (MLST) são amplamente
utilizadas para fins epidemiológicos e esquemas
e bancos estão disponíveis para uma grande diversi-
dade de bactérias. Se baseia no sequenciamento de cerca
de sete genes de manutenção, seguido por definição de
sequências-tipo (STs) que podem se agrupar
em complexos clonais (CCs) trazendo inferências
epidemiológicas importantes. Esquemas baseados em
"core genoma" também já existem (cgMLST), com
maior potencial discriminatório.

Análises baseadas em genoma completo (WGS) ala-
ncaram após a introdução do sequenciamento de
nova geração (NGS). O WGS revolucionou a identificação
de espécies, fornecendo não só uma tipificação precisa,
mas também a identificação de fatores de virulência
e resistência, contribuindo também para estudos epide-
miológicos. Entretanto, seu custo ainda é oneroso para a
realidade Brasileira.

Por fim, é importante ressaltar o papel da bioinfor-
mática nas análises epidemiológicas baseadas em
NGS. É importante softwares e profissionais capacitados
para lidar com a densidade e complexidade dos
dados gerados.

559431

[illegible]

BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

As bactérias Gram-negativas são um grupo diverso, que inclui espécies de importância em saúde pública, com destaque para as enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNE), Neisseria spp., Bordetella spp. e Vibrio spp. De forma relevante, cinco dos sete patógenos do grupo ESKAPEE são gram-negativos: Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli e Enterobacter. Portanto, são foco de pesquisas e políticas por seu potencial de múltipla resistência.

Com relação às características fenotípicas, as bactérias Gram-negativas apresentam em comum o componente LPS (LOS em Neisseria). Com relação à morfologia, enterobactérias e BGNNEs são bastonetes, Neisseria e Bordetella são cocos e Vibrio são bacilos curvos em forma de vírgula. A macromorfologia das colônias pode ser presuntiva em alguns casos. Por exemplo, em meio ágar MacConkey, enterobactérias fermentadoras de lactose ficam rosas (ex: E. coli, Klebsiella, Enterobacter), enquanto não fermentadoras permanecem sem cor (ex: Salmonella, Shigella). O meio XLD revela a produção de gás sulfídrico e diferencia Salmonella (positiva) de Shigella (negativa). Colônias de P. aeruginosa são verde/azuladas por conta da produção de pirardina e pircianina, o que somado ao odor de "cheiro de urina" característico, auxiliam na identificação da espécie. B. pertussis em ágar Regon-Love forma colônias típicas prateadas que lembram mercúrio. N. meningitidis produz colônias mucoides em ágar Thayer-Martin e se diferencia de N. gonorrhoeae, que, por não possuir cápsula, apresenta

7

559481

colônias lisas. Métodos fenotípicos baseados em ensaios bioquímicos podem confirmar esses achados morfológicos. O sistema VITEK possibilita essa rápida identificação de características bioquímicas.

É muito importante, ainda, identificar a presença do fenótipo de resistência. O teste de difusão dupla avalia a presença de beta-lactamases e o teste tESBL permite quantificar o nível de resistência a partir da análise de difusão em tira. Ambos se baseiam em observar o crescimento das cepas na presença de ácido clavulânico.

Testes fenotípicos são também necessários para avaliar a capacidade de produção de biofilme ("slime") em *P. aeruginosa* e para detectar cepas produtoras de toxinas em *Bordetella* e *Vibrio cholerae*.

De forma importante, existem meios cromogênicos disponíveis comercialmente, que possibilitam não apenas identificar a bactéria, mas também seu fenótipo de resistência. Exemplos são os meios CHROMagar™ ESBL e CHROMagar™ SuperCarba, capazes de identificar bactérias (resistentes) produtoras de betalactamases e produtores de carbapenemases, respectivamente.

A caracterização molecular dessas bactérias envolve os métodos previamente apresentados no tópico anterior. Além da correta identificação da espécie, é importante realizar o rastreamento de genes de resistência, como bla-KPC, bla-CTM, bla-OXA, tetA, tetB. Isso pode ser feito através de PCR direcionada (um alvo), PCR multiplex (vários alvos), PCR em tempo real (rapidez e quantificação) ou, ainda qPCR de alta resolução, que permite a análise

de diversos genes de forma rápida e eficiente, sendo uma ferramenta útil para caracterização de bactérias Gram negativas em ambientes clínicos hospitalares e ambientais. Ainda neste contexto de multirresistência, principalmente de enterobactérias e BGNFs, ferramentas como WGS e metagenômica são fundamentais para o rastreamento e monitoramento de genes de resistência.

Bactérias Gram negativas estão associadas a uma ampla variedade de infecções em humanos, incluindo infecções intestinais (Salmonella, Shigella, E. coli enteropatógena - EPEC, enteroinvasiva - EIEC, enterotoxigênica ETEC e enteroagregativa - EAEC), urinárias (E. coli uropatógena - UPEC), associadas à feridas, cateteres, superfícies, nebulizadores, aparelhos ventilatórios (A. baumannii, P. aeruginosa, K. pneumoniae, Enterobacter spp.), sexual (N. gonorrhoeae); trato respiratório (K. pneumoniae, B. pertussis) e sistema nervoso central (E. coli associada a meningite neonatal - NMEC e N. meningitidis).

Os mecanismos de patogenicidade são diversos e incluem elevada capacidade de adesão, como fímbrias do tipo IV em Neisseria e pertactina em B. pertussis. ~~E. coli~~ UPEC tem a capacidade de se aderir firmemente no sistema urinário, resistindo à passagem da urina.

O LPS/LOS das bactérias atua como endotoxina, podendo levar a distúrbios cardiovasculares importantes, ou mesmo choque. Muitas bactérias gram negativas produzem toxinas, com destaque para toxina shiga produzida por E. coli enterohemorrágica / EHEC.

Shigella dysenteriae e Enterobacter spp. Essa toxina inibe a síntese de proteínas, causando morte celular. Sua ação nas células endoteliais, renais e plasmáticas.

Outros componentes de patogenicidade/virulência incluem sideróforos (ex: aerobactina de *A. baumannii*), enzimas hidrolíticas e sistemas secretórios (ex: TSST 3 de EPEC, responsável pelo evento "pedestal" no intestino).

Quatro mecanismos de escape incluem a: variação de fase antigênica, presença de IgA proteases e modulação da produção de citocinas.

O controle das infecções por essas bactérias inclui o diagnóstico precoce e correto, o tratamento adequado, a adoção de medidas de prevenção, vigilância e monitoramento, educação em saúde e conscientização da população.

O diagnóstico deve ser realizado a partir de amostra biológica representativa do processo infeccioso (fezes, urina, aspirado traqueal, sangue, líquor, catarro) e submetido a métodos fenotípicos e genotípicos de identificação.

O tratamento deve ser iniciado, de preferência, após realização do antibiograma, visto a alta incidência de cepas multirresistentes.

A prevenção envolve medidas para minimizar/evitar a transmissão:

- a) Transmissão fecal-oral: cuidados de higiene, saneamento básico, maior atenção para manipulação de alimentos
- b) Transmissão alimentar (para zoonoses como salmonelose não tifoide e EHEC): lavar bem os alimentos, manter refrigeração adequada, cozinhar bem os alimentos
- c) Transmissão no ambiente de saúde: uso de EPIs, culturas de vigilância ativa, desinfecção de equipamentos e superfícies
- d) Transmissão respiratória: isolamento paciente, uso de máscaras N95, higiene respiratória
- e) Transmissão sexual: testagem dos parceiros, sexo seguro, campanhas educativas, redução do estigma

Existe vacinação disponível para coqueluche, meningite e cólera

É muito importante fazer o uso judicioso de antibióticos, evitando seu uso indiscriminado em animais, pessoas e ambiente, no intuito de mitigar o impacto negativo da evidente multirresistência em bactérias Gram-negativas.

pl

12

559480

1. Einleitung
 2. Grundlagen
 3. Methoden
 4. Ergebnisse
 5. Diskussion
 6. Fazit
 7. Literaturverzeichnis
 8. Anhang
 9. Index
 10. Abbildung
 11. Tabelle
 12. Formel
 13. Diagramm
 14. Skizze
 15. Zeichnung
 16. Photographie
 17. Video
 18. Audio
 19. Software
 20. Hardware
 21. Netzwerk
 22. System
 23. Umfeld
 24. Umwelt
 25. Ökologie
 26. Ökonomie
 27. Ökonomie
 28. Ökonomie
 29. Ökonomie
 30. Ökonomie
 31. Ökonomie
 32. Ökonomie
 33. Ökonomie
 34. Ökonomie
 35. Ökonomie
 36. Ökonomie
 37. Ökonomie
 38. Ökonomie
 39. Ökonomie
 40. Ökonomie
 41. Ökonomie
 42. Ökonomie
 43. Ökonomie
 44. Ökonomie
 45. Ökonomie
 46. Ökonomie
 47. Ökonomie
 48. Ökonomie
 49. Ökonomie
 50. Ökonomie
 51. Ökonomie
 52. Ökonomie
 53. Ökonomie
 54. Ökonomie
 55. Ökonomie
 56. Ökonomie
 57. Ökonomie
 58. Ökonomie
 59. Ökonomie
 60. Ökonomie
 61. Ökonomie
 62. Ökonomie
 63. Ökonomie
 64. Ökonomie
 65. Ökonomie
 66. Ökonomie
 67. Ökonomie
 68. Ökonomie
 69. Ökonomie
 70. Ökonomie
 71. Ökonomie
 72. Ökonomie
 73. Ökonomie
 74. Ökonomie
 75. Ökonomie
 76. Ökonomie
 77. Ökonomie
 78. Ökonomie
 79. Ökonomie
 80. Ökonomie
 81. Ökonomie
 82. Ökonomie
 83. Ökonomie
 84. Ökonomie
 85. Ökonomie
 86. Ökonomie
 87. Ökonomie
 88. Ökonomie
 89. Ökonomie
 90. Ökonomie
 91. Ökonomie
 92. Ökonomie
 93. Ökonomie
 94. Ökonomie
 95. Ökonomie
 96. Ökonomie
 97. Ökonomie
 98. Ökonomie
 99. Ökonomie
 100. Ökonomie

MECANISMOS GENÉTICOS DE EVOLUÇÃO DE PATÓGENOS BACTERIANOS

Na fábula "Alice no país das Maravilhas" escutamos a frase "Alice, você deve correr para ficar no mesmo lugar". Em 1923, Van Lwen trouxe a hipótese da "Rainha vermelha / rainha de copas" para elucidar a relação parasito-hospedeiro: microorganismos devem estar em constante evolução para sobreviver às pressões que são impostas tanto no ambiente como por seus hospedeiros. Os mecanismos genéticos de evolução são processos que permitem as bactérias adquirirem, modificarem ou transferir material genético, conferindo-lhes uma vantagem adaptativa frente às pressões do meio. Como consequência, as bactérias expressam fatores de virulência e de resistência, além de traçarem estratégias para sobreviver em condições adversas e escapar das defesas do hospedeiro. Para tanto, apresentam uma característica importante: plasticidade genômica, o que lhes permite doar e receber material genético para se adaptar a determinadas situações.

As mutações são processos que podem influenciar na evolução. Mutações pontuais, onde apenas uma base é modificada, podem alterar a conformação das proteínas, gerando, por exemplo, dificuldade de ligação a antibióticos. Já inserções/deleções modificam grandes fragmentos, podendo levar ao surgimento de novas funções.

A transferência horizontal de genes talvez seja o mecanismo mais importante para evolução de patógenos. Três mecanismos são reconhecidos: transformação (captação de DNA exógeno), Conjugação (transferência de

11.

genus carregados por elementos genéticos móveis e mediado por pili sexual), Transdução (mediada por bacteriófagos). Elementos genéticos móveis incluem plasmídeos, transposons e integrons e ilhotas de patogenicidade, sendo componentes chave para virulência, resistência e evasão. Plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos de replicação independente. Transposons são também conhecidos como "genes saltadores" e transportam fragmentos de DNA. As ilhotas de patogenicidade são grandes regiões do material genético que contêm genes de virulência e resistência e podem ser transferidos de uma célula a outra. De forma importante, essa transferência horizontal pode ocorrer tanto de forma intraespecífica como interespecífica.

Um outro mecanismo genético de evolução é a recombinação genética, que pode ser homóloga (troca entre regiões similares) ou heteróloga (troca entre regiões muito diferentes). O primeiro caso leva à alterações sutis, como redução da permeabilidade à um antibiótico. Já no segundo caso, as alterações são mais drásticas, podendo levar a perda total da função.

É importante ressaltar que as bactérias apresentam um avançado mecanismo de controle de expressão gênica. Ou seja, a depender das condições, determinados genes ou conjuntos de genes podem ser ativados ou desligados. Dois exemplos clássicos são os mecanismos de variação de fase antigênica, mimetismo molecular e controle populacional e de funções coletivas via quorum

sensing. Outro exemplo é a variação de fase observada em Mycobacterium ~~abscessus~~ ^{abscessus}: durante sua morfologia lisa, a bactéria permanece contida no granuloma; já quando muda para rugosa, consegue escapar dos macrófagos e se disseminar para outros sítios. De forma semelhante, através de mecanismos genéticos bem estabelecidos, fruto de um longo processo de co-evolução, M. tuberculosis consegue subverter a fagocitose por macrófagos e sobreviver intracelularmente por longos períodos, às vezes durante a vida inteira do hospedeiro humano. Alguns bacilos Gram positivos, como Bacillus e Clostridium, evoluíram de forma a sobreviver por longos períodos no ambiente, ~~ao~~ mesmo sob condições adversas, ao ativar genes que modificam sua morfologia para esporos resistentes.

O exemplo mais claro e preocupante de sucesso evolutivo bacteriano é o atual cenário de multirresistência. Menos de 100 anos depois da descoberta da penicilina, seguido por diversas outras drogas, observamos uma evolução rápida e assustadora da resistência em diversos grupos de bactérias. Sem dúvida isso é agravado e acelerado por ações antrópicas, principalmente o uso inadequado e indiscriminado de antibióticos. Mas é verdade também que as bactérias têm a brilhante capacidade de prontamente se adaptar e responder aos estímulos externos, fruto de mecanismos genéticos complexos que se desenvolvem e evoluem há milhões de anos, muito antes do Homo sapiens. Nesse equilíbrio dinâmico representado pela rainha de copas, não estamos conseguindo acompanhar o assustador processo de multirresistência.

a descoberta de novos antimicrobianos não é proporcional às cepas cada vez mais resistentes. Entender os mecanismos genéticos envolvidos não só com a resistência, mas também com a virulência de patógenos bacterianos é peça fundamental para a mitigação dos impactos negativos que esses fantásticos organismos microscópicos podem causar.