



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: 718661



16-1

9) mecanismos genéticos de evolução de patógenos bacterianos

Os procaríotes foram os primeiros organismos a povoarem a Terra, os fósseis mais antigos encontrados datam de 3,5 bilhões de anos e são compostos de células procarióticas e rochas. Ao longo de todos esses anos, esses organismos se adaptaram a diversas condições ambientais e foram capazes de evoluir até os dias atuais.

Por muito tempo acreditava-se que os processos evolutivos eram muito lentos, mas processos como transferência horizontal de genes pode ocorrer de forma muito rápida, em horas. E porque os microrganismos evoluem? A principal resposta é para sobreviver. Os organismos tentam a todo custo se adaptar para resistir aos desafios ambientais, porém nem sempre os mecanismos de evolução fazem benefícios as células.

A recombinação gênica é um importante mecanismo de evolução, visto que para se reproduzir as células precisam replicar seu DNA e erros podem acontecer. A DNA polimerase, enzima responsável pela replicação do DNA é bastante fiel, e raramente comete erros, porém esses erros na duplicação dos nucleotídeos podem ocorrer e causar mutações pontuais que podem silenciar ou ainda aumentar a expressão de determinados genes. Esse processo é de transferência vertical, onde as filiações celulares vão herdando diferentes modificações.

De forma mais rápida, as bactérias podem ainda fazer a transferência horizontal de genes, seja por transformação, conjugação ou transdução. Esse mecanismo é muitas vezes regulado pelos estímulos do ambiente, facilitado por exemplo pela formação de biofilmes que permite o quorum sensing. A transformação é um mecanismo pelo qual uma bactéria libera no meio extracelular uma parte do seu material genético, que somente será recebido por uma célula competente. Competência é a habilidade da célula

de receber o DNA exógeno, e incorporar no seu próprio. No ambiente do biofilme, a matriz extracelular facilita esse contato entre as bactérias, e há maior taxa de transformação.

Na conjugação a transferência de genes é feita por contato célula-célula, através do pili-sexual, um apêndice da membrana celular de algumas bactérias que permite fazer um canal de ligação entre os citoplasmas, inserindo o material genético na célula receptora. E por fim, a transdução é a transferência de genes mediada por bacteriófagos, vírus que infectam bactérias e durante a replicação viral carregam genes bacterianos que podem ser passados adiante.

Outros mecanismos genéticos que podem participar da evolução dos patógenos são os Elementos geneticamente móveis, como transposons, integrons e ilhas de patogenicidade. Os transposons já foram chamados de "jumping genes", por sua habilidade de "pular" de um local a outro do genoma bacteriano, regulando a expressão de genes. As ilhas de patogenicidade, como o nome já diz, estão associadas aos mecanismos de patogenicidade das bactérias. São regiões grandes dentro do DNA bacteriano que conferem fatores de virulência importantes. Por exemplo, a Salmonella enterica possui ilhas de patogenicidade (SPI, II e III) que conferem a habilidade de invadir as células do epitélio intestinal e causar a enterocolite.

Muito desse conhecimento advém do pangenoma, uma técnica desenvolvida com o surgimento da genômica que é capaz de identificar todos os genes de um organismo. Por meio de comparações, essa técnica permite diferenciar cepas e fazer rotas filogenéticas. O sequenciamento do genoma completo atualmente é uma técnica mais acessível, porém necessita de profissionais capacitados para análises de bioinformática e interpretação adequada dos resultados. Neste contexto, a técnica MLST auxilia muito na avaliação filogenética, permitindo a identificação de múltiplos

locus no DNA bacteriano. Apesar dessas novas técnicas, o padrão ~~utilizado~~ ouro para estudos desse tipo é a técnica PFGE, que avalia o perfil de diferentes amostras e permite identificar surtos infecciosos e separar as cepas pelo seu perfil de bandas no gel.

Todos esses mecanismos genéticos para a evolução de bactérias podem trazer benefícios adaptativos, como por exemplo a resistência a antimicrobianos. Em uma situação de pressão seletiva, como o ambiente hospitalar, os patógenos mais resistentes vão sobreviver e continuar se replicando para se disseminar. Isso faz bastante preocupação clínica quando pensamos em patógenos multifixantes, como as superbactérias carreadoras de KPC. Essas transferências de genes podem ainda carrear novos fatores de virulência, como por exemplo um bacteriófago que carrega um gene para codificar uma toxina e faz maior patogenicidade ao patógeno.

Não podemos parar esses mecanismos evolutivos, pois são estratégias naturais de sobrevivência. Porém podemos diminuir a disseminação de patógenos e a pressão seletiva exercida, por exemplo, pelo uso indiscriminado de antimicrobianos.

Código: 748661

7 - Bactérias gram-negativas de importância médica: caracterização, fenotípica e molecular, patogenicidade e controle.

As bactérias Gram-negativas são um grupo bastante diverso, que compreende muitos patógenos de importância médica, com muitas espécies relacionadas a IRAS (infecções relacionadas a assistência em saúde). São classificadas dentro deste grupo de acordo com sua parede celular, que difere das gram-positivas por ter uma fina camada peptidoglicânica entre a membrana plasmática e a membrana externa, composta do lipopolissacarídeo (LPS). Essa característica permite que durante a coloração de gram o corante primário seja removido com o decolorante, e a bactéria seja corada em rosa, com o corante secundário. O LPS é um importante fator de virulência, pois atua como uma endotoxina quando a membrana é lisada, e estimula um processo inflamatório com liberação de citocinas que elevam a temperatura corporal. Logo, infecções por bactérias gram-negativas frequentemente apresentam febre e mal-estar.

São bactérias com importante arsenal de virulência e mecanismos de resistência aos antimicrobianos, estando entre as bactérias mais preocupantes em IRAS nos últimos anos, ~~as~~ as bactérias denominadas ESKAPE = Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterococcus faecium e faecalis.

Didaticamente, dividiremos esse grupo bacteriano de acordo com suas características bioquímicas, para facilitar principalmente as chaves de identificação em laboratórios de diagnóstico.



11

→ Fermentadores de glicose:

- Escherichia coli: bacilo gram - que habita o intestino de humanos e animais. De forma geral, fazem parte da microbiota e participam dos processos de homeostase, porém algumas cepas são patogênicas.

- Enteropatogênica (EPEC): ao ~~se~~ colonizar a mucosa intestinal, essa cepa de E. coli altera a conformação das microvilosidades, conferindo uma diarreia não absorvível, principalmente em crianças.

- Enteroinvaziva (EIEC): causa uma disenteria semelhante a Shigella, com diarreia sanguinolenta e muco, devido ao processo inflamatório causado pela invasão celular.

- Enterotoxigênica (ETEC): causa a chamada diarreia do viajante, muitas vezes associada ao consumo de alimentos e água contaminados durante viagens. Possui uma toxina shiga-like, que leva a morte dos ~~de~~ enterócitos.

- Enteroadesegativa (EAEC): essa cepa de E. coli é capaz de formar uma biopelícula na mucosa intestinal, persistindo por um longo período. Normalmente causa diarreia persistente em idosos e indivíduos imunocomprometidos.

- Enterohemorrágica (EHEC): além na infecção intestinal, é capaz de se disseminar para outros órgãos causando hemorragia.

- Uropatogênica (UPEC): causa infecções urinária e renal, devido a sua capacidade de translocar de sítio devido ao movimento flagelar.

- Klebsiella pneumoniae: bactéria capsulada considerada atualmente uma das mais importantes patógenos associados a IRAS. No ambiente hospitalar usualmente causa infecções respiratórias e do trato urinário. É uma bactéria com diversos fatores de virulência e atualmente contém diversas cepas resistentes a β -lactâmicos e carbapenêmicos, as cepas chamadas de KPC ou superbactérias.

Código: 718661

Esse fenotipo de resistência foi inicialmente identificada na Klebsiella, porém outras gram negativas também já expressas KPCs.

- Salmonella spp.: as espécies patogênicas desse gênero são normalmente associadas a gastroenterites. Habitam o trato intestinal de aves e animais de sangue quente, logo é associada a transmissão por alimentos mal-cozidos ou crus, principalmente à base de ovos.

• S. enterica: causa uma enterocolite autolimitada que normalmente é tratada apenas com reposição de fluidos. O uso de antimicrobianos pode ser indicado apenas para diminuir a carga bacteriana nas fezes e evitar disseminação. Essa cepa invade os enterócitos por um mecanismo chamado atio de disparo (trigger), que induz a célula epitelial a fazer uma alteração ondulosa do citoesqueleto (ruffling) que engloba a bactéria, internalizando.

• S. typhi e paratyphi: cepa causadora de febre tifóide, doença de contaminação fecal-oral, porém com comprometimento sistêmico, levando até a ~~cep~~ seps. Antimicrobianos são utilizados para o tratamento e o controle é feito por boas práticas de manipulação dos alimentos, aplicando as técnicas de higiene adequadamente.

→ Não Fermentadores de glicose:

- Pseudomonas aeruginosa: bacilo encontrado no ambiente principalmente em áreas molhadas, como rios e lagos. É uma bactéria capaz de formar biofilme que resiste ao fluxo de água, e pode contaminar piscinas e aparelhos de ventilação mecânica, devido a umidade. Algumas cepas formam um biofilme rico em alginato, que confere maior viscosidade e persistência ao patógeno oportunista. Esse fenotipo mucóide, conferido pela produção de alginato, confere pior prognóstico para pacientes com fibrose cística que se conta

153815-4-2023

minam com essa bactéria. A fibrose cística é uma doença genética que altera a produção de muco principalmente no trato respiratório, formando um muco volumoso que favorece o crescimento de patógenos. Quando o paciente se contamina com a P. aeruginosa com fenótipo mucóide, tem maior acúmulo de muco e piora da função respiratória devido a baixa troca gasosa nos alvéolos.

Essa bactéria produz diversos pigmentos (como pioverdina e piscianina) que podem atuar como toxinas durante a infecção. É ~~considerada~~ um patógeno oportunista que pode causar diferentes IRAS e, na comunidade, é frequentemente causadora da otite do nadador. Recentemente, houve um surto de infecções oculares por essa bactéria nos EUA devido a um lote de colírio que estava contaminado.

É uma bactéria com diversos fatores de virulência e mecanismos de resistência a antimicrobianos, como a produção de bombas de efluxo, conferindo resistência a múltiplas drogas.

- Acinetobacter baumannii: coco-bacilo de grande importância médica devido a emergência de multiresistência. Atualmente são encontradas cepas resistentes a todos os antimicrobianos, deixando sem alternativa clínica. Em 2023, um estudo utilizando inteligência artificial (in silico) propôs um novo antimicrobiano para essas cepas multiresistentes, a abaucina. Porém ainda não foram realizados todos os testes adequados para a liberação do medicamento, mas nos traz novas alternativas para tratamento.

→ Fastidiosos:

- Bordetella pertussis: bactéria causadora da coqueluche, uma doença que tem como principal característica a tosse prolongada. É uma bactéria encapsulada ~~que se transmite~~ transmitida por gotículas de uma pessoa infectada para uma saudável, e coloniza as células

ciliadas do trato respiratório superior. Essa colonização causa a morte dessas células ciliadas, impedindo a eliminação do patógeno. Desde 1990 a incidência da coqueluche no Brasil era muito baixa, devido a ampla vacinação de grávidas e crianças com a vacina Tetra Valente (DTPa), protegendo contra a produção da toxina pertussis e os quadros graves da doença. Porém, recentemente houve um aumento significativo dos casos de coqueluche, com o óbito de 3 bebês esse mês, filhos de mães que não se vacinaram. Infelizmente, desde o início da pandemia de COVID-19, houve uma diminuição das taxas de vacinação no Brasil, permitindo o ressurgimento de infecções anteriormente controladas.

- Helicobacter pylori: bacilo flagelado em formato helicoidal, é uma bactéria que habita o estômago de humanos, muitas vezes de forma assintomática. Pode ser transmitida pelo contato interpessoal e por alimentos e bebidas.

É uma bactéria sensível ao pH ácido do estômago, porém produz uma urease que quebra a uréia da alimentação em amônia e CO_2 , aumentando o pH ao seu redor, o que confere proteção. Possui diversos fatores de virulência como a VacA que está associada ao dano da mucosa estomacal, resultando na gastrite crônica e até à úlcera. Algumas cepas expressam o gene CagA, que está correlacionado a alta incidência de câncer gástrico em indivíduos colonizados pela H. pylori, o linfoma de MALT.

Essa bactéria pode ser detectada por técnicas invasivas, como a coleta de biópsia do estômago durante endoscopia, ou ainda técnicas não invasivas como o teste ~~de~~ respiratório pl detectar a urease. Uma vez positivo para a bactéria, o tratamento é feito

→

por uma terapia tripla, com 2 antimicrobianos e 1 inibidor de bomba de prótons.

→ Neisseria gonorrhoeae: agente etiológico da gonorréia, uma Infecção Sexualmente Transmissível com manifestações distintas em homens e mulheres.

Nas mulheres, a infecção pode ser confundida com o próprio muco cervical, ou ainda com outras vaginoses, e por esse motivo não ser tratada adequadamente. Pode causar uma complicação grave chamada Doença Inflamatória Pélvica, que leva à infertilidade. Nos homens, causa dor ao urinar e secreção purulenta, levando a buscar atendimento. Em neonatos, pode causar uma infecção ocular por se contaminar ao passar pelo canal vaginal materno.

É um diplococo aeróbico, altamente sensível, que não resiste por ~~uma~~ muito tempo fora da mucosa, logo só pode ser transmitido pelo contato íntimo. Para os homens, o diagnóstico pode ser feito pela microscopia da secreção, pois não há outros diplococos gram negativos na microbiota uretral, nas mulheres porém há outras Neisserias residentes da microbiota, precisando de um diagnóstico diferencial.

É uma doença que não confere imunidade duradoura, então há reinfecção recorrente se não houver uso de preservativos durante o contato sexual. Muitas cepas já são detectadas com múltipla resistência, logo o tratamento de escolha atual é uma dose de ceftriaxona ou cefixima.

→ Neisseria meningitidis: conhecida como meningococo, esse diplococo microaerófilo é o principal agente etiológico de meningite bacteriana em crianças. Habitam o trato respiratório, porém cepas

Código 718661

cepas virulentas são capazes de se disseminar e invadir as meninges. A principal medida de controle é a vacinação com as vacinas conjugadas A, B, C, W, Y.

— Haemophilus influenzae: a cepa tipo B dessa bactéria causa uma importante epigloteite em crianças, podendo levar ~~ao~~ ~~ao~~ ao óbito por impedir a respiração. A cepa tipo B é a mais virulenta devido a presença de PRP, molécula também usada para a produção da vacina Hib, que protege contra a forma grave da doença.

A emergência de multiresistência em bactérias gram negativas é de grande preocupação para a clínica, pois cepas multiresistentes aumentam mortalidade, morbidade e os custos em saúde. É imperativo o uso consciente de antimicrobianos para o controle da resistência.

Código 718661

③ - Métodos Fenotípicos e Moleculares aplicados a identificação, diagnóstico e epidemiologia de bactérias patogênicas

O estudo das bactérias se iniciou em meados de 1700 quando um pesquisador pegou a "massa" (que hoje sabemos ser o biofilme dental) dos dentes e misturou com uma gota de chuva e olhou no microscópio. Ele relatou ver animáculos se movendo e desenhou diferentes formas bacterianas. A partir de 1800 se iniciou a Era Dourada da Microbiologia, com a identificação de diversos agentes etiológicos de doenças por técnicas fenotípicas.

O objetivo do estudo das bactérias pode ser a identificação de patógenos relacionado a um quadro infeccioso, o diagnóstico; a pesquisa, para estudo fenotípico e molecular dos patógenos; ou ainda o controle de cura de infecções.

→ Métodos Fenotípicos:

- Microscopia: independente da técnica utilizada (óptica, contraste de fase, varredura, fluorescência...), o objetivo dessa técnica é visualizar a célula inteira, avaliar suas características estruturais. Muitas vezes nos traz um diagnóstico presuntivo, como por exemplo a microscopia de secreção purulenta uretral identificar diplococos gram-negativos, logo pensamos em gonorréia.

- Visualização de amostras coradas: a técnica mais utilizada é a coloração de Gram, onde separamos 2 grandes grupos bacterianos de acordo com sua capacidade de reter o corante primário. As bactérias gram + serão coradas em roxo, e devido a sua espessa camada peptidoglicânica, não vai perder a cor ao descorar. As gram - serão rosas, pois não retêm o corante primário e serão coradas com o secundário, de cor rosa.

A coloração de Ziehl-Nielsen também pode ser utilizada para bactérias álcool-ácido-resistentes, como as micobactérias e a *Nocardia*. Essa avaliação inicial vai nortear as próximas etapas de identificação fenotípica.

- **Cultura:** é o processo de propagação das bactérias fornecendo nutrientes e condições ambientais adequadas. Os meios de cultura podem ser sólidos, semi-sólidos ou líquidos. Estes podem ainda ser categorizados em enriquecidos como por exemplo o meio Agar Sangue, diferencial como o meio Enterococcosel que permite que enterococos ~~sejam~~ formem colônias pretas, ou ainda seletivos, quando adicionamos antimicrobianos ou substâncias que favorecem o crescimento de um grupo restrito, em detrimento de outros.

A atmosfera também deve ser controlada, microrganismos anaeróbios só crescem na ausência de oxigênio, e para isso são utilizadas câmaras ou jarra de anaerobiose, para manter o ambiente sem oxigênio.

- **Testes bioquímicos:** avaliam características dos patógenos, como habilidade de fermentar carboidratos, presença de enzimas como catalase, oxidase e coagulase, além de pesquisa por proteínas como o teste de fator CAMP. Pode ser feito manualmente ou em sistemas automatizados com Vitek/Bactec, e em sistemas miniaturizados.

- **Testes imunológicos:** podem ser usados quando há dificuldade de crescer a bactéria. Testes de aglutinação, ELISA, entre outros podem ser usados para detectar o patógeno através das ligações antígeno-anticorpo. Diversos testes rápidos já foram criados para identificação de patógenos, o que facilita muito em áreas sem acesso a laboratórios de diagnóstico.



Código 718661

- Teste de susceptibilidade a antimicrobianos, uma vez que se tenha a amostra infecciosa, é importante realizar TSA para identificar a melhor conduta antimicrobiana. Podem ser realizados testes de disco difusão, onde discos embebidos com antimicrobianos são adicionados a culturas bacteriana, e se avalia a presença ou ausência de halo de inibição. Conferindo sensibilidade, resistência ou fenótipo intermediário.

Também podem ser realizadas técnicas de concentração Inibitória mínima, com objetivo de definir a concentração ideal do antimicrobiano. Pode ser realizada por microdiluição, macrodiluição ou ainda pela prova Epilométrica (E-test), onde é usada uma fita com diferentes concentrações do antimicrobiano e se avalia o halo de inibição.

- MALDI-TOF: é uma técnica rápida de ^{espectrometria} ~~análise~~ que é capaz de identificar o patógeno em minutos pelo seu padrão proteico. Ainda é muito caro, mas hospitais modernos já fazem uso dessa técnica rápida e eficiente.

→ Métodos moleculares:

Baseados em análises de ácidos nucleicos, são técnicas bem específicas e sensíveis, e não dependem de cultivo, logo espécies de difícil cultivo artificial podem ser identificadas.

- Reação de cadeia da polimerase (PCR): foi ~~descoberta~~ inventada na década de 80 por Kary Wills e tem como objetivo amplificar o material genético a ponto de conseguir visualizar em um gel de eletroforese. Pode ser utilizada para identificação de espécies, busca por genes e fatores de virulência, e além do papel no diagnóstico das infecções, também é importante para estudos epi-

demiológicos.

São utilizados para a reação um DNA alvo, iniciadores específicos do gene o qual será amplificado, uma DNA polimerase, ~~o~~ DNTPs (nucleotídeos) e co-fatores. A mistura é colocada em um termociclador, uma máquina que altera temperaturas para permitir a replicação do DNA em escala logarítmica. O produto do PCR é visualizado em um gel de agarose, por eletroforese que separa em bandas pelo peso molecular, permitindo a detecção da presença ou ausência do gene escolhido.

Diversas técnicas evoluíram o PCR clássico, como o Nested-PCR que fazem 2 reações combinadas, aumentando a especificidade; o PCR multiplex, que permite a detecção de diversos genes ao mesmo tempo; e o PCR em tempo real, que elimina a necessidade de fazer a eletroforese, pois a leitura é feita simultaneamente pela emissão de fluorescência, e é um método quantitativo.

— Híbridização: são metodologias clássicas para identificação de espécies ou de genes, como o Dot-Blot e o checkerboard, este segundo utiliza sondas genômicas, que ao se ligar com o DNA alvo emite uma fluorescência. Permite a detecção de mais de 40 espécies em cada corrida. Também há a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), permitindo rápida identificação.

A principal evolução das técnicas de hibridização é o microarray (microarray), onde são feitos chips ou lâminas contendo as sondas marcadas com fluorescência, e em seguida são adicionadas as amostras. Quando positivo, emite a fluorescência. Pode ser usada para pesquisa de diversos genes ao mesmo tempo, ou ainda a identificação de mais de 100 espécies ao mesmo tempo.

- Sequenciamento: as técnicas de sequenciamento evoluíram de Sanger, que era dependente de PCR, para técnicas mais modernas de pirosequenciamento, como os aparelhos Illumina, Ion-Torrent e Nanopore.

Essa técnica permite o estudo ~~da~~^{da} genômica e transcriptômica das bactérias, para identificação do genoma e a expressão de genes. Como diagnóstico, pode ser usada a avaliação do genoma completo ou a metagenômica para identificação da comunidade, porém são técnicas cara e que requerem conhecimento avançado em análises de bioinformática. Porém são técnicas muito utilizadas em estudos epidemiológicos, para caracterização molecular de patógenos, avaliação da cadeia de transmissão e ainda o estudo de marcadores que podem ser usados para diagnósticos rápidos no futuro.

Os testes fenotípicos e moleculares são complementares para o estudo de patógenos, trazendo maior ~~confiabilidade~~ especificidade aos resultados. Os métodos dependem também de uma coleta e transporte adequados da amostra, com escolha do sítio mais representativo da infecção e um transporte que mantenha as características do patógeno, permitindo uma recuperação bacteriana adequada para cada tipo de método.

And.

nº 718661

- Resumos -

① 3,5 bi - procariontes ; pp evoluiu?

Recombinação, mutação pontual

TH de genes: transformação, conjugação, transdução

EGM: transposons, integrons, ilhas de patogenicidade

Técnicas: seq, MLST, PFGE*

② LPS, resistência, ES KAPE, IRAS

- ~~Micro~~ Fermentadores:

• E. coli: EPEC, EIEC, ETEC, UTEC, EAEC, EHEC

• Klebsiella: cápsula, KPC

• Salmonella: enterica, typhi

• Shigella

- Não fermentadores:

• Pseudomonas: biofilme, bomba

• Acinetobacter

- Outras:

• Neisserias: gonococo, meningococo

• Bordetella pertussis: coqueluche - cápsula

• H. pylori:

• Campylobacter e Legionella (rapidamente)

③ Histórico

Etapas e objetivos

• métodos fenotípicos: cultura, microscopia, bioquím, imunológicos, TSA
MALDI-TOF

• " genotípicos: ácidos nucleicos, antígenos

PCR, hibridização (dot-blot, x-board, FISH)

sequenciamento