



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: 529442

Questão 2: Tema 7

As bactérias gram-negativas compõem um amplo grupo de bactérias caracterizadas ~~por~~ principalmente por possuírem uma parede celular composta por uma fina camada de peptidoglicano, uma membrana celular interna e uma membrana externa após o peptidoglicano. Dito isso, bactérias pertencentes a estes grupos são consideravelmente diversas quanto a outros aspectos fenotípicos e moleculares, assim como mecanismos de patogenicidade e portanto os métodos para controle também poderão ser distintos.

Um importante grupo de bactérias gram-negativas pertence às ~~gram-negativas~~ Enterobacterales, as quais podem ser consideradas/classificadas como patógenos oportunistas, ~~algumas~~ que geralmente também fazem parte da microbiota de seres humanos e animais (assim como muitas vezes podem estar presentes no ambiente); os patógenos estritos que quando encontrados em seres humanos estão associados a doenças e ainda bactérias não-patogênicas componentes da microbiota.

Dentro do grupo Enterobacterales, podemos destacar *Escherichia coli* como uma espécie que não causa doença e faz parte da microbiota intestinal humana, mas também como um patógeno, ~~especificamente~~ ~~o~~ já que esta espécie pode se tornar patogênicamente.

2

ca do receber elementos genéticos maiores através de mecanismos de transferência horizontal de genes (como conjugação, transdução e transformação).

E. coli são bacilos gram-negativos, flagelados, fermentadores de glicose e oxidase negativos, ~~anaeróbios~~ anaeróbios facultativos, e também fermentadores de lactose.epas patogênicas de *E. coli* podem ser classificadas em diferentes patótipos de acordo com o mecanismo de patogenicidade que abrigam a partir de diferentes elementos genéticos que receberam, como por exemplo *E. coli* enterotoxigênicas, *E. coli* enteropatogênicas, *E. coli* enterohemorrágicas, *E. coli* enteroinvasivas; ~~sendo~~ sendo estas causadoras de doenças intestinais, mas existem ainda patótipos associados a doenças extra-intestinais, como a *E. coli* uropatogênica, associada a infecções urinárias.

A *E. coli* enterotoxigênica por exemplo produz as toxinas termolábeis (toxinas do tipo AB) e termостаáveis que promovem fosforilação de canais de membrana com a liberação de eletrólitos e ~~água~~ água intracelular para o lúmen do intestino, causando sintomas com diarreia aquosa. A *E. coli* enteropatogênica entretanto, é capaz de se aderir a células do epitélio

intestinal, com uma subsequente adesão íntima e liberação de moléculas na célula hospedeira através de um sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), que promove a modulação do citoesqueleto e formação de um pedestal característico desta cepa. Esta característica está associada a genes codificados na ilha de patogenicidade LEE, e proteínas fimbriais codificadas por plasmídeos que facilitam a adesão ao epitélio intestinal.

Assim como ETEC, as EPEC também estão associadas à diarreia aquosa. Entretanto, alguns patótipos podem ser ainda mais virulentos como a *E. coli* enterohemorragiaca, que além da modulação do citoesqueleto promovida pelas proteínas codificadas pela LEE, podem ainda codificar uma toxina Shiga-like em profagos, a qual está associada à interferência na síntese proteica das células hospedeiras intestinais, levando à morte celular e ocasionando diarreia sangüinolenta. As cepas de *E. coli* enteroinvasivas são caracterizadas por invadir a célula e por isso também levam à disenteria.

Em casos de infecções causadas por *E. coli* patogênicas geralmente recomenda-se a reposição de eletrólitos e líquidos, mas na maioria das vezes são autolimitantes, porém em casos mais graves como os causados por EHEC e EPEC, pode-se entrar

4

com antibiótico terapia.

Também é importante mencionar gêneros de enterobactérias que ~~estes~~ são ~~associados~~ ~~de doenças~~ ~~em humanos~~ considerados patógenos estritos mas estão associados a doenças quando encontrados em humanos, como *Salmonella* e *Shigella*.

Assim como *E. coli*, *Salmonella* é um bacilo gram-negativo, fermentador de glicose, possui flagelos que auxiliam na sua mobilidade, mas não é um fermentador de lactose. *Salmonella* possui uma classificação confusa incluindo duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) mais diferentes subespécies e serovares. Diferentes serovares podem estar associados a ~~diferentes~~ doenças em diferentes hospedeiros, mas igualmente esta associada a ingestão de alimentos contaminados e invasão de células epiteliais intestinais em humanos.

Dentro deste tópico, gostaria de destacar *Salmonella* Typh e Paratyph por serem patógenos estritos a humanos e além de causarem diarreia através da umvasar e morte celular hospedeira também causam manifestações clínicas mais generalizadas como a febre tifóide e paratífóide. Também é importante destacar que a patogênica de *Salmonella* está muito associada a ilhas de patogenicidade que codificam diversos fatores de virulência localizados

em seu ecossistema.

Diarréia causada por *Salmonella* pode ser auto-limitante, mas em casos mais severos pode-se utilizar antimicrobianos. Entretanto é importante destacar que já foram identificadas diversas mecanismos de resistência a antimicrobianos importantes utilizados em seu controle, como as fluoroquinolonas.

Também devemos destacar dentre o grupo de bactérias gram-negativas, gêneros não fermentadores de glicose que estão associados a infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS), como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Estes são patógenos oportunistas ~~de~~ muito importantes no ambiente hospitalar principalmente pela sua resistência a antimicrobianos. Ambos possuem diferentes mecanismos de resistência intrínsecos, principalmente associados a super-expressão / modulação de bombas de efluxo assim como diminuição da expressão de porinas, dentre outros mecanismos importantes como a produção beta-lactamases intrínsecas. Além disso, podem adquirir outros mecanismos de resistência, dificultando o tratamento de indivíduos já comprometidos e hospitalizados. Geralmente o seu controle está associado a higienização de utensílios utilizados para o tratamento dos indivíduos.

6

hospitalizadas, assim como boas práticas de higiene dos profissionais de saúde, que em caso contrário podem ser importantes disseminadores destes microrganismos entre pacientes. Além disso, como estamos falando de microrganismos resistentes a diversas classes de antimicrobianos, recomenda-se a prática de testes de susceptibilidade a antimicrobianos para a adequação da terapia antimicrobiana correta.

Questão 3 - Tema 9:

Quando falamos em bactérias, devemos destacar que estes ^{são} seres capazes de uma rápida adaptação e evolução. Em grande parte isso acontece devido ao tamanho de seu genoma, muito menor que o de outros ~~organismos~~ organismos mais complexos, tornando assim as taxas de mutações mais elevadas.

É claro que mutações pontuais, deleções e inserções devido a erros na replicação do DNA e/ou ação de agentes mutagênicos seguidos pela seleção devido ao ambiente em que estes organismos estão inseridos e manutenção desta seleção em sua prole pela transferência vertical (duplicação celular), ocorrem, e são de fato, importantes para a evolução bacteriana. Entretanto, bactérias estão submetidas a mecanismos muito mais eficientes que permitem ~~uma~~ a troca genética entre células, os quais podem ser agrupados em mecanismos de transferência horizontal de genes (THG), sendo estes: conjugação, transdução, transformação e a transferência mediada por vesículas de membrana.

A THG pode estar ainda associada a um elemento genético móvel, onde pode-se citar os plasmídeos, elementos de transferência e bacteriófagos. Os elementos genéticos móveis e a THG são muito

8

importantes pois medeiam uma plasticidade de ~~genótipo~~ e variabilidade genômica muito maior e de forma muito mais rápida, a qual pode ser importante às variações ambientais às quais a célula é imposta e é claro, selecionada quando for vantajoso. É porque isso é importante para microrganismos patogênicos?

Primeiramente, a bactéria pode receber importantes mecanismos de virulência e patogenicidade, além disso, a bactéria pode receber diferentes mecanismos de resistência a antibióticos, os quais são utilizados para combater as mas-práticas clínicas.

Dentre os elementos genéticos móveis (EGM), plasmídeos são um dos que mais contribuem para transferência de DNA entre células bacterianas. Estes ~~plasmídeos~~ são caracterizados como material extra cromossômico, circular ou linear e capazes de se replicar de forma autônoma dentro da célula (ou seja de forma independente à replicação do cromossomo, e por isso são considerados replicons). Os plasmídeos podem ser conjugativos, ou seja, promoverem a sua transferência para uma ^{outra} célula bacteriana, e possuem toda a maquinaria necessária para tanto, ou não. Entretanto, os plasmídeos que não são conjugativos, podem ainda serem estabilizados por plasmídeos

conjugativos. É digno de nota, que plasmídeos podem ainda se integrar ao cromossomo bacteriano através de recombinação homóloga ou recombinação sito específica. Isso é importante por duas razões importantes: os plasmídeos passam a fazer parte do cromossomo e serão perdidos pela célula mais dificilmente; e uma segunda razão, mais importante sob o ponto de vista de mobilização gênica, é que ao se incorporarem ao cromossomo podem contribuir para a transferência também de material cromossômico próximo adjacente.

Além de plasmídeos, também podemos considerar os fagos como importantes EGM. Isso porque fagos podem incorporar o seu genoma ao genoma bacteriano para sua entrada no ciclo lisogênico através de recombinação. Entretanto, por mecanismos errôneos de excisão estes fagos podem transportar material genético adjacente ou voltarem ao ciclo lítico, e assim infectarem outras células levando também esse material genético extra. Se isso acontece, esse evento é considerado um mecanismo de TG denominado transdução.

Também é importante mencionar que elementos de transposição como os transposons são importantes elementos de mobilização gênica, não só dentro do próprio genoma da célula, através

10

de recombinação sítio-específica mediada por enzimas especializadas ~~denominadas~~ ^{denominadas} transposases, como também entre células, neste segundo caso, por estarem localizadas em outros elementos como plasmídeos ou fagos ou por promoverem a sua própria transferência (transposons conjugativos). Transposons conjugativos são os elementos de transposição que possuem a sua própria maquinaria de conjugação (assim como plasmídeos).

Também gostaria de destacar aqui os integrons, que apesar de não promoverem a sua própria transposição, são capazes de incorporar à sua estrutura cassetes gênicos que podem conter ORFs importantes para a sobrevivência bacteriana. Mas apesar disso, é claro que integrons podem ser ainda mobilizados se estiverem localizados em outras estruturas como plasmídeos, fagos ou transposons.

É ainda de grande importância mencionar algumas formas de THG que são independentes da ação de EGM. Por exemplo, a transforção é uma forma importante de captura de DNA livre no ambiente, quando a célula está apta para isso (quimiocompetente). De fato, esse parece ser um importante mecanismo de aquisição gênica em cepas patogênicas com *Neisseria gonorrhoeae*.

Ainda, vale destacar um importante me-

o mesmo de TAG que vem sendo estudado atualmente ~~capitulo~~ denominado vesículas que abrange a transferência de DNA entre células mediada por vesículas membranares formadas pela célula hospedeira, as quais podem ser incorporadas a membrana de células receptoras bacterianas com a liberação desse DNA no citoplasma dessa célula receptora. Apesar de não ser um mecanismo mediado por MGE, acredita-se que estes elementos (inteiros ou parte deles) pode ser transferidos por vesículas.

sendo assim, diferentes mecanismos de TAG e EGM contribuem para a evolução de patógenos. Deve-se considerar ainda que cada tipo/classe de EGM é ainda composto por uma grande variabilidade genética. Por exemplo, plasmídeos foram por muito tempo classificados por sua família de incompatibilidade genética. (plasmídeos são incompatíveis quando possuem uma sequência muito similar, seja em proteínas que promovem sua replicação, mobilização ou particionamento, o que garante a manutenção do plasmídeo na célula), entretanto, hoje, diversas novas classificações com base em toda a sua sequência estão sendo propostas, dada a sua importância para a evolução da célula bacteriana. Dentre dessas novas classificações podemos ressaltar a classificação em ~~unidades~~ ~~unidades~~ Unidade taxonômica plasmidial (PTU).

Assim diferentes PTUs podem estar associadas à transferência entre grupos bacterianos diferentes ou promovendo a transferência de diferentes elementos genéticos (como genes específicos de resistência, virulência, dentre outros).

Da mesma forma, integrons e transposons também podem ser classificados de acordo com ^{sua} sequência e enzima de recombinação, e ainda estarem associados a mobilizações de genes específicos, como o Tn4406 associado a disseminação de blaKPC-2.

Questão 1 - Tópico 3.

Os métodos de identificação, ~~diagnóstico~~ diagnóstico e epidemiologia são importantes para que ocorra o controle do patógeno que está causando a infecção.

Dentre importantes métodos fenotípicos podemos citar a coloração de ~~Gram~~ Gram que permite a diferenciação entre bactérias gram-negativas e positivas e podem ser utilizadas para auxiliar em diagnóstico presuntivo em caso de espécimes clínicos que não sejam colonizados por uma ampla variedade de microrganismos (como sangue).

Ainda dentre os métodos fenotípicos podemos citar a utilização de meios de cultura seletivos e/ou diferenciais. O ágar sangue é um bom exemplo de meio diferencial que promove a ~~distinção~~ distinção entre bactérias/espécies β -hemolíticas, α -hemolíticas ou não-hemolíticas. Para o caso de suspeita de patógenos gram-negativos pode-se usar meios seletivos e diferenciais como o MacConkey que ~~permitem o cultivo~~ permitem o crescimento de gram-positivos e permitem a diferenciação entre fermentadores e não-fermentadores de lactose. Adicionalmente, meios cromogênicos como Chromagar podem facilitar a diferenciação entre diferentes gêneros bacterianos, de acordo com sua fermentação de açúcar.

Ainda, diferentes testes fenotípicos podem

14

ser utilizadas para a diferenciação de cocos gram-positivos, como o próprio agar-agar que, mas também testes como o teste de coagulase para diferenciação de *S. aureus* de outros *Staphylococcus* e o teste CAMP que permite diferenciação entre *S. pyogenes* e *S. agalactiae*. Para gram-negativos, geralmente a identificação é muito mais complexa e exige a utilização de diferentes testes que permitem a identificação visual da fermentação de açúcares, produção de gás, produção de H₂S, entre outras características.

Devido à complexidade de identificação com métodos fenotípicos convencionais, métodos automatizados, ainda baseados em metabolização de açúcares como o VITEK surgiram, demandando poucas horas para identificação de patógenos. Entretanto, hoje em dia existem métodos ainda mais modernos como o MALDI-TOF MS que permitem a identificação a nível de gênero e espécie pela comparação de espectra (quase principalmente pela análise de proteínas ribossômicas) com um banco de dados. Diversos estudos ressaltam ainda a utilização do MALDI-TOF para identificação de linhagens bacterianas dentro de uma mesma espécie e a produção de mecanismos de resistência e patogenicidade.

Já quando falamos de métodos mo

culares, técnicas como PCR e a amplificação de genes específicos podem auxiliar na identificação de patógenos. Aqui pode-se destacar a técnica de amplicon sequencing do ~~16S~~ 16S rDNA facilitando a diferenciação entre patógenos ~~usando~~ utilizando a sequência variável de regiões específicas do 16S rDNA. Ainda como uma variação de PCR, a PCR quantitativa pode ser utilizada para identificação de microrganismos não cultiváveis, e quando acoplada a técnica de real-time PCR (RT-qPCR), esse diagnóstico pode ser realizado em tempo muito inferior.

A técnica de PCR acoplada a sequenciamento de amplicons de genes específicos (qualquer gene housekeeping) podem ser utilizados para identificação de clones dentro uma determinada espécie bacteriana, ~~através~~ uma técnica denominada MLST. Entretanto ~~os~~ os resultados obtidos com tal metodologia é menos discriminatório do que o que se pode obter com o sequenciamento do genoma total de cepas isoladas bacterianas.

Hoje em dia, com o avanço das técnicas de sequenciamento de short- e long-reads é possível se obter genomas bacterianos de forma muito mais rápida e menos custosa que no início da era genômica. Além disso, pipelines de análises genômicas facilitam a análise e a comparação genô

16

529492

mica, permitindo não só a rápida identificação de patógenos, como também a identificação de todo o seu arsenal de genes de virulência e resistência. Além disso comparações genômicas e análises de Pan Genoma permitem a identificação de linhagens bacterianas, auxiliando assim na epidemiologia de doenças ~~infecciosas~~ infecciosas importantes.

RASCUNHO

3 7 9

Tema 7 - Rascunho.

Boe gram - neg → Enterobactérias → ^{Cocos.} Neisseria
E. coli gonorrhoeae
Salmonella typhi meningitidis
Shigella paratyphi
Kleb. Haemophilus
Citrobacter influenzae.
Enterobacter.
Campylobacter
Helicobacter

Tema 9 - Rascunho.

mutação - espontânea, dirigida, inserção.

THG - conjugação, transformação, transdução.

EGM - plasmídeos

sequência de ~~cel~~ inserção
transposon.

fagos.