



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: 806634

Ponto 3 - Métodos fenotípicos e moleculares aplicados à identificação, diagnóstico e epidemiologia de bactérias patogênicas

A identificação e o diagnóstico preciso de bactérias causadoras de infecções é de fundamental importância para a adoção de medidas para controle e tratamento das infecções. Isso se deve porque dependendo do sítio de infecção, da espécie bacteriana e das características de resistência intrínseca aos antimicrobianos, determinados tratamentos deverão ser empregados, como antimicrobianos adequados ou alternativos, ou remoção cirúrgica de tecidos infectados. Além disso, a resistência adquirida pode ser imperativa para determinados microrganismos e em determinadas localidades, exigindo a adoção de antimicrobianos mais potentes. Ainda, a investigação epidemiológica pode estabelecer cepas ou clones específicos de bactérias que causam surtos, endemias, epidemias e pandemias.

②

Diferentes técnicas e metodologias tem sido empregadas para a identificação e o diagnóstico de bactérias causadoras de infecções em humanos, assim como para investigações epidemiológicas. Dentre essas técnicas, podemos elencar quatro grupos principais: (1) técnicas de microscopia e de cultura; (2) testes bioquímicos; (3) testes sorológicos; e, (4) testes moleculares de DNA.

Nas técnicas de microscopia e de cultura, as amostras adequadas para análise devem conter uma quantidade de bactérias adeq. abundante ou próxima disso para análise pelas técnicas, pois amostras de sítio anatómico com impacto exclusivo de toxinas (sem a presença de bactérias) não revelará o microrganismo que está sendo investigado.

Existem diferentes técnicas de microscopia, tais como microscopia de campo claro, microscopia de campo escuro, microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica, de transmissão ou de varredura. A maioria dessas técnicas exige fixação e coloração da bactéria, assim como o uso de microscópios específicos.

Na microscopia de campo claro, as bactérias são visualizadas por meio de microscópio óptico, no qual a lâmina contendo o microrganismo é posicionada num suporte entre uma lâmpada/condensador e lentes objetivas. Assim, a luz atravessa o esfregaço bacteriano em direção as lentes objetivas e o olho humano. O método de coloração das bactérias para esse microscopia mais empregado é a coloração de Gram, no qual a bactéria passa por uma

série de etapas sequenciais de coloração, descoloração e nova coloração. Os corantes utilizados são fucina e cristal violeta, sendo que o cristal violeta é fixado nas bactérias gram-positivas por um mordente isolado, enquanto nas bactérias gram-negativas o cristal violeta complexado ao mordente isolado são removidos devido a descoloração com álcool que remove a membrana externa. Posteriormente, as bactérias gram-negativas são coradas com fucina. Na microscopia, as bactérias Gram-negativas serão visualizadas em coloração rosa-avermelhada, ao passo que as bactérias Gram-positivas apresentarão coloração rosa-púrpura.

Avançando rapidamente sobre os demais técnicas de microscopia, a de campo escuro é ideal para a visualização de estruturas externas bacterianas, como cápsula, flagelo ou pili sexual, devendo-se empregar técnicas de coloração específicas do esfugo. Na microscopia de fluorescência, marcadores fluoróforos são utilizados para a coloração da bactéria ou de estruturas bacterianas específicas em *in vivo* investigações. Nos microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura, as bactérias são coradas com ouro ou outros íons. Estas técnicas de microscopia tem como finalidade a visualização de estruturas internas ou externas das bactérias com maior resolução e contraste se comparado as demais técnicas de microscopia, possibilitando, desse modo maior aplicação para visualização das estruturas.

Com relação as culturas, ou seja, técnicas de culturas, diferentes meios de cultura podem

J

(4)

empregados com a finalidade de obter o crescimento bacteriano em laboratório. Os meios de cultura empregados podem ser seletivos, não-seletivos, diferenciais, de enriquecimento e complexos.

Os meios de cultura seletivos são utilizados para a recuperação de bactérias específicas em amostras contendo uma comunidade microbiana.

Eles podem ser seletivos e diferenciais permitindo que diferentes bactérias de interesse sejam isoladas e diferenciadas ao mesmo tempo, ao passo que outras bactérias não importantes para o quadro clínico em questão são suprimidas. Um exemplo de meio de cultura desse tipo frequentemente utilizado é o sêro MacConkey, no qual amostras de fezes (comunidades microbianas complexas) são semeadas. O meio MacConkey permitirá o crescimento de bacilos Gram-negativos fermentadores ou não de lactose (presente na composição do meio) ao passo que suprimirá as bactérias Gram-positivas por meio do constituinte vermelho de fenol e sais biliares. Além disso, os bacilos Gram-negativos podem ser presumivelmente identificados por fermentar ou não a lactose. Na fermentação bacteriana, há a produção de ácidos no qual o indicador de pH vermelho de fenol se precipita no entorno das colônias, além das colônias apresentarem coloração rose-avermelhada. Caso a bactéria Gram-negativa não seja fermentadora de lactose, não haverá precipitação do vermelho de fenol e as colônias serão incolores. Os bacilos gram-negativos fermentadores de lactose incluem E. coli, Klebsiella; Citrobacter e

Enterobacter, os passos que os não fermentadores da lactose incluem Salmonella, Shigella e Yersinia, Pseudomonas, Acinetobacter e Stenotrophomonas.

Os meios não-seletivos são empregados para amostras com pouca quantidade de células bacterianas, geralmente pt para amostras de sítios estéreis. Por exemplo, o sêr sangue de carneiro é utilizado para o isolamento de Staphylococcus e Streptococcus causadores de infecção do sistema nervoso central ou infecção de corrente sanguínea.

Os meios de enriquecimento permitem a amplificação (crescimento) de células bacterianas em baixa quantidade nos amostras. Por exemplo, o sêr peptonado pode ser utilizado para enriquecer Vibrio cholerae de amostras de fezes e de peixes, por estarem em pequenas quantidades se comparados as outras bacterias. A condição básica do meio favorece o crescimento de V. cholerae frente a outros microorganismos de crescimento rápido, que são enfraquecidos nesse condição de cultivo.

Os meios complexos incluem meios cuja composição não é plenamente conhecida por conter substâncias como sangue, infusões de cérebro e coração ou outras substâncias complexas. O próprio sêr sangue, sêr chocolate e sêr infusões de cérebro e coração (BHI) são exemplos destes meios.

Após o isolamento e visualização inicial das bacterias de importância médica, os estipes podem ser caracterizados por tests bioquímicos. Esses tests analisam características fenotípico-metabólicas dos

⑥

bactérias de interesse. Dentre esses testes, podemos elencar o teste de coagulase, o teste de catalase, o teste de indol, o teste do citocromo oxidase, o teste de PYR, o teste de optoquina, o teste de DNAse, dentre vários outros. Os testes aqui citados são empregados na identificação bacteriana e diagnóstica de infecção.

O teste de catalase, por exemplo, verifica a capacidade da bactéria quebrar peróxido de hidrogênio em oxigênio e água por meio da produção da enzima ~~peróxido~~ catalase. As bactérias catalase-positivas apresentam a formação de bolhas de oxigênio, ao passo que as negativas, não. Esse é um importante teste utilizado para a identificação de cocos gram-positivos, pois Staphylococcus são catalase-positivos, e Streptococcus e Enterococcus são catalase-negativos.

Ainda, o teste de coagulase pode separar os Staphylococcus em coagulase-positivo (Staphylococcus aureus) e ~~em~~ coagulase-negativo (Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus). O teste se baseia na capacidade da bactéria produzir uma coagulase (ligase ou secretase) que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina na presença de soro.

Por vezes, não é possível a recuperação das bactérias em cultura por uma série de fatores, como crescimento lento, exigência nutricional e invisibilidade bacteriana em cultivo. Para a identificação e o diagnóstico, testes sorológicos e testes moleculares podem ser empregados.

Nos testes sorológicos, anticorpos ou antígenos es-

pecíficos são investigados referente a ~~detecção~~ de determinados microrganismos. Dentre esses testes podemos elencar o teste de imunofluorescência direta, de imunofluorescência indireta, ELISA, dentre outros.

No teste de imunofluorescência direta o antígeno bacteriano específico é detectado por meio de anticorpos marcados com fluorocromo. Por sua vez, o teste de imunofluorescência indireta detecta anticorpos específicos contra o bacteriano investigado, uma vez, que o teste possui o antígeno ligado a um anticorpo marcado com fluorocromo. A ligação do anticorpo do soro do paciente aos antígenos desencadeará uma reação de hidrólise do pirofosfato da fluorocromo, que emitirá fluorescência.

Os ~~tipos~~ diferentes testes sorológicos tem sido utilizados para o diagnóstico de sífilis (Treponema pallidum), de pneumonia por Haemophilus influenzae e gonorreia por Neisseria gonorrhoeae.

Quanto aos testes moleculares, estes pesquisam a presença de ácidos nucleicos de determinados patógenos nos amostras ou em bactérias isoladas em cultura. Dentre estes testes, incluem-se a reação em cadeia da polimerase (PCR); PCR em tempo real; polimorfismo por fragmento de restrição (RFLP); eletroforese em gel de campo pulsedo (PFGE); multilocus de sequência-tipo (MLST); transcriptoma; sequenciamento de genome completo; e, metagenômica.

Por meio de PCR, genes espécie-específicos podem ser detectados. Para isso, utiliza-se um par de iniciadores que se hibridizam ao gene inves-

⑧

tigado, caso presente na amostra bacteriana.

No caso de RFLP, PFGE e MLST, são técnicas empregadas na investigação epidemiológica de surtos bacterianos. O RFLP consiste na observação do perfil de restrição do DNA cromossômico bacteriano em eletroforese em gel após uma digestão do genoma com enzimas de restrição. O PFGE consiste na visualização do DNA-cromossômico genômico bacteriano também após a digestão com enzimas de restrição específicas, mas por espécie, em gel de agarose após eletroforese. Em RFLP e PFGE são observadas diferentes bandas (correspondentes a fragmentos de DNA) que, caso sejam bactérias da mesma espécie e clones, o perfil de bandas (fragmentos) será semelhante. Caso sejam bactérias da mesma espécie, porém ~~por~~ clones diferentes, o perfil de bandas também será diferente. Importante salientar que a corrida eletroforética de PFGE ocorre em campo pulsado, o que significa que a corrente elétrica segue em diferentes ~~de~~ direções, o que permite a separação e a visualização mais adequada de fragmentos grandes de DNA (> 50 kb). PFGE tem sido frequentemente empregada na investigação epidemiológica de S. aureus resistentes à meticilina (MRSA) causadores tanto de infecções relacionadas à assistência e saúde, como infecções comunitárias. Isso permitiu a constatação de que estirpes MRSA causadoras de infecções relacionadas à assistência e saúde (IRAS) são diferentes daquelas causadoras de infecções comunitárias.

As técnicas ômicas (genômica, metagenômica, transcriptômica) começam a ser empregadas no contexto clínico a partir do momento em que ocorre a diminuição dos valores de sequenciamento de ácidos nucleicos. Na genômica (sequenciamento de genoma completo) e na metagenômica é possível analisar todos os genes presentes em um ou vários genomas (cromossomos + elementos genéticos extracromossômicos), respectivamente. Na transcriptoma, diferentes moléculas de RNA são analisadas, podendo apresentar o perfil de genes que estão sendo expressos por uma comunidade bacteriana ou comunidade ao focar em RNAs mensageiros. As técnicas ômicas têm sido empregadas na investigação de patógenos bacterianos, surtos, genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência.

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde publicou um documento que recomenda o emprego de todas as técnicas de sequenciamento completo para a investigação epidemiológica de resistência aos antimicrobianos em patógenos bacterianos. Isso ressalta a importância da adequada caracterização (identificação, diagnóstica e epidemiológica) dos patógenos bacterianos, uma vez que a resistência e a caracterização inadequada ou insuficiente dos patógenos bacterianos poderá conduzir a humanidade a uma era em que os antimicrobianos não tenham mais o efeito desejado (Era Pós-Antibiótica).

50

Conto 7 - Bactérias Gram-negativas de Importância médica: caracterização fenotípica e molecular, patogênese e controle.

As bactérias gram-negativas são um grande grupo de bactérias que possuem como características comuns a presença de membrana externa, uma peptidoglicana mais delgada se comparada as das Gram-positivas, e a presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa. Esses microrganismos se coram de vermelho na coloração de gram (por isso, do nome).

Essas bactérias podem ser ubíquas ou colonizarem o intestino de animais, por exemplo. As bactérias Gram-negativas podem apresentar uma variedade de fatores de virulência ou adquirir por meio de transferência horizontal de genes. Além disso, podem adquirir múltiplos genes de resistência ou apresentarem resistência intrínseca a antimicrobianos. Por esses fatores, essas bactérias frequentemente são responsáveis por infecções oportunistas.

As bactérias gram-negativas (também chamadas de bacilos gram-negativos - BGN por seu formato bacilar, bastonete ou coco-bacilo) geralmente são divididas quanto a sua capacidade de fermentar ou não a glicose. Entre os fermentadores da glicose, temos os BGN da ordem Enterobacterales, Vibrio e Aeromonas. Os não fermentadores da glicose de importância médica incluem Pseudomonas, Acinetobacter, Burkholderia e Stenotrophomonas.

Os BGN podem utilizar de uma série de fatores

de virulência para causar infecções. Dentre esses fatores, podemos elencar:

- (1) adesão: pili, adesinas, fimbrias, cápsula
- (2) invasão: sistema de secreção tipo III
- (3) toxicidade: toxinas
- (4) evasão do sistema imune: cápsula, sobrevivência intracelular.

Estirpes de Escherichia coli causadoras de infecção do trato urinário pode utilizar o pili P para se aderir as células epiteliais do uretra.

Para invasão, estirpes de E. coli enteropatógenicas (EPEC) utilizam enteroinvasivas se utilizam de proteínas codificadas por um plasmídeo pIno que permitem serem fagocitadas por células do epitélio do cólon e escaparem do fagossomo.

Como toxinas, diferentes toxinas podem ser secretadas por BGN. Por exemplo, Pseudomonas podem secretar Las A e Las B envolvidos na degradação esfingomielina de leucócitos. Estirpes de E. coli enteropatógenicas (EPEC) secretam a proteína Tir por meio de Sistema de Secreção tipo III na célula do epitélio intestinal, conduzindo a polimerização de actina o que leva ao sítio de adesão da bactéria e destruição das microvilosidades, e consequentemente de integridade celular.

Dentre os mecanismos de evasão dos sistemas imune do hospedeiro, Salmonella podem se multiplicar dentro do fagossomo, produzindo proteínas que impedem a fusão do fagossomo com o lisossomo.

Essas bactérias podem ser investigadas por meio de cultura e testes bioquímicos. Por exemplo,

(52)

o cultivo em ágar MacConkey permite o isolamento e a diferenciação entre bactérias fermentadoras de lactose (E. coli, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter) e as não fermentadoras de lactose (Yersinia, Salmonella, Shigella, Proteus, Pseudomonas, Acinetobacter). É um teste de cultura e bioquímico ao mesmo tempo.

O teste do citocromo oxidase pode separar os BGN em aqueles que não são oxidase positiva (Enterobacter e Acinetobacter) daqueles que são (Pseudomonas e Moraxella).

Os BGN podem causar uma série de infecções oportunistas, como:

- Gastroenterites: E. coli, Salmonella, Vibrio
- Infecções do trato urinário: E. coli, Klebsiella
- Bacteremia e sepsis: Klebsiella, Acinetobacter
- Pneumonia: Pseudomonas, Burkholderia

Ponto 9 - Mecanismos genéticos de evolução de patógenos bacterianos.

As bactérias podem utilizar de diferentes mecanismos genéticos para a sua evolução como patógenos. Entre esses, alguns são de mudança lenta, como mutações, recombinações e variação de fase, enquanto outros conduzem a mudanças mais rápidas, como: transferência horizontal de genes.

As mutações podem conduzir a mudança de um nucleotídeo, enquanto na transformação, conjugação e transdução podem levar a aquisição de uma série de genes codificadores de patogenicidade.

Virulência.

Na transformação, a bactéria adquire DNA extracelular, enquanto na

A