



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: 937657

Questão 1 - Tema: Métodos fenotípicos e moleculares aplicados à identificação, diagnóstico e epidemiologia de bactérias patogênicas.

Na microbiologia, inúmeras são as metodologias que existem para se identificar um microrganismo, sendo testes fenotípicos ou genotípicos (moleculares). Fenotipicamente, na microbiologia pode-se dividir as bactérias em 2 grandes grupos, baseando-se na coloração de Gram, as Gram Positivas e as Gram Negativas. Nesta metodologia as bactérias são coradas por cristal violeta e safranina, que conferem a coloração e a qual grupo pertencem.

As Gram Positivas coram-se pelo cristal violeta, adquirindo a coloração roxa, por possuírem um peptídeo glicocógeno mais espesso, ou seja, mais rígido, diferentemente das Gram Negativas que se descoloram em uma etapa de lavagem por solução alcoólica.

e adquirem a cor rosa conferida pela ~~para~~ Saffronina, devido seu peptidoglicano ser mais delgado.

Além da coloração de Gram, existem outras colorações que podem auxiliar na identificação microbiana, como no caso da coloração de Ziehl-Nelsen. Esta coloração é voltada para as bactérias álcool-ácido Resistentes, ou seja as micobactérias, nesta metodologia, estas bactérias que possuem ácidos graxos de cadeia longa (ácidos micólicos) em sua parede celular (e que as tornam impermeáveis aos corantes comuns), não coradas pela Saffronina ou Fucsina Aquosa, o que permite que as ceras e lipídios permitam a passagem do corante e mesmo após a etapa de lavagem com solução de álcool-ácido, não há perda do corante. As demais bactérias se coram pela coloração de fundo com azul de metileno. Outros tipos de colorações que podem ser empregados mas não são tão consensuais é a de Fontana-Tribondeau de impregnação por prata para *Treponema pallidum* e de Albert-Laybourn para corar os grânulos metacromáticos de *Corynebacterium diphtheriae*. A partir da coloração e do exame direto com microscopia a partir do material clínico, pode-se analisar a morfologia bacteriana, classificando em cocos (estafilococos em cachos, estreptococos em cadeia ou diplococos aos pares) ou bacilos. A coloração em conjunto da microscopia que não auxiliam no processo de escolha para qual meio de cultura deve-se realizar o cultivo da amostra, além claro de qual espécime clínico está sendo analisado.

Meios seletivos vão permitir o crescimento de determinadas espécies como Ágar MacConkey, que inibe o crescimento de Gram positivas por conter cristal violeta e sais biliares, permitindo assim o crescimento de Gram negativas. O ágar sangue de carneiro 5% além de ser um meio altamente nutritivo, permite observar o padrão de hemólise que alguns gêneros bacterianos produzem como S. aureus e S. pyogenes. Meios seletivos e de isolamento como Ágar Thayer Martin que apresenta cloranfenicol, Neostatina, colistina e trimetoprima é capaz de inibir Gram positivas e negativas e fungos, com exceção do gênero Neisseria. Já os meios cromogênicos permitem que as colônias bacterianas cresçam com cores diferentes o que permite uma identificação presumtiva do gênero bacteriano.

Entre as ~~provas~~ provas bioquímicas, muito utilizadas para identificação fenotípica de Enterobactérias, é avaliada a capacidade de cada bactéria em utilizar determinados substratos ou enzimas. Como a fermentação de glicose com produção ou não de gás (visualizado pelo tubo de Durham), a utilização do citrato como fonte de carbono, a presença da enzima tripsina formada no teste do amido, a capacidade de descarboxilar aminoácidos como lisina, arginina ou ornitina, ~~para~~ produção de H_2S , avaliação da motilidade entre outras.

Já as provas de catalase e oxidase, avaliam a presença das enzimas catalase e peroxidase oxidase. Na prova de catalase, utiliza-se

Uma gota de peróxido de hidrogênio em leionina, é realizada então o espreguço de uma colônia sobre a gota, em que uma prova positiva não possível observar a presença de bolhas. Enquanto na prova da oxidase, tras de papel com reagentes quando em contato com uma colônia oxidase positiva, torna-se arroxeada.

Apesar dos inúmeros testes ~~para~~ fenotípicos existentes, não testes moleculares e genotípicos que apresentam ainda maior poder de identificação e tipificação para fins epidemiológicos. Por exemplo a metodologia de MALDI-TOF-MS, espectroscopia ^{matricial} de massas de ionização/ ionização associada a matriz e laser pode ser utilizada na identificação de bactérias. A técnica se baseia na adição de uma colônia bacteriana fresca em um target de aço inox, embebido de ácido fórmico para lise celular e ácido alfa-hidroxiacético para posterior ionização. Uma vez no espectômetro, o laser incide sobre a amostra, pulverizando-a, as moléculas escapam em um tubo a vácuo por estarem ionizadas, e alcançam um detector no final do vóo. O aparelho calcula a razão de massa/carga, inferindo o espectro que são únicos para cada gênero e espécie bacteriana, associado a um score de confiança. Acreditava-se que não os subórgãos, organelas presentes abundantemente na célula bacteriana que sejam detectados e utilizados para a identificação.

Além da espectrometria de massas, é muito comum ~~na~~ na biologia molecular o uso da

PCR e suas variações. A PCR, reação em cadeia de polimerase utiliza dois primers ou iniciadores e uma molécula de DNA molde para que seja replicada um número variável durante os ciclos no qual a técnica ocorre. Apesar da PCR convencional apresenta uso externo na microbiologia para detectar e/ou auxiliar na amplificação de genes de ~~patógenos~~^{interesse}, não suas variações que apresentam outras funcionalidades como RAPD, qPCR, Nested PCR, PCR Multiplex, BOX/REP e ERIC PCR. No RAPD, utiliza-se para a reação primers arbitrários, aleatórios, sem a necessidade de se desenharem um primer específico. Na qPCR ou PCR em tempo real, quantitativa, pode-se aplicar para numerosas análises, desde o exame clínico para identificação do patógeno como o Cobas CT/NG que detecta a presença de Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae ou até mesmo de genes de resistência como no caso do GeneExpert MTB)RIF que avaliam tanto a presença do M. tuberculosis quanto da resistência a rifampicina. O PCR Multiplex por sua vez é capaz de realizar a amplificação de múltiplos alvos ao mesmo tempo, com o uso de diferentes primers. Já a Nested PCR é uma PCR 2 em 1, pois utiliza o produto da primeira reação para realizar a segunda reação, aumentando a sua especificidade e poder discriminatório. As PCR BOX/REP e ERIC não aplicadas para diferentes patógenos, a BOX amplifica os genes BOX (A, B, C) de S. pneumoniae; a REP amplifica as regiões de repetição do genoma de bactérias Gram negativas e a

ERIC PCR amplifica as repetições ERIC, presentes nos genomas de Enterobactérias. Além da PCR, existe também o PFGE, muito utilizado em estudos epidemiológicos e em surtos. O PFGE é uma técnica de Eletroforese em campo pulsado, em que a bactéria primariamente imobilizada em um plug de agarose, seguida da digestão do genoma por endonucleases de corte raro, que resultará num genoma com poucos fragmentos, por sua vez, longos. Então, as amostras são colocadas num campo elétrico pulsado que ao longo da corrida vai rearranjando os fragmentos, gerando assim pulsotipos que podem ser utilizados como fingerprint para as amostras ou construção de árvores por softwares como bioinformatics. A única limitação do PFGE está justamente na sua laboriosa execução, ultrapassando mais de 20 horas em alguns casos e sua reprodutibilidade.

Após o surgimento da PCR, houve uma verdadeira revolução na biologia molecular, e com os contatos avulsos pode-se desenvolver os métodos de sequenciamento. A começar por Sanger, que realizou o sequenciamento por base única, gerando ~~os~~ seis de eletroforese gigante, a tecnologia foi sendo aperfeiçoada, passando pelo pirosequenciamento, 454, Illumina, Ion torrent e atualmente o Minion.

Com o WGS (sequenciamento de genoma completo), atualmente sendo o mais popular o Illumina que baseia-se em um PCR em ponte, sintetizando uma fita de cada vez, tornou-se possível que muitas aplicações auxiliaram a microbiologia. Atualmente, é possível analisar o genoma completo,

Genes específicos de resistência, virulência, realizam tipificação molecular, além de outras análises abrangidas através das técnicas ômicas, como transcriptômica, proteômica, genômica, metabolômica e metagenômica.

Entre as aplicações do sequenciamento do genoma, destaca-se a tipificação molecular, como por exemplo realizada pela técnica de MLST. O MLST é uma tipificação por sequência multilocus, nesta técnica 7 genes conservados, que geralmente estão associados com o metabolismo celular, são sequenciados e ~~os~~ inferidos mínimos para cada alelo. Estes mínimos por sua vez não correspondem a uma sequência tipo ou ST. O MLST tem alta empregabilidade em estudos epidemiológicos de rastreamento e vigilância de clones resistentes ou hipervirulentos. Nem todos os gêneros bacterianos possuem um esquema de MLST pronto para ser utilizado, mas para alguns como N. gonorrhoeae, que apresenta ótima correlação para com outros métodos de tipificação como NG-MAST e NG-STAR (exclusivo de gonococos), que por sua vez relaciona-se com o ST-1901 de gonococos altamente resistente ou como em Salmonella enterica em que o MLST já foi utilizado para discriminar novo tipos.

Por fim, entre as ômicas, ~~destacam-se~~ destacam-se a Genômica, transcriptômica e a metagenômica. Na Genômica é possível estudar a estrutura dos genomas, mapas e core genoma de uma espécie ou clone, análises de perfil plasmidial, genes de virulência de resistência. Nas aplicações da transcriptômica, o sequenciamento de RNA permite que os produtos de express-

não glicose, de modo a se analisarem questões como resistência, persistência e vias metabólicas, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Já a metagenômica pode ser utilizada para inúmeras aplicações, até mesmo de patógenos não cultiváveis, pois baseia-se no sequenciamento de DNA total da amostra, podendo ser utilizada também em estudos de vigilância para análise de genes de resistência.

Questão 2 - Tema 7: Bactérias Gram Negativas.

As bactérias Gram Negativas de importância médica incluem um vasto grupo de bactérias que podem causar diversas infecções, desde diarreia, a pneumonia e infecções sexualmente transmissíveis. Destacam-se as pertencentes à família Enterobacteriaceae, os não fermentadores como Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter baumannii, os cocos gram negativos: Neisseria meningitidis e Neisseria gonorrhoeae e outros como Haemophilus influenzae e Vibrio cholerae.

A caracterização fenotípica pode ser realizada de diversas maneiras. As enterobactérias podem ser semeadas em ágar Macdonkey, em que por exemplo Klebsiella pneumoniae ~~costuma~~ costuma crescer com aspecto mucoso e colônias rosadas, assim como E. coli. Já Salmonella e Shigella crescem com aspecto de colônias estranguladas. No ágar SS, Salmonella e Shigella formam diferentes colônias, sendo a Salmonella colônias de centro negro e Shigella as colônias rosáceas. P. aeruginosa pode crescer com colônias verde-azuladas em

ou agulhados, por causa dos pigmentos pteridina e pterocianina. Já Acinetobacter pode apresentar colônias brancas e opacas. As Neisserias apresentam colônias opacas em ágar chocolate ou Thayer-Martin. O Haemophilus influenzae pode crescer ao redor de estria de S. aureus ~~em~~ um ágar sangue pois precisa dos fatores X (hemina) e V (NAD) para seu crescimento e V. cholerae pode ser semeado em meio próprio como ágar TCBS.

As enterobactérias são divididas em fermentadoras de lactose, as de fermentação rápida como Klebsiella e E. coli, fermentação lenta como Shigella e Citrobacter e não fermentadoras como Salmonella e Shigella. Todas as enterobactérias reduzem nitrato à nitrito e não oxidam Negativas. Apresentam morfologia de bastonete gram negativo com flagelos peritricos. ~~É~~ E. aerogenes

As Neisserias são diplococos gram negativo em "forma de rim" ou "grão de feijão", não catalase e oxidase positivas, fermentam a glicose, lactose ou sacarose. São uniaxiais e no caso do meningococo, apresenta uma capsula polissacarídica que a divide em grupos (A, B, C, W-135, X, Y, Z).

A Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram negativo, não fermentador, apresenta flagelo e uma capsula de alginate. Enquanto o Acinetobacter baumannii é um cocobacilo uniaxial, assim como H. influenzae. Já o V. cholerae é um bastonete curvo que apresenta um único flagelo polar.

A patogenicidade de estas espécies vai variar de acordo com seus diferentes mecanismos de virulência. As enterobactérias de maneira geral apresentam

-20+EP

Um LPS (lipopolissacarídeo) altamente imunogênico, que se relaciona com sua virulência, sendo capaz de ativar receptores do tipo TLR4. Algumas delas com Escherichia coli apresenta diversos patótipos como ~~EPEC~~ EHEC (Entero-hemorrágica) como a popular O157:H7, EPEC (Entero-patogênica) STEC e VTEC (produtoras de toxina shiga e Verotoxina), EAEC (Entero-agregativa) e ExPEC (Extra-intestinal). Outras como Salmonella e Shigella usam ~~o~~ sistemas de secreção do tipo 3 (a seringa molecular) para injetar proteínas efetoras na célula hospedeira e impactar o sistema imune.

A patogenicidade do gênero Neisseria está associada ao lipopolissacarídeo e as proteínas de opsonidade, que auxiliam no processo de travessia do sistema imune e adesão à superfície da célula hospedeira. Ademais, estas bactérias são capazes de obter nutrientes como Ferro por proteínas de membrana externa como HbpB, LbpB, HpuAB que são essenciais para o seu crescimento. As porinas também são utilizadas para indução de apoptose por translocação e a cápsula do meningococo apresenta propriedades anti-fagocítica e antimicrobiana.

A patogenicidade de Pseudomonas relaciona-se com sua cápsula de alginate e sua capacidade de produzir biofilme. Enquanto Acinetobacter utiliza vários sistemas de secreção como T6SS, T4SS e T3SS.

Já H. influenzae tem sua patogenicidade relacionada a sua cápsula, sendo a do tipo B a mais virulenta ~~em~~ e esta relacionada com casos graves de meningite. E Vibrio Cholerae tem

Sua patogenicidade relacionada com a toxina colérica que uma vez em contato com as células do ~~epit~~ epitélio intestinal, causa um aumento de amp ~~os~~ cíclico intracelular, gerando uma perda maciça de água e eletrólitos.

O controle destas infecções pode ser realizado com a correta antibiótico terapia. Existe atualmente a problemática das enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro-estendido ou carbapenemases, assim como Pseudomonas e Acinetobacter MDR (multi droga resistente). Para estas infecções, pode-se utilizar colistina, mimosiclina, tigeciclina, piperacilina com tazobactam ou amibactam. Para infecções causadas pelo gênero Shigella, em casos de gonorréia, deve-se tratar com a terapia combinada de Azitromicina + ceftriaxona e infecções por meningococo, com ceftriaxona, penicilina G ou azitromicina.

Por fim, a caracterização molecular pode ser feita por PCR ERIC ou REP para as enterobactérias, PCR do gene stx para toxina shiga, para gene alg da capsula de alginate de Pseudomonas, PCR em tempo real ou MLST para caracterização de Neisseria e PCR para os genes da capsula de H. influenzae e da toxina colérica de V. Cholerae.

Questão 3 - Mecanismos Genéticos de Evolução

As bactérias não são seres que estão em constante evolução e este processo está ligado a inúmeros eventos celulares, a começar pelas mutações.

As mutações são um processo natural que ocorre e confere variabilidade genética. Mutações do tipo de deleção, inserção, substituição ou inversão de base podem alterar a funcionalidade de um gene, seja silenciando sua expressão ou conferindo a ele mesmo novas funções.

Em outros termos, as mutações por si só não são capazes de manter o processo evolutivo em constante movimento pois é um processo demandado e que demanda tempo, sem contar que algumas mutações podem conferir vantagens, o que por sua vez resultaria na eliminação de determinada linhagem.

A chave do processo evolutivo está no processo de transferência horizontal gênica. Neste processo, que compreende os mecanismos de transformação, recombinação e transdução, a bactéria é capaz de receber e doar material genético. Na transformação, esta troca é limitada pois costumam ser fragmentos curtos de DNA e que requerem compatibilidade para entre as espécies. Geralmente são genes de virulência ou resistência. No processo de recombinação, parte do fragmento do genoma é recombinado com o genoma da célula ~~receptora~~ receptora, o que vai permitir e conferir uma maior variabilidade genética. Já o processo de transdução requer um bacteriófago para que ocorra a receptação e transferência do material como em S. pyogenes causador da Escarlatina, que possui o gene da exotoxina pirogênica vindo de um fago ou na recombinação do gene penA de N. gonorrhoeae

que realiza a recombinação deste gene com ele Neisseria comensais, o que resulta num mecanismo de gene, alterando o quadro de leitura mas mantendo sua função e ainda conferindo resistência a ceftriaxona.

Outro mecanismo de movimento são os elementos genéticos móveis como plasmídeos, sequências de inserção, transposons, ~~as~~ cromossomos e ilhas de patogenicidade. Os plasmídeos são pequenos fragmentos de DNA circular que podem conferir autotransmissão, virulência ou resistência. Como no caso dos plasmídeos de virulência de Leptospira e de Y. pestis ou o plasmídeo que carrega a toxina colérica de V. cholerae ou de resistência como os conjugativos American e Dutton de N. gonorrhoeae que carregam tetM.

As sequências de inserção (IS) não carregam genes além daqueles necessários pt sua mobilização, mas estes elementos podem se inserir em genes, causando alterações no quadro de leitura ou uma vez mobilizam um gene para outra bactéria. Assim como as IS, os transposons são elementos genéticos que não flancuados por sequências repetidas e invertidas e não capazes de mobilizar genes ou partes do genoma, podendo causar rearranjos no genoma e está associada com a resistência como o Tn1546 de Enterococcus que carrega o operon Van que codifica resistência a Vancomicina, em cepas de VRE ou VRSA (S. aureus resistente a Vancomicina). Os cromossomos por sua vez podem também estar associados à resistência

Como o Sec de S. aureus que carrega a

gene *mevA*, que confere resistência à metilamina. As ilhas de patogenicidade por sua vez podem conferir alterações de fitness, virulência e resistência. Como no caso do genótipo que possui uma ilha de patogenicidade que codifica um T4SS exclusivo desta espécie que é capaz de excitar ~~o~~ DNA de fita simples para o meio extracelular para induzir a transformação de outros Neisseria.

Por fim, outro mecanismo que pode ocorrer durante o processo evolutivo é a redução do genoma, perda de genes de ~~o~~ virulência e mecanismo de reparo de SOS. Algumas bactérias podem reduzir o seu genoma, para mantê-lo mais compacto e funcional como no caso de Francisella tularensis em que a subespécie tularensis tem um genoma menor do que em comparação a subespécie holartica que apresenta baixa virulência. Este processo de "pseudogenização" auxilia a bactéria a manter em seu genoma somente o que é essencial como no caso acima em que a subespécie tularensis possui um genoma menor e com mais genes de virulência por causa de infecções em humanos e a holartica tem um genoma mais diverso por ser encontrada no meio ambiente. É concluído, o mecanismo de reparo de SOS, por sua vez pode atuar no processo evolutivo desde que a célula consegue manter viável após danos extensos no DNA, o que induz mutações generalizadas e caso a célula persista, poderá passar estas informações

[Handwritten scribble]

spans cümlen filman.

1 5v