UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1933

LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG

Complexo *Burkholderia cepacia*: **Identificação, Caracterização do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos e Avaliação dos Mecanismos de Resistência a Trimetoprim/Sulfametoxazol**

Tese apresentada ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2014

LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG

Complexo *Burkholderia cepacia*: **Identificação, Caracterização do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos e Avaliação dos Mecanismos de Resistência a Trimetoprim/Sulfametoxazol**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Translacional do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Ana Cristina Gales.

São Paulo

2014

Fehlberg, Lorena Cristina Corrêa

Complexo *Burkholderia cepacia*: Identificação, Caracterização do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos e Avaliação dos Mecanismos de Resistência a Trimetoprim/Sulfametoxazol./Lorena Cristina Corrêa Fehlberg – São Paulo, 2014.
XXIV. 159 pp. 182 fls.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Medicina Translacional. Departamento de Medicina.

Título em inglês: *Burkholderia cepacia* complex: species identification, evaluation of antimicrobial susceptibility profile and characterization of the mechanisms of resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim.

1. *Burkholderia cepacia* complex. 2. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. 3. Trimetoprim/sulfametoxazol. 4. *dhfr* gene. 5. Resistência bacteriana.

Serviço Público Federal
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Câmara de Pós-Graduação e Pesquisa

ATA DA REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos três dias do mês de julho do ano dois mil e quatorze, reuniu-se no Anfiteatro José Lanzio Filho às 9:00 horas, a Comissão Julgadora para a DEFESA DE TESE DE DOUTORADO , solicitada por LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA TRANSLACIONAL, que apresentou tese sob o Título: COMPLEXO BURKHOLDERIA CEPACIA: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL.

A referida Comissão estava constituída pelos Professores Doutores:

Profa. Dra. ANA CRISTINA GALES - Professora - Departamento de Medicina - Universidade Federal de São Paulo;
Profa. Dra. ANA PAULA D ALINCOURT CARVALHO ASSEF - Professora - Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - Fundação Oswaldo Cruz;
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI - Professor - Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias - Universidade Federal de São Paulo;
Profa. Dra. DOROTI DE OLIVEIRA GARCIA - Pesquisadora Científica - Divisão Técnica de Biologia Médica - Instituto Adolfo Lutz;
Prof. Dr. NILTON ERBET LINCOPAN HUENUMAN - Professor - Departamento de Microbiologia - Universidade de São Paulo;

O(a) Presidente Profa. Dra. ANA CRISTINA GALES , inicia a sessão dando a palavra ao(a) candidato(a), que dispõe de trinta minutos no máximo, para expor sua tese. A seguir dá a palavra aos Professores para a arguição. Cada examinador(a) dispõe de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o(a) candidato(a) para as respostas. Tendo o(a) candidato(a) respondido todas as arguições em tempo hábil os membros da Banca Examinadora , emitiram seus Pareceres:

Prof. Drs. :

ANA CRISTINA GALES, APROVADO
ANA PAULA D ALINCOURT CARVALHO ASSEF, APROVADO
ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI, APROVADO
DOROTI DE OLIVEIRA GARCIA, APROVADO
NILTON ERBET LINCOPAN HUENUMAN, APROVADO

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera o(a) Sr(a) LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG habilitado(a) a receber o título de DOUTOR EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO . E por estarem de acordo, assinam a presente ata. São Paulo, quarta-feira, 3 de julho de 2014.

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS CAMPOS PIGNATARI

Prof. Dr. NILTON ERBET LINCOPAN HUENUMAN

Profa. Dra. ANA CRISTINA GALES

Profa. Dra. ANA PAULA D ALINCOURT CARVALHO ASSEF

Profa. Dra. DOROTI DE OLIVEIRA GARCIA

Sugestões e Observações

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

Departamento de Medicina

Disciplina de Medicina Translacional

Chefe do Departamento de Medicina

Profª Drª Maria Tereza Zanella

Chefe do Curso de Pós-graduação em Medicina Translacional

Profª Drª Dulce Elena Casarini

LORENA CRISTINA CORRÊA FEHLBERG

Complexo *Burkholderia cepacia*: Caracterização do Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos e Avaliação dos Mecanismos de Resistência a Trimetoprim/Sulfametoxazol

Banca examinadora

Presidente

Profª Drª Ana Cristina Gales

Professora adjunta e diretora do Laboratório ALERTA da disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina – Unifesp/EPM

Titulares

ProfªDrª Ana Paula D'Alicourt Carvalho Assef

Professora pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari

Professor titular, diretor e pesquisador do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp/EPM.

Profª Drª Doroti de Oliveira Garcia

Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman

Professor pesquisador do Instituto de Ciências Biomédicas - ICB da Universidade de São Paulo - USP.

Suplentes

Profª Drª Líbera Maria Dalla Costa

Farmacêutica pesquisadora do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e professora da Faculdade e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe – Curitiba – Paraná.

Prof. Dr. Guilherme Henrique Campos Furtado

Coordenador do Grupo de Racionalização Antimicrobiana em Unidades de Terapia Intensiva do Hospital São Paulo e pesquisador da disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp/EPM.

"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa

que fez tua rosa tão importante."

Antonie de Saint-Exupéry

Dedico esta conquista à minha saudosa avó Alzira Rossoni Corrêa (in memorian), que, sem querer, me incentivou a ver muito além de atrás dos montes.

Meu reconhecido agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado ao meu esposo e companheiro, Rafael Gomes Ferreira. Por incondicionalmente, sempre estar ao meu lado, partilhando todas as minhas aflições e conquistas. Por me encorajar nos momentos difíceis e de incertezas, sempre apoiando minhas decisões e incentivando a seguir em busca dos meus ideais! Obrigada por compartilhar e realizar tantos sonhos juntos. Obrigada por sermos uma família! Amo você!

Agradecimentos

Este espaço não me permite agradecer à todas as pessoas que me auxiliaram durante a minha trajetória acadêmica dentro dos Laboratórios Alerta e Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Unifesp. Desta forma, espero expressar, em algumas poucas palavras, um reconhecido agradecimento:

À *Drª Ana Cristina Gales*, minha orientadora e professora. Pelo carinho que sempre teve para comigo e pelos ensinamentos e conselhos sempre afáveis. Reconheço, com gratidão, a confiança depositada em mim durante todo este tempo que trabalhamos juntas. Obrigada pela oportunidade de integrar o grupo LEMC/Alerta e por me tornar uma pessoa profissionalmente e pessoalmente melhor.

Ao *Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari*, pelo exemplo de competência na área de microbiologia clínica e pela sua persistência e dedicação ao grupo LEMC/Alerta.

Aos membros componentes da banca, *Profª Drª Ana Paula Assef, Prof. Dr. Antônio C.C. Pignatari, Profª Drª Doroti O. Garcia, Prof. Dr. Nilton Lincopan, Profª Drª Líbera Dalla Costa e Prof. Dr. Guilherme Furtado*, por gentilmente terem aceito o convite e pela enriquecedora contribuição para o nosso trabalho.

Aos meus pais *Sílvia Helena Corrêa* e *Waldevino Fehlberg*, pela vida e por sempre me fazerem acreditar que era possível alcançar nossos sonhos.

Aos meus amados tios *Vera Mª Corrêa da Penha* e *Lazarino da Penha*, por nunca me abandonarem em nenhum momento da minha vida e pelo carinho e preocupação que sempre dispensaram para comigo.

Aos meus sogros, *Maria da Silva* e *Raul Gomes Ferreira*, pela acolhida em São Paulo, pela atenção e pelo carinho.

À *José Geraldo da Silva*, um amigo incrível e um profissional extremamente competente, que me ensinou os primeiros passos no mundo da microbiologia.

Aos meus colegas do *Laboratório Especial de Microbiologia Clínica*, pelos prazerosos momentos de convivência.

Aos meus colegas do Alerta, *Ana Paula Streling, Graziela Braun, Lygia Schandert, Marina Visconde, Rafael Affini, Talita Barone, Willames Brasileiro,* pela equipe que somos e pela amizade de todos. Em especial, agradeço à *Adriana Matos, Ana Carolina Ramos, Cecília Carvalhaes, Dandara Cassu Corsi, Fernanda Rodrigues e Jhonatha Moura,* pelo auxílio em diversos procedimentos do durante a execução deste projeto. Muito obrigada!

À *Lucas H. S. Andrade*, pela confiança durante a co-orientação do seu trabalho de conclusão de curso, muito me auxiliando no início deste projeto.

Aos meus amigos *Adriana Nicoletti, Danilo E. Xavier, Eloíza H. Campana, Paula P. Barbosa, Raquel Girardello, Renata C. Picão e Rodrigo Cayô*, pela paciência nos primeiros ensinamentos desde quando cheguei a este grupo. Obrigada pela acolhida e pelo incentivo no início desta jornada. Alguns já trilharam outros caminhos, mas todos sempre levarei carinhosamente guardados em meu coração.

À secretária *Rosana Capecce*, pela amizade e pelo auxílio em muitos procedimentos burocráticos.

À *Letícia Molina,* secretária da disciplina de Medicina Translacional, sempre solícita e disposta a ajudar.

A Profª Drª *Elizabeth de Andrade Marques*, por ter aceito em participar deste estudo, gentilmente cedendo as cepas do complexo *Burkholderia cepacia* do hospital B.

Ao *Departamento de Biofísica da Unifesp*, em nome dos professores *Dr. Luiz Juliano Neto e Drª Maria Juliano*, por disponibilizarem o equipamento de espectrometria de massas MALDI-TOF para a realização deste estudo.

Ao *Diego Magno Assis*, do Departamento de Biofísica da Unifesp, pela sua competência e profissionalismo, e seu carisma em sempre nos ajudar.

Às minhas melhores amigas *Larissa L. Botelho, Mariene S. Guerra, Sheyla Rio Branco*, pela força de sempre em todos os momentos. O tempo provou que a nossa amizade é mais importante que a distância física. Vocês são muito especiais para mim!

Aos meus professores de dança de salão, *Pedro Ferreira e Tatiana Saltini*, e aos meus colegas da dança da *Academia Dance 4 All*, por me permitirem vivenciar momentos de extrema satisfação e por sempre passarem a mensagem de que, além do cuidado com o corpo físico, é importante também cuidar da mente e alimentar a alma de momentos bons.

A todos aqueles que colaboraram com este trabalho, direta ou indiretamente, muito obrigada!

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2012/04910-9.

Sumário

Lista de Figuras XV

Lista de Tabelas XVII

Lista de Abreviaturas e Siglas XIX

Resumo XXI

Abstract XXIII

1 Introdução 1

2 Objetivos 4

2.1 Objetivo geral 4

2.2 Objetivos específicos 4

3 Revisão Bibliográfica 5

3.1 Histórico e taxonomia do gênero *Burkholderia* 5

3.2 Características do gênero *Burkholderia* 8

3.3 Cultura e identificação 9

3.4 Epidemiolgia das infecções causadas pelas espécies do CBc 15

3.5 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos 22

3.5.1 Betalactamase cromossomal Pen 22

3.5.2 Sistemas de efluxo 23

3.6 Tratamento das infecções causadas por espécies do CBc 24

3.7 Sulfonamidas e trimetoprim 26

3.7.1 Estrutura química das sulfonamidas e do trimetoprim 27

3.7.2 Mecanismo de ação das sulfonamidas e do trimetoprim 29

3.7.3 Mecanismos de resistência à sulfonamidas e ao trimetoprim 30

4 Material e métodos 34

4.1 Amostras bacterianas 34

4.2 Identificação bacteriana 35

4.2.1 Identificação genotípica 35

4.2.1.1 Extração do DNA bacteriano 35

4.2.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 36

4.2.1.3 Reações de sequenciamento 37

4.2.2 Espectrometria de massas por MALDI-TOF MS 38

4.3 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos 40

4.3.1 Preparo das soluções estoque de antimicrobianos para as técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar 41

4.3.1.1 Microdiluição em caldo 41

4.3.1.2 Preparo das placas de microdiluição em caldo 42

4.3.1.3 Preparo e pipetagem do inóculo bacteriano das amostras clínicas e dos controles 43

4.3.2 Diluição em ágar 44

4.3.2.1 Preparo das placas de diluição em ágar 44

4.3.2.2 Preparo e dispensação do inóculo bacteriano das amostras clínicas e dos controles 45

4.3.3 Etest® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, França) 45

4.3.3.1 Preparo das placas de ágar Müeller-Hinton 46

4.3.3.2 Preparo do inóculo bacteriano e plaqueamento das amostras clínicas e dos controles 46

4.3.4 Método de Kirby-Bauer ou disco difusão em ágar 47

4.3.4.1 Preparo das placas de ágar Müeller-Hinton 47

4.3.4.2 Preparo do inóculo bacteriano e plaqueamento das amostras clínicas e dos controles 47

4.3.5 Análise estatística 47

4.4 Caracterização dos genes de resistência nos isolados clínicos do CBc 49

4.5 Caracterização molecular dos isolados do CBc resistentes a SXT 55

4.5.1 Avaliação da similaridade genética 55

4.5.1.1 Técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e interpretação dos padrões moleculares 55

4.5.2 Estudo da localização do gene codificador da resistência a SXT e demais betalactamases 57

4.5.2.1 Extração do DNA total 57

4.5.2.2 Extração do DNA plasmidial 57

4.5.2.2.1 Extração de Kieser 57

4.5.2.3 Reação de hibridização 59

4.5.2.4 Análise da transferência dos genes de resistência 59

5 Resultados 61

5.1 Amostras bacterianas 61

5.2 Identificação bacteriana 61

5.3 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos 65

5.3.1 Comparação entre os resultados obtidos para microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão 69

5.3.1.1 Microdiluição em caldo *versus* diluição em ágar 69

5.3.1.2 Microdiluição em caldo *versus* Etest 69

5.3.1.3 Microdiluição em caldo *versus* disco difusão 73

5.3.1.4 Diluição em ágar *versus* Etest 73

5.3.1.5 Diluição em ágar *versus* disco difusão 76

5.3.1.6 Etest *versus* disco difusão 76

5.3.1.7 Comparação entre as metodologias de microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão de acordo com a espécie do CBc 77

5.3.1.7.1 Microdiluição em caldo *versus* diluição em ágar 77

5.3.1.7.2 Microdiluição em caldo *versus* Etest 82

5.3.1.7.3 Microdiluição em caldo *verus* disco difusão 82

5.3.1.7.4 Desempenho das técnicas de sensibilidade avaliadas neste estudo para *B. cenocepacia* 87

5.4 Caracterização dos genes de resistência nos isolados do CBc 90

5.4.1 Avaliação da similaridade genética e interpretação dos padrões moleculares 92

5.4.2 Estudo da localização dos genes *dhfr e* $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ 93

6 Discussão **94**

7 Conclusões **111**

8 Referências Bibliográficas **113**

Apêndice 128

Anexos **132**

Anexo 1 132

Anexo 2 154

Anexo 3 157

Lista de Figuras

Figura 3.1 Walter Hagemeyer Burkholder (1891–1983), fitopatologista americano (http://www.apsnet.org/). **5**

Figura 3.2 Distribuição epidemiológica mundial dos isolados do CBc **21**

Figura 3.3 Organização genética dos operons da família RND descritos em *B. cenocepacia* J2315. As setas listradas representam os genes reguladores proximais de cada operon, que podem exercer a função ativadora (seta para a direita) ou repressora (seta para a esquerda) para cada gene. Os genes que codificam as proteínas de fusão periplasmática estão representadas nas setas cinza e os que codificam as proteínas de membrana interna (bomba) aparecem nas setas pretas, enquanto os genes que codificam as proteínas de membrana externa (canal extrusivo) estão representados pelas setas brancas. As regiões promotoras estão representadas pelos traços pretos (Adaptado de Bazzini *et al.,* 2011). **25**

Figura 3.4 Fórmula estrutural das sulfonamidas e do trimetoprim (Adaptado de Zinner & Mayer, 2010). **28**

Figura 3.5 Via da biossíntese do folato. As setas brancas indicam o sítio de ação de SXT (Masters *et al.*, 2003). **31**

Figura 3.6 Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1. Esses integrons são formados por duas regiões conservadas, 5'CS e 3'CS, que flanqueiam uma região variável em tamanho e sequência, a qual comporta os cassetes gênicos. A região 5'CS contém o gene codificador da integrase, *IntI,* e por um sítio de recombinação à jusante do gene da integrase, denominado *attI* (integrase attachment). A região 3'CS é normalmente formada por um gene que confere resistência a compostos de quaternário de amônio, *qacEΔ1*, truncado a um gene que confere resistência à sulfonamida, denominado *sul.* As setas indicam os genes e o sentido da sua transcrição e os círculos representam os sítios de recombinação dos cassetes gênicos (Adaptado de Picão, 2009; Barbosa, 2011). **33**

Figura 4.1 Cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25608 semeada em meio BCAS. **35**

Figura 4.2 Fluxograma do processo de extração das proteínas ribossomais e identificação bacteriana pela espectrometria de massas MALDI-TOF MS (Adaptado de Fehlberg et al., 2012). **39**

Figura 4.3 Desenho esquemático de uma placa de trimetoprim/sulfametoxazol. Cada coluna representa uma concentração diferente do antimicrobiano (µg/mL) e cada linha uma amostra bacteriana. CP, controle positivo (controle do crescimento bacteriano); CN, controle negativo (controle de esterilidade do meio de cultura). **44**

Figura 4.4 Representação de um scatergrama comparando duas técnicas de sensibilidade para um antimicrobiano hipotético. Os círculos de cor azul indicam os erros leves; laranja os erros graves e os erros muito graves estão indicados pelo **49**

círculo vermelho.

Figura 5.1 Distribuição dos isolados do CBc avaliados neste estudo de acordo com o sítio corpóreo de isolamento e com o hospital de procedência. **61**

Figura 5.2 Distribuição das espécies do CBc de acordo com o hospital de procedência. **62**

Figura 5.3 Distribuição do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com a espécie do Complexo *Burkholderia cepacia* avaliada neste estudo. **67**

Figura 5.4 Concordância geral (CIM±1$\log_2$) para as técnicas de microdiluição em caldo (referência) diluição em ágar e Etest para os 82 isolados clínicos do CBc avaliados neste estudo. **70**

Figura 5.5 Concordância por categoria para as técnicas de microdiluição em caldo (referência) diluição em ágar e Etest para os 82 isolados clínicos do CBc avaliados neste estudo. **70**

Figura 5.6 Concordância por categoria para as técnicas de sensibilidade avaliadas neste estudo para os 82 isolados clínicos do CBc. **76**

Figura 5.7 Representação esquemática do contexto genético no qual está inserido o gene $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ presente no isolado de *B. cenocepacia*. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. A figura não está em escala. **90**

Figura 5.8 Representação esquemática do contexto genético no qual está inserido o gene *dfr22* presente nos isolados do CBc. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. A figura não está em escala. **90**

Figura 5.9 Avaliação da similaridade genética dos isolados que carreavam genes de resistência. À esquerda, o perfil eletroforético pelo PFGE e à direita, o ERIC-PCR. PM, padrão de peso molecular; 1, isolado 31980 *B. cenocepacia* produtora do gene *dhfr22*; 2, isolado 53670 *B. cepacia* produtora do gene *dhfr22*; 3, isolado 38670 *B. cenocepacia* produtora de $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$. Os padrões de peso moleculares estão expressos em pb. **92**

Figura 5.10 Eletroforese em gel de agarose 0,8% [TBE1x] da extração do DNA cromossomal e plasmidial dos isolados do CBc que carreavam genes de resistência. (A) Isolados que carreavam o gene *dhfr22.* PP, *E. coli* 50192 controle de peso plasmidial; 1, DNA cromossomal do isolado 31980; 2, DNA plasmidial do isolado 31980; 3, DNA cromossomal do isolado 53670; 4, DNA plasmidial do isolado 53670. (B) Isolado que carreava o gene $bla_{\mathrm{OXA\text{-}10\text{-}like}}$. PP, *E. coli* 50192 controle de peso plasmidial; 1, DNA cromossomal do isolado 38673; 2, DNA plasmidial do isolado 38673. **93**

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Descrição das espécies e genomovares pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia.* **7**

Tabela 3.2 Características bioquímicas das espécies pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia.* **12**

Tabela 4.1 Diluentes e solventes utilizados para o preparo das soluções estoque de antimicrobianos e suas respectivas variações das diluições utilizadas neste estudo. **42**

Tabela 4.2 Concentração de cálcio e magnésio recomendados pelo CLSI e encontradas no Müller-Hinton caldo utilizado neste estudo. **43**

Tabela 4.3 Sequência de oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizadas para a amplificação dos genes de resistência pesquisados neste estudo. **51**

Tabela 5.1 Comparação entre os resultados obtidos pelo sequenciamento do gene *recA* e pelo MALDI-TOF MS para a identificação dos isolados pertencentes ao CBc. **64**

Tabela 5.2 Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 82 isolados clínicos do CBc avaliados neste estudo. **66**

Tabela 5.3 Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para os isolados clínicos do CBc de acordo com o hospital de procedência. **66**

Tabela 5.4 Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo. **68**

Tabela 5.5 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e diluição em ágar para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc. **71**

Tabela 5.6 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc. **72**

Tabela 5.7 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc. **74**

Tabela 5.8 Comparação entre as técnicas de ágar diluição (referência) e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc. **75**

Tabela 5.9 Comparação das técnicas de diluição em ágar (referência) e disco **78**

difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Tabela 5.10 Comparação das técnicas de Etest (referência) e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc. **79**

Tabela 5.11 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e diluição em ágar para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo. **80**

Tabela 5.12 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo. **83**

Tabela 5.13 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo. **85**

Tabela 5.14 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e ágar diluição, Etest e disco difusão para a determinação CIM e da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos para *B. cenocepacia* procedentes do hospital A (n=14). **88**

Tabela 5.15 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e ágar diluição, Etest e disco difusão para a determinação CIM e da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos para *B. cenocepacia* procedentes do hospital B (n=30). **89**

Tabela 5.16 Características microbiológicas dos isolados do CBc que carreavam genes de resistência. **91**

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC – American Type Culture Collection

attI - Integrase attachment

BCAS - *Burkholderia cepacia* Agar

BCESM - *Burkholderia cepacia* Epidemic Strain Marker

BGN-NF - Bacilos Gram negativos não fermentadores da glicos

CAZ – Ceftazidima

CBc – Complexo *Burkholderia cepacia*

CDG – Doença granulomatosa crônica

CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CIM – Concentração inibitória minima

CLO – Cloranfenicol

CLSI – Clinical Laboratory Standard Institute

CZI - Czech epidemic clone

dhfr - Dehidrofolato redutase gene

ET12 - Electrophoresis type *12* ou Edinburgh/Toronto12

EUCAST - European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing

FC – Fibrose cística

Int – Integrase

IRAS – Infecções relacionadas à assistência à saúde

LEV – Levofloxacina

LPS – Lipopolissacarídeo

m/z - massa/carga

MALDI-TOF MS - Processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz - tempo de vôo

MER – Meropenem

MIN – Minociclina

MLST - Multilocus Sequence Typing

MRSA – *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MSSA – *Staphylococcus aureus* mitilicina sensível

NADPH - Nicotinamide dinucleotide phosphate-oxidase

PABA - Ácido para aminobenzóico

PenA – Penicilinase A

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

PHDC - Columbia Philadelphia-District

recA – recombinase A

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RND - Resistance-Nodulation-Division

SXT – Trimetoprim/sulfametoxazol

TIC/AC - Ticarcilina/ácido clavulânico

TSB - Tryptic Soy Broth

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a identificação, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, a similaridade genética e os mecanismos de resistência à trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) entre os isolados clínicos do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc). **Metodologia:** Foram avaliados 82 isolados clínicos do CBc recuperados de pacientes atendidos em dois hospitais universitários localizados na região sudeste do Brasil. A identificação bacteriana foi realizada pelo sequenciamento do gene *recA* e pela espectrometria de massas MALDI-TOF MS. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado para ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacina, meropenem, minociclina, ticarcilina/ácido clavulânico e SXT. Os resultados do perfil de sensibilidade também foram comparados entre quatro técnicas distintas, microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão, sendo a microdiluição em caldo considerada a técnica referência. A concordância geral e por categoria de sensibilidade, assim como as taxas de erros, foram calculadas de acordo com as recomendações do CLSI M23-A3. Os genes que conferem resistência aos betalactâmicos e ao SXT foram pesquisados por meio das técnicas de PCR e sequenciamento dos respectivos amplicons. A similaridade genética entre os isolados que carreavam genes de resistência foi determinada por PFGE. O DNA plasmidial e cromossomal dos isolados foram extraídos utilizando as técnicas de Kieser e kits comerciais, respectivamente. A localização dos genes de resistência foi determinada por Southern blot e hibridização utilizando sondas específicas. O contexto genético dos genes de resistência encontrados entre os isolados do CBc foi determinado por PCR e sequenciamento das regiões conservadas 3'CS e 5'CS do integron de classe 1. A técnica de conjugação foi realizada utilizando como amostra receptora *E.coli* J53. **Resultados:** Foram identificadas, pelo sequenciamento do gene *recA, B. cenocepacia* (n=44), *B. multivorans* (n=12), *B. vietnamiensis* (n=10), *B. contaminans* (n=9) e *B. cepacia* (n=7). Comparando os resultados obtidos pelo *recA* com aqueles do MALDI-TOF MS, 100% e 75,6% dos isolados foram concordantes na identificação ao nível de gênero e espécie, respectivamente. Boas taxas de sensibilidade foram encontradas para ceftazidima (86,6%), meropenem (87,8%), minociclina (87,8%) e SXT (97,6%). A concordância geral entre as técnicas avaliadas foi maior que 93% entre microdiluição em caldo e diluição em ágar, exceto para cloranfenicol (89%). Entre a

técnica referência e os resultados obtidos pelo Etest, a concordância geral foi maior que 92%, exceto para ceftazidima (78%), SXT (80,4%) e cloranfenicol (85,3%). A concordância por categoria entre microdiluição em caldo e disco difusão foi maior que 90% para a maioria dos antimicrobianos testados, exceto para cloranfenicol (52,4%), SXT (74,4%) e levofloxacina (83,3%). Dois isolados (*B. cenocepacia* e *B. cepacia*) apresentaram resistência ao SXT e carreavam o gene *dhfr22* inserido em um integron que classe 1. Entre os isolados resistentes à ceftazidima (7,3%), em apenas um (*B. cenocepacia*) foi detectado o gene $bla_{\text{OXA-10-like}}$, também inserido em um integron de classe 1 o qual continha um gene cassete que confere resistência aos aminoglicosídeos, *aadA1.* De acordo com os resultados da hibridização, $bla_{\text{OXA-10-like}}$ estava inserido em um plasmídeo de ~70 Kb. Entretanto, não conseguimos realizar a transferência deste plasmídeo pela técnica de conjugação. Os dois isolados de *B. cenocepacia* que carreavam genes de resistência apresentaram perfil clonal semelhante pelo PFGE. **Conclusões:** O MALDI-TOF MS demonstrou ser uma excelente técnica alternativa para a identificação dos isolados do CBc. Boas taxas de sensibilidade foram observadas para os antimicrobianos usualmente empregados no tratamento das infecções causadas por estes micro-organismos. Em geral, foi observada boa concordância entre as técnicas de sensibilidade avaliadas neste estudo, exceto para as metodologias Etest e disco difusão na predição da sensibilidade ao SXT. O gene *dhfr22* demonstrou ser o principal mecanismo entre os isolados resistentes ao SXT. De acordo com os nossos conhecimentos, descrevemos, pela primeira vez, a presença do gene $bla_{\text{OXA-10-like}}$ em um isolado clínico do CBc.

Abstract

Objective: The aims of this study were to compare the methodologies for bacteria identification and antimicrobial susceptibility profile of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) clinical isolates. The detection of genes encoding resistance to trimetoprim/sulfamethoxazole (TMP/SXT) was also performed. **Methods:** A total of 82 non-duplicated Bcc clinical isolates were evaluated in this study. These isolates were collected from patients assisted at two Brazilian tertiary teaching hospitals. The bacteria identification was performed by MALDI-TOF MS and *recA* sequencing. Antimicrobial susceptibility testing (AST) was carried out for seven antimicrobial agents, ceftazidime, chloramphenicol, levofloxacin, meropenem, minocycline, ticarcillin/clavulanate acid, and TMP/SX). In addition, the performance of four antimicrobial susceptibility techniques to determine the susceptibility profile of Bcc clinical was compared. The CLSI broth microdilution (BMD) was considered as the gold standard method. The AST results obtained by agar dilution (AD), E-test and disk diffusion (DD) were compared to those of BMD. Essential and categorical agreements rates as well as error rates were calculated as recommended by CLSI M23-A3 document. Detection of antimicrobial resistance encoding genes determinants were investigated by PCR following DNA sequencing. The genetic similarity among isolates carrying determinants of resistance was determinate by PFGE. Plasmids and chromosomal DNA extraction was performed by Kieser protocol and Qiagen kits. Subsequent Southern blot and hybridization with a specific probe was performed using the *DIG DNA Labeling and Detection Kit*. Conjugation experiments were evaluated using azide-resistant *E.coli* J53. In addition, the genetic environment of detected genes was determined by PCR followed by sequencing using specific primers. **Results:** A total of 82 non-duplicated Bcc clinical isolates identified by *recA* sequencing as *B. cenocepacia* (n=44), *B. multivorans* (n=12), *B. vietnamiensis* (n=10), *B. contaminans* (n=9) and *B. cepacia* (n=7). Comparing the results by *recA* sequencing with those obtained by MALDI-TOF MS, 100% and 75,6% of the isolates were agreement to the bacterial genus and species identification, respectively. Good susceptibility rates were found to ceftazidime (86.6%), meropenem (87.8%), minociclina (87.8%) and TMP/SXT (97.6%). Essential agreement rates (±1-$\log_2$ dilution) were ≥ 93% between BMD and AD for most antimicrobial agents tested, except for chloramphenicol

(89%). The E-test results compared to those of the reference methodology (BMD) showed essential agreement rates ≥92%, except for ceftazidime (78%), TMP/SXT (80.4%) and chloramphenicol (85.3%). Categorical agreement rates between BMD and DD were ≥90% for the CLSI preconized antimicrobials for testing, except for chloramphenicol (52.4%), TMP/SXT (74.4%), and levofloxacin (83.3%). Two isolates (*B. cenocepacia* and *B. cepacia*) were resistant to TMP/SXT and carried the *dhfr-22* gene, which was inserted into a small class 1 integron as a single gene cassette. Only six (7.3%) isolates were resistant to ceftazidime (MIC_{50}, 4 µg/mL), and among them, the $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ was detected in a single *B. cenocepacia* isolate. The OXA-10-like-producing *B. cenocepacia* isolate was susceptible only to meropenem (MIC, 0.06 µg/mL) and TMP/SXT (MIC, 1 µg/mL) and was inserted into a class 1 integron which also carrying the gene cassette that confer resistance to aminoglycosides, *aadA1*. The genetic similarity among the *B. cenocepacia* isolates that carrying resistance genes showed a similar pattern by PFGE. According to the hybridization results, the *dhfr-22* gene was located into the chromosome of both isolates resistance to SXT, while the $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ was inserted into a ~70kb plasmid. However, transfer the $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ gene failed despite many repetitive attempts. No other acquired beta-lactamase encoding genes were detected in this collection. **Conclusion:** Although the *recA* sequencing remains the gold standard technique, the MALDI-TOF MS is a good alternative methodology to identify the Bcc clinical isolates. High susceptibility rates to the antimicrobials agents usually employed for treatment of Bcc infections were observed. In general, a good correlation was obtained among the four methodologies for testing the antimicrobial agents for CLSI, except for TMP/SXT by E-test and DD. The *dhfr-22* gene represents the main mechanism of resistance to TMP/SXT among the Bcc studied isolates. In addition, we firstly described the presence of an oxacillinase encoding $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ gene in a Bcc clinical isolate.

1 Introdução

Fibrose cística (FC) é uma doença hereditária, comumente letal, mais frequente em caucasianos. A transmissão da FC é do tipo autossômico recessivo, cujo gene codifica uma proteína de mesmo nome, denominada CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), responsável pela regulação do transporte iônico de cloro e de sódio através da membrana celular e, consequentemente, pela manutenção do equilíbrio iônico e osmótico das células (Havermans *et al.*, 2013). A prevalência da doença varia de acordo com a localização geográfica. Estima-se que cerca de 70.000 a 100.000 pessoas são acometidas pela FC no mundo. No Brasil, a população de fibrocísticos na região sul do país é semelhante ao descrito na região central da Europa. Em outras regiões, a incidência diminui para cerca de 1 em cada 10.000 nascidos vivos (Faucz *et al.*, 2010).

Pseudomonas aeruginosa é o principal patógeno associado a infecções em pacientes fibrocísticos. Entretanto, nos últimos anos, espécies pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) tornaram-se importantes patógenos causando infecções em pacientes com FC e imunocomprometidos. Além disso, as espécies do CBc são consideradas a principal causa de mortalidade por infecções bacterianas em pacientes portadores da doença granulomatosa crônica (CDG). Esta doença, de base genética, caracteriza-se pela inativação da cadeia de *nicotinamide dinucleotide phosphate-oxidase* (NADPH). Pacientes com esta doença apresentam infecções bacterianas e fúngicas recorrentes, acompanhadas por inflamações e formação de granulomas (Porter & Goldberg, 2011).

O CBc consiste em um grupo de 18 espécies geneticamente relacionadas entre si, sendo *B. cenocepacia* e *B. multivorans* as mais frequentemente encontradas no mundo. A

primeira descrição de *B. cepacia* foi feita há mais de 60 anos a partir do estudo que avaliou o apodrecimento de bulbos de cebola. Posteriormente, esta espécie foi descrita como importante patógeno pulmonar oportunista, responsável por causar um quadro de choque séptico denominado "síndrome cepacia" (Mahenthiralingam *et al.*, 2008; Peeters *et al.* 2013).

Acredita-se que a patogenicidade das espécies do CBc esteja atribuída à sua capacidade de crescer formando biofilmes e de invadir e de sobreviver no interior de células epiteliais. Estudos realizados com cepas do CBc recuperadas de biofilmes mostraram que as mesmas apresentavam-se mais resistentes à ceftazidima e à ciprofloxacina quando comparadas às cepas planctônicas (Desai *et al.*, 1998). A composição do lipopolissacarídeo (LPS), um importante fator de virulência, é diferente nas espécies do CBc, quando comparada com outras bactérias Gram negativas. A quantidade de fosfato no núcleo oligossacarídico destas espécies é menor que outras bactérias Gram negativas, sendo este LPS mais endotóxico que o LPS produzido por *P. aeruginosa,* por exemplo. Além disso, a presença de moléculas de 4-amino-arabinose associadas aos resíduos de fosfato no lipídeo A é responsável pela resistência intrínseca deste gênero aos antimicrobianos peptídeos catiônicos, incluindo as polimixinas. Entretanto, acredita-se que o efluxo ativo nestas bactérias seja o mecanismo mais importante de resistência às polimixinas (Loutet &Valvano, 2010; Bazzini *et al.*, 2011). Além disso, as espécies do CBc são intrinsecamente resistentes a outros antimicrobianos além das polimixinas, incluindo os aminoglicosídeos e alguns betalactâmicos (Mahenthiralingam *et al.*, 2008).

A patogenicidade, a virulência e a resistência aos antimicrobianos apresentada por estas espécies são características que influenciam diretamente no tratamento das infecções causadas por CBc. Trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) é a opção terapêutica de

escolha, porém, terapias combinadas envolvendo a associação de meropenem ou ceftazidima com aminoglicosídeos tem se mostrado eficazes contra cepas do CBc resistentes ao SXT (Avgeri *et al.*, 2009).

Não é por acaso que foi necessário ser criado um complexo para agrupar as 18 espécies de *Burkholderia.* Realmente, são espécies complexas que, ao mesmo tempo em que compartilham características tão peculiares entre si, apresentam comportamento clínico e epidemiológico diversificado. E devido a sua fascinante complexidade, este estudo teve como objetivo avaliar as diferentes técnicas para identificação das espécies do CBc e a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos recomendadas para o uso clínico. Também foram avaliados os mecanismos de resistência ao SXT em isolados clínicos do CBc recuperados de dois hospitais brasileiros.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a identificação, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, a similaridade genética e os mecanismos de resistência ao SXT entre os isolados clínicos do CBc recuperados de pacientes atendidos em dois hospitais universitários localizados na região sudeste do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a identificação das espécies do CBc pelas metodologias de sequenciamento do gene *recA* e MALDI-TOF MS;

- Comparar os resultados obtidos pelas metodologias de identificação bacteriana utilizadas;

- Determinar e comparar o perfil de sensibilidade destes isolados bacterianos por meio de quatro técnicas: microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão;

- Pesquisar a presença de genes que codificam a resistência aos betalactâmicos e ao SXT;

- Avaliar a similaridade genética dos isolados do CBc resistentes que carreavam genes de resistência aos betalactâmicos e ao SXT;

- Determinar a localização, a transferência e o contexto genético do determinante de resistência ao SXT.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Histórico e taxonomia do gênero *Burkholderia*

Nas últimas décadas, a ascensão e o aprimoramento das técnicas de biologia e análise taxonômica molecular têm desempenhado um papel crucial na classificação e rearranjo da nomenclatura de diferentes gêneros bacterianos, envolvendo, também, a criação de novos gêneros. Estudos baseados na homologia de grupos de rRNA permitiram a revisão gradual da classificação do gênero *Pseudomonas* em diversos momentos nas últimas décadas (Palleroni *et al.*, 1973, Kersters *et al.*, 1996, Anzai *et al.*, 2000). Enquanto o nome *Pseudomonas* ficou associado ao grupo de homologia do rRNA I, Yabuuchi e colaboradores (1992), baseado na análise de sequências de *16sRNA,* da hibridização de DNA-DNA, de proteínas de parede celular e da caracterização bioquímica e fenotípica, reclassificaram seis espécies pertencentes ao grupo de homologia do rRNA II (*P. cepacia, P. solanacearum, P. gladioli, P. mallei, P. pseudomallei* e *P. caryophylli*) para um novo gênero, denominado *Burkholderia*. O nome dado ao gênero foi em homenagem a Walter H. Burkholder (Figura 3.1) que descreveu, em 1949, em Nova Iorque, *P. cepacia* como importante fitopatógeno responsável pelo apodrecimento dos bulbos de cebola (Burkholder, 1950). Desde a atribuição deste novo gênero, sua taxonomia tem sofrido mudanças e o aumento do interesse pelo estudo das burkholderias tem levado à descrição cada vez maior de novas espécies. Até o momento, 88

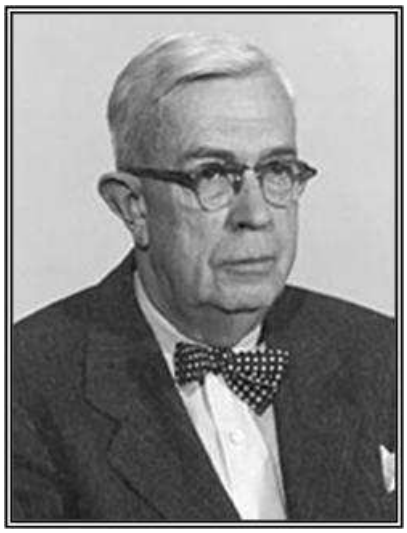


Figura 3.1 Walter Hagemeyer Burkholder (1891–1983), fitopatologista americano (http://www.apsnet.org/).

espécies foram incluídas no gênero *Burkholderia* (http://www.bacterio.net/burkholderia.html), distribuídas em vários nichos ecológicos.

Na década de 90, pesquisadores começaram a observar uma heterogeneidade evidente entre as espécies até então identificadas como *B. cepacia* isoladas de diferentes nichos ecológicos. Baseado nesta observação, Vandamme e colaboradores (1997) perceberam que era necessário um esquema de identificação confiável especificamente para estes isolados, fato este que levou estes pesquisadores a realizarem um estudo taxonômico. Este estudo revelou que isolados identificados como *B. cepacia* pertenciam, na verdade, a distintos genomovares[I], os quais foram agrupados coletivamente em um sistema taxonômico denominado de Complexo[II] *Burkholderia cepacia* (CBc). Inicialmente, cinco genomovares distintos foram descritos pelo estudo de Vandamme e colaboradores (1997). Trabalhos realizados posteriormente revelaram uma heterogeneidade ainda maior dentro do genomovar III (Tabela 3.1). A análise da sequência do gene *recA* e os resultados obtidos pelas técnicas de hibridização de DNA revelaram a presença de quatro linhagens distintas dentro deste genomovar. Portanto, entre as espécies de *B. cenocepacia,* podemos encontrar diferentes linhagens, as quais são denominadas de *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. cenocepacia* IIIC e *B. cenocepacia* IIID (Mahenthiralingam *et al.*, 2000; Vandamme *et al.*, 2003). Atualmente, 18 espécies compõem o CBc (Tabela 3.1). Estas espécies compartilham entre si altos níveis de similaridade genética para o *16S rRNA* (97,5% a 100%) e para o *recA* (94% a 95%) e moderadas taxas de similaridade de hibridização do DNA-DNA (30% a 60%) (Vandamme *et al.*, 1997; Coenye & Vandamme, 2003).

[I] O termo "genomovar" foi introduzido para designar grupos de cepas fenotipicamente semelhantes, mas genotipicamente distintas. Estes genomovares compartilham baixo nível de hibridação do DNA, representando espécies distintas as quais, porém, um nome binomial oficial não é proposto enquanto testes de diagnósticos diferenciais não estejam disponíveis (Vandamme *et al.*, 1997).

[II] O termo "complexo" surgiu na literatura no início da era genômica. O significado pretendido era agrupar os organismos pertencentes a espécies diferentes, mas que exibiam padrões semelhantes de acordo com suas características fenotípicas, morfológicas e/ou fisiológicas (Almeida & Araújo, 2013).

Tabela 3.1 Descrição das espécies e genomovares pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia.*

Espécie	Genomovar	Ano da identificação e/ou denominação da espécie	Fonte de isolamento (clínico)	Referência
B. cepacia	I	1950/1997	FC, soluções médicas	Burkholder, 1950; Vandamme *et al.*, 1997
B. multivorans	II	1997	FC, DGC, não-FC	Vandamme *et al.*, 1997
B. cenocepacia	IIIA	1997/2000	FC	Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralignam *et al.*, 2000
	IIIB	2000	FC	Mahenthiralignam *et al.*, 2000
	IIIC	2003	não relatado	Vandamme *et al.*, 2003
	IIID	2003	FC e não-FC	Vandamme *et al.*, 2003
B. stabilis	IV	1997/2000	FC, equipamentos hospitalares	Vandamme *et al.*, 1997; Vandamme *et al.*, 2000
B. vietnamiensis	V	1995/1997	FC	Gillis *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1997
B. dolosa	VI	2001/2004	FC	Coenye *et al.*, 2001a; Vermis *et al.*, 2003
B. ambifaria	VII	2001	FC	Coenye *et al.*, 2001b
B. anthina	VIII	2002	FC	Vandamme *et al.*, 2002
B. pyrrocinia	IX	2002	FC e não-FC	Vandamme *et al.*, 2002
B. ubonensis	X	2000/2008	Infecções nosocomiais	Yabuuchi *et al.*, 2000; Vanlaere *et al.*, 2008a
B. latens	-	2008	FC	Vanlaere *et al.*, 2008a
B. difusa	-	2008	FC, não-FC e equipamentos hospitalares	Vanlaere *et al.*, 2008a
B. arboris	-	2008	FC e não-FC	Vanlaere *et al.*, 2008a
B. seminalis	-	2008	FC, infecções nosocomiais	Vanlaere *et al.*, 2008a
B. metallica	-	2008	FC	Vanlaere *et al.*, 2008a
B. contaminans	-	2009	FC, não-FC, equipamentos hospitalares	Vanlaere *et al.*, 2009
B. lata	-	2009	FC e não-FC	Vanlaere *et al.*, 2009
B. pseudomultivorans	-	2013	FC	Peeters *et al.*, 2013

Adaptado de LiPuma, 2011; Vial *et al.*, 2011. FC, fibrose cística; DGC, doença granulomatosa crônica.

3.2 Características do gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* atualmente está classificado no filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria,* ordem *Burkholderiales* e família *Burkholderiaceae.* Na mesma família, estão incluídos, ainda, *Cupriavidus* spp., *Lautropia* spp., *Limnobacter* spp., *Pandoraea* spp., *Paucimonas* spp., *Polynucleobacter* spp., *Ralstonia* spp. e *Thermothrix* spp. (Garrity *et al.*, 2005). As espécies do gênero *Burkholderia* são bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose (BGN-NF), de formato reto ou ligeiramente curvados, medindo 1 µm a 5 µm de comprimento e 0,5 µm a 1 µm de largura. Estas bactérias são aeróbias, catalase positiva e a maioria destas possui a prova da oxidase positiva. Não formam esporos e são móveis pela presença de um ou mais flagelos polares. Assim como *Stenotrophomonas maltophilia*, as espécies do CBc são os únicos BGN-NF capazes de descarboxilar a lisina. Possuem uma ampla versatilidade nutricional que contribui para a sua capacidade de sobreviver em ambientes extremos e diversificados. A maioria das espécies é mesófila, com temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 37°C; porém, algumas espécies podem crescer a 42°C (Tabela 3.2) (LiPuma *et al.*, 2011).

As espécies do CBc estão distribuídas nos mais diversos nichos ecológicos, como solo, água, rizosfera e plantas (Vial *et al.*, 2011). Sobrevivem em simbiose com vários micro-organismos, mas podem ser patogênicos em outros (Loutet & Valvano, 2010). *Burkholderia* spp. possui a capacidade de degradar poluentes, fixar nitrogênio e solubilizar metais, facilitando o uso desses compostos para o seu hospedeiro. Além disso, as espécies deste gênero podem produzir compostos que protegem o hospedeiro contra a ação de fungos e bactérias patogênicas, protozoários e nematóides, podendo, ainda, induzir mecanismos de defesa da planta hospedeira. É descrito ainda como agente promotor do crescimento em plantas e endossimbiontes de fungos e insetos. Algumas espécies também estão envolvidas

na biotecnologia aplicada a agronomia, como a produção de substâncias antifúngicas para medicina veterinária e fins agrícolas e a formação de fitormônios. Por outro lado, *Burkholderia* spp. é descrito, também, como importante fitopatógeno e patógeno de animais (Vandamme *et al.*, 2007; Compant *et al.*, 2008; Loutet & Valvano, 2010; Vial *et al.*, 2011; Santini *et al.*, 2013).

Clinicamente, as espécies do CBc estão associadas principalmente com infecções em pacientes com FC e com DGC, assim como com infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados. O CBc também tem sido descrito como patógeno responsável por infecções que se desenvolvem após hospitalização em pacientes com atendimento ambulatorial, tais como, endoftalmite póscirúrgica, pneumonia adquirida na comunidade e endocardite. Em pacientes hospitalizados, as principais infecções causadas por estes patógenos são pneumonia, infecções do trato urinário e corrente sanguínea (Avgeri *et al.*, 2009). Diferentemente do cenário observado para *B. pseudomallei,* espécie causadora da melioidosis e transmitida aos seres humanos e animais por meio do contato direto com a fonte contaminada (água e/ou solo) (Schweizer, 2012), o papel do meio ambiente na aquisição da infecção ou na transmissão de cepas do CBc tem sido pouco estudado. Entretanto, há relatos de cepas idênticas do CBc isoladas do ambiente que também foram encontradas infectando pacientes com FC (Avgeri *et al.*, 2009).

3.3 Cultura e identificação

O gênero *Burkholderia*, incluindo as espécies pertencentes ao CBc, são bactérias de crescimento lento (48h a 72h) (LiPuma *et al.*, 2011), sendo que o seu isolamento a partir de amostras clínicas pode ser dificultado ou até mesmo impedido pela presença de outros micro-organismos de crescimento mais rápido como, por exemplo, *P. aeruginosa* (Bittar & Rolain, 2010). Embora cresçam satisfatoriamente em meios de cultura utilizados em

laboratórios de microbiologia clínica, tais como, ágar MacConkey, ágar sangue e ágar chocolate, meios de cultura seletivos foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar a chance de recuperação destes micro-organismos a partir das amostras clínicas. Geralmente, estes meios de cultura possuem corantes, valores baixos de pH e antimicrobianos, características que os tornam seletivos e favorecem o crescimento de *Burkholderia* spp. Entretanto, é preciso cautela ao utilizar estes meios seletivos quanto à presença de outros BGN-NF que podem coexistir na amostra clínica e também terem seu crescimento favorecido nestes meios (Bittar & Rolain, 2010).

As espécies pertencentes ao CBc são, fenotipicamente, muito similares entre si, sendo difícil a sua diferenciação mesmo quando são utilizados painéis com uma ampla variedade de testes bioquímicos convencionais (LiPuma *et al.*, 2011). Os resultados gerados por estes testes podem ser conflitantes e de difícil interpretação. Não são raros os relatos de espécies do CBc erroneamente identificadas como *B. gladioli, R. pickettii, Achromobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia, Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., assim como estes gêneros bacterianos serem erroneamente identificados como CBc devido à semelhança fenotípica e genética presente entre eles (Brisse *et al.*, 2002; Bosshard *et al.*, 2006). Adicionalmente, diferentes isolados bacterianos pertencentes a uma mesma espécie do CBc podem apresentar variabilidade genética entre si. Esta diversidade pode ser atribuída ao tamanho do genoma das espécies do gênero *Burkholderia* (6 Mb a 9 Mb), rico em sequências de inserção e elementos genéticos móveis, que podem contribuir para a sua plasticidade e diversidade genética, e a capacidade de rearranjo intra-genômico. É essa enorme capacidade genética que sustenta a sua versatilidade em sobreviver em diferentes ambientes e causar doença em distintos hospedeiros. Todas as espécies também são capazes de separar o seu DNA em replicons, tornando-as ainda mais flexíveis na aquisição,

na perda e na expressão de genes. Estas características, quando expressas diferencialmente em isolados pertencentes a uma mesma espécie, podem resultar em perfis bioquímicos variáveis, dificultando ainda mais a sua correta identificação (Mahenthiralingam *et al.*, 2008; Drevinek & Mahenthiralingam, 2010; LiPuma *et al.*, 2011). Na Tabela 3.2 estão apresentadas algumas provas bioquímicas utilizadas para a identificação das espécies do CBc.

A identificação laboratorial destas espécies por meio de kits e sistemas comerciais também pode apresentar resultados errôneos devido à dificuldade na leitura das provas bioquímicas destes sistemas. Além disso, a má performance da maioria dos sistemas comerciais de identificação bacteriana pode ser atribuída ao fato de que nem todas as espécies do CBc estão incluídas nos seus respectivos bancos de dados, por serem consideradas patógenos humanos incomuns ou por terem sido descritas recentemente (Bosshard *et al.*, 2006). Um estudo conduzido na Holanda comparou os resultados dos testes moleculares para identificação de 134 isolados clínicos e ambientais do CBc com aqueles obtidos por dois sistemas comerciais, Phoenix e Vitek 2. Considerando todos os isolados do CBc, a taxa de concordância entre os sistemas comerciais e os testes moleculares foi de 50% e 53% para Phoenix e Vitek 2, respectivamente. Analisando os isolados identificados molecularmente como *B. cenocepacia,* a taxa de concordância foi maior para o sistema Phoenix (71%) que para o sistema Vitek 2. Em contrapartida, para os isolados identificados como *B. multivorans*, o sistema Vitek 2 apresentou melhor performance (89%) que o sistema Phoenix (58%). Os autores concluíram que testes moleculares são necessários para a identificação correta das espécies do CBc, uma vez que os sistemas comerciais avaliados apresentaram resultados insatisfatórios na identificação dos isolados do CBc tanto para o gênero, como para a espécie (Brisse *et al.*, 2002).

Tabela 3.2 Características bioquímicas das espécies pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia.*

Provas bioquímicas	Espécies do CBc																	
	B. ambifaria	*B. anthina*	*B. arboris*	*B. cenocepacia*	*B. cepacia*	*B. contaminans*	*B. difusa*	*B. dolosa*	*B. lata*	*B. latens*	*B. metallica*	*B. multivorans*	*B. pseudomultivorans**	*B. pyrrocinia*	*B. seminalis*	*B. stabilis*	*B. ubonensis*	*B. vietnamiensis*
Oxidase	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V
Sucrose	+	V	V	+	V	+	V	-	V	+	V	-	-	V	V	-	+	+
Nitrato	V	V	V	V	-	V	+	+	V	-	-	+	+	V	-	-	V	V
Lisina	+	V	V	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	-	+
Ornitina	-	-	+	V	V	-	-	-	V	-	-	-	-	V	V	+	-	-
Esculina	V	-	-	V	V	V	-	-	V	-	+	-	+	-	V	-	-	-
ONPG	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	NA	+	+	V	-	+
Crescimento																		
MacConkey	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
Ágar seletivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	V	V	V	V	V	V	V	+	-	+	+	+	+	V	+	-	V	+

Adaptado de LiPuma *et al.*, 2011.

* Peeters *et al.*, 2013.

+, >90% dos isolados foram positivos para a prova testada; -, < 10% dos isolados foram negativos para a prova testada; V, 10% a 90% dos isolados foram positivos para a prova testada; NA, não avaliado.

Devido à semelhança fenotípica entre as espécies do CBc e às limitações para a diferenciação destas espécies por meio de métodos diagnósticos rotineiramente utilizados, testes moleculares tem sido desenvolvidos nos últimos anos com a finalidade de aumentar a acurácia na identificação destas espécies. A maioria destes testes é baseada na técnica da PCR combinada com a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) (McDowell *et al.*, 2001). Embora menos utilizado, a análise do gene *16SrRNA* permite a identificação confiável do gênero, mas não o suficiente para distinguir isolados de espécies fortemente relacionadas (Ferri *et al.*, 2010). Por esta razão, tem sido cada vez mais frequente a pesquisa de outros genes com maior potencial discriminatório das espécies de um mesmo gênero. O *recA* tornou-se um dos mais utilizados para a identificação do CBc, uma vez que permite a distinção dos isolados ao nível de espécie (Mahenthiralingam *et al.*, 2000; Vermis *et al.*, 2002). Entretanto, outros genes espécie-específicos também foram descritos para a identificação das espécies do CBc, tais como *hisA* e *gyrB* (Tabacchioni *et al.*, 2008; Ferri *et al.*, 2010; Papaleo *et al.*, 2010), sendo alguns utilizados na identificação destas espécies diretamente da amostra clínica (escarro) (Brown & Govan, 2007). Algumas PCR multiplex têm sido desenvolvidas com o intuito de diferenciar as espécies do gênero *Burkholderia* que apresentam maior importância clínica. Entretanto, estas técnicas são capazes de diferenciar o CBc de outras espécies não pertencentes ao complexo, tais como *B. gladioli, B. mallei, B. pseudomallei* e *B. thailandensis,* porém, não diferencia as espécies dentro do CBc (Lee *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2012). Outros estudos demonstram a aplicabilidade da PCR em tempo real na identificação do CBc utilizando concomitantemente os genes *recA* e *16S rRNA* (Pimentel *et al.*, 2007). Recentemente, Baldwin e colaboradores (2005) desenvolveram um *Multilocus Sequence Typing* (MLST) para a tipagem e a identificação das espécies do CBc por meio da análise de

sete *house keeping genes* (*atpD* , ATP synthase beta chain; *gltB,* glutamate synthase large subunit; *gyrB*, DNA gyrase B; *recA,* recombinase A; *lepA;* GTP binding protein; *phaC*, acetoacetyl-CoA reductase; *trpB,* tryptophan synthase) (http://pubmlst.org/bcc/). Um estudo conduzido na Itália com 26 isolados clínicos e ambientais do CBc demonstrou que o sequenciamento do *recA* foi capaz de distinguir 65,4% dos isolados ao nível de espécie, enquanto que pela análise do MLST 88,5% das amostras avaliadas foram discriminadas (Cesarini *et al.*, 2009).

A espectrometria de massas MALDI-TOF tem ganhado grande notoriedade nos últimos anos devido à sua praticidade e ao seu baixo custo, aliado ao seu desempenho e reprodutibilidade acurados na identificação de isolados bacterianos e fúngicos (Ford & Bumham, 2013; Patel, 2013). No entanto, em alguns casos, divergências na identificação da espécie por esta metodologia tem sido notadas, devido à grande semelhança na sequência do *16SrRNA* (Wieser *et al.*, 2012; Patel, 2013). Além da identificação bacteriana, estudos demonstram que o MALDI-TOF foi capaz de identificar a atividade hidrolítica de alguns antimicrobianos, como os carbapenens, podendo indicar a presença de enzimas que conferem resistência a estes compostos (Hrabák *et al.*, 2011; Carvalhaes *et al.*, 2013).

A tradução da palavra MALDI seria o *processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz*, ou seja, a matriz é um ácido orgânico o qual fornece um próton para o processo de ionização da amostra. Ao mesmo tempo, tem a capacidade de absorver a energia emitida por um *laser,* infravermelho ou UV, e desencadear um processo de dessorção, o que possibilita a passagem intacta da amostra em estado sólido para o estado gasoso. Já a sigla TOF caracteriza *o tempo de vôo* da amostra ionizada em um tubo de vácuo até que esta atinja o detector de leitura (Lay 2001; Carvalhaes et al., 2012). Resumidamente, uma vez ionizada e dessorvida, a amostra é acelerada por um campo elétrico, provocando a

sua vaporização parcial, dentro de uma câmara de vácuo, separada em função da sua massa molecular e da sua carga. A medida da relação massa/carga (*m/z*) gera espectros de massas que são comparados com aqueles depositados no banco de dados do software do equipamento (Assis *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm avaliado a performance da metodologia de MALDI-TOF na identificação de isolados pertencentes ao CBc (Vanlaere *et al.*, 2008b; Minán *et al.*, 2009; Fernandez-Olmos *et al.*, 2012; Marko *et al.*, 2012). Um estudo conduzido na França, o qual avaliou 52 isolados clínicos do CBc, demonstrou que a taxa de concordância entre o MALDI-TOF e a metodologia padrão (sequenciamento do *16S rRNA* e/ou *recA*) foi de 83% (Degand *et al.*, 2008). Lambiase e colaboradores (2013) ao avaliarem 57 isolados clínicos do CBc recuperados de pacientes atendidos em um hospital italiano, obtiveram 100% de concordância entre o MALDI-TOF e o sequenciamento do gene *recA* para a identificação ao nível de espécie dos isolados do CBc.

3.4 Epidemiologia das infecções causadas pelas espécies do CBc

Embora sejam consideradas responsáveis por infecções em pacientes imunocomprometidos e indivíduos com DGC, as espécies do CBc emergiram como importantes patógenos causadores de infecções em pacientes com FC há mais de 30 anos (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). O primeiro relato foi feito por Isles e colaboradores (1984), que descreveram o isolamento de uma cepa virulenta de *P. cepacia,* como era denominada até então, do trato respiratório de pacientes com FC no Canadá. A infecção causada por esta bactéria é caracterizada por um rápido declínio da função pulmonar e deterioramento clínico e, na maioria das vezes, apresenta desfecho fatal, que ficou caracterizado como "síndrome cepacia". Esta síndrome é caracterizada por um tipo de infecção invasiva e sistêmica, que não é observada em outros patógenos que causam infecção em pacientes

fibrocísticos, tais como *P. aeruginosa* (Govan *et al.*, 1996). Pacientes diagnosticados com a "síndrome cepacia" geralmente apresentam febre alta, severo e progressivo déficit da função pulmonar, bacteremia e altas taxas de sedimentação eritrocitária. As taxas de mortalidade em pacientes crônicos variam de 20% a 35%, podendo chegar a 90% nos casos de infecções por *P. aeruginosa* (Isles *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 2001; Mahenthiralingam &Vandamme, 2005a). Além disso, quando estes pacientes tornam-se colonizados e/ou infectados por espécies do CBc, a possibilidade de serem submetidos a um transplante pulmonar é praticamente excluída (Olland *et al.* 2011). Embora o impacto clínico negativo das infecções em pacientes com FC seja frequentemente associado à *B. cenocepacia*, estudos demonstram que outras espécies do CBc, tais como *B. multivorans* e *B. dolosa,* têm sido também relatas como agentes causadores da "síndrome cepacia" (Waters, 2012).

Existe a evidência de que certas espécies do CBc podem ser substituídas por outras do complexo durante o curso de uma infecção crônica (Mahenthiralingam *et al.*, 2008; Waters, 2012). Um estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2005) avaliou a presença de diferentes espécies do complexo infectando um único paciente durante quatro anos. Dentre as 15 amostras clínicas de escarro coletadas durante o período do estudo, observou-se que o paciente monitorado era cronicamente infectado por *B. vietnamiensis* (12/15). Em três episódios, o paciente apresentou infecção ou colonização transitória por *B. cenocepacia* (n=2) e *B. multivorans* (n=1). Os autores também demonstraram a predominância de um perfil de RAPD nas cepas de *B. vietnamiensis*, que não foi observado nas demais espécies isoladas. Um outro estudo realizado na cidade de Recife, em 2002, também observou este mesmo fato (Magalhães *et al.*, 2002). Em uma das internações de um paciente com FC, foram isoladas *P. aeruginosa, B. cenocepacia* e *B. vietamiensis.* Seis meses depois, este mesmo paciente retornou ao hospital com os mesmos sintomas de bronquite, e

P. aeruginosa e *B. cenocepacia* foram novamente isoladas. Apesar de não ter sido realizada a análise da similaridade genética destes isolados, este estudo sugere que *B. cenocepacia* persistiu colonizando este indivíduo, mesmo após a administração da terapia antimicrobiana.

Em meados da década de 90, começaram a surgir vários relatos de surtos causados por uma cepa de *B. cenocepacia,* posteriormente denominada de J2315, em pacientes fibrocísticos do Reino Unido e Canadá. A cepa J2315 representa uma das mais importantes linhagens de *B. cenocepacia* distribuída por várias partes do mundo e também conhecida como ET12, *electrophoresis type 12* ou Edinburgh/Toronto12. Esta cepa se distingue das demais linhagens de *B. cenocepacia* devido o seu grande potencial virulento. Geralmente, expressam mecanismos de virulência, tais como o *cabe pillus*, codificado pelo gene *cblA*, uma estrutura que confere a adesão da bactéria à mucina produzida pelas células epiteliais do trato respiratório de pacientes com FC, e o fator de transmissibilidade, denominado BCESM (*Burkholderia cepacia Epidemic Strain Marker*), codificado pelo gene *esmR* e que está envolvido na regulação do *quorum sensing* (Baldwin *et al.*, 2004; Mahenthiralingam *et al.*, 2008; Turton *et al.*, 2009; Drevinek & Mahenthiralingam, 2010). Govan e colaboradores (1996) sugeriram que a mobilidade populacional entre americanos e europeus tenha contribuído fortemente para a disseminação do clone ET12. Estudos epidemiológicos e moleculares realizados posteriormente indicaram que o ET12 pode ter uma relação clonal com os primeiros relatos dos surtos documentados em Ontário, Canadá (Isles *et al.*, 1984), uma vez que as infecções causadas por espécies do CBc em pacientes com FC nesta região foi quase que inteiramente causada pelo ET12. Sendo assim, é provável que os isolados descritos por Isles e colaboradores (1984) em 1971 pertencessem ao clone ET12 que já circulava nesta população (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). A análise MLST também

demonstrou que isolados pertencentes ao clone ET12 apresentam pelo menos quatro STs (*sequence types*) relacionados, os quais se diferenciam apenas em um dos sete *loci*. ST29, ST30 e ST31 foram recuperados pacientes com FC oriundos do Canadá, enquanto ST28 foi somente observado em pacientes com FC no Reino Unido (Baldwin *et al.*, 2005).

Outros clones epidêmicos foram descritos, geralmente associados à *B. cenocepacia* do grupo IIIA. Os clones RAPD tipos 1, 2, 4 e 6 foram descritos nesta espécie em pacientes com FC no Canadá (Mahenthiralingam *et al.*, 2000; Mahenthiralingam *et al.*, 2001; Speert *et al.*, 2002). O clone CZI (*Czech epidemic clone*), pertencente ao ST32, foi descrito na Europa em 2005 em cepas de *B. cenocepacia* IIIA (Drevinek *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, os clones PHDC (*Columbia Philadelphia-District*) e *Mid-West* também foram identificados em isolados clínicos de *B. cenocepacia* subgrupo IIIB (Chen *et al.*, 2001; Campana *et al.*, 2005). Estudos posteriores revelaram que o clone PHDC também estava presente em isolados clínicos de *B. cenocepacia* de pacientes com FC na Europa (Coenye *et al.*, 2004).

A prevalência e a distribuição das espécies do CBc são dependentes da localização geográfica (LiPuma, 2010) (Figura 3.2). *B. cenocepacia* é a espécie mais prevalente em todo o mundo, sendo os subgrupos IIIA e IIIB os mais relevantes clinicamente, pelos motivos descritos no parágrafo anterior (Mahenthiralingam *et al.*, 2000; Drevinek & Mahenthiralingam, 2010, LiPuma, 2010). Estudos realizados na América do Norte, Europa e Austrália demonstraram que *B. cenocepacia* é a espécie predominante, sendo reportada em 46% a 90% dos pacientes infectados (Campana *et al.*, 2005; Reik *et al.*, 2005; Kidd *et al.*, 2008). Aproximadamente 3% dos pacientes com FC nos Estados Unidos desenvolvem infecções causadas pelas espécies do CBc, sendo *B. cenocepacia* a espécie mais frequentemente reportada (45%), seguida por *B. multivorans* (40%), *B. vietnamiensis* (6%), *B. dolosa* (4%) e *B. cepacia* (3%) (Waters, 2012). O genomovar IIIB tem sido reportado como o

mais prevalente nos Estados Unidos, alcançando índices de até 72,8%, enquanto o genomovar IIIA foi frequente em apenas 30% das amostras (Lynch *et al.*, 2009) (Figura 3.2).

Nos últimos anos, países da Europa tem descrito um aumento no isolamento de *B. multivorans* causando infecções em pacientes com FC (Turton *et al.*, 2003; Govan *et al.*, 2007; Baldwin *et al.*, 2008; Norskov-Lauritsen *et al.*, 2010; Hanulik *et al.*, 2013; Hanulik *et al.*, 2014). Diferentes situações foram identificadas em Lisboa, onde a contaminação de soluções salinas utilizadas na terapia inalatória resultou em uma predominância de *B. cepacia* (Cunha *et al.*, 2007), e na França, onde foi descrito um pequeno aumento do isolamento de *B. multivorans* (52%) em relação à *B. cenocepacia* (45%) (Brisse *et al.*, 2004). *B. cepacia* também apresenta alta prevalência na Austrália e Portugal (aproximadamente 30%) (Leitão *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2008). Um estudo conduzido na Eslováquia demonstrou prevalência de 54% de *B. stabilis* entre pacientes com FC (Drevinek *et al.*, 2003). Khalish e colaboradores (2006), por sua vez, observaram que infecções causadas por *B. dolosa* em pacientes fibrocísticos atendidos em um hospital nos Estados Unidos estavam associadas à elevada perda da função pulmonar e diminuição significativa da sobrevivência desses pacientes. Nos últimos cinco anos, *B. contaminans* tem ganhado maior notoriedade devido aos relatos de surtos causados por esta espécie na Alemanha, Argentina, Espanha e Estados Unidos (Martin *et al.*, 2011; Barrado *et al.*, 2013; Martina *et al.*, 2013; Peterson *et al.*, 2013). Enquanto que o subgrupo IIID já foi isolado em amostras de pacientes fibrocísticos atendidos em um centro de referência em Gênova, Itália (Manno *et al.*, 2004), até o momento, não existem relatos do isolamento de *B. cenocepacia* subgrupo IIIC em amostras clínicas (Figura 3.2).

Embora dados sobre a epidemiologia das infecções causadas pelas espécies do CBc no Brasil sejam escassos, *B. cenocepacia* é a espécie mais frequentemente encontrada em isolados clínicos de pacientes com FC, com índices que variaram entre 53% a 71%, e *B.*

vietnamiensis e *B. multivorans* ocupam a segunda posição (Silva Filho *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011; Pretto *et al.*, 2013). Em um estudo realizado na cidade de Recife, o qual avaliou pacientes com e sem FC, foi observado que *B. cenocepacia* IIIA (71,8%) e *B. cepacia* (15,4%) foram as espécies mais frequentes no grupo dos pacientes sem FC, enquanto que no outro grupo, *B. cenocepacia* IIIA (18,2%) e *B. vietnamiensis* (18,2%) foram as espécies mais frequentemente isoladas (Detsika *et al.*, 2003). Interessantemente, nesse estudo, seis dos onze isolados do CBc do grupo dos pacientes fibrocísticos não foram identificados pela técnica de sequenciamento dos genes *recA* e *16SrRNA*. Por outro lado, ainda foi possível identificar mais duas espécies do complexo no grupo dos pacientes sem FC, *B. vietnamiensis* (7,7%) e *B. multivorans* (5,1%) (Detsika *et al.*, 2003) (Figura 3.2).

Diversos surtos causados pelo CBc envolvendo fontes ambientais tem sido descritos. Entre essas fontes, destacam-se a contaminação da água, de medicamentos, de soluções nebulizadoras, de soluções assépticas, de solução de heparina, de soluções bucais e de solução hidratante corporal (Abe *et al.*, 2007; Alvarez-Lerma *et al.*, 2008; Romero-Gómez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010; Lucero *et al.*, 2011). A maioria dos casos de CBc no Brasil está relacionada, também, a surtos ocorridos principalmente em unidades de hemodiálise. Souza e colaboradores (2004) descreveram um surto causado pela contaminação da água utilizada na osmose reversa dos equipamentos de hemodiálise em uma unidade hospitalar na cidade de São Paulo. A maioria das espécies encontradas naquele estudo pertenciam ao CBc (43%) seguido por *S. maltophilia* (15%). A contaminação das membranas utilizadas na osmose reversa também foi responsável por um surto causado pelo CBc em pacientes com insuficiência renal crônica em uma unidade de hemodiálise na cidade de Recife, sendo identificadas as espécies *B. cenocepacia* e *B. vietnamiensis*

(Magalhães *et al.*, 2003). Um estudo *case crossover* entre três hospitais no Rio de Janeiro demonstrou a associação entre o uso da bromoprida e da dipirona e casos de infecção de corrente sanguínea causados pelo CBc. A análise do PFGE demonstrou a presença de seis clones, sendo um predominante e circulante nos três hospitais (Martins *et al.*, 2010). Outros surtos também foram descritos no Rio de Janeiro e em São Paulo (Moreira *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2013). O primeiro ocorreu em uma UTI neonatal e estava associado à contaminação da água utilizada para o preparo de soluções intravenosas (Moreira *et al.*, 2005), e o segundo ocorreu em pacientes que foram submetidos à cirurgia urológica e foram contaminados com a solução de manitol utilizada durante o procedimento (Dias *et al.*, 2013). Em nenhum destes casos a identificação em nível de espécie foi realizada. Boszczowski e colaboradores (2014) avaliaram um surto por CBc ocorrido em 2008 em uma unidade de transplante de medula óssea em São Paulo. Dentre os 24 casos identificados, *B. multivorans* estava presente em 14 pacientes, sendo 12 deles pentencentes a um único clone.

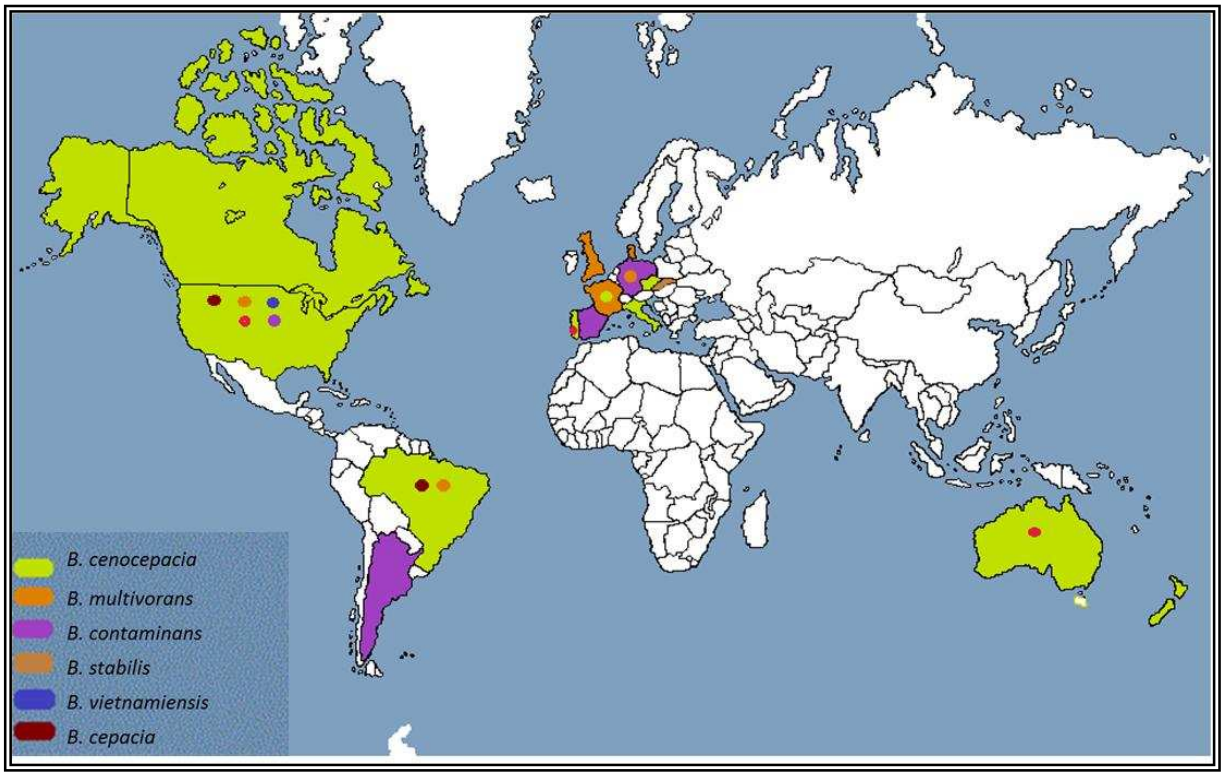


Figura 3.2 Distribuição epidemiológica mundial dos isolados do CBc.

3.5 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Entre os mecanismos de resistência aos antimicrobianos mais comumente encontrados nas espécies do CBc destacam-se a produção de enzimas modificadoras ou que degradam antimicrobianos, alteração no sítio alvo do antimicrobiano, a expressão de sistemas de efluxo e as alterações na permeabilidade celular (Parr *et al.*, 1987; Mahenthiralingam *et al.*, 2005b; Drevinek & Mahenthiralingam, 2010).

3.5.1 Betalactamase cromossomal Pen

A resistência a betalactâmicos observada nas espécies do CBc tem sido relacionada à expressão de uma betalactamase cromossomal e induzível denominada PenA, descrita em 1988 em um isolado de *P. cepacia* nos Estados Unidos (Prince *et al.*, 1988, Proença *et al.*, 1993). Com os estudos taxonômicos realizados neste grupo de bactérias, esta espécie foi posteriormente reclassificada como *B. multivorans* (Trépanier *et al.*, 1997). PenA está classificada na classe molecular A de Ambler e no grupo 4 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Trépanier *et al.*, 1997; Bush & Jacoby, 2010). Apresenta espectro de atividade limitado, conferindo altos níveis de resistência às benzilpenicilinas, às carbenicilinas, à cefuroxima, e redução da sensibilidade ao aztreonam e à piperacilina. Entretanto, não confere resistência ao imipenem, distinguindo, assim, das serino betalactamases Sme, NmcA, NOR e IMI. Esta penicilinase não é inibida pelo ácido clavulânico. (Trépanier *et al.*, 1997; Poirel *et al.*, 2009). A comparação da sequência de aminoácidos revelou que PenA está relacionada com as enzimas BlaI, K1, CTX-M-1 e CTX-M-2, Bla (CdiA) isoladas de *Yersinia enterocolitica, de Salmonella typhimurium,* de *Escherichia coli* e de *Citrobacter diversus*, respectivamente, apresentando cerca de 53% ou mais de identidade entre elas (Trépanier *et al.*, 1997).

A frequência dos genes que codificam PenA entre amostras clínicas do CBc ainda não foi amplamente estudada. Embora tenha sido avaliado um número restrito de amostras (n=12), um estudo conduzido na França conseguiu identificar cinco variantes da enzima Pen entre espécies do gênero *Burkholderia.* PenB1-like foi identificada em 11 isolados pertencentes ao CBc. *B. stabilis, B. pyrrocinia* e *B. vietnamiensis* coproduziam também PenC1, PenD1 e PenE-like, respectivamente. Os autores sugeriram, ainda, com base em uma análise *in silico*, a nomenclatura de PenF para *B. ambifaria,* PenG para *B. dolosa,* PenH para *B. ubonensis*, PenI para *B. pseudomallei,* PenJ para *B. oklahomensis*, PenK para *B. mallei,* e, finalmente, PenL para *B. thailandensis.* Audaciosamente, o grupo concluiu que a identificação de diferentes variantes do gene *pen* poderia ser utilizada para a identificação de diferentes espécies de *Burkholderia* (Poirel *et al.*, 2009). Estudos que enfoquem na identificação desta enzima e suas variantes são necessários para a confirmação destes dados.

3.5.2 Sistemas de efluxo

Nos últimos anos, sistemas de efluxo pertencentes à família RND (*Resistance-Nodulation-Division*), família esta que possui a maior relevância clínica e desempenha um importante papel na resistência intrínseca e adquirida em diversos Gram negativos, tem sido parcialmente determinados em espécies do CBc (Bazzini *et al.*, 2011; Fernández & Hancock, 2012).

Até o momento, foram descritos 16 operons que codificam sistemas de efluxo da família RND em *B. cenocepacia* e designados como RND-1 a RND-16 (Bazzini *et al.*, 2011) (Figura 3.3). O envolvimento de alguns destes sistemas na resistência aos antimicrobianos já foi demonstrada, como no caso do sistema CeoAB-OpcM, que confere resistência ao cloranfenicol, à ciprofloxacina e ao trimetoprim (Nair *et al.* 2004; Fernández & Hancock,

2012). Estudos realizados com mutantes de *B. cenocepacia* J2315 evidenciaram que o sistema CeoAB-OpcM está envolvido com a resistência ao SXT (Sass *et al.*, 2011). A resistência aos aminoglicosídeos em *B. vietnamensis* parece ser induzida pela presença do sistema AmrAB-OprM, também encontrado em *B. pseudomallei,* e que também confere resistência aos aminoglicosídeos e aos macrolídeos nesta espécie (Jassen *et al.*, 2014). Outros estudos realizados com mutantes de *B. cenocepacia* demonstraram que o operon que regula RND-3 parece estar envolvido na resistência aos antimicrobianos, demonstrando especificidade pelo ácido nalidíxico. Ainda neste estudo, foi observado que a deleção de RND-4 sugere o envolvimento deste sistema na resistência intrínseca aos antimicrobianos. A presença de clorexidina induziu a expressão de RDN-8, assim como observado para o sistema MexCD-OprJ em *P. aeruginosa*, que é induzido pela presença deste desinfetante. E, por último, RND-9 parece estar parcialmente envolvido no efluxo ativo de antimicrobianos (Buroni *et al.*2009; Saas *et al.*, 2011; Bazzini *et al.* 2011).

3.6 Tratamento das infecções causadas por espécies do CBc

As espécies do CBc são intrinsecamente resistentes a múltiplos antimicrobianos, entre eles, as polimixinas, os aminoglicosídeos e a maioria dos agentes betalactâmicos. Além disso, possuem a capacidade de desenvolver resistência a outras classes de antimicrobianos durante o tratamento (Drevinek & Mahenthiralingam, 2010).

A principal opção terapêutica para o tratamento das infecções causadas pelo CBc é a associação trimetoprim/sulfametoxazol. SXT também tem sido considerado o antimicrobiano profilático de escolha para o tratamento de DGC (Avgeri *et al.*, 2009). Um estudo de análise sistemática sobre o uso de antimicrobianos no tratamento das infecções causadas pelo CBc revelou que a ceftazidima, o meropenem e a penicilina, especialmente piperacilina, em regime de monoterapia ou em combinação com outros antibióticos, são

alternativas terapêuticas eficazes quando estes isolados apresentam resistência ao SXT (Avgeri *et al.*, 2009). Entretanto, não foi possível determinar que a terapia combinada seja mais eficaz que a monoterapia no tratamento destas infecções (Avgeri *et al.*, 2009). Em contrapartida, outros estudos *in vitro* demonstram que a terapia combinada seria mais eficaz com o uso de meropenem e tobramicina em altas doses, combinado com ceftazidima, ou com SXT, ou com cloranfenicol ou com aztreonam (Waters & Ratjen, 2006).

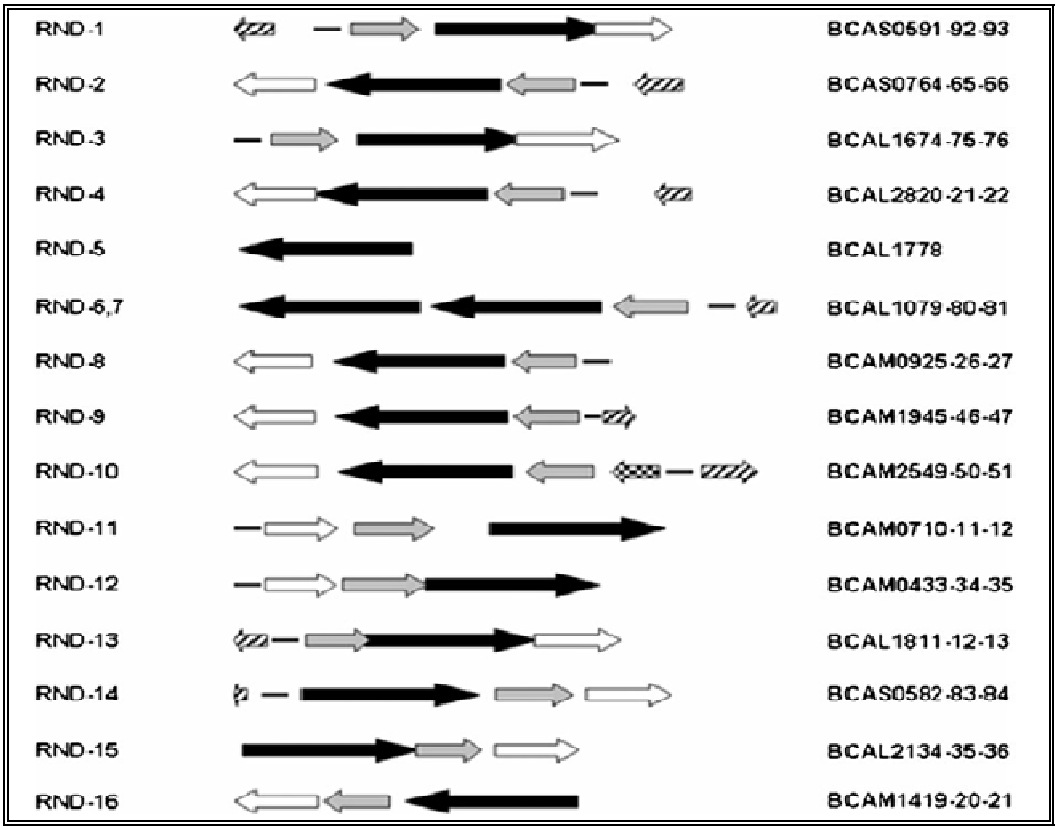


Figura 3.3 Organização genética dos operons da família RND descritos em *B. cenocepacia* J2315. As setas hachuradas representam os genes reguladores proximais de cada operon, que podem exercer a função ativadora (seta para a direita) ou repressora (seta para a esquerda) para cada gene. Os genes que codificam as proteínas de fusão periplasmática estão representadas nas setas cinza e os que codificam as proteínas de membrana interna (bomba) aparecem nas setas pretas, enquanto os genes que codificam as proteínas de membrana externa (canal extrusivo) estão representados pelas setas brancas. As regiões promotoras estão representadas pelos traços pretos (Adaptado de Bazzini *et al.* 2011).

Alguns estudos tem relatado o uso da temocilina, um betalactâmico semissintético, para o tratamento de pacientes com FC infectados por espécies do CBc (van Acker *et al.*, 2010). Embora a temocilina tenha sido comercializada pela primeira vez na década de 80, seu uso foi rapidamente abandonado por ser um antimicrobiano sem atividade contra bactérias Gram positivas, anaeróbios e *P. aeruginosa.* Entretanto, ao contrário de outros antimicrobianos betalactâmicos, a grande vantagem da temocilina é ser um composto estável à ação das betalactamases de amplo espectro e das enzimas AmpC. A estabilidade dessa droga contra as enzimas KPC e OXA carbapenemases ainda está sendo estudada (Livermore & Tulkens, 2009).

Em um estudo piloto conduzido na Inglaterra, Taylor e colaboradores (1992) avaliaram a associação de temocilina com aminoglicosídeos no tratamento de cinco pacientes fibrocísticos os quais apresentavam infecções por *P. aruginosa* e *B. cepacia*. Os autores observaram uma melhora significativa no quadro clínico desses pacientes, tanto naqueles em que a temocilina foi utilizada como terapia de escolha de primeira linha, quanto nos pacientes em que foi utilizada após falha terapêutica com o uso de outros antimicrobianos. Um outro estudo britânico, o qual também avaliou pacientes com fibrose cística infectados pelo CBc, demonstrou melhora nos parâmetros clínicos e funcionais pulmonares em 14 dos 20 pacientes fibrocísticos tratados com temocilina associada com aminoglicosídeos (Lekkas *et al.*, 2006).

3.7 Sulfonamidas e trimetoprim

A primeira classe de antimicrobianos foi descoberta em 1932, com o relato de uma substância que apresentava atividade protetora contra infecções causadas por estreptococos, ora denominado de sulfacrisoidina. Gerhard Johannes Paul Domagk (1895-1964), microbiologista alemão, foi o responsável por esta descoberta, fato este que lhe

rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1939. A sulfacrisoidina (sulfanilamida) foi o primeiro antimicrobiano utilizado para terapia nos Estados Unidos da América, em 1935, em uma tentativa frustada de tratar uma paciente de 10 anos com meningite e sepse causada por *Haemophylus influenzae* (Zinner & Mayer, 2010). Durante o final da década de 30, foram realizadas modificações na estrutura da sulfonilamida com o intuito de remover os efeitos colaterais desagradáveis e ampliar o seu espectro de ação. Essas modificações resultaram em compostos com ação específica, tais como compostos altamente solúveis utilizados no tratamento de infecções urinárias ou sulfonamidas que não são absorvidas pelo trato gastrointestinal quando utilizadas no tratamento de infecções nesse sítio corpóreo (Skold, 2000; Zinner & Mayer, 2010).

Trimetoprim foi sintetizado pela primeira vez na década de 60 pelo bioquímico americano George Herbert Hitchings (1905-1998), prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1988. O conceito do trimetoprim como composto potencializador da atividade da sulfonamida foi introduzido em 1968 por Bushby e Hitchings. Na década seguinte, a associação de trimetoprim/sulfametoxazol foi introduzida clinicamente, demonstrando espectro de ação contra uma ampla variedade de micro-organismos (Huovinen, 2001; Zinner & Mayer, 2010).

3.7.1 Estrutura química das sulfonamidas e do trimetoprim

As sulfonamidas disponíveis para o uso clínico são derivadas da sulfanilamida, composto com estrutura similar ao ácido para aminobenzóico (PABA), um cofator essencial para a bactéria durante a síntese do ácido fólico (Figura 3.4). A presença de um grupo amina livre na posição 4 do carbono está associada com o aumento da sua atividade. O aumento dessa atividade está associado, também, com substituições no radical sulfonil (SO_2), o qual está ligado ao carbono na posição 1, como observado nas moléculas de sulfadiazina,

sulfisoxazol e sulfametoxazol, sendo todos esses compostos mais ativos em comparação ao original, a sulfanilamida. As substituições feitas nas moléculas de sulfonamidas determinam outras propriedades farmacológicas, tais como, a aborção da droga pelo organismo, sua solubilidade e sua tolerância gastrointestinal (Zinner & Mayer, 2010).

As sulfonamidas podem causar efeitos colaterais graves, incluindo hipersensibilidade e/ou reações tóxicas a este medicamento e são altamente associadas à discrasias sanguíneas, como a anemia aplástica (Skold, 2000; Huovinen, 2001).

Trimetoprim é um composto também denominado 2,4-diamino-(3',4',5'-trimetoxibenzil)-pirimidina (Figura 3.4). Quando comparado às sulfonamidas, esse antimicrobiano apresenta menos efeitos colaterais. Reações de hipersensibilidade e erupções cutâneas têm sido reportadas, principalmente em pacientes soropositivos para o HIV. A associação desse antimicrobiano com meningite asséptica induzida por drogas também tem sido relatada (Huovinen, 2001; Zinner & Mayer, 2010).

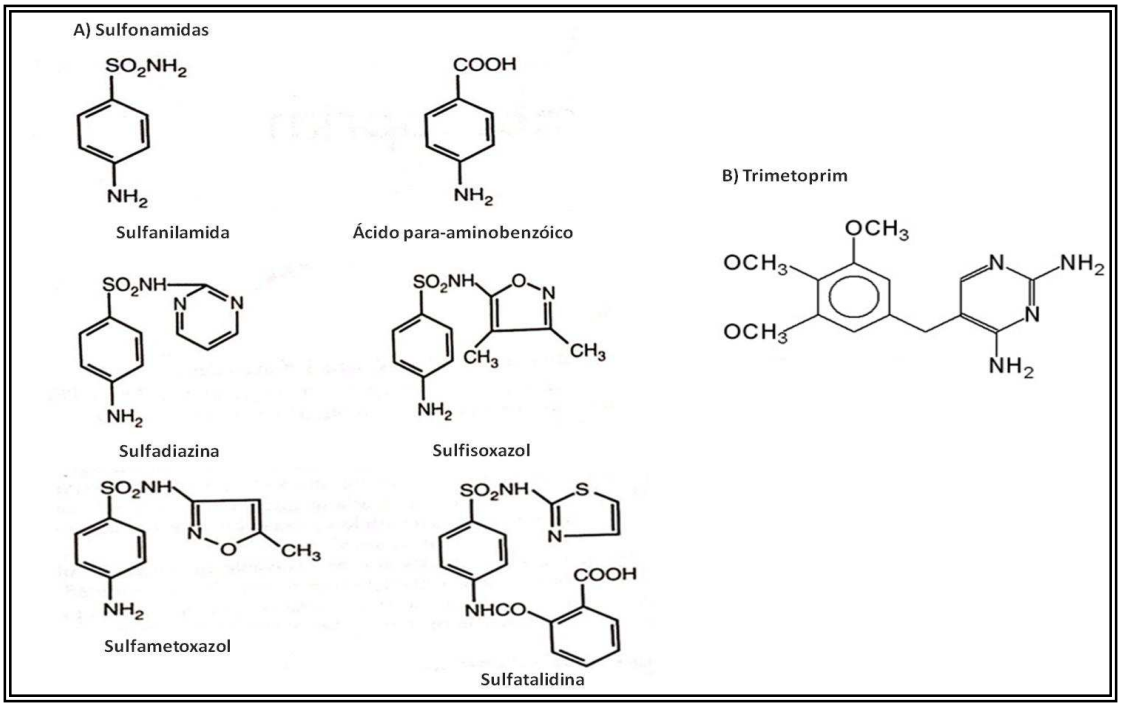


Figura 3.4 Fórmula estrutural das sulfonamidas e do trimetoprim (Adaptado de Zinner & Mayer, 2010).

3.7.2 Mecanismo de ação das sulfonamidas e do trimetoprim

Trimetoprim e sulfametoxazol compartilham um amplo espectro de ação bacteriana, incluindo patógenos comuns do trato urinário (*E. coli* e outros membros da família *Enterobacteriaceae*), patógenos do trato respiratório (*Streptococcus pneumoniae, H. influenzae, Moraxella catarrhalis*), e certos agentes patogênicos entéricos (*E. coli* e *Shigella* spp.), além de apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* meticilina sensível (MSSA) e resistente (MRSA), *S. pyogenes, S. viridans, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus* spp. e *Salmonella* spp. Entretanto, *P. eruginosa, Acinetobacter* spp., *Neisseria* spp., *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Nocardia* spp., *Actinomyces* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Chlamydia pneumoniae* e micobactérias apresentam sensibilidade reduzida ou são resistentes ao trimetoprim (Huovinen *et al.*, 1995; Huovinen, 2001; Hawser *et al.*, 2006).

Embora uma variedade de modificações tenha sido sintetizada na sua estrutura química, as sulfonamidas exibem o mesmo mecanismo de ação. Quando administradas isoladamente, exibem uma ação bacteriostática; no entanto, a combinação das sulfonamidas com trimetoprim numa proporção de 1:5 apresenta um efeito bactericida para a bactéria (Huovinen *et al.*, 1995; Huovinen, 2001). A utilização dos dois compostos em associação possui um efeito sinérgico, ambos afetando a síntese do ácido fólico na célula bacteriana. O ácido fólico é cofator de muitas enzimas e está envolvido em várias reações intracelulares. A inibição da formação do ácido fólico afeta diretamente na síntese de precursores de DNA e RNA bacterianos (Bushby & Hitchings, 1968; Huovinen, 2001). Resumidamente, a ação ocorre da seguinte maneira (Figura 3.5).

Como descrito anteriormente, as sulfonamidas são análogos do PABA, um metabólito essencial para a síntese do ácido fólico. As sulfonamidas agem inibindo

competitivamente a dihidroperoato-sintetase, que catalisa a formação do ácido dihidropteróico a partir do PABA. O ácido dihidropteróico é um precursor do ácido tetrahidrofólico que, por sua vez, é a forma reduzida do ácido fólico. As sulfonamidas podem reagir em qualquer lugar da molécula de PABA e competir pelo sítio ativo da enzima, interferindo em qualquer etapa da síntese do ácido fólico. Entretanto, esses antimicrobianos podem apresentam alta afinidade pela enzima tetrahidropteróica do que para o substrato natural PABA. Como resultado final, formam-se análogos não funcionais do ácido fólico, com subsequente inibição do crescimento bacteriano e consequente morte da bactéria (Skold, 2000; Huovinen, 2001; Masters *et al.*, 2003; Zinner & Mayer, 2010).

A atividade do trimetoprim é consequente da inibição da ação do ácido dihidrofolato-redutase, etapa seguinte ao bloqueio da síntese do ácido fólico pelas sulfonamidas (Figura 3.5). A dehidrofolato redutase é uma enzima altamente conservada e constitui o alvo para a ação de diversos medicamentos quimioterápicos para o tratamento contra o câncer e para diferentes drogas antibacterianas (Hawser *et al.*, 2006). O trimetoprim é 50.000 a 100.000 vezes mais ativo contra a dehidrofolato redutase produzida pela bactéria que contra essa enzima produzida pelo organismo humano. Trimetoprim interfere também na redução do ácido dihidrofólico a ácido tetradrofólico, precursor de ácido folínico que, consequentemente, é utilizado para a síntese de purinas e de DNA. O bloqueio sequencial da mesma via de biosíntese causado pelas sulfonamidas e pelo trimetoprim resulta em uma atividade sinérgica desses dois antimicrobianos contra um largo espectro de micro-organismos selvagens descrito no início deste tópico (Skold, 2000; Huovinen, 2001; Masters *et al.*, 2003; Zinner & Mayer, 2010).

3.7.3 Mecanismos de resistência à sulfonamidas e ao trimetoprim

Diferentes mecanismos podem causar resistência à sulfonamidas e ao trimetoprim. A resistência a sulfonamidas pode ser atribuída a mutações que envolvam a hiperprodução de PABA, ou por mutações cromossômicas no gene *dhp,* que codifica a enzima dihidropteroato sintetase (Huovinen *et al.*, 1995; Zinner & Mayer, 2010). Entretanto, o principal mecanismo de resistência à sulfonamidas em bacilos Gram negativos é a aquisição de genes denominados *sul*. *sul1* e *sul2* as principais variantes que codificam resistência a esta droga em isolados clínicos e estes dois genes apresentam 57% de similaridade na sequência de aminoácidos. O gene *sul1* geralmente está presente em integrons de classe 1 e, por isso, frequentemente está associado a outros genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos (Figura 3.6). O gene *sul2* pode ser encontrado em pequenos plasmídeos não conjugativos pertencentes à família *IncQ*, assim como em plasmídeos multirresistentes altamente transmissíveis (Huovinen *et al.*, 1995; Alekshun & Levy, 2007). O gene *sul3,* que também pode estar localizado em plasmídeos, é mais frequente em bactérias ambientais e aquelas isoladas de animais (Perreten & Boerlin, 2003; Antunes *et al.*, 2005; Alekshun & Levy, 2007).

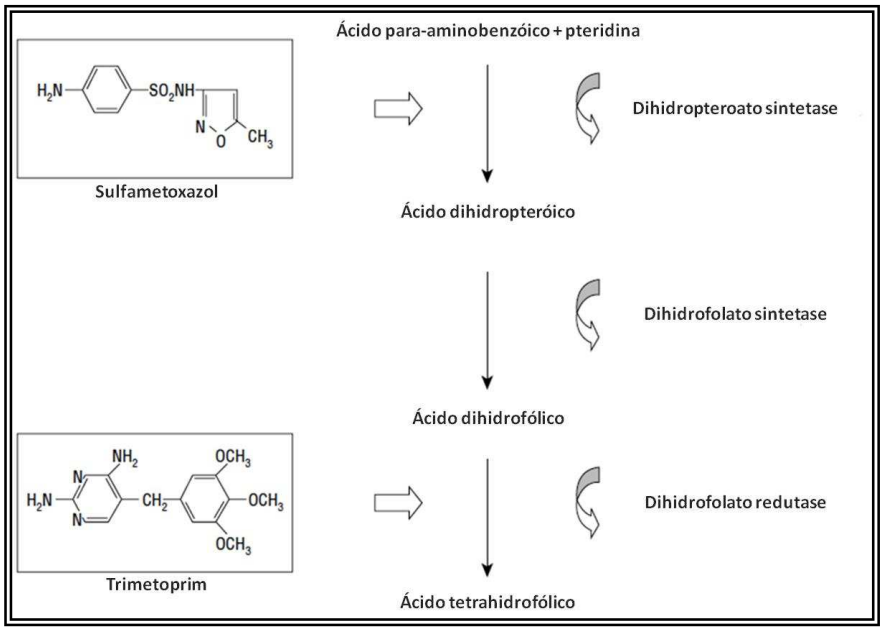


Figura 3.5 Via da biossíntese do folato. As setas brancas indicam o sítio de ação de SXT (Adaptado de Masters *et al.*, 2003).

Um estudo irlandês demonstrou a presença de integrons de classe 1 em cinco *B. cenocepacia* IIIA de 17 amostras clínicas do CBc avaliadas. Estas cinco amostras carreavam, além do gene *sul1*, $bla_{OXA\text{-}like}$ e *aac(6')1a* (Crowley *et al.*, 2002). Outro estudo descreveu a presença de um integron de classe 2 associado a um novo transposon, Tn7::In2-1, em um isolado clínico de *B. cenocepacia* IIIB na Argentina (Ramírez *et al.*, 2005). Os resultados deste estudo demonstraram a ausência de *orfX,* gene cassete presente em transposons da família *Tn7*, e a presença de um outro gene cassete, *sat.* Os autores sugeriram ainda que integrons de classe 2 localizados em transposons desta família são capazes de se incorporar no genoma das bactérias do CBc.

A resistência ao trimetoprim pode ser causada pela diminuição da permeabilidade celular, pela perda de porinas e por mutações cromossômicas nos genes denominados *dhfr* (Huovinen *et al.*, 1995; Zinner & Mayer, 2010). Clinicamente, este último mecanismo é o mais importante, pois o gene *dhfr* pode ser mediado por plasmídeos e transposons, podendo ser transferido para outras bactérias. A resistência ao trimetoprim mediada por plasmídeos foi descrita pela primeira vez em 1972 e estava associada à transferência do gene *dhfr*. A variante mais comum é o *dhfrI*, geralmente atribuído à propagação do transposon *Tn*7, frequentemente encontrado em *E. coli* resistente ao trimetoprim (Huovinen *et al.*, 1995; Huovinen, 2001). O gene *dhfr* também pode ser transferido por integrons. Atualmente, mais de 20 variantes do gene *dhfr* foram descritas em diferentes espécies bacterianas (Alekshun & Levy, 2007).

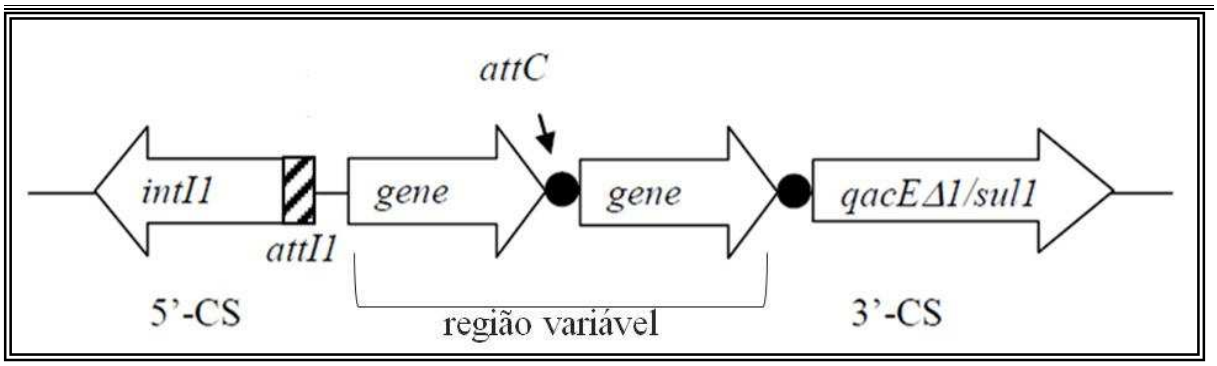


Figura 3.6 Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1. Esses integrons são formados por duas regiões conservadas, 5'CS e 3'CS, que flanqueiam uma região variável em tamanho e sequência, a qual comporta os cassetes gênicos. A região 5'CS contém o gene codificador da integrase, *IntI,* e por um sítio de recombinação à jusante do gene da integrase, denominado *attI* (integrase attachment). A região 3'CS é normalmente formada por um gene que confere resistência a compostos de quaternário de amônio, *qacEΔ1*, truncado a um gene que confere resistência à sulfonamida, denominado *sul.* As setas indicam os genes e o sentido da sua transcrição e os círculos representam os sítios de recombinação dos cassetes gênicos (Adaptado de Picão, 2009; Barbosa, 2011).

4 Material e Métodos

4.1 Amostras bacterianas

Foram avaliados 82 isolados clínicos pertencentes ao CBc recuperados de diferentes sítios corpóreos de pacientes atendidos em dois hospitais universitários da região sudeste do país. Trinta e três isolados foram recuperados de pacientes procedentes do hospital A durante o período de 2007 a 2012, e 49 isolados foram procedentes do hospital B, recuperados entre os anos de 1995 a 2010. Somente um isolado do CBc por paciente foi incluído no estudo. Estas amostras foram coletadas de maneira retrospectiva e encontram-se armazenadas a -20°C em TSB (Tryptic Soy Broth; Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 15% de glicerol (GE HealthCare, Uppsala, Suécia). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp/EPM, parecer número 0071/12 (Anexo 3).

Para a realização dos experimentos, os isolados bacterianos foram inoculados em 5 mL de TSB e incubados em estufa com agitação à 35°C ± 2°C (Tecnal, Piracicaba, São Paulo) por um período de 24 a 48 horas. Após o crescimento em meio de cultura líquido, as amostras foram, então, cultivadas em ágar seletivo para *B. cepacia* (BCAS, *Burkholderia cepacia* agar; Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), suplementado com polimixina 75.000 IU/L, gentamicina 2,5 mg/L e ticarcilina 50 mg/L (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) (Figura 4.1). As placas foram incubadas por um período de 24 a 48 horas em estufa de aerobiose a 35°C ± 2°C (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA).

Figura 4.1 Cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25608 semeada em meio BCAS.

4.2 Identificação bacteriana

Os isolados foram previamente identificados como pertencentes ao CBc pelos métodos automatizados utilizados em cada hospital. A confirmação da identificação das espécies do CBc foi realizada por dois métodos distintos: sequenciamento do gene *recA* e por MALDI-TOF MS.

4.2.1 Identificação genotípica

4.2.1.1 Extração do DNA bacteriano

Para a realização das técnicas de PCR e sequenciamento, o DNA bacteriano foi extraído conforme protocolo descrito a seguir. Após o crescimento bacteriano em ágar BCAS, três a cinco colônias foram transferidas para um tubo de polipropileno o qual continha 10 mL de caldo TSB. Esta cultura foi, então, incubada por 18h a 35°C ± 2°C, sob agitação. Após este período, 1 mL da cultura bacteriana foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL e centrifugado por 10 minutos a 7000 rpm (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e 1 mL de água destilada estéril foi adicionado ao sedimento, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm. O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de tampão SET (75 nM NaCl; 25 nM de EDTA; 20 mM TRIS pH 7.0) e, a esta solução,

foi adicionado 25 µL de SDS 20%, 2,5 µL de proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 1 µL de lisozima (50 mg/mL, Sigma Aldrich, St. Loius, Missouri, EUA), homogeneizando por inversão e incubando a 37°C durante 1 hora. Depois deste período, 220 µL de NaCl 5M e 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado e, após vigorosa homogeneização, o conteúdo foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm. Logo após a centrifugação, a fase superior foi recuperada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL e ao qual foi adicionado 700 µL de isopropanol puro gelado (-20°C) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), e a suspensão homogeneizada por inversão. O material foi precipitado por 1 hora a -20°C. Após este período, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm, retirado o sobrenadante e adicionado 800 µL de etanol 70% gelado (-20°C) (Carlo Erba, Rodano, Milão, Itália) ao sedimento. O material foi centrifugado novamente durante 5 minutos a 10000 rpm e, a seguir, o sobrenadante foi retirado. O tubo contendo o DNA foi seco à temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em 100 µL de água deionizada estéril e armazenado a -20°C até o momento da sua utilização.

4.2.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram preparadas em fluxo laminar, contendo *master-mix* (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), água estéril (Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A solução mãe foi mantida refrigerada durante o seu preparo e, após homogeinização, 19 µL foi transferido para cada tubo de polipropileno de 0,2 mL, previamente identificado, o qual continha 1 µL do DNA bacteriano extraído. As condições para amplificação do DNA foram: denaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. A etapa de extensão

final foi realizada durante 10 minutos a 72°C. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Eppendorf vapo.protect (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *recA* foram: sequência sense (CBc_*recA*_F) 5' TGACCGCCGAGAAGAGCAA 3' e sequência antisense (CBc_*recA*_R) 5' CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC 3' (Fehlberg et al., 2012). O tamanho do amplicon gerado foi de aproximadamente 1043 pb.

A revelação dos produtos da PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (Ultrapure Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA) a 110V por 40 minutos em tampão TBE 0,5x (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M). Como marcador de peso molecular, foi utilizado DNA *ladder* 1000 pares de base (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). O gel foi corado com brometo de etídio (25 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Loius, Missouri, EUA) e a diferenciação das bandas visualizada sob a luz ultravioleta – 320 nm (GelDoc Quantity One; BioRad Laboratories, EUA).

4.2.1.3 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento do gene *recA* foram realizadas a partir da purificação dos produtos obtidos nas reações da PCR, utilizando o QIAquick Gel Extraction (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi determinada por densidade óptica, em espectrofotômetro digital NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, EUA), utilizando 2 µL do DNA total purificado. Após a quantificação, aproximadamente 70 ng de DNA foi utilizado para a reação preparatória de sequenciamento, utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia).

As reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento ABI 3500 Genetic Analysers (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). As sequências de DNA

obtidas e as sequências protéicas derivadas foram analisadas utilizando o programa Lasergene Software Package (DNAStar, Madison, EUA) e, então, submetidas à comparação com a base de dados genéticos disponíveis na internet (http://www.ebi.ac.uk/fasta33/ e http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

4.2.2 Espectrometria de Massas por MALDI-TOF MS

Após o isolamento em meio ágar BCAS, as bactérias previamente identificadas como *Burkholderia* spp. pelos hospitais de origem foram submetidas à identificação das espécies pelo método de espectrometria de massas MALDI-TOF.

Para a leitura das massas das amostras bacterianas, foi realizada a extração das proteínas ribossomais pelo método de ácido fórmico/acetonitrila. Foram selecionadas de cinco a sete colônias bacterianas, as quais foram resuspensas em 300 µL de água destilada estéril em tubo de polipropileno de 1,5 mL. A esta mistura, foi adicionado 900 µL de etanol absoluto (Carlo Erba, Rodano, Milão, Itália) e centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 50 µL de ácido fórmico 70% (Sigma Aldrich, St. Loius, Missouri, EUA). Após vigorosa agitação, 50 µL de acetonitrila pura (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado e a solução foi novamente centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm (Marko *et al.*, 2012). Finalmente, 1 µL do sobrenadante foi adicionado em placa de aço inox própria do equipamento. Cada amostra foi inoculada em triplicata para a avaliação da reprodutibilidade da identificação bacteriana e, após a secagem das amostras e do calibrante à temperatura ambiente, 1 µL de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 10 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Loius, Missouri, EUA) foi adicionado sobre as amostras. Posteriormente, a placa foi introduzida no espectrômetro de massas Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). Este equipamento encontra-se alocado no Departamento de Biofísica da UNIFESP. Os espectros

de massa gerados de acordo com o perfil protéico da amostra foram comparados com uma série de espectros depositados no banco de dados do software Biotyper MALDI 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) para que a identificação da espécie bacteriana fosse realizada (Figura 4.2).

Os critérios de identificação bacteriana utilizados neste estudo foram aqueles especificados pelo próprio fabricante: *scores* ≥ 2.3 foram considerados confiáveis para a identificação do gênero e da espécie; entre 2.0 e 2.2, identificação confiável para o gênero bacteriano e, provavelmente, para a espécie; entre 1.7 e 1.9, identificação provável somente do gênero, enquanto *scores* de identificação abaixo de 1,7 foram considerados como não confiáveis. Os espectros foram analisados em um intervalo de 2.000 a 20.000 *m/z*, onde **m** representa a massa e **z** representa o número da carga de íons. Como controle da extração e da leitura das proteínas foram utilizadas as cepas *B. cepacia* ATCC 25608, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922.

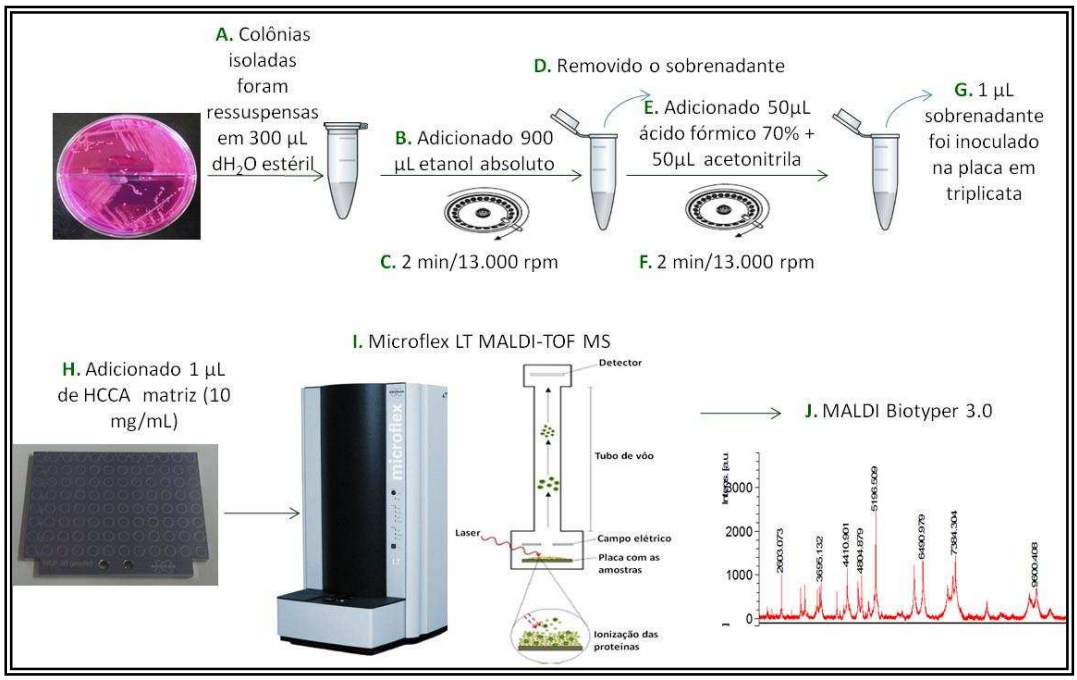


Figura 4.2 Fluxograma do processo de extração das proteínas ribossomais e identificação bacteriana pela espectrometria de massas MALDI-TOF MS (Adaptado de Fehlberg et al., 2012).

4.3 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

Com o objetivo de avaliar a acurácia dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos frente aos isolados do CBc, a determinação do perfil de sensibilidade dos isolados avaliados neste estudo foi realizada por quatro técnicas distintas: microdiluição em caldo, diluição em ágar, disco difusão e Etest (BioMerieux, Marcy I'Etoile, França), seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2012a; CLSI, 2012b; CLSI, 2014) e do fabricante para o Etest. A microdiluição em caldo foi considerada a técnica padrão-ouro neste estudo.

Para as técnicas quantitativas, a CIM (concentração inibitória mínima) foi definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para a técnica de disco difusão, o perfil de sensibilidade foi determinado pelo tamanho do halo de inibição, expresso em milímetros, formado ao redor do disco de antimicrobiano. Para todos os antimicrobianos, a CIM foi determinada onde houve a inibição completa de todo crescimento bacteriano, exceto para SXT, onde a leitura da CIM foi realizada com inibição de 80% do crescimento bacteriano. A leitura das placas foi procedida manualmente e as amostras classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2014). A leitura dos resultados para disco difusão para levofloxacina e ticarcilina/ácido clavulânico foi realizada utilizando os pontos de corte estabelecidos para *P. aeruginosa*, enquanto que para cloranfenicol foram aplicados os pontos de corte estabelecidos para enterobactérias (CLSI, 2014). Para todas as técnicas, a leitura dos testes foi realizada, independentemente, por três leitores para a confirmação dos resultados.

Os antimicrobianos testados foram aqueles preconizados pelo CLSI (CLSI, 2014): ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacina, minociclina, meropenem, trimetoprim/sulfametoxazol, ticarcilina/ácido clavulânico. Os sais dos antimicrobianos foram

adquiridos do fabricante Sigma-Aldrich (St. Loius, Missouri, EUA) e os discos foram adquiridos do fabricante Oxoid (Basingstoke, Inglaterra) [ceftazidima 30 µg, cloranfenicol 30 µg, levofloxacina 5 µg, minociclina 30 µg, meropenem 10 µg, trimetoprim/sulfametoxazol 1.25/23.75 µg, ticarcilina/ácido clavulânico 75/10 µg]. Como controle da qualidade foram utilizadas as ATCCs *P. aeruginosa* 27853, *E. coli* 25922, *E. coli* 35218, *S. aureus* 29213 e *S. aureus* 25923. Como controle da reprodutibilidade dos testes, foi utilizada a *B. cepacia* ATCC 25608.

4.3.1 Preparo das soluções estoque de antimicrobianos para as técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar

As soluções estoque dos antimicrobianos testados foram preparadas 20 vezes mais concentradas que a última diluição a ser testada e seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2012a). A quantidade de sal utilizada para preparar as soluções foi estabelecida pela seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volume (mL) x concentração (µg/mL)}}{\text{potência (µg/mg)}}$$

Cada sal de antimicrobiano foi dissolvido de acordo com o solvente requerido (Tabela 4.1) em balão volumétrico de 10 mL. Após a dissolução do sal, a solução foi esterilizada em filtro de membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA) e congeladas a -70°C até o momento de sua utilização.

4.3.1.1 Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo é uma técnica que utiliza pequenos volumes de meio de cultura em caldo distribuídos em placas de poliestireno estéreis, próprias para este teste,

com o fundo em formato de "U", que permite a melhor visualização do crescimento bacteriano.

Tabela 4.1 Diluentes e solventes utilizados para o preparo das soluções estoque de antimicrobianos e suas respectivas variações das diluições utilizadas neste estudo.

Antimicrobiano	Solvente[a]	Diluente[a]	Variação das diluições[b] (µg/mL)
Ceftazidima	Água	Água	0,03 – 256
Cloranfenicol	Etanol 95%	Água	0,03 – 256
Levofloxacina	½ do volume de água com 0,1 mol/L de NaOH	Água	0,03 – 64
Meropenem	Água	Água	0,03 – 64
Minociclina	Água	Água	0,03 – 256
Trimetoprim[c]	10% do volume final de 0,05 mol/L de HCl	Água aquecida	0,03 – 64
Sulfametoxazol[c]	½ volume em água quente e quantidade mínima de 2,5 mol/L de NaOH	Água	0,59 – 1216
Ticarcilina[d]	Tampão fosfato pH6,0 0,1 mol/L	Tampão fosfato pH6,0 0,1 mol/L	0,03 – 256
Clavulanato de potássio[d]	Tampão fosfato pH6,0 0,1 mol/L	Tampão fosfato pH6,0 0,1 mol/L	Concentração fixa de 2

[a] De acordo com as recomendações do CLSI (2014) (tabela 5A).
[b] Para uma padronização das diluições, a maior diluição utilizada nos testes foi estabelecida de acordo com o gradiente de leitura das fitas de Etest.
[c] Estes antimicrobianos foram testados em associação.
[d] Estes antimicrobianos foram testados em associação.

4.3.1.2 Preparo das placas de microdiluição em caldo

Para o preparo das diluições seriadas, a partir de cada solução estoque de antimicrobiano, foi utilizado o meio de cultura Müeller-Hinton caldo cátion ajustável (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra, lote 1035177; val. 04/2016). A dosagem de cálcio e de magnésio foi realizada pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas pela técnica de espectrometria de absorção atômica (Anexo 2) e a concentração do meio foi ajustada àquela

recomendada pelo CLSI (CLSI, 2012a). Quando necessário, o pH do meio de cultura também foi ajustado para 7,2. A concentração de cátion recomendada pelo CLSI (2012a) e a concentração encontrada no meio de cultura utilizado estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Concentração de cálcio e magnésio recomendados pelo CLSI e encontradas no Müeller-Hinton caldo utilizado neste estudo.

Cátions	Concentração (mg/L)	
	Müeller-Hinton caldo lote 1035177; val. 04/2016 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra)	**CLSI (2012a)**
Cálcio	3,5	20 a 25
Magnésio	2,9	10 a 12,5

Após a preparação das diluições dos antimicrobianos, o volume final de 100 µL de cada diluição foi dispensado em microplacas de 96 poços, conforme demonstrado na Figura 4.3. As concentrações utilizadas estão apresentadas na Tabela 4.1. Em cada placa de microdiluição, a coluna 12 foi utilizada como controle do crescimento bacteriano e a linha H foi utilizada como controle de esterilidade do meio. Após o preparo das placas, as mesmas foram congeladas à -70°C até o momento do seu uso, exceto para meropenem, onde as placas foram preparadas no mesmo dia do seu uso.

4.3.1.3 Preparo e pipetagem do inóculo bacteriano das amostras clínicas e dos controles

O inóculo bacteriano foi preparado ressuspendendo colônias previamente isoladas de cada amostra em 3 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ajustado à escala de 0,5 de McFarland em turbidímetro digital (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), que representa 1,5 a 2 x 10^8 UFC/mL. Uma

diluição adicional foi realizada para obter um inóculo de 10 x 10^5 UFC/mL (33 µL da suspensão bacteriana em 4,967 µL de Müeller-Hinton caldo). O volume de 100 µL desta suspensão bacteriana foi adicionado nas placas de microdiluição contendo já 100 µL da solução do antimicrobiano (diluição 1:2). A concentração final do inóculo bacteriano será de aproximadamente 5 x 10^5 UFC/mL e as concentrações do antimicrobiano diluídas pela metade. As placas foram incubadas em estufa a 35°C ± 2°C, por um período de 20 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
B	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
C	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
D	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
E	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
F	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
G	0,03/0,59	0,06/1,18	0,12/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	16/304	32/608	64/1216	CP
H	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN

Figura 4.3 Desenho esquemático de uma placa de trimetoprim/sulfametoxazol. Cada coluna representa uma concentração diferente do antimicrobiano (µg/mL) e cada linha uma amostra bacteriana. CP, controle positivo (controle do crescimento bacteriano); CN, controle negativo (controle de esterilidade do meio de cultura).

4.3.2 Diluição em ágar

O teste de diluição em ágar é uma técnica realizada pela incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas de um determinado antimicrobiano em ágar Müeller-Hinton.

4.3.2.1 Preparo das placas de diluição em ágar

As diluições seriadas foram preparadas a partir das soluções estoque de antimicrobianos (item 4.3.1) em concentrações 10 vezes superior à concentração de uso.

Após o preparo das diluições, o volume de 1 mL de cada concentração foi adicionado a tubos contendo 19 mL de ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), fundidos e estabilizados previamente em banho-maria entre 45°C a 50°C (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Os tubos foram homogeneizados e o conteúdo vertido em placas de petri descartáveis previamente identificadas com o nome e a concentração do antimicrobiano avaliado. Cada placa representou uma única concentração do antimicrobiano. As placas foram utilizadas no mesmo dia do seu preparo.

4.3.2.2 Preparo e dispensação do inóculo bacteriano das amostras clínicas e dos controles

O inóculo bacteriano foi preparado e ajustado à escala de 0,5 de McFarland, conforme descrito no item 4.3.1.2. Adicionalmente, foi realizada uma diluição da ordem de 1:10, sendo pipetado 270 µL de cloreto de sódio 0,85% e 30 µL do inóculo inicial na base do multinoculador Steers (Steers *et al.*, 1959). A partir dessa diluição, o inóculo bacteriano foi dispensado simultaneamente sobre a superfície do ágar, com o auxílio do multinoculador Steers, o qual dispensa de 1 µl a 3 µl da solução bacteriana, para obtenção de um inóculo final de 1 x 10^4 UFC/mL. Primeiramente, foi inoculada uma placa de controle de crescimento bacteriano (sem antimicrobiano), seguindo pelas placas do antimicrobiano da concentração mais baixa até a mais alta. Por último, inoculou-se uma segunda placa de controle de crescimento bacteriano, com a finalidade de verificar se houve contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação. Depois de inoculadas, as placas foram incubadas em estufa a 35°C ± 2°C, por um período de 20 horas após a completa absorção do inóculo bacteriano no meio de cultura.

4.3.3 Etest® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, França)

O Etest é uma técnica quantitativa que compreende de uma fita impregnada com um gradiente de antimicrobiano pré definido que é utilizado para a determinação da CIM.

4.3.3.1 Preparo das placas de ágar Müeller-Hinton

Para o preparo das placas de ágar Müeller-Hinton, foi adicionado 50 mL e 20 mL de meio de cultura para placas de petri grandes (150 mm x 90 mm) e para placas pequenas (90 mm x 15 mm), respectivamente, para a obtenção de uma espessura de aproximadamente 4 mm de meio de cultura. Estas placas foram armazenadas a 4°C até o momento da sua utilização.

4.3.3.2 Preparo do inóculo bacteriano e plaqueamento das amostras clínicas e dos controles

Um inóculo com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland foi preparado conforme descrito no item 4.3.1. Com auxílio de um swab alginatado estéril (JS Medical Materials, Jiangsu, China), essa suspensão foi uniformemente semeada sobre o ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) em três direções, girando a placa aproximadamente 90° antes de cada semeadura. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos para que houvesse a completa absorção total do inóculo pelo meio de cultura.

As fitas de Etest foram retiradas do freezer aproximadamente 30 minutos antes da inoculação das mesmas no meio de cultura para garantir que se encontravam à temperatura ambiente. Após o período de 15 minutos, as fitas de Etest contendo os antimicrobianos foram dispensadas na superfície do ágar com o auxílio de uma pinça, flambada a cada fita utilizada. Em placas de 150 mm, foram aplicadas até 5 fitas e em placas

de 90 mm foram aplicadas até 2 fitas de Etest. As placas foram incubadas a 35°C ± 2°C, por um período de 20 horas.

4.3.4 Método de Kirby-Bauer ou disco difusão em ágar

O método de Kirby-Bauer ou disco difusão em ágar foi descrito em 1966 (Bauer *et al.*, 1966) e é a metodologia mais difundida e utilizada em laboratórios clínicos. Esta técnica consiste na difusão do antimicrobiano impregnado com concentrações específicas no disco de papel filtro pelo ágar.

4.3.4.1 Preparo das placas de ágar Müeller-Hinton

O preparo das placas de petri contendo ágar Müeller-Hinton foi realizado conforme descrito no item 4.3.3 e seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2012b).

4.3.4.2 Preparo do inóculo bacteriano e plaqueamento das amostras clínicas e dos controles

Um inóculo com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland foi preparado conforme descrito no item 4.3.1 e a suspensão foi semeada em meio de cultura conforme descrito no item 4.3.3.1. Assim como as fitas de Etest, os discos de antimicrobianos foram retirados do freezer com aproximadamente 30 minutos de antencedência. Os discos de antimicrobianos foram dispensados no ágar com o auxílio de uma pinça, flambada a cada disco utilizado. Em placas de 90 mm foram apliacados até 5 discos. As placas foram incubadas a 35°C ± 2°C, por um período de 20 horas. A determinação do perfil de sensibilidade foi realizada pela leitura do halo de inibição formado em torno do disco. Quando nenhum halo de inibição foi observado (resistência total), o valor reportado foi aquele do diâmetro do disco de antimicrobiano (6 mm).

4.3.5 Análise estatística

Os resultados das CIMs obtidas pelas técnicas de microdiluição em caldo, diluição em ágar e Etest foram comparados por análise de regressão linear. A concordância geral foi definida quando o resultado da CIM obtida pela diluição em ágar ou Etest variou ± 1-log_2 diluição da CIM obtida pela microdiluição em caldo. O resultado foi considerado discordante quando houve diferença ≥ 2-log_2 diluições entre os resultados (Figura 4.4). Os resultados também foram analisados em relação à concordância da categoria de sensibilidade. Eles foram considerados concordantes, quando as CIMs obtidas pelas diferentes metodologias e o diâmetro do halo de inibição pelo disco difusão encontravam-se em uma mesma categoria de sensibilidade estabelecida pelo CLSI (CLSI, 2014). Adicionalmente, as taxas de erros leves, graves e muito graves também foram calculadas segundo os critérios do CLSI (CLSI, 2008) (Figura 4.4). Foram definidos como erro leve a mudança da categoria sensível ou resistente para a intermediária ou desta para a sensível ou resistente entre as metodologias de referência e avaliada, respectivamente; erro grave, a mudança da categoria sensível pela metodologia de referência para resistente pela metodologia testada (falsa-resistência pela metodologia teste); e erro muito grave, a mudança da categoria de resistente pela metodologia de referência para a sensível pela metodologia testada (falsa-sensibilidade pela metodologia teste). Foram consideradas aceitáveis taxas de até 1,5% para erros muito graves, 3% para erros graves e 10% para erros leves (CLSI, 2014). Para a metodologia de disco difusão, foi analisada apenas a concordância entre categorias. Adicionalmente, foram calculadas as CIM_{50} e CIM_{90}, definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento em 50% e em 90% das amostras avaliadas, respectivamente, e as porcentagens de sensibilidade e resistência para os resultados obtidos pela microdiluiçãoao em caldo. Todas as análises

foram realizadas com auxílio do programa SPSS® para Windows, versão 17.0 (IBM Corporation, Nova York, EUA, 2008).

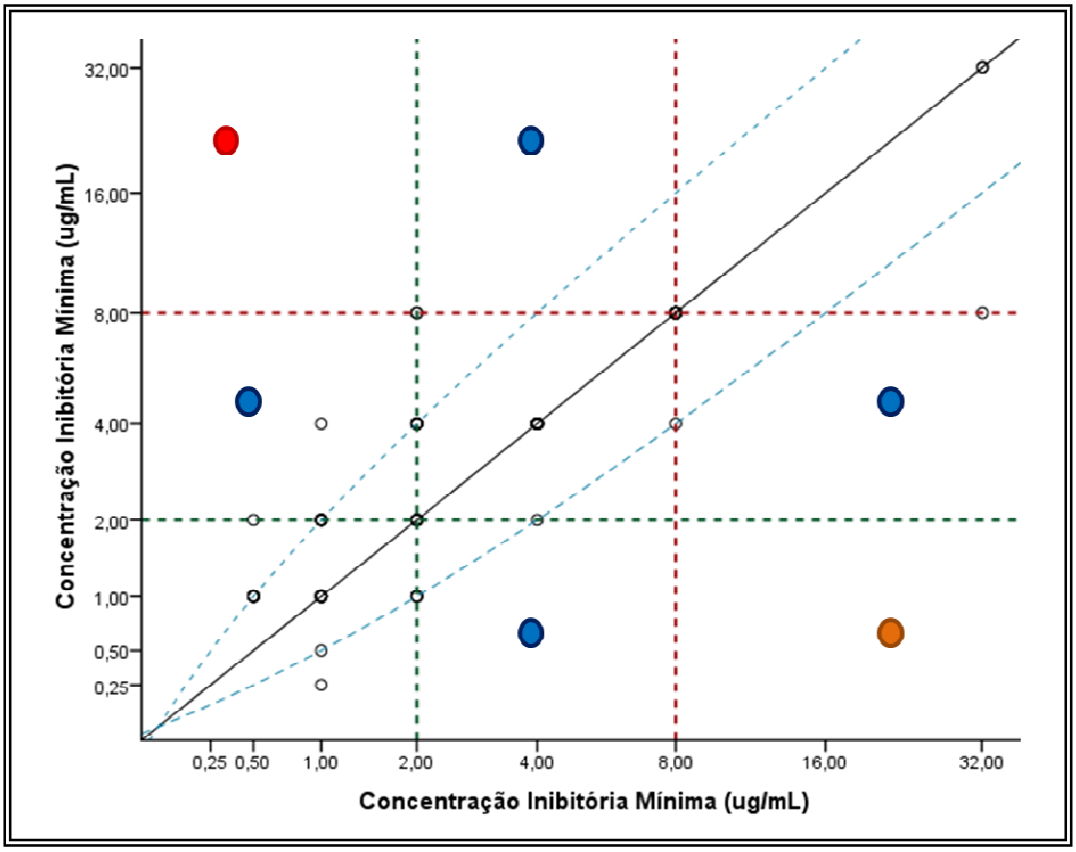


Figura 4.4 Representação de um scatergrama comparando duas técnicas de sensibilidade para um antimicrobiano hipotético. Os círculos de cor azul indicam os erros leves; laranja os erros graves e os erros muito graves estão indicados pelo círculo vermelho.

4.4 Caracterização dos genes de resistência nos isolados clínicos do CBc

A detecção dos genes de resistência foi realizada pela técnica de PCR. Os genes pesquisados e as condições de ciclagem estão apresentados na Tabela 4.3.

A extração do DNA bacteriano e o preparo das reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito nos itens 4.2.1.1 e 4.2.1.2 deste documento. As reações de sequenciamento foram realizadas conforme descrito no item 4.2.1.3 para os isolados que apresentaram amplificação no gel de agarose para qualquer um dos genes pesquisados.

A PCR para os genes codificadores de betalactamases de espectro restrito e estendido (*bla*$_{GES}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1/2\text{-}like}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}8\text{-}like}$, *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}like}$, *bla*$_{OXA\text{-}1\text{-}like}$, *bla*$_{OXA\text{-}2\text{-}like}$, *bla*$_{OXA\text{-}7\text{-}like}$, *bla*$_{OXA\text{-}18}$, *bla*$_{OXA\text{-}45}$, *bla*$_{OXA\text{-}46\text{-}like}$) foi realizada para todos os isolados bacterianos. Genes codificadores de carbapenemases (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{SPM}$, *bla*$_{SIM}$, *bla*$_{GIM}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA\text{-}23}$, *bla*$_{OXA\text{-}24}$, *bla*$_{OXA\text{-}51}$, *bla*$_{OXA\text{-}58}$) e aqueles codificadores de resistência à SXT (*dhfr, sul1, sul2*) foram pesquisados apenas para os isolados resistentes a meropenem e a SXT, respectivamente.

Tabela 4.3 Sequência de oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizadas para a amplificação dos genes de resistência pesquisados neste estudo.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Gene alvo	Amplicon (pb)	Condições de termocilagem	Referência
IMP-F1 IMP-R1	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATC	*bla*$_{IMP}$	188		
VIM-F2 VIM-R2	GTTTGGTCGCATACGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	*bla*$_{VIM}$	382	Denaturação: 94°C – 5 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 30 segundos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Mendes *et al.*, 2007
SPM-F1 SPM-R1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG CCTTTTCCGCGACCTTGATC	*bla*$_{SPM}$	798		
SIM-F1 SIM-R1	GTACAAGGGATTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGAG	*bla*$_{SIM}$	569		
GIM-F1 GIM-R1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC CGGAACGACCATTTGAATGG	*bla*$_{GIM}$	72		
Pre-NDM-F Pre-NDM-R	GGCGTTAGATTGGCTTAACC CTGGGTCGAGGTCAGGATAG	*bla*$_{NDM}$	1200	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 1 minuto; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Laboratório Alerta
OXA 23-F OXA 23-R	GATCGCATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	*bla*$_{OXA-23}$	501	Denaturação: 94°C – 5 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 52°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 50 segundos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Woodford *et al.*, 2006
OXA 24-F OXA 24-R	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	*bla*$_{OXA-24}$	246		
OXA 51-F OXA 51-R	TAAAGCTTTGATCGCCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	*bla*$_{OXA-51}$	353		
OXA 58-F OXA 58-R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	*bla*$_{OXA-58}$	599		

Tabela 4.3 *(continuação)* Sequência de oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizadas para a amplificação dos genes de resistência pesquisados neste estudo.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Gene alvo	Amplicon (pb)	Condições de termocilagem	Referência
KPC-F KPC-R	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	*bla*$_{KPC}$	893	Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 50 segundos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Lamaestro *et al.*, 2006 Poirel *et al.*, 2000
GES F GES R	TCACGCACTATTACTGGC TATTTGTCCGTGCTCAGG	*bla*$_{GES}$	900		
SHV-F1 SHV-R1	ATGCGTTATTAGTTTCGCCTGTGTATTATC TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC	*bla*$_{SHV}$	1018	Denaturação: 94°C – 5 minutos; Denaturação: 94°C – 1 minuto; Anelamento: 61°C – 1 minuto; Extensão: 72°C – 2 minutos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Nagano *et al.*, 2004
MCTX-1 e 2 F MCTX-1 e 2 R	ATGTGCAGYACCAGTAA CGCTGCCGGTTTTATCSCCC	*bla*$_{CTX-M-1/2-like}$	512	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 50 segundos; 30 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Laboratório Alerta
MCTX-8 F MCTX-8 R	AACRCRCAGACGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGTYAT	*bla*$_{CTX-M-8-like}$	333		
MCTX-14 F MCTX-14 R	GGTGACAAAGAGARTGCAACGGAT TTACAGCCCTTCGGCGATGA	*bla*$_{CTX-M-14-like}$	876		
MTEM F MTEM R	CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG AACCAGCCAGCCWGAAGG	*bla*$_{TEM}$	650		
OXA-1 multi F OXA-1 multi R	TATCTACAGCAGCGCCAGTG TGCACCAGTTTTCCCATACA	*bla*$_{OXA-1-like}$	601	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 50 segundos; 30 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Petrolini, 2013
OXA-2 multi F OXA-2 multi R	CGATAGTTGTGGCAGACGAA TCTTTGCACGCAGTATCCAG	*bla*$_{OXA-2-like}$	504		
OXA-7 multi F OXA-7 multi R	TTTTCAAATGGGACGGAAAG CCACTTGATTAACTGCGGAAA	*bla*$_{OXA-7-like}$	237		

Tabela 4.3 *(continuação)* Sequência de oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizadas para a amplificação dos genes de resistência pesquisados neste estudo.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Gene alvo	Amplicon (pb)	Condições de termocilagem	Referência
OXA-18 multi F OXA-18 multi R OXA-45 multi F OXA-45 multi R OXA-46 multi F OXA-46 multi R	ATGCAACGGAGCCTGTCC GGCAGGGTGTTGAGGAACT GCAGATGCTCGAATGCAC GGCAATGCCTTGAGGAAG GATCAGCGATGCGAAATTCT ACCAGCCAAACCTGCCTTC	bla_{OXA-18} bla_{OXA-45} $bla_{OXA-46-like}$	806 705 318	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 53°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 50 segundos; 30 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Petrolini, 2013
DFR F DFR R	CTGGAAAATCCCGGGTGAGCA GGAAGAAGGCGTCACCCTC	*dfr*	310 Integron*	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 55°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 1 minuto; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Barbosa, 2011
sul1-F sul1-R	TTTCGGCATCGTCAACATAA GTGTGTGCGGATGAAGTCAG	*sul1*	816 Integron*	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 56°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 1,5 minutos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Este estudo
sul2-F sul2-R	GGGTTTCCGAGAAGGTGATT TCACCGAGGACTCCTTCTTC	*sul2*	840 Integron*	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 20 segundos; Anelamento: 56°C – 45 segundos; Extensão: 72°C – 1,5 minutos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Este estudo

* Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos seus respectivos genes e na caracterização do integron.

Tabela 4.3 *(continuação)* Sequência de oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizadas para a amplificação dos genes de resistência pesquisados neste estudo.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' - 3')	Gene alvo	Amplicon (pb)	Condições de termocilagem	Referência
intl1 F QAC R	CCGTAGAAGAACAGC CGGATGTTGCGATTACTTCG	*intl1* *qacEDE1*	Integron	Denaturação: 94°C – 10 minutos; Denaturação: 94°C – 1 minuto; Anelamento: 60°C – 1 minuto; Extensão: 72°C – 5 minutos; 35 ciclos Extensão final: 72°C – 10 minutos	Barbosa, 2011

4.5 Caracterização molecular dos isolados do CBc

4.5.1 Avaliação da similaridade genética

Os isolados do CBc que apresentaram a presença de genes envolvidos com a resistência bacteriana foram molecularmente caracterizados pela técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

4.5.1.1 Técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* e interpretação dos padrões moleculares

Para a observação do padrão molecular das amostras clínicas do CBc resistentes a SXT, a técnica padrão utilizada foi a análise do DNA cromossômico pela eletroforese de campo pulsado "*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*" (Pfaller *et al.* 1992).

Para cada amostra bacteriana, foi preparada uma suspensão em 3 mL de TSB. As amostras foram incubadas a 37°C sob agitação por 18 a 24 horas e, então, centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, o centrifugado de células foi diluído em 1 mL de solução de NaCl 0,85% e transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado de células, os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em solução de NaCl 0,85% na proporção de 1:1, isto é, o volume da NaCL em µL foi equivalente ao peso do centrifugado em µg. Um volume de 5 µL desta suspensão celular foi transferido para outro tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e foi adicionado 300 µL da solução tampão TEM (Tris 100 mM pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada com 340 µL de agarose (*low melt,* Invitrogen, Carlsbad, EUA) para a formação de pequenos blocos de

géis contendo o DNA cromossômico, denominados *plugs*. Após homogeinizado, a mistura foi adicionada nos moldes para *plug*¸ e resfriada à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos para a sua completa solidificação. Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em 2 mL de solução EC (Tris 6mM pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01 M ; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2%) a 37°C em placas de microtitulação de 24 poços. Em seguida, o tampão EC foi removido, duas lavagens com tampão CHEF-TE (Tris 0,1M pH 7,5; EDTA 0,1M) de 30 minutos cada em temperatura ambiente foram realizadas e o material foi incubado a 50°C em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4M pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo 100 µL de proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, EUA) por um período de 12 horas. Após este período de incubação, os blocos foram lavados com 2 mL de solução CHEF-TE (quatro lavagens de 1 hora de incubação cada) e armazenados nessa solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

Para a digestão do DNA bacteriano, primeiramente os blocos foram cortados em 1/3 do seu tamanho original, transferidos para uma nova placa de microtitulação de 96 poços e lavados 4 vezes com 200 µL de tampão DNS (MgCl 1M; Tris 1 M pH 8.0). O DNA bacteriano foi digerido com a enzima de restrição SpeI (10 unidades/amostra) diluída em tampão NEB 4 (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, EUA - 10U por amostra), incubado por 12 a 18 horas a 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% (Ultrapure Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA) no sistema CHEF-DR II (BioRad, Richmond, CA) e o padrão da corrente elétrica (*switch time*) foi de inicial 5 e final 60 segundos. A eletroforese foi realizada por 23 horas, em solução 0,5x de TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M) à temperatura de 13°C e corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Como marcador de peso molecular, foi utilizado Lambda *ladder* Marker 50 pares de base (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, EUA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 µL/mL) (Sigma

Aldrich, St. Loius, Missouri, EUA) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e a diferenciação das bandas visualizada sob a luz ultravioleta - 320nm (GelDoc Quantity One; BioRad Laboratories, EUA).

De acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (Tenover *et al.*, 1995) foram consideradas idênticas amostras que apresentaram perfil migratório idêntico para todas as bandas. Foram consideradas semelhantes e pertencentes a um mesmo clone as amostras que apresentaram perfil migratório com diferença em até seis bandas. As amostras que apresentaram sete bandas ou mais discordantes foram consideradas amostras distintas. Para a interpretação dos padrões moleculares e seus subtipos, os representantes de cada clone foram categorizados com uma letra maiúscula e um número arábico.

4.5.2 Estudo da localização do gene codificador da resistência a SXT e demais betalactamases

4.5.2.1 Extração do DNA total

O DNA cromossomal dos isolados do CBc foi extraído com auxílio do kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, França) de acordo com as especificações do fabricante.

4.5.2.2 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial dos isolados do CBc foi realizada por duas metodologias distintas: técnica de Kieser (Kieser, 1984), que tem por finalidade a extração de plasmídeos de alto peso molecular, e o kit Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germanny), o qual possui a capacidade de extração de plasmídeos de baixo peso molecular.

4.5.2.2.1 Extração de Kieser

Para a obtenção de colônias puras, as amostras bacterianas foram cultivadas em ágar Müeller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Com auxílio de uma alça de

semeadura, foram coletadas de sete a dez colônias e adicionadas a um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de Kieser (sacarose 0,3M, Tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, verde de bromocresol 0,02%), homogeinizando cuidadosamente para evitar a formação de grumos de colônias bacterianas. Em seguida, foi adicionado 250 µL de solução de lise (SDS 2%, NaOH 0,3N e água destilada estéril) e os tubos foram cuidadosamente homogeneizados por inversão (6 a 8 vezes) e incubados a 55°C durante 30 minutos (Boekel Scientific, Pensilvania, EUA). Após a incubação, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente por 5 minutos e, então, foi adicionado 250 µL da fase inferior de fenol:clorofórmio (fenol 50g, clorofórmio 50 mL, hidroxiquinoleína 50 mg, água destilada q.s.p.). Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 12.000 rpm por 12 minutos a 4°C. Um volume de aproximadamente 300 µL do sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo tipo eppendorf de 0,6 mL. Paralelamente, foram extraídos os plasmídios das cepas *E. coli* NCTC 50192 e NCTC 50193, os quais foram utilizados como marcadores de peso plasmidial. Após a extração, as alíquotas de DNA total e de DNA plasmidial das amostras avaliadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Ultrapure Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA) em tampão TBE 1x (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M pH 8.0) em dois ciclos: o primeiro a 70V por 15 minutos com TBE suficiente para obter corrente elétrica sem cobrir o gel de agarose, e o segundo ciclo a 90V por aproximadamente 3 horas; após completar a cuba com TBE até cobrir totalmente o gel de agarose. O primeiro ciclo se faz necessário para que as alíquotas de DNA plasmidial sejam depositadas no poço e iniciem a migração pelo gel de agarose. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (25 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Loius, Missouri, EUA) por 20 a 30 minutos e a diferenciação das bandas visualizada sob a luz ultravioleta - 320nm (GelDoc Quantity One; BioRad Laboratories, EUA).

4.5.2.3 Reação de hibridização

Posteriormente à extração e eletroforese do DNA cromossomal e plasmidial, o material genético foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N+, Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia) pela técnica de Southern blot. Essa membrana foi submetida à reação de hibridização utilizando o kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante. O fragmento de DNA utilizado como sonda específica foi obtido por amplificação do determinante de resistência em estudo por PCR. A sonda também foi preparada utilizando os reagentes disponibilizados no mesmo kit.

4.5.2.4 Análise da transferência dos genes de resistência

A capacidade de transferência do gene de resistência foi avaliada pela metodologia de conjugação. Para esses ensaios, foi utilizada a cepa receptora *E. coli* J53, resistente à azida, e os isolados clínicos do CBc originais, os quais carreavam genes de resistência, como cepas doadoras. Uma a três colônias das bactérias doadora e receptora foram inoculadas em 3 mL de caldo LB e incubadas por três horas a 37°C sob agitação lenta. Após este período, foram misturados 200 µL e 800 µL das suspensões de células doadoras e receptoras, respectivamente, e a mistura foi incubada a 37°C e sob agitação lenta por mais três horas. Posteriormente, 600 µL desta mistura foi inoculado em três placas seletivas contendo azida 150 µg/mL e canamicina 50 µg/mL, que foram, então, incubadas a 37°C, por 24 horas. Foi adicionado, ainda, 1 mL de caldo LB aos 400 µL restantes da mistura, que foi incubada novamente a 37°C, por 18h a 24h, sem agitação. No dia seguinte, 600 µL desta mistura foi semeado novamente em três placas seletivas contendo azida 150 µg/mL e canamicina 50 µg/mL, que foram incubadas a 37°C, por 18 a 24 horas. A confirmação da transferência do gene foi realizada pela técnica de PCR a partir das colônias de

transconjugantes obtidas, utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada gene pesquisado.

5 Resultados

5.1 Amostras bacterianas

Foram avaliados 82 isolados clínicos pertencentes ao CBc, sendo 33 isolados recuperados de pacientes atendidos no hospital A, no período de 2007 a 2012, e 49 no hospital B entre os anos de 1995 e 2010.

Em relação ao sítio corpóreo de isolamento, a maioria dos isolados do CBc dos hospitais A e B foi recuperada de hemocultura (63,6%) e de escarro (96%), respectivamente. A distribuição dos isolados do CBc de acordo com o sítio corpóreo de isolamento e o hospital de procedência está representada na Figura 5.1.

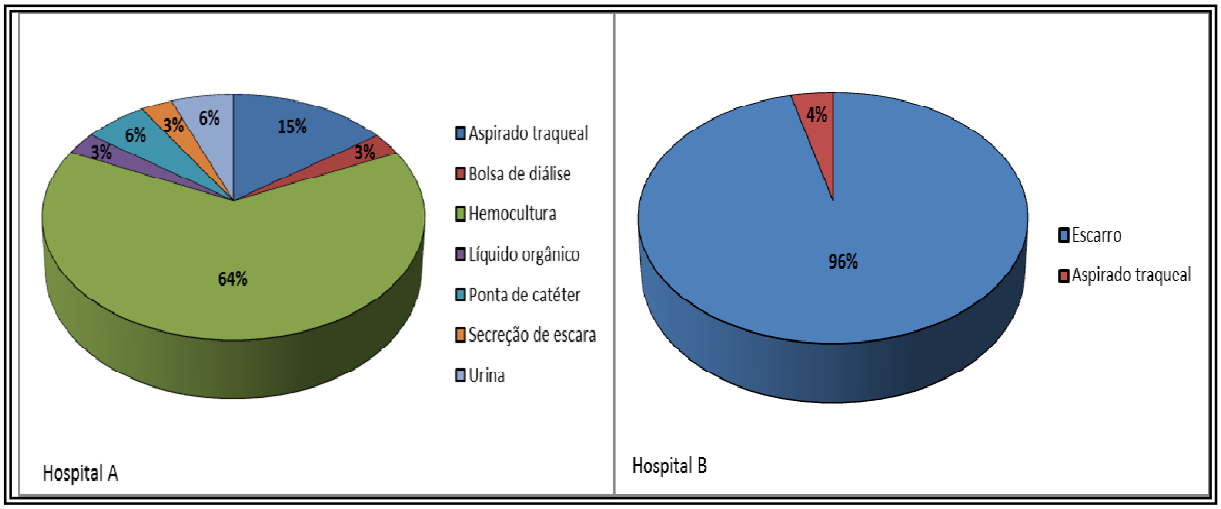


Figura 5.1 Distribuição dos isolados do CBc avaliados neste estudo de acordo com o sítio corpóreo de isolamento e com o hospital de procedência.

5.2 Identificação bacteriana

De acordo com o sequenciamento do gene *recA*, método padrão ouro, foram identificadas 44 *B. cenocepacia* (53,6%), 12 *B. multivorans* (14,6%), 10 *B. vietnamiensis* (12,2%), 9 *B. contaminans* (11%) e 7 *B. cepacia* (8,5%). *B. cenocepacia* foi a espécie mais frequente nos dois hospitais (hospital A, 42,4% (n=14) e hospital B, 61,2% (n=30)). Dentre as outras espécies do CBc avaliadas, *B. contaminans* (n=8; 24,2%) e *B. cepacia* (n=6; 18,2%) foram as espécies mais frequentemente encontradas no hospital A, enquanto *B. multivorans* (n=9; 18,3%) e *B. vietnamiensis* (n=8; 16,3%) foram as mais frequentes no hospital B. Na Figura 5.2 está demonstrada a distribuição destes isolados de acordo com o hospital de procedência.

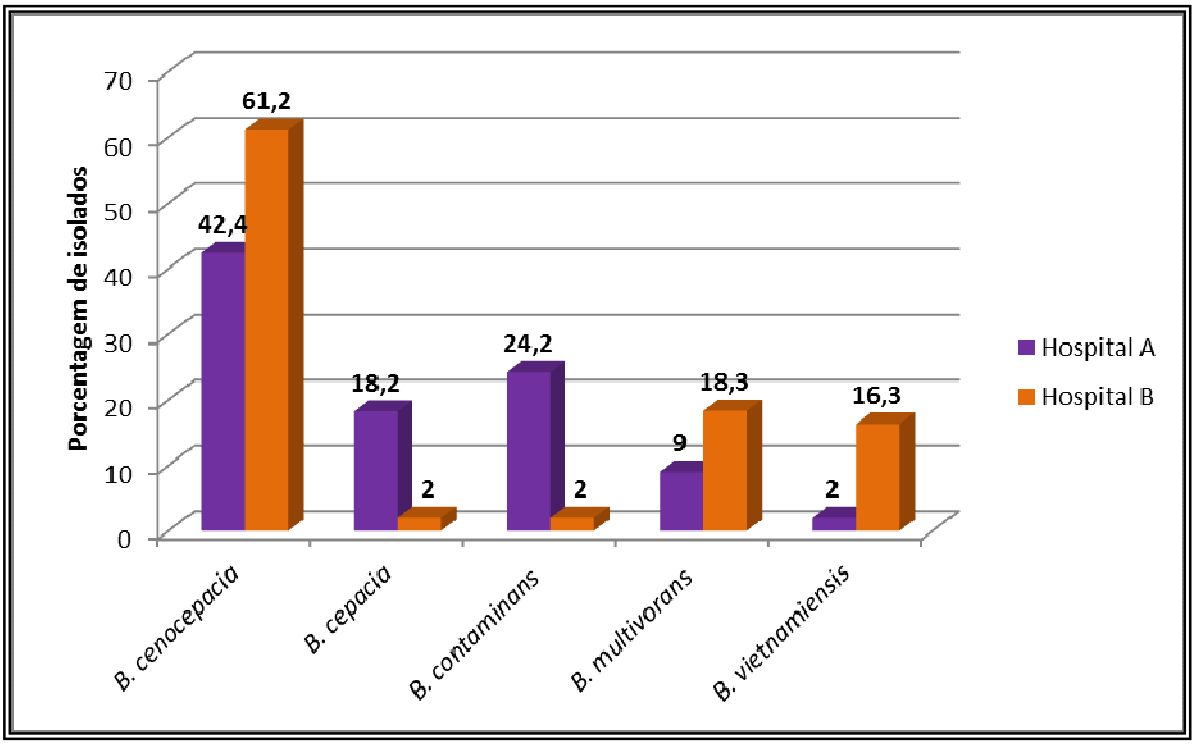


Figura 5.2 Distribuição das espécies do CBc de acordo com o hospital de procedência.

Comparando os resultados da identificação dos isolados do CBc pelo sequenciamento do gene *recA* com aqueles obtidos pelo MALDI-TOF MS, houve uma concordância de 100% em relação à identificação do gênero bacteriano entre as duas metodologias. A concordância para as duas metodologias para a identificação dos isolados

em nível de espécie foi de 75,6% (n=62). Para os resultados discordantes, a re-identificação dos isolados foi repetida pelo sequenciamento do gene *recA* e a identificação das espécies foi confirmada de acordo com o resultado inicial. Da mesma forma, a identificação das espécies pelo MALDI-TOF MS foi repetida para estes mesmos isolados, a partir de uma nova extração de proteínas, e os resultados também foram confirmados (Tabela 5.1).

Dentre os 62 isolados do CBc para os quais a identificação em nível de espécie foi concordante entre as duas metodologias, 50% eram *B. cenocepacia,* 12,2% *B. multivorans,* 11% *B. vietnamiensis* e 2,4% *B. cepacia*. Por outro lado, 100% dos isolados de *B. contaminans* e 28,5% dos isolados de *B. cepacia* não foram corretamente identificados em nível de espécie pelo software MALDI BioTyper 3.0. Adicionalmente, o software não foi capaz de distinguir dois espectros de massas semelhantes, reportando a identificação de duas possíveis espécies diferentes com *scores* acima de 2.3 para sete isolados (8,5%) analisados. Somente em dois destes sete isolados, um dos espectros de massas gerado correspondia a uma das espécies confirmada pelo sequenciamento do gene *recA* (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Comparação entre os resultados obtidos pelo sequenciamento do gene *recA* e pelo MALDI-TOF MS para a identificação dos isolados pertencentes ao CBc.

Nº de isolados	ID pelo sequenciamento do *recA*	Identificação pelo MALDI-TOF MS			% de concordância da identificação ao nível de espécies
		ID correta do gênero (N)	ID correta das espécies (N)*	ID errônea* (N= 20)	
44	*B. cenocepacia*	44	41	*B. vietnamiensis* (01) *B. cepacia/B. stabilis* (01)# *B. cenocepacia/B. cepacia* (01)#	93,1
12	*B. multivorans*	12	10	*B. cepacia/B. stabilis* (01)# *B. cenocepacia* (01)	83,3
10	*B. vietnamiensis*	10	09	*B. cepacia* (01)	90
09	*B. contaminans*	09	0	*B. cepacia* (05) *B. cenocepacia* (02) *B. multivorans* (01) *B. cepacia/B. pyrrocinia* (01)#	0
07	*B. cepacia*	07	02	*B. cenocepacia* (02) *B. cenocepacia/B. vietnamiensis* (01)# *B. cenocepacia/B. cepacia* (02)#	28,5
% de concordância entre o MALDI-TOF MS e o sequenciamento do *recA*		100%	75,6%		

*****Os isolados foram identificados pelo MALDI-TOF MS com scores ≥ 2.3.
Não foi possível fazer a distinção entre as espécies pelo MALDI-TOF MS.

5.3 Avaliação da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

As CIMs capazes de inibir o crescimento bacteriano em 50% (CIM_{50}) e 90% (CIM_{90}) e o perfil de sensibilidade das 82 amostras do CBc estudadas frente aos antimicrobianos testados estão apresentados na Tabela 5.2. Estes resultados foram obtidos utilizando a microdiluição em caldo como técnica padrão ouro para a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos.

SXT foi o antimicrobiano que apresentou a maior porcentagem de sensibilidade (97,6%) e atividade *in vitro* CIM_{50}, 1/19 µg/mL. Ceftazidima e meropenem apresentaram a mesma atividade antimicrobiana (CIM_{50}, 4 µg/mL) e taxas de sensibilidade similares (86,6% e 87,8%, respectivamente). Por sua vez, minociclina e levofloxacina também apresentaram a mesma atividade *in vitro* (CIM_{50}, 2 µg/mL), entretanto a porcentagem de isolados sensíveis a minociclina foi maior (87,8%) em comparação à levofloxacina (50%). A associação de ticarcilina/ácido clavulânico apresentou péssima atividade antimicrobiana (CIM_{50}, >256 µg/mL), sendo também o antimicrobiano que apresentou a menor taxa de sensibilidade (1,2%).

Além disso, os dados foram analisados de acordo com a procedência da amostra (Tabela 5.3). No geral, os isolados procedentes do hospital B foram mais sensíveis que os do hospital A. As maiores diferenças foram observadas para ceftazidima (hospital A, 75,8%; hospital B, 93,9%), minociclina (hospital A, 81,8%; hospital B, 91,8%) e SXT (hospital A, 93,9%; hospital B, 100%). Entretanto, a porcentagem de isolados sensíveis recuperadas do hospital A (75,8%; CIM_{50}, 2 µg/mL) para levofloxacina foi muito maior que o hospital B (32,7%; CIM_{50}, 4 µg/mL). Em relação à atividade *in vitro,* os valores de CIM_{50} de levofloxacina foram até duas vezes inferiores no hospital A comparadas com aquelas observadas no hospital B.

Tabela 5.2 Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 82 isolados clínicos do CBc avaliados neste estudo.

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)[a]			% por categoria[b]	
	CIM_{50}	CIM_{90}	Pontos de corte (S – I – R)[b]	Sensível	Resistente
Ceftazidima	4	16	≤8 – 16 - ≥32	86,6	7,3
Cloranfenicol	16	128	≤8 – 16 - ≥32	30,5	35,4
Levofloxacina	2	8	≤2 – 4 - ≥8	50	17,1
Meropenem	4	8	≤4 – 8 - ≥16	87,8	1,2
Minociclina	2	8	≤4 – 8 - ≥16	87,8	3,7
TIC/AC	>256/2	>256/2	≤16/2 – 32/2 - ≥128/2	1,2	97,6
SXT	1/19	2/38	≤2/38 - ≥4/76	97,6	2,4

[a] CIM determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2012a).
[b] Pontos de corte estabelecidos pelo documento CLSI M100-S24 (2014). S, sensibilidade; R, resistência; I, intermediário.
TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim.

Tabela 5.3 Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para os isolados clínicos do CBc de acordo com o hospital de procedência.

Antimicrobiano	Hospital A (n= 33)				Hospital B (n= 49)			
	CIM (µg/mL)[a]		% por categoria[b]		CIM (µg/mL)[a]		% por categoria[b]	
	CIM_{50}	CIM_{90}	Sensível	Resistente	CIM_{50}	CIM_{90}	Sensível	Resistente
Ceftazidima	4	32	75,8	15,2	2	4	93,9	2
Cloranfenicol	16	64	30,3	27,3	16	128	30,6	40,8
Levofloxacina	2	8	75,8	18,2	4	4	32,7	16,3
Meropenem	4	4	87,9	0	4	8	87,8	2
Minociclina	2	8	81,8	9,1	4	4	91,8	0
TIC/AC	>256	>256	3	97	>256	>256	0	98
SXT	0,5	2	93,9	6,1	1	1	100	0

[a] CIM determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2012a).
[b] As porcentagens de sensibilidade e resistência foram determinadas seguindo os parâmetros estabelecidos pelo CLSI M100-S24 (2014).
TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetorpim/sulfametoxazol.

O perfil de sensibilidade dos antimicrobianos testados de acordo com a espécie do CBc também foi comparado (Figura 5.3, Tabela 5.4). Em geral, meropenem e SXT foram os antimicrobianos que apresentaram as maiores taxas de sensibilidade para todas as espécies avaliadas, com valores superiores a 75% e 85%, respectivamente. Para minociclina e ceftazidima, as taxas de sensibilidade também foram boas, exceto para *B. cepacia* (57,1% e 42,9%, respectivamente). Taxas de sensibilidade para levofloxacina maiores que 80% somente foram observadas para *B. multivorans* (83,3%) e *B. contaminans* (88,9%). Em todas as espécies avaliadas neste estudo, cloranfenicol e ticarcilina/ácido clavulânico foram os dois antimicrobianos que apresentaram o pior desempenho, tanto nos resultados de sensibilidade, quanto nos valores de atividade *in vitro*. *B. multivorans* foi a espécie que apresentou as melhores taxas de sensibilidade frente os antimicrobianos testados. Por sua vez, *B. cepacia* foi a espécie que apresentou taxas de sensibilidade inferiores àquelas observadas nas outras espécies do CBc.

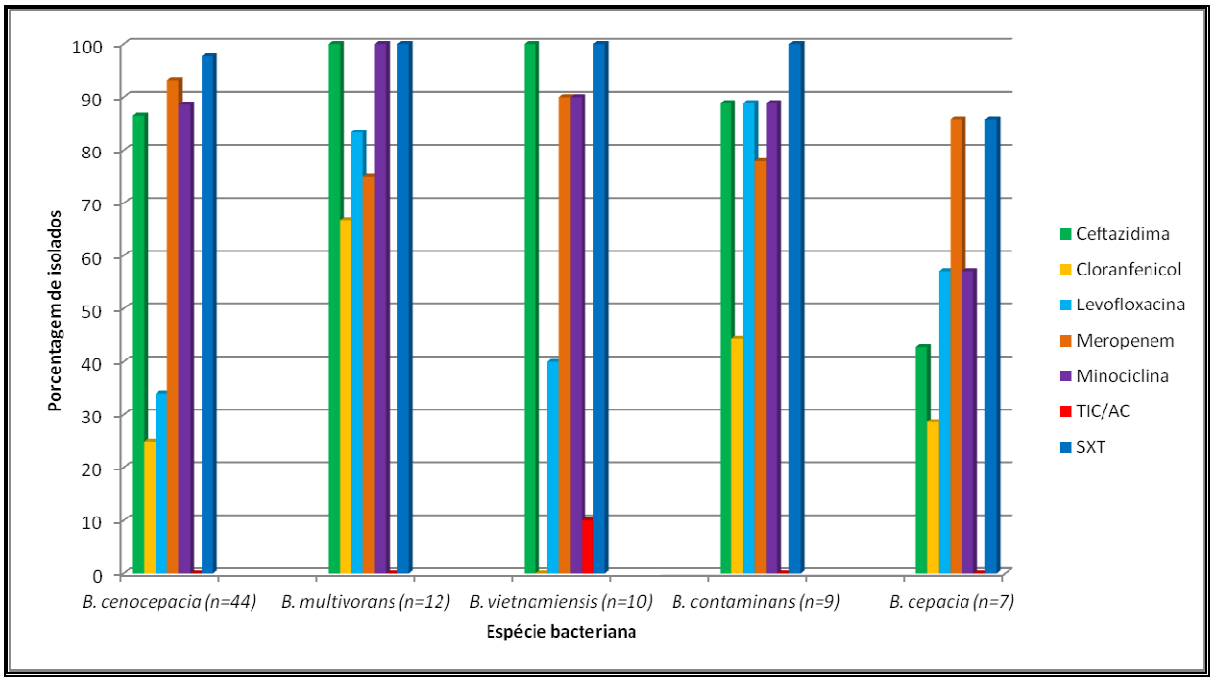


Figura 5.3 Distribuição do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com a espécie do Complexo *Burkholderia cepacia* avaliada neste estudo.
TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetorpim/sulfametoxazol

Tabela 5.4 Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobiano	*B. cenocepacia* (n=44)				*B. multivorans* (n=12)				*B. vietnamiensis* (n=10)				*B. contaminans* (n=09)				*B. cepacia* (n=07)			
	[a]CIM_{50} (µg/mL)	[a]CIM_{90} (µg/mL)	% S[b]	% R[b]	[a]CIM_{50} (µg/mL)	[a]CIM_{90} (µg/mL)	% S[b]	% R[b]	[a]CIM_{50} (µg/mL)	[a]CIM_{90} (µg/mL)	% S[b]	% R[b]	[a]CIM_{50} (µg/mL)	[a]CIM_{90} (µg/mL)	% S[b]	% R[b]	[a]CIM_{50} (µg/mL)	[a]CIM_{90} (µg/mL)	% S[b]	% R[b]
CAZ[c]	4	16	86,4	9,1	2	4	100	0	2	4	100	0	8	32	88,9	11,1	16	64	42,9	14,3
CLO[c]	16	128	25	40,9	8	16	66,7	8,3	16	128	0	40	16	64	44,4	22,2	32	128	28,6	57,1
LEV[c]	4	8	34,1	15,9	1	4	83,3	8,3	4	8	40	20	2	>32	88,9	11,1	2	8	57,1	42,9
MER[c]	4	4	93,2	2,3	4	8	75,0	0	2	4	90	0	4	8	77,8	0	2	8	85,7	0
MIN[c]	4	8	88,6	2,3	1	2	100	0	2	4	90	0	2	16	88,9	11,1	4	32	57,1	14,3
TIC/AC[c]	>256	>256	0	100	>256	>256	0	100	>256	>256	10	80	>256	>256	0	100	>256	>256	0	100
SXT[c]	1	2	97,7	2,3	0,5	1	100	0	1	2	100	0	1	2	100	0	1	8	85,7	14,3

[a] CIM determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI (2012a).
[b] As porcentagens de sensibilidade e resistência foram determinadas seguindo os parâmetros estabelecidos pelo CLSI M100-S24 (2014). S, sensibilidade; R, resistência.
[c] CAZ, ceftazidima; CLO, cloranfenicol; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; MIN, minociclina; TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetorpim/sulfametoxazol.

5.3.1 Comparação entre os resultados obtidos para microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão

5.3.1.1 Microdiluição em caldo *versus* diluição em ágar

A concordância geral (CIM $\pm 1\log_2$) entre as metodologias de microdiluição em caldo e diluição em ágar foi maior que 93% para todos os antimicrobianos testados, exceto cloranfenicol (89%). Entretanto, a concordância por categoria foi menor que 90% para cloranfenicol (72%), levofloxacina (85,3%) e minociclina (83%). Comparando as duas metodologias, SXT apresentou concordância geral de 98,8% e 100% de concordância por categoria (Figuras 5.4 e 5.5; Anexo 1). Taxas de erros leves maiores que 10% foram observadas para cloranfenicol (26,8%), levofloxacina (12,2%) e minociclina (17%). Embora estejam dentro dos limites aceitáveis, foram observados erros graves para cloranfenicol (1,2%), levofloxacina (1,2%) e ticarcilina/ácido clavulânico (1,2%), e erros muito graves, também dentro dos limites aceitáveis, para ceftazidima (1,2%) e levofloxacina (1,2%) (Tabela 5.5).

5.3.1.2 Microdiluição em caldo *versus* Etest

Boas taxas de concordância geral entre o Etest e a microdiluição em caldo foram observadas para levofloxacina (92,7%), meropenem (98,8%), minociclina (96,3%) e ticarcilina/ácido clavulânico (97,5%). A maioria dos antimicrobianos apresentou concordância de categoria acima de 90%, exceto cloranfenicol (60,9%) e levofloxacina (87,8%) (Figuras 5.4 e 5.5; Anexo 1). Embora a concordância geral para SXT tenha sido de 80,4%, 100% dos isolados apresentaram concordância por categoria. Taxas de erros graves dentro dos limites aceitáveis foram observadas somente para ticarcilina/ácido clavulânico (1,2%). Porém, taxas inaceitáveis de erros leves foram observadas para cloranfenicol

(36,5%), enquanto taxas de erros muito graves inaceitáveis foram observadas para ceftazidima (2,4%), cloranfenicol (2,4%) e levofloxacina (2,4%) (Tabela 5.6).

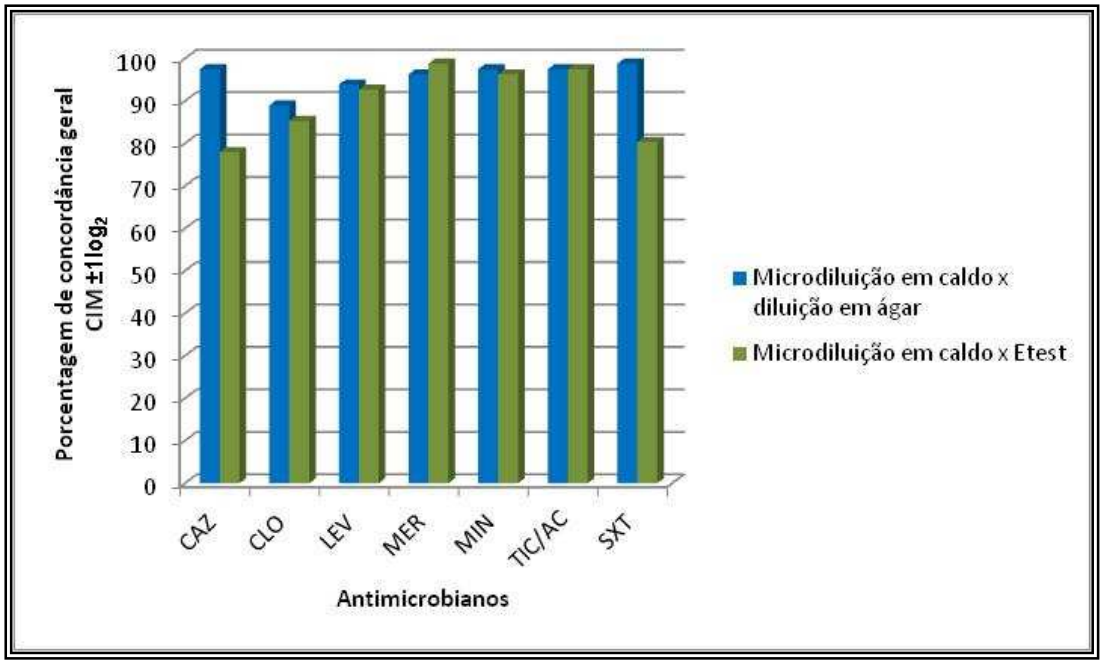


Figura 5.4 Concordância geral (CIM±1$\log_2$) para as técnicas de microdiluição em caldo diluição em ágar e Etest para os 82 isolados clínicos do CBc avaliados neste estudo.
CAZ, ceftazidima; CLO, cloranfenicol; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; MIN, minociclina; TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

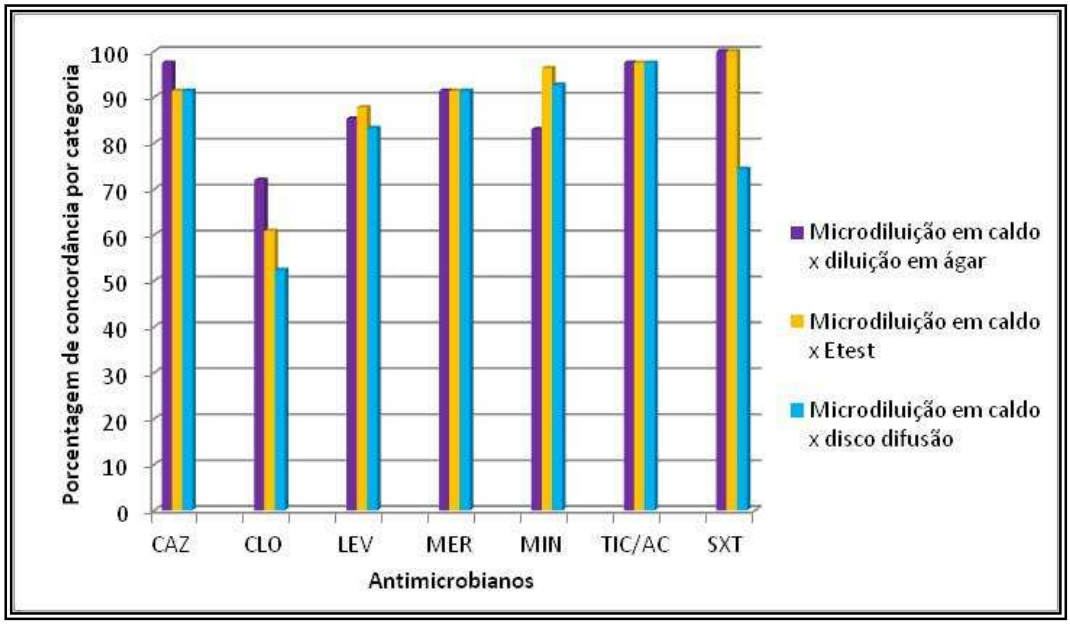


Figura 5.5 Concordância por categoria para as técnicas de microdiluição em caldo (referência) diluição em ágar e Etest para os 82 isolados clínicos do CBc avaliados neste estudo.
CAZ, ceftazidima; CLO, cloranfenicol; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; MIN, minociclina; TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabela 5.5 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Antimicrobianos	N	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
Ceftazidima	82	80 (97,5)	80 (97,5)	2 (2,4)	1 (1,2)	0	1 (1,2)
Cloranfenicol	82	73 (89)	59 (72)	23 (28)	22 (26,8)	1 (1,2)	0
Levofloxacina	82	77 (93,9)	70 (85,3)	12 (14,6)	10 (12,2)	1 (1,2)	1 (1,2)
Meropenem	82	79 (96,3)	75 (91,4)	7 (8,5)	7 (8,5)	0	0
Minociclina	82	80 (97,5)	68 (83)	14 (17)	14 (17)	0	0
TIC/AC	82	80 (97,5)	80 (97,5)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0
SXT	82	81 (98,8)	82 (100)	0 (0)	0	0	0

TIC/AC,ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabela 5.6 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Antimicrobianos	n	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria n (%)	Discordantes N (%)	Erros leves n (%)	Erros graves n (%)	Erros muito graves n (%)
Ceftazidima	82	64 (78)	75 (91,4)	7 (8,5)	5 (6)	0	2 (2,4)
Cloranfenicol	82	70 (85,3)	50 (60,9)	32 (39)	30 (36,5)	0	2 (2,4)
Levofloxacina	82	76 (92,7)	72 (87,8)	10 (12,2)	8 (9,7)	0	2 (2,4)
Meropenem	82	81 (98,8)	75 (91,4)	7 (8,5)	7 (8,5)	0	0
Minociclina	82	79 (96,3)	79 (96,3)	3 (3,6)	3 (3,6)	0	0
TIC/AC	82	80 (97,5)	80 (97,5)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0
SXT	82	66 (80,4)	82 (100)	0 (0)	0	0	0

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

5.3.1.3 Microdiluição em caldo *versus* disco difusão

A técnica de disco difusão apresentou concordância por categoria maior que 90% para ceftazidima (91,4%), meropenem (91,4%), minociclina (94%), e ticarcilina/ácido clavulânico (97,5%). Porém, a pior taxa de concordância foi observada para cloranfenicol (52,4%), seguido do SXT (74,4%) e da levofloxacina (83,3%) (Figura 5.5; Anexo 1). Consequentemente, as taxas de erros leves (34,1%) e erros muito graves (12,2%) elevadas também foram observadas para o cloranfenicol. SXT (23,1%) e levofloxacina (13,4%) também apresentaram taxas de erros leves fora dos limites aceitáveis, enquanto que erros muito graves, acima dos limites aceitáveis, foram observados para ceftazidima (2,4%) e levofloxacina (3,6%). Taxas de erros graves fora dos limites aceitáveis foram observadas somente para SXT (2,4%) (Tabela 5.7).

5.3.1.4 Diluição em ágar *versus* Etest

Quando comparamos os resultados das CIMs obtidas pelo Etest com aquelas da ágar diluição, observamos que a maioria dos antimicrobianos apresentou concordância geral acima de 90%, exceto para ceftazidima (83%). Meropenem, ticarcilina/ácido clavulânico e SXT apresentaram 100% de concordância por categoria, seguido pela ceftazidima (94%), minociclina (86,6%) e levofloxacina (76,8%) (Figura 5.6; Anexo 1). Nenhum erro categórico foi observado para meropenem, ticarcilina/ácido clavulânico e SXT. Por outro lado, taxas de erros leves, acima do limite aceitável, foram observados para cloranfenicol (19,5%), levofloxacina (14,6%) e minociclina (13,4), enquanto erros muito graves, também fora dos limites aceitáveis, foram observadas para cloranfenicol (3,6%) e levofloxacina (2,4%) (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Antimicrobianos	N	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
Ceftazidima	82	75 (91,4)	7 (8,5)	5 (6,1)	0	2 (2,4)
Cloranfenicol[a]	82	43 (52,4)	39 (47,5)	28 (34,1)	1 (1,2)	10 (12,2)
Levofloxacina[b]	82	68 (83,3)	14 (17)	11 (13,4)	0	3 (3,6)
Meropenem	82	75 (91,4)	7 (8,5)	6 (7,3)	1 (1,2)	0
Minociclina	82	77 (92,7)	5 (6,2)	6 (7,3)	0	1 (1,2)
Ticarcilina/ac. clavulânico[b]	82	80 (97,5)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0
Trimetoprim/sulfametoxazol	82	61 (74,4)	21 (25,6)	19 (23,1)	2 (2,4)	0

[a] Interpretação dos resultados realizada com os pontos de corte estabelecidos para enterobactérias segundo o CLSI (CLSI, 2014).

[b] Interpretação dos resultados realizada com os pontos de corte estabelecidos para *P. aeruginosa* segundo o CLSI (CLSI, 2014).

Tabela 5.8 Comparação entre as técnicas de ágar diluição (referência) e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Antimicrobianos	n	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria n (%)	Discordantes N (%)	Erros leves n (%)	Erros graves n (%)	Erros muito graves n (%)
Ceftazidima	82	68 (83)	77 (94)	5 (6,1)	4 (4,8)	0 (0)	1 (1,2)
Cloranfenicol	82	74 (90,2)	63 (76,8)	19 (23,1)	16 (19,5)	0 (0)	3 (3,6)
Levofloxacina	82	76 (92,7)	67 (81,7)	15 (18,3)	12 (14,6)	1 (1,2)	2 (2,4)
Meropenem	82	78 (95,1)	82 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Minociclina	82	81 (98,8)	71 (86,6)	11 (13,4)	11 (13,4)	0 (0)	0 (0)
TIC/AC	82	82 (100)	82 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SXT	82	75 (91,4)	82 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

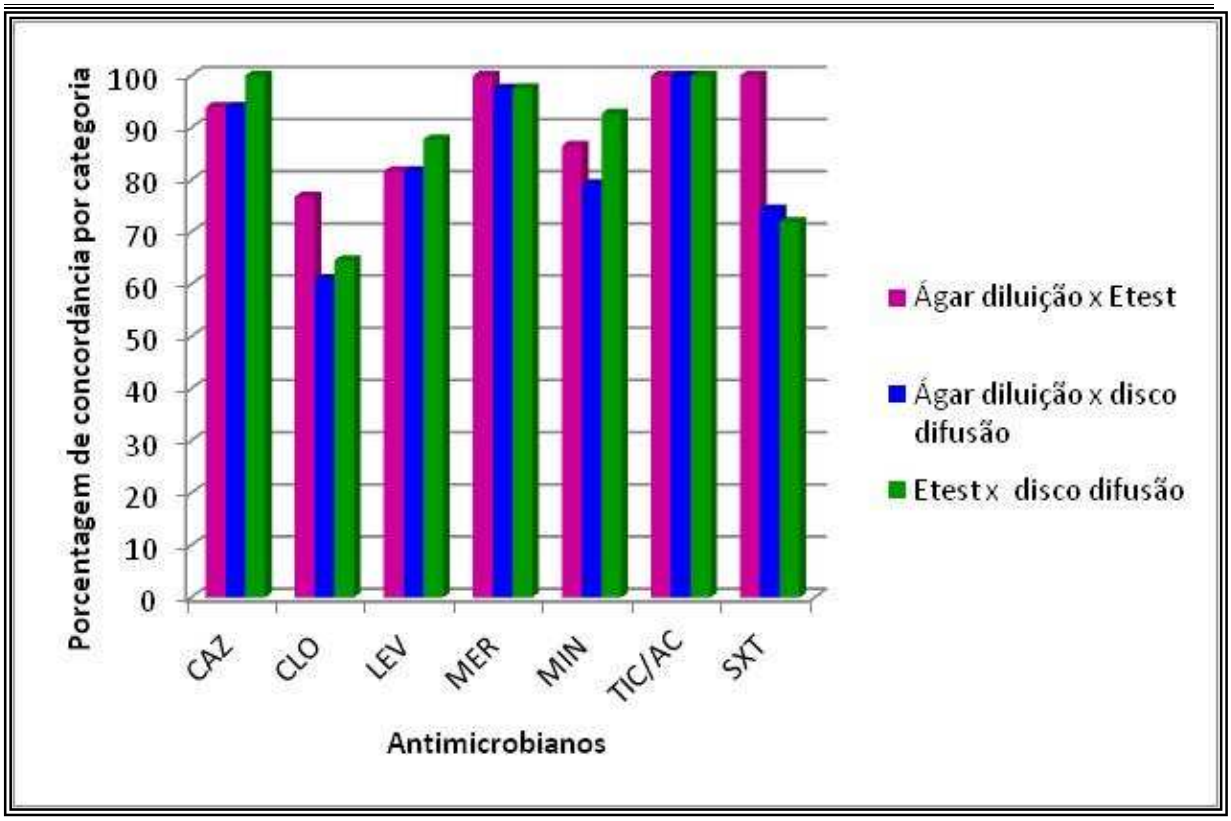


Figura 5.6 Concordância por categoria para as técnicas de sensibilidade avaliadas neste estudo para os 82 isolados clínicos do CBc.
CAZ, ceftazidima; CLO, cloranfenicol; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; MIN, minociclina; TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

5.3.1.5 Diluição em ágar *versus* disco difusão

A taxa de concordância por categoria entre as técnicas de diluição em ágar e disco difusão foi maior que 90% para ceftazidima (94%), meropenem (97,5%) e ticarcilina/ácido clavulânico (100%) (Figura 5.6; Anexo 1). Elevada taxa de discordância foi observada para cloranfenicol, distribuída em 29,2% de erros leves e 9,7% de erros muito graves, limites muito além dos limites aceitáveis. Levofloxacina (15,8%), minociclina (20,7%) e SXT (25,6%) também apresentaram elevadas taxas de erros leves. Erros muito graves, acima 1,5%, foram observados para cloranfenicol (9,7%) e levofloxacina (2,4%) (Tabela 5.9).

5.3.1.6 Etest *versus* disco difusão

A maioria dos antimicrobianos testados apresentou resultados concordantes por categoria de sensibilidade maior que 90% quando foram comparadas as técnicas Etest e disco difusão, exceto para cloranfenicol (61%), SXT (74,4%) e minociclina (79,2%) (Figura 5.6). Erros leves, acima do aceitável, foram observados para cloranfenicol (29,2%), SXT (23,1%), minociclina (20,7%) e levofloxacina (15,8%). Elevadas taxas de erros muito graves foram encontradas para cloranfenicol (9,7%), seguido por levofloxacina (2,4%) (Tabela 5.10).

5.3.1.7 Comparação entre as metodologias de microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão de acordo com a espécie do CBc

Para esta análise comparativa, utilizamos como técnica de referência apenas a microdiluição em caldo.

5.3.1.7.1 Microdiluição em caldo *versus* diluição em ágar

B. multivorans foi a espécie que apresentou os melhores índices de concordância geral para todos os antimicrobianos testados quando foram comparadas as técnicas de microdiluição em caldo e ágar diluição. Valores inferiores a 90% foram observados para *B. cenocepacia* (cloranfenicol, 88,6%), *B. vietnamiensis* (meropenem, 70%; ticarcilina/ácido clavulânico, 80%); *B. contaminans* (cloranfenicol, 66,6%; levofloxacina, 77,7%) e *B. cepacia* (cloranfenicol, 71,4%; SXT, 85,7%). Na avaliação da concordância por categoria, os piores resultados foram apresentados para *B. vietnamiensis*.

Taxas de erros leves fora dos limites aceitáveis foram observadas em todas as espécies avaliadas, principalmente em *B. cenocepacia*. Entretanto, taxas de erros graves e erros muito graves inaceitáveis foram observadas para ceftazidima, cloranfenicol e levofloxacina contra *B. cenocepacia* e ticarcilina/ácido clavulânico contra *B. vietnamiensis* (Tabela 5.11).

Tabela 5.9 Comparação das técnicas de diluição em ágar (referência) e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Antimicrobianos	N	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
Ceftazidima	82	77 (94)	5 (6,1)	4 (4,8)	0 (0)	1 (1,2)
Cloranfenicol[a]	82	50 (61)	32 (39)	24 (29,2)	0 (0)	8 (9,7)
Levofloxacina[b]	82	67 (81,7)	15 (18,3)	13 (15,8)	0 (0)	2 (2,4)
Meropenem	82	80 (97,5)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0 (0)
Minociclina	82	65 (79,2)	17 (20,7)	17 (20,7)	0 (0)	0 (0)
Ticarcilina/ac. clavulânico[b]	82	82 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trimetoprim/sulfametoxazol	82	61 (74,4)	21 (25,6)	19 (23,1)	2 (2,4)	0 (0)

[a] Interpretação dos resultados realizada com os pontos de corte estabelecidos para enterobactérias segundo o CLSI (CLSI, 2014).

[b] Interpretação dos resultados realizada com os pontos de corte estabelecidos para *P. aeruginosa* segundo o CLSI (CLSI, 2014).

Tabela 5.10 Comparação das técnicas de Etest (referência) e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos em amostras clínicas do CBc.

Antimicrobianos	N	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
Ceftazidima	82	82 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cloranfenicol[a]	82	53 (64,6)	29 (35,3)	26 (31,7)	2 (2,4)	1 (1,2)
Levofloxacina[b]	82	72 (87,8)	10 (12,2)	7 (8,5)	1 (1,2)	2 (2,4)
Meropenem	82	80 (97,6)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0 (0)
Minociclina	82	76 (92,7)	6 (7,3)	5 (6,1)	0 (0)	1 (1,2)
Ticarcilina/ac. clavulânico[b]	82	82 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trimetoprim/sulfametoxazol	82	59 (72)	23 (28)	20 (24,3)	3 (3,6)	0 (0)

[a] Interpretação dos resultados realizada com os pontos de corte estabelecidos para enterobactérias segundo o CLSI (CLSI, 2014).

[b] Interpretação dos resultados realizada com os pontos de corte estabelecidos para *P. aeruginosa* segundo o CLSI (CLSI, 2014).

Tabela 5.11 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobianos	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
B. cenocepacia (n=44)						
Ceftazidima	42 (95,4)	42 (95,4)	2 (4,5)	1 (2,2)	0	1 (2,2)
Cloranfenicol	39 (88,6)	33 (75)	11 (25)	10(22,7)	1 (2,2)	0
Levofloxacina	42 (95,4)	37 (84)	7 (15,9)	5 (11,3)	1 (2,2)	1 (2,2)
Meropenem	44 (100)	43 (97,2)	1 (2,2)	1 (2,2)	0	0
Minociclina	43 (97,2)	35 (79,5)	9 (20,4)	9 (20,4)	0	0
TIC/AC	44 (100)	44 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	44 (100)	44 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. multivorans (n=12)						
Ceftazidima	12 (100)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	12 (100)	9 (75)	3 (25)	3 (25)	0	0
Levofloxacina	11 (91,6)	11 (91,6)	1 (8,3)	1 (8,3)	0	0
Meropenem	12 (100)	9 (75)	3 (25)	3 (25)	0	0
Minociclina	11 (91,6)	11 (91,6)	1 (8,3)	1 (8,3)	0	0
TIC/AC	12 (100)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	12 (100)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. vietnamiensis (n=10)						
Ceftazidima	10 (100)	10 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	9 (90)	7 (70)	3 (30)	3 (30)	0	0
Levofloxacina	10 (10)	9 (90)	1 (10)	1 (10)	0	0

Tabela 5.11 *(continuação)* Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobianos	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
B. vietnamiensis (n=10)						
Meropenem	7 (70)	9 (90)	1 (10)	1 (10)	0	0
Minociclina	10 (100)	8 (80)	2 (20)	2 (20)	0	0
TIC/AC	8 (80)	8 (80)	2 (20)	1 (10)	1 (10)	0
SXT	10 (100)	10 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. contaminans (n=9)						
Ceftazidima	9 (100)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	6 (66,6)	5 (55,5)	4 (44,4)	4 (44,4)	0	0
Levofloxacina	7 (77,7)	6 (66,6)	3 (33,3)	3 (33,3)	0	0
Meropenem	9 (100)	7 (77,7)	2 (22,2)	2 (22,2)	0	0
Minociclina	9 (100)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
TIC/AC	9 (100)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	9 (100)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. cepacia (n=7)						
Ceftazidima	7 (100)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	5 (71,4)	5 (71,4)	2 (28,5)	2 (28,5)	0	0
Levofloxacina	7 (100)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Meropenem	7 (100)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Minociclina	7 (100)	5 (71,4)	2 (28,5)	2 (28,5)	0	0
TIC/AC	7 (100)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	6 (85,7)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

5.3.1.7.2 Microdiluição em caldo *versus* Etest

Na comparação entre as duas técnicas de acordo com a espécie, *B. contaminans* apresentou o pior desempenho na avaliação da concordância geral, exibindo índices menores que 90% para ceftazidima (55,5%), cloranfenicol (66,6%), levofloxacina (77,7%) e SXT (77,7%). Além desta espécie, *B. cenocepacia* apresentou taxas de concordância inferiores a 90% para ceftazidima (75%) e cloranfenicol (88,6%), sendo que para este último antimicrobiano a taxa de concordância por categoria também foi ruim (54,5%). A comparação entre a técnica referência e o Etest também evidenciou que, embora a concordância por categoria tenha sido 100% para SXT para todas as espécies avaliadas, a concordância geral foi abaixo do esperado para *B. multivorans* (66,6%), *B. vietnamiensis* (80%), *B. contaminans* (77,7%) e *B. cepacia* (85,7%). Taxas de erros leves inaceitáveis foram observadas para todas as espécies, enquanto taxas de erros muito graves fora dos limites aceitáveis foram observadas para *B. cenocepacia* (ceftazidima e cloranfenicol), *B. vietanamiensis* (cloranfenicol e levofloxacina) e *B. cepacia* (levofloxacina) (Tabela 5.12).

5.3.1.7.3 Microdiluição em caldo *versus* disco difusão

B. vietnamiensis, B. contaminans e *B. cepacia* foram as espécies que apresentaram as piores taxas de concordância por categoria (<90%) quando foram comparadas estas duas técnicas. Taxas de erros leves inaceitáveis foram encontradas em todas as espécies e taxas de erros muito graves maiores que 1,5% foram observadas *B. cenocepacia* (ceftazidima, cloranfenciol e levofloxacina), *B. vietnamiensis* (cloranfenicol e levofloxacina), *B. contaminans* (cloranfenicol) e *B. cepacia* (cloranfenicol e minociclina) (Tabela 5.13).

Tabela 5.12 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobianos	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
B. cenocepacia (n=44)						
Ceftazidima	33 (75)	40 (91)	4 (9)	2 (4,5)	0	2 (4,5)
Cloranfenicol	39 (88,6)	24 (54,5)	20 (45,4)	19 (43,2)	0	1 (2,2)
Levofloxacina	43 (97,7)	38 (86,3)	6 (13,6)	6 (13,6)	0	0
Meropenem	44 (100)	43 (97,7)	1 (2,2)	1 (2,2)	0	0
Minociclina	41 (93,1)	43 (97,7)	1 (2,2)	1 (2,2)	0	0
TIC/AC	44 (100)	44 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	40 (91)	44 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. multivorans (n=12)						
Ceftazidima	12 (100)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	11 (91,6)	9 (75)	3 (25)	3 (25)	0	0
Levofloxacina	12 (100)	11 (91,6)	1 (8,3)	1 (8,3)	0	0
Meropenem	11 (91,6)	9 (75)	3 (25)	3 (25)	0	0
Minociclina	12 (100)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
TIC/AC	12 (100)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	8 (66,6)	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. vietnamiensis (n=10)						
Ceftazidima	9 (90)	10 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	7 (70)	6 (60)	4 (40)	3 (30)	0	1 (10)
Levofloxacina	9 (90)	8 (80)	2 (20)	1 (10)	0	1 (10)

Tabela 5.12 *(continuação)* Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e Etest para a determinação da CIM a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobianos	Concordância geral N (%)	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
B. vietnamiensis (n=10)						
Meropenem	10 (100)	9 (90)	1 (10)	1 (10)	0	0
Minociclina	10 (100)	9 (90)	1 (10)	1 (10)	0	0
TIC/AC	8 (80)	8 (80)	2 (20)	1 (10)	1 (10)	0
SXT	8 (80)	10 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. contaminans (n=9)						
Ceftazidima	5 (55,5)	8 (88,8)	1 (11,1)	1 (11,1)	0	0
Cloranfenicol	6 (66,6)	6 (66,6)	3 (33,3)	3 (33,3)	0	0
Levofloxacina	7 (77,7)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Meropenem	9 (100)	7 (77,7)	2 (22,2)	2 (22,2)	0	0
Minociclina	9 (100)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
TIC/AC	9 (100)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	7 (77,7)	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. cepacia (n=7)						
Ceftazidima	5 (71,4)	5 (71,4)	2 (28,5)	2 (28,5)	0	0
Cloranfenicol	7 (100)	5 (71,4)	2 (28,5)	2 (28,5)	0	0
Levofloxacina	5 (71,4)	6 (85,7)	1 (14,2)	0	0	1 (14,2)
Meropenem	7 (100)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Minociclina	7 (100)	6 (85,7)	1 (14,2)	1 (14,2)	0	0
TIC/AC	7 (100)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	6 (85,7)	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabela 5.13 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobianos	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
B. cenocepacia (n=44)					
Ceftazidima	40 (91)	4 (9)	2 (4,5)	0	2 (4,5)
Cloranfenicol	26 (59)	18 (41)	12 (27,2)	1 (2,2)	5 (11,3)
Levofloxacina	33 (75)	11 (25)	10 (22,7)	0	1 (2,2)
Meropenem	43 (97,2)	1 (2,2)	1 (2,2)	0	0
Minociclina	41 (93,1)	3 (6,8)	3 (6,8)	0	0
TIC/AC	44 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	27 (61,3)	17 (38,6)	16 (36,3)	1 (2,2)	0
B. multivorans (n=12)					
Ceftazidima	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	8 (66,6)	4 (33,3)	4 (33,3)	0	0
Levofloxacina	11 (91,6)	1 (8,3)	1 (8,3)	0	0
Meropenem	9 (75)	3 (25)	3 (25)	0	0
Minociclina	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
TIC/AC	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	12 (100)	0 (0,0)	0	0	0
B. vietnamiensis (n=10)					
Ceftazidima	10 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Cloranfenicol	1 (10)	9 (90)	7 (70)	0	2 (20)
Levofloxacina	8 (80)	2 (20)	0	0	2 (20)
Meropenem	10 (100)	0 (0,0)	0	0	0

Tabela 5.13 *(continuação)* Comparação das técnicas de microdiluição em caldo e disco difusão para a determinação da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos de acordo com as espécies do CBc avaliadas neste estudo.

Antimicrobianos	Concordância por categoria N (%)	Discordantes N (%)	Erros leves N (%)	Erros graves N (%)	Erros muito graves N (%)
B. vietnamiensis (n=10)					
Minociclina	9 (90)	1 (10)	1 (10)	0	0
TIC/AC	8 (80)	2 (20)	1 (10)	1 (10)	0
SXT	7 (70)	3 (30)	2 (20)	1 (10)	0
B. contaminans (n=9)					
Ceftazidima	8 (88,8)	1 (11,1)	1 (11,1)	0	0
Cloranfenicol	5 (55,5)	4 (44,4)	3 (33,3)	0	1 (11,1)
Levofloxacina	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Meropenem	7 (77,7)	2 (22,2)	2 (22,2)	0	0
Minociclina	8 (88,8)	1 (11,1)	1 (11,1)	0	0
TIC/AC	9 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	8 (88,8)	1 (11,1)	1 (11,1)	0	0
B. cepacia (n=7)					
Ceftazidima	5 (71,4)	2 (28,5)	2 (28,5)	0	0
Cloranfenicol	3 (42,8)	4 (57,1)	2 (28,5)	0	2 (28,5)
Levofloxacina	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
Meropenem	6 (85,7)	1 (14,3)	0	1 (14,3)	0
Minociclina	5 (71,4)	2 (28,5)	1 (14,3)	0	1 (14,3)
TIC/AC	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0
SXT	7 (100)	0 (0,0)	0	0	0

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

5.3.1.7.4 Desempenho das técnicas de sensibilidade avaliadas neste estudo para *B. cenocepacia*

A comparação entre as técnicas foi realizada separadamente para *B. cenocepacia*, pois esta foi a espécie com o maior número de representantes dentre aquelas avaliadas em nosso estudo. Esta comparação foi feita, ainda, de acordo com o hospital de procedência das amostras. Entre a técnica de referência, microdiluição em caldo, e diluição em ágar, as taxas de concordância geral (CIM $\pm 1\log_2$) foram melhores para os isolados do hospital B em comparação com o hospital A. Em contrapartida, o desempenho do Etest em comparação com a microdiluição em caldo foi semelhante entre os dois hospitais, dependendo do antimicrobiano avaliado. No hospital A, somente ceftazidima (71,4%) e minociclina (85,7%) apresentaram taxas de concordância geral menores que 90%, enquanto que no hospital B, ceftazidima (66,6%) e cloranfenicol (86,6%) foram os dois antimicrobianos que apresentaram taxas inferiores do que o esperado. Por outro lado, não foram observados erros graves e erros muito graves nos isolados do hospital B, enquanto no hospital A, erros muito graves acima dos limites aceitáveis foram observados para ceftazidima (14,2%) e cloranfenicol (7,1%) (Tabelas 5.14 e 5.15).

Os isolados do hospital A foram 100% concordantes na comparação entre a técnica de disco difusão com a microdiluição em caldo para meropenm, ticarcilina/ácido clavulânico e SXT, enquanto que no hospital B taxas de concordância por categoria acima de 90% foram observadas para ceftazidima (93,3%), minociclina (93,3%), meropenem (96,6%) e ticarcilina/ácido clavulânico (100%). Embora erros de concordância para SXT não tenham sido observados no hospital A, a taxa de discordância entre as duas técnicas avaliadas para os isolados do hospital B para este antimicrobiano foi de 56,6%, distribuídos entre erros leves (53,3%) e erros graves (3,3%) (Tabelas 5.14 e 5.15).

Tabela 5.14 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e ágar diluição, Etest e disco difusão para a determinação CIM e da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos para *B. cenocepacia* procedentes do hospital A (n=14).

Antimicrobianos	Concordância (CIM ± 1log$_2$)	% de concordância (CIM ±1log$_2$)	Discordantes	% de discordantes	Erros leves n (%)	Erros graves n (%)	Erros muito graves n (%)	Concordância por categoria n (%)
Microdiluição em caldo x diluição em ágar								
Ceftazidima	12	85,7	1	7,1	0	0	1 (7,1)	13 (92,8)
Cloranfenicol	14	100	5	35,7	5 (35,7)	0	0	9 (64,3)
Levofloxacina	12	85,7	3	21,4	1 (7,1)	1 (7,1)	1 (7,1)	11 (78,5)
Meropenem	14	100	0	0	0	0	0	14 (100)
Minociclina	13	92,8	1	7,1	1 (7,1)	0	0	13 (92,8)
TIC/AC	14	100	0	0	0	0	0	14 (100)
SXT	14	100	0	0	0	0	0	100
Microdiluição em caldo x Etest								
Ceftazidima	10	71,4	2	14,2	0	0	2 (14,2)	12 (85,7)
Cloranfenicol	13	92,8	7	50	6 (42,8)	0	1 (7,1)	7 (50)
Levofloxacina	14	100	1	7,1	1 (7,1)	0	0	13 (92,8)
Meropenem	14	100	0	0	0	0	0	14 (100)
Minociclina	12	85,7	1	7,1	1 (7,1)	0	0	13 (92,8)
TIC/AC	14	100	0	0	0	0	0	14 (100)
SXT	14	100	0	0	0	0	0	14 (100)
Microdiluição em caldo x disco difusão								
Ceftazidima	NA	NA	2	14,2	0	0	2 (14,2)	12 (85,7)
Cloranfenicol	NA	NA	8	57,1	6 (42,8)	0	2 (14,2)	6 (42,8)
Levofloxacina	NA	NA	2	14,2	1 (7,1)	0	1 (7,1)	12 (85,7)
Meropenem	NA	NA	0	0	0	0	0	14 (100)
Minociclina	NA	NA	1	7,1	1 (7,1)	0	0	13 (92,8)
TIC/AC	NA	NA	0	0	0	0	0	14 (100)
SXT	NA	NA	0	0	0	0	0	14 (100)

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; NA, não aplicado.

Tabela 5.15 Comparação das técnicas de microdiluição em caldo (referência) e ágar diluição, Etest e disco difusão para a determinação CIM e da categoria de sensibilidade a diversos antimicrobianos para *B. cenocepacia* procedentes do hospital B (n=30).

Antimicrobianos	Concordância (CIM ± 1log_2)	% de concordância (CIM ±1log_2)	Discordantes	% de discordantes	Erros leves n (%)	Erros graves n (%)	Erros muito graves n (%)	Concordância por categoria n (%)
Microdiluição em caldo x diluição em ágar								
Ceftazidima	30	100	1	3,3	1 (3,3)	0	0	29 (96,6)
Cloranfenicol	25	83,3	6	20	5 (16,6)	1 (3,3)	0	24 (80)
Levofloxacina	30	100	4	13,3	4 (13,3)	0	0	26 (86,6)
Meropenem	30	100	1	3,3	1 (3,3)	0	0	29 (96,6)
Minociclina	30	100	8	26,6	8 (26,6)	0	0	22 (73,3)
TIC/AC	30	100	0	0	0	0	0	30 (100)
SXT	30	100	0	0	0	0	0	30 (100)
Microdiluição em caldo x Etest								
Ceftazidima	20	66,6	2	6,6	2 (6,6)	0	0	28 (93,3)
Cloranfenicol	26	86,6	13	43,3	13 (43,3)	0	0	17 (56,6)
Levofloxacina	29	96,6	5	16,6	5 (16,6)	0	0	25 (83,3)
Meropenem	30	100	1	3,3	1 (3,3)	0	0	29 (96,6)
Minociclina	30	100	0	0	0	0	0	30 (100)
TIC/AC	30	100	0	0	0	0	0	30 (100)
SXT	30	100	0	0	0	0	0	30 (100)
Microdiluição em caldo x disco difusão								
Ceftazidima	NA	NA	2	6,6	2 (6,6)	0	0	28 (93,3)
Cloranfenicol	NA	NA	10	33,3	6 (20)	1 (3,3)	3 (10)	20 (66,6)
Levofloxacina	NA	NA	9	30	9 (30)	0	0	21 (70)
Meropenem	NA	NA	1	3,3	1 (3,3)	0	0	29 (96,6)
Minociclina	NA	NA	2	6,6	2 (6,6)	0	0	28 (93,3)
TIC/AC	NA	NA	0	0	0	0	0	30 (100)
SXT	NA	NA	17	56,6	16 (53,3)	1 (3,3)	0	13 (43,3)

TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; NA, não aplicado.

5.4 Caracterização dos genes de resistência nos isolados do CBc

Do total de amostras analisadas (n=82), apenas três (3,6%) isolados carreavam determinantes de resistência (Tabela 5.16). Somente em uma das seis amostras que apresentavm resistência à ceftazidima houve a detecção do gene $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$. Não houve detecção dos genes codificadores das outras betalactamases pesquisadas

O gene $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ foi encontrado em um isolados clínico de *B. cenocepacia* do hospital A. Este gene estava inserido em um integron de classe 1, que também continha um gene que codifica uma adeniltransferase do tipo *aadA1*, que encontrava-se à montante do $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ (Figura 5.7). Esse isolado apresentou sensibilidade ao meropenem e ao SXT, e resistência a todos os outros antimicrobianos avaliados (Tabela 5.16).

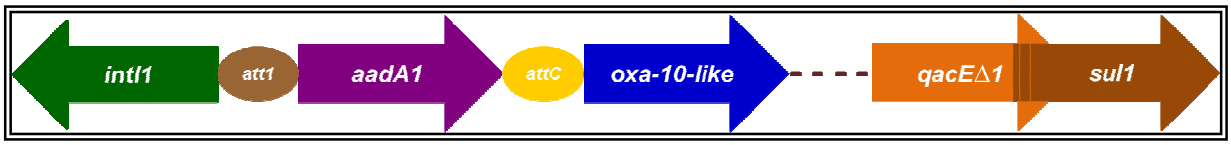


Figura 5.7 Representação esquemática do contexto genético no qual estava inserido o gene $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ presente no isolado de *B. cenocepacia*. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. A figura não está em escala.

Em outros dois isolados do hospital A, uma *B. cenocepacia* e uma *B. cepacia,* os quais eram resistentes ao SXT, possuíam o gene *dhfr22* (Tabela 5.16). A análise do sequenciamento dos amplicons obtidos revelou que este gene estava inserido em um integron de classe 1 que possuía o gene codificador da integrase *IntI1* (Figura 5.8).

Figura 5.8 Representação esquemática do contexto genético no qual está inserido o gene *dhfr22* presente nos isolados do CBc. As setas indicam a direção da transcrição dos genes. A figura não está em escala.

Tabela 5.16 Características microbiológicas dos isolados do CBc que carreavam genes de resistência.

Isolado	Identificação (*recA*)	Unidade de internação	Sítio de isolamento	Data de isolamento	Gene	PFGE	CIM (µg/mL) [categoria de sensibilidade][a]						
							CAZ	CLO	LEV	MER	MIN	TIC/AC	SXT
38673	*B. cenocepacia*	UTI pneumologia	Secreção traqueal	08/05/2009	$bla_{\text{OXA-10-like}}$	A2	128 [R]	>256 [R]	>32 [R]	0,06 [S]	32 [R]	128 [R]	1 [S]
31980	*B. cenocepacia*	UTI reumatologia	Secreção de escara (pé direito)	17/01/2008	*dhfr22*	A	2 [S]	16 [I]	2 [S]	4 [S]	8 [I]	>256 [R]	32 [R]
53670	*B. cepacia*	Unidade de tratamento renal	Bolsa de diálise	21/07/2012	*dhfr22*	A1	4 [S]	16 [I]	2 [S]	4 [S]	4 [S]	>256 [R]	8 [R]

[a] Perfil de sensibilidade determinado pela técnica de microdiluição em caldo e interpretado de acordo com o CLSI M100-S24 (2014).

CAZ, ceftazidima; CLO, cloranfenicol; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; MIN, minociclina; TIC/AC, ticarcilina/ácido clavulânico; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol.

5.4.1 Avaliação da similaridade genética e interpretação dos padrões moleculares

A análise da similaridade genética pela técnica de PFGE foi realizada para os dois isolados de *B. cenocepacia* que carreavam os seguintes determinantes de resistência: isolado 31980, resistente ao SXT e que carreava o gene *dhfr22*, e o isolado 38673, que carreava o gene $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$ (Tabela 5.16). De acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (Tenover *et al.*, 1995), embora estes dois isolados apresentaram perfil eletroforético semelhante, eles eram fracamente relacionados, sendo designados pelas letras A1 e A2 (Figura 5.9).

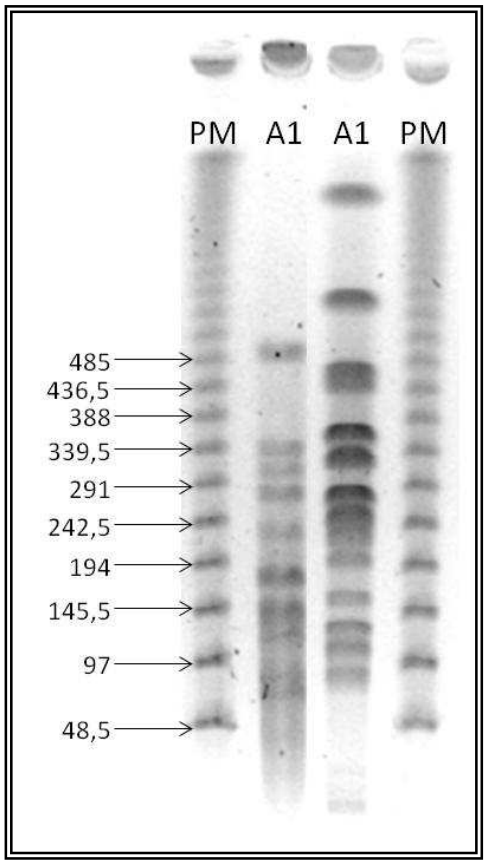


Figura 5.9 Avaliação da similaridade genética dos isolados que carreavam genes de resistência. **PM**, padrão de peso molecular; **A1**, isolado 31980 *B. cenocepacia* produtora do gene *dhfr22*; **A2**, isolado 38670 *B. cenocepacia* produtora de $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$. Os padrões de peso moleculares estão expressos em pb.

5.4.2 Estudo da localização dos genes *dhfr* e *bla*$_{OXA-10-like}$

Embora a extração do DNA plasmidial pela técnica de Kieser (Kieser, 1984) tenha revelado a presença de um plasmídeo de aproximadamente 37 kb nos dois isolados do CBc resistentes ao SXT (Figura 5.10), a hibridização confirmou que o gene *dhfr22* está localizado no cromossomo bacteriano destes isolados. Ainda de acordo com os resultados obtidos pela hibridização, o gene *bla*$_{OXA-10-like}$ está localizado em um plasmídeo de aproximadamente 70 kb. Entretanto, as tentativas de transferir este plasmídeo por conjugação foram infrutíferas.

Nenhum plasmídeo foi observado pela extração realizada com o kit QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, França).

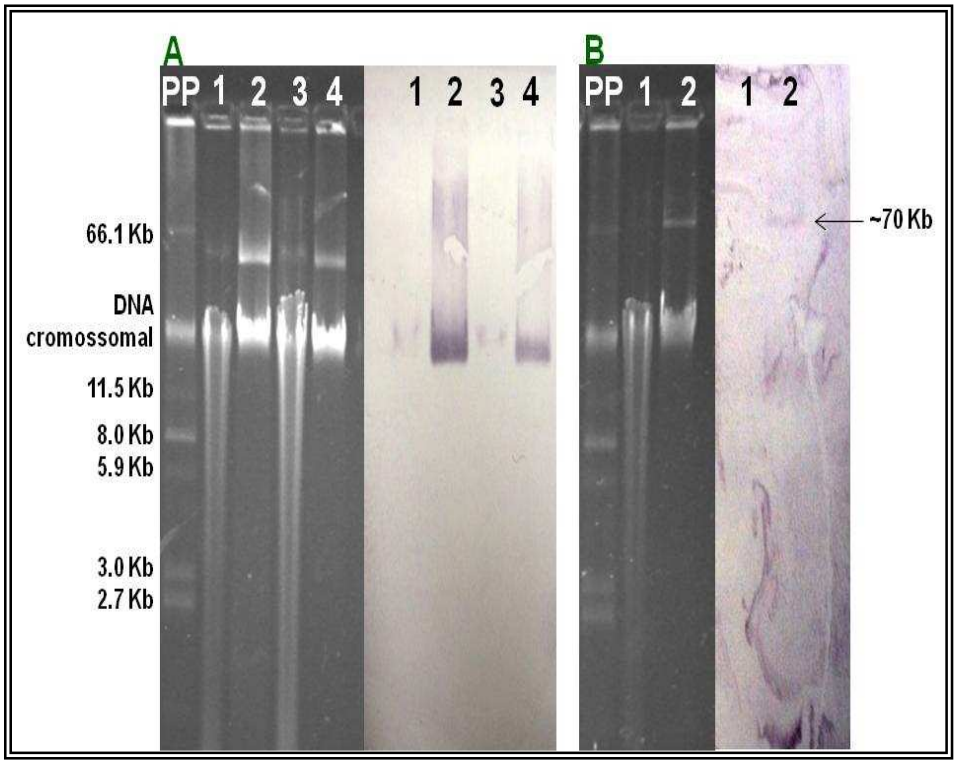


Figura 5.10 Eletroforese em gel de agarose 0,8% [TBE1x] da extração do DNA cromossomal e plasmidial, pela técnica de Kieser, dos isolados do CBc que carreavam genes de resistência. **(A)** Isolados que carreavam o gene *dhfr22. PP*, *E. coli* 50192 controle de peso plasmidial; *1*, DNA cromossomal do isolado 31980; *2*, DNA plasmidial do isolado 31980; *3*, DNA cromossomal do isolado 53670; *4*, DNA plasmidial do isolado 53670. **(B)** Isolado que carreava o gene *bla*$_{OXA-10-like}$. *PP*, *E. coli* 50192 controle de peso plasmidial; *1*, DNA cromossomal do isolado 38673; *2*, DNA plasmidial do isolado 38673.

6 Discussão

Ao longo das últimas décadas, o interesse pelo estudo do gênero *Burkholderia* vem ganhando grande notoriedade por serem bactérias abundamentemente encontradas na natureza, mas, principalmente, pelo seu potencial em causar infecções em plantas, animais e humanos. Semelhante a outros patógenos oportunistas, como *P. aeruginosa*, espécies do CBc normalmente não infectam indivíduos saudáveis, sendo sua prevalência relevante em pacientes imunocomprometidos (Mahenthiralingam *et al.*, 2005b).

Os patógenos que causam infecções no trato respiratório de pacientes com FC geralmente seguem uma sequência iniciada por *S. aureus,* ocasionalmente seguido por *H. influenzae* e, finalmente, por *P. aeruginosa.* Com o aumento da idade média dos pacientes fibrocísticos, ocorre um aumento da gravidade da doença pulmonar, principalmente pela presença de outros patógenos multirresistentes, como espécies do CBc e *S. aureus* resistente à oxacilina, sendo que a seleção destes micro-organismos pode ser em decorrência da pressão seletiva causada pelo uso contínuo de antimicrobianos nesta população. Entretanto, a permanência e a re-infecção por um ou diferentes clones de *P. aeruginosa* nestes pacientes faz com que este patógeno seja o mais comum e o clinicamente mais importante (Waters & Ratjen, 2006).

Comparado com *P. aeruginosa*, o CBc infecta apenas uma pequena parte da população de pacientes fibrocísticos, e destes, cerca de 20% morrem em decorrência de bacteremias e infecções pulmonares severas (Crowley *et al.*, 2002). Entretanto, a infecção causada por estas espécies possuem um impacto significativo na sobrevida dos pacientes (Coenye & Vandamme, 2003, Jones *et al.*, 2004). Apesar da maioria dos laboratórios de

microbiologia clínica não realizarem a identificação ao nível de espécie, a determinação da espécie bacteriana é importante, do ponto de vista clínico, pois algumas são mais virulentas quando comparadas a outras espécies do CBc. Por exemplo, pacientes infectados por *B. cenocepacia* IIIA apresentam um declínio da função pulmonar mais acelerado que pacientes infectados por *B. multivorans* ou por *P. aeruginosa* (Mahenthiralingam *et al.*, 2002).

A maioria dos isolados avaliados neste estudo foi recuperada de hemocultura (hospital A, 63,6%) e escarro (hospital B, 96%). Os isolados do CBc procedentes do hospital B foram todos recuperados do trato respiratório de pacientes com FC atendidos em um centro de referência que realiza monitoramento destes indivíduos. Embora o perfil dos pacientes atendidos neste hospital, assim como o longo período de coleta das amostras, nos levassem a obter mais de um isolado por paciente, selecionamos para a avaliação neste estudo somente a primeira amostra do CBc isolada nos indivíduos de cada população estudada.

Diferentemente do cenário observado no hospital B, o sítio infeccioso mais frequente no hospital A foi o de corrente sanguínea. Curiosamente, este também foi o sítio de infecção mais frequente (62,7%) para *Burkholderia* spp. em um estudo realizado pelo Programa de Vigilância SENTRY com 176 isolados clínicos de BGN-NF coletados de 12 hospitais localizados em sete cidades distintas na América Latina entre 1997 e 2002 (Gales *et al.*, 2005). Um outro estudo deste mesmo programa conduzido com amostras clínicas de BGN-NF isoladas de diferentes países durante os anos de 1997 a 2003, o sítio de infecção mais frequente foi o de corrente sanguínea (63%), seguido por infecções do trato respiratório (29%) entre 269 isolados clínicos do CBc avaliados (Sader & Jones, 2005). Não podemos afirmar se o foco de infecção observado nos pacientes avaliados no presente estudo era primário ou secundário, uma vez que não realizamos a análise retrospectiva dos respectivos prontuários. Adicionalmente, não foi objetivo desse estudo avaliar a maneira

pela qual os indivíduos adquiriram as infecções por CBc ou, ainda, a ocorrência de surtos. Porém, não podemos descartar a possibilidade da existência de amostras clínicas procedentes de pacientes fibrocísticos no hospital A ou aquelas relacionadas a pequenos surtos ocorridos em determinadas unidades de internação. Entretanto, os nossos resultados sugerem que isolados do CBc representam patógenos responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

A correta identificação bacteriana é muito importante, pois permite estabelecer a terapia adequada, mesmo que empírica, para o início do tratamento das infecções, assim como é essencial para avaliar a epidemiologia e as implicações clínicas de patógenos emergentes. Além disso, permite realizar medidas de controle que sejam eficazes no combate à disseminação de clones, os quais podem causar surtos em unidades hospitalares. Dentro do CBc, por exemplo, a identificação correta das espécies é crucial, pois a presença de certos genomovares, como II, IIIA e IIIB podem causar infecções extremamente graves por serem cepas altamente virulentas, além do seu potencial em causar surtos devido à alta capacidade de transmissibilidade destas espécies (Bittar & Rolain, 2010). Entretanto, a identificação correta de patógenos causadores de infecções em pacientes fibrocísticos, especialmente os BGN-NF, continua sendo um desafio para os laboratórios de microbiologia clínica de rotina.

Em nosso estudo, utilizamos como técnica padrão-ouro para a identificação das espécies do CBc o sequenciamento do gene *recA*, um gene ligado a recombinação e reparo da fita de DNA. Dentre os 82 isolados clínicos do CBc avaliados, *B. cenocepacia* (53,6%) e *B. multivorans* (14,6%) foram as espécies mais frequentes. Analisando os dados por procedência, *B. cenocepacia* (61,2%) e *B. multivorans* (18,3%) também foram as duas espécies mais frequentes no hospital B. Esses dados corroboram com os resultados

observados na maioria dos estudos epidemiológicos realizados nos EUA e Europa (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). Entretanto, no hospital A, embora *B. cenocepacia* (42,2%) tenha sido a espécie mais frequentemente isolada, *B. contaminans* (24,2%) foi a segunda espécie mais frequentemente identificada. Interessantemente, de acordo com um estudo realizado com 66 pacientes com FC na Argentina, *B. contaminans* foi a espécie mais frequentemente encontrada (57,6%), com índices bem superiores que a segunda espécie, *B. cenocepacia* (15%) (Martina *et al.*, 2013).

Jordá-Vargas e colaboradores (2008) analisaram 30 isolados do CBc também recuperados de pacientes fibrocísticos na Argentina e observaram que as sequências de nucleotídeos resultantes do sequenciamento do *recA* para 16 isolados demonstrou alto nível de identidade com duas espécies, até então desconhecidas, denominadas de "espécies do CBc indeterminadas". Esses dados sugerem que *B. contaminans* poderia ser uma espécie frequente causando infecções em pacientes fibrocísticos argentinos antes mesmo da sua identificação definitiva, pois, até 2009, *B. contaminans,* assim como *B. lata,* eram denominadas como Taxon K (Minán *et al.*, 2009). Não foi objetivo deste estudo a avaliação da similaridade genética entre todas as amostras do CBc, sendo esta análise realizada apenas para isolados que carreavam genes de resistência. Porém, de acordo com a frequência das espécies do CBc, não pode ser descartada a possibilidade da disseminação de um clone de *B. contaminans* no hospital A e que, provavelmente, tenha sido o responsável pela elevada frequência desta espécie naquele hospital.

Embora *B. cenocepacia* tenha sido a espécie mais frequente (53,6%) neste estudo, não realizamos a determinação dos subgrupos dentro desta espécie, pois necessitaríamos aplicar uma outra técnica de identificação para a confirmação destes subgrupos (Mahenthiraligam *et al.*, 2000).

O sequenciamento do gene *16srRNA* e de outros genes conservados para determinadas espécies bacterianas constitui o método mais confiável para a identificação destes micro-organismos. Entretanto, o sequenciamento ainda é uma técnica restrita a laboratórios de pesquisa e, mesmo alguns centros que realizam estes serviços de forma terceirizada, o custo ainda continua elevado para a sua aplicação na rotina laboratorial. Sendo assim, o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos que sejam acessíveis aos laboratórios clínicos, mas que possuam características como rapidez, acurácia e confiabilidade, são extremamente importantes para facilitar a rotina laboratorial, além de auxiliarem na implementação rápida de medidas terapêuticas e/ou de prevenção. A técnica de MALDI-TOF MS é uma metodologia rápida, precisa e significativamente mais barata, quando comparada aos métodos automatizados usualmente encontrados nos laboratórios de rotina, além de não serem necessários profissionais altamente qualificados para a realização dos procedimentos. Porém, a grande vantagem desta técnica é a rapidez na liberação dos resultados, em média, um minuto por amostra (Lay, 2001).

Diversos estudos em diferentes países têm avaliado a aplicabilidade do MALDI-TOF MS na identificação de isolados bacterianos comumente recuperados na rotina laboratorial, tais como estafilococos, enterococos, enterobactérias e BGN-NF. A taxa de concordância entre os resultados do MALDI-TOF MS com aqueles liberados por métodos fenotípicos e/ou automatizados está acima de 90% (Bizzini *et al.*, 2010; van Veen *et al.*, 2010; Benagli *et al.*, 2011; Saffert *et al.*, 2011; Khot *et al.*, 2012; Marko *et al.*, 2012; Ford & Bumhan, 2013).

Em nosso estudo, observamos que a técnica de MALDI-TOF MS foi acurada na identificação de 100% e 75,6% dos isolados do CBc ao nível de gênero e espécie, respectivamente. Apesar do número de isolados de *B. cepacia* avaliado ter sido baixo (n= 7),

apenas 28,5% destas amostras foram corretamente identificados pelo MALDI-TOF MS ao nível de espécie. Assim como observado por Desai e colaboradores (2012), que utilizaram a mesma versão do software Biotyper 3.0 aplicada neste estudo, nenhum isolado de *B. contaminans* foi identificado por esta técnica. Este fato pode ser explicado pela ausência de perfis de espectros de massas de algumas espécies do CBc, incluindo *B. contaminans,* nesta versão do software. Um estudo realizado na Argentina avaliou o perfil de massas protéicas gerado pelo software FlexControl versão 2.4 (Bruker Daltonics, Alemanha) na identificação de isolados clínicos e amostras referência do CBc. Os autores observaram que o espectro gerado entre 7501 Da a 7900 Da representa picos distintos e adequados para a identificação de *B. contaminans* (Minán *et al.*, 2009). Entretanto, é necessário uma atualização do software com a inclusão destas novas espécies do CBc para a validação dos resultados observados pelo grupo argentino.

Embora o MALDI-TOF MS apresente algumas limitações semelhantes àquelas observadas em outros sistemas de identificação bacteriana, como a baixa diversidade do banco de dados, quando da aquisição do software pelo fabricante, e a difícil distinção entre espécies estreitamente relacionadas, a sua acurácia e rapidez são superiores aos outros sistemas automatizados, os quais são empregados rotineiramente pelos laboratórios de microbiologia clínica. Outra vantagem do MALDI-TOF MS utilizado neste estudo é o seu software ser um sistema aberto, permitindo a ampliação do banco de dados com a criação de bibliotecas as quais podem suprir carências específicas. Entretanto, vale ressaltar que, como qualquer outro sistema, a validação do espectro de massas a ser inserido no banco de dados é de primordial importância para não ocasionar futuros erros de identificação. Uma desvantagem do MALDI-TOF MS, bem como observada nos outros métodos de identificação bacteriana, é a necessidade do isolamento prévio da colônia bacteriana. Embora esta

desvantagem tenha sido vencida pela identificação diretamente da garrafa de hemocultura (Buchan *et al.*, 2012), há uma limitação do uso desta técnica a partir de amostras polimicrobianas, como escarro.

Não obstante a dificuldade em identificar as espécies do CBc e o próprio gênero *Burkholderia*, estes micro-organismos apresentam resistência intrínseca a diversos antimicrobianos de classes não associadas, como as polimixinas, os aminoglicosídeos, alguns betalactâmicos e as quinolonas (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). Sendo assim, as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por CBc são extremamente restritas. O CLSI (CLSI, 2014) recomenda o teste de sensibilidade para sete antimicrobianos: ceftazidima, meropenem, minociclina, levofloxacina, cloranfenicol, ticarcilina associado ao inibidor de betalactamase ácido clavulânico e a associação entre trimetoprim e sulfametoxazol. Semelhantemente, a terapia recomendada para o tratamento das infecções causadas por estas espécies incluem meropenem, minociclina, SXT, ceftazidima, algumas vezes associada com aminoglicosídeos, como a tobramicina (Waters & Ratjen, 2006). Os dados deste estudo demonstram que SXT foi o antimicrobiano com maior atividade antimicrobiana (MIC_{50} 1/19 µg/mL) e o que apresentou a melhor taxa de sensibilidade (97,6%), seguido pelo meropenem (87,8%), pela minociclina (87,8%) e pela ceftazidima (86,6%), que também apresentaram boas taxas de sensibilidade para os isolados avaliados.

Nossos dados corroboram com aqueles apresentados pelo Programa de Vigilância SENTRY contra 83 isolados de *Burkholderia* spp. coletados de diferentes hospitais localizados na América Latina, incluindo o Brasil, sendo a ceftazidima o agente com a maior taxa de sensibilidade (83,1%), seguido por levofloxacina (81,9%), meropenem (79,5%) e SXT (71,1%) (Gales *et al.*, 2005). SXT também foi o antimicrobiano que apresentou maior atividade *in vitro* e maior taxa de sensibilidade (CIM_{90}, 2 mg/L; 90,7%) contra 269 isolados

clínicos do CBc procedentes de diferentes regiões do mundo e recuperados de infecção de corrente sanguínea e do trato respiratório. Meropenem (82,1%), ceftazidima (81%), levofloxacina (69,1%) e piperacilina/tazobactan (68,8%) foram os antimicrobianos que também apresentaram boas taxas de sensibidade contra esse grupo de bactérias avaliado. Embora a atividade *in vitro* para ticarcilina/ácido clavulânico tenha sido ruim ($CIM_{50,}$ >128; CIM_{90}, >128) entre os 269 isolados avaliados, a taxa de sensibilidade para este antimicrobiano foi relativamente maior (15,6%) quando comparada com os isolados avaliados no presente estudo (1,2%) (Sader & Jones, 2005).

Um estudo canadense avaliou 119 amostras clínicas do CBc recuperadas entre 1990 e 1999, demonstrou que as taxas de sensibilidade para minociclina, ticarcilina/ácido clavulânico e SXT foram menores que 5%, enquanto que meropenem exibiu maior eficácia contra estas bactérias (47%), seguido de ceftazidima (15%) e cloranfenicol (10%). Adicionalmente, este grupo avaliou a eficácia *in vitro* da combinação de determinados antimicrobianos contra estes isolados. Enquanto que a porcentagem de resistência a todos antimicrobianos testados isoladamente foi de 50%, este índice caiu para 8% quando a combinação de dois antimicrobianos juntos foi testada. No entanto, todos os isolados foram inibidos por, pelo menos, uma combinação tripla de antimicrobianos testada. Na combinação dupla, meropenem-minociclina, meropenem-amicacina e meropenem-ceftazidima apresentaram atividade bactericida em 76%, 73% e 73% dos isolados, respectivamente. A combinação tripla mais eficaz foi tobramicina-meropenem-antimicrobiano adicional, com taxas de inibição variando entre 81% e 93% (Aaron *et al.*, 2000).

Nosso estudo também demonstrou pequenas variações nas taxas de sensibilidade para maioria dos antimicrobianos entre os dois hospitais, exceto para a

levofloxacina, pois as taxas de sensibidade variaram muito entre os hospitais (hospital A, 75,8%; hospital B, 32,7%). Diferenças nas taxas de sensibilidade para levofloxacina foram observadas em dois estudos realizados na Europa. Enquanto que no estudo espanhol 46% dos isolados avaliados foram resistentes a este antimicrobiano, na Itália, este índice foi de 79% (Golini *et al.*,2006; Medina-Pascual *et al.*, 2012). Um estudo japonês avaliou 33 isolados do CBc recuperados de infecção de corrente sanguínea e observou que a ceftazidima e a minociclina apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* de MIC_{50} 4 µg/mL, assim como baixas taxas de resistência (3% e 6,1%, respectivamente) (Saika *et al.*, 2002). Estes resultados são semelhantes aos observados no hospital A, onde a maioria das amostras avaliadas era de infecção de corrente sanguínea. Embora as amostras do CBc do hospital B tenham sido provenientes de pacientes com FC, as taxas de sensibilidade foram maiores nesta população que naquelas obtidas dos pacientes do hospital A. Este fato nos chama a atenção, uma vez que pacientes com FC geralmente apresentam o dobro da resistência aos antimicrobianos em comparação aos pacientes não fibrocísticos (Medina-Pascual *et al.*, 2012).

Um estudo canadense o qual avaliou 176 isolados clínicos do CBc recuperados de 36 pacientes fibrocísticos monitorados durante 38 meses demonstrou que existem diferenças significativas na sensibilidade aos antimicrobianos para os isolados recuperados em períodos em que o paciente encontrava-se clinicamente estável em comparação com os isolados recuperados durante as exacerbações pulmonares. Os isolados do CBc recuperados durantes as exacerbações foram menos sensíveis ao meropenem, à ciprofloxacina, ao cloranfenicol, à piperacilina e à tobramicina em comparação com os isolados recuperados em períodos clinicamente estáveis (St Denis *et al.*, 2007).

Provavelmente, as amostras do CBc obtidas do hospital A tivessem sido responsáveis por causar IRAS. Nossos resultados confirmam que a epidemiologia da

resistência bacteriana para os isolados clínicos do CBc pode variar entre centros médicos de um mesmo país. Além disso, o tipo de paciente assistido, as medidas de controle para prevenção das IRAS e contenção de surtos bacterianos e a pressão seletiva exercida por diferentes compostos antimicrobianos também podem ser fatores que contribuam de forma significativa para a variação da frequência das diferentes espécies do CBc e dos seus perfis de sensibilidade aos antimicrobianos.

De fato, uma observação importante a ser feita é a alta sensibilidade a SXT encontrada nos isolados avaliados. Estudos realizados em diferentes países demonstram taxas de resistência elevadas a SXT, variando de 13% na Inglaterra e 38% na Espanha, a 80% e 95% na Itália e nos EUA, respectivamente (Wighey & Burton, 1999; Golini *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Medina-Pascual *et al.*, 2012).

Os dois únicos isolados resistentes a SXT encontrados em nosso estudo pertenciam ao hospital A, carreavam o gene *dhfr22* e apresentavam perfil clonal similar entre si, designados A e A1. É sabido que o gene *dhfr* é responsável pela resistência ao trimetoprim e que, geralmente, está associado a integrons de classe 1 (Alekshun & Levy, 2007). Nos isolados avaliados, este gene estava localizado em um integron de classe 1, o qual possui o gene da integrase *intI* e o gene que codifica compostos quaternários de amônio, *qacEΔ1*. Interessantemente, o gene *sul,* que geralmente está presente em integrons de classe 1 truncado ao gene *qacEΔ1*, não foi identificado nestes isolados. Isso nos sugere que a presença do *dhfr* é o principal mecanismo responsável pela resistência à SXT nos isolados do CBc avaliados. A baixa frequência de isolados resistentes ao SXT pode ser explicada pela localização genética deste determinante no cromossomo bacteriano.

Outro gene encontrado nos isolados do hospital A foi uma oxacilinase do grupo $10_{\text{-like}}$. Este grupo é constituído pelas betalactamases do tipo OXA de espectro restrito mais

frequentes em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. As enzimas pertencentes a este grupo incluem OXA-7, OXA-10, OXA-11, OXA-13, OXA-16, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-35, OXA-56, OXA-74, OXA-142, OXA-145, OXA-147, OXA-183 e OXA-240 (Poirel *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2010). De acordo com dados do estudo do grupo SCOPE Brasil, *P. aeruginosa* é o 5º patógeno mais frequentemente associado a infecções de corrente sanguínea, sendo também o 5º mais frequente causando este tipo de infecção em pacientes admitidos em UTIs (Marra *et al.*, 2011). Embora não tenhamos obtido sucesso na tentativa da transferência do $bla_{\text{OXA-10-like}}$, que estava localizado em um plasmídeo de ~70 Kb, dados do estudo conduzido por Marra e colaboradores (2011) nos sugere que o gene que codifica esta enzima muito provavelmente tenha sido transferido horizontalmente a partir de uma cepa de *P. aeruginosa* presente no hospital A, uma vez que as oxacilinases deste grupo estavam presentes em 15,6% dos 231 isolados de *P. aeruginosa* que apresentavam resistência à cefepima recuperados de pacientes admitidos neste mesmo hospital no período de 1997 a 2011 (Petrolini, 2013).

O integron que carreava a oxacilinase também carreava o gene cassete *aadA1,* à montante do $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$, uma adeniltransferase que confere resistência aos aminoglicosídeos, especialmente estreptomicina e espectinomicina (Vakulenko & Mobashery, 2003). Crowley e colaboradores (2002) avaliaram 17 amostras clínicas do CBc isoladas a partir do escarro de pacientes fibrocísticos na Irlanda e identificaram a presença de integron classe 1 carreando os cassetes gênicos *aac(6')-1b* à jusante de bla_{OXA}, em 4/17 isolados. Entretanto, este grupo não conseguiu definir qual era a variante de OXA presente nestes isolados. Embora a sequência dos cassetes gênicos e a variante do determinante de resistência aos aminoglicosídeos tenha sido diferente daquela encontrada no nosso estudo,

as porções 3'CS e 5'CS destes integrons eram semelhantes àquelas encontradas na *B. cenocepacia* que carreava o gene da $bla_{OXA\text{-}10\text{-}like}$.

"Há uma falta de evidência experimental para orientar a tomada de decisões e nenhuma conclusão pode ser tirada a partir desta revisão sobre a terapia antimicrobiana ideal para pacientes com fibrose cística que apresentam infecções crônicas pelo CBc. Os médicos devem continuar a avaliar cada paciente individualmente, levando em conta dados de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, as respostas clínicas anteriores e a sua própria experiência."[2]

[2] Cochrane Systematic Review. Horsley & Jones, 2012.

Baseado nas conclusões apresentadas pelo estudo realizado Horsley & Jones (2012), podemos perceber que além da dificuldade de identificação deste patógeno, a terapia adequada para o tratamento das infecções causadas por CBc devido ao seu peculiar perfil de resistência intrínseco a alguns antimicrobianos e a escolha do melhor teste para determinar o perfil de sensibilidade também são assuntos que permanecem em intensa discussão.

O CLSI (2014) e o "European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST, 2013) apresentam opiniões divergentes sobre os pontos de corte para determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos do CBc. Enquanto o CLSI recomenda o teste de sensibilidade para pelo menos sete antimicrobianos, o EUCAST reporta que não é possível estabelecer pontos de corte para estes patógenos, pois não existem evidências clínicas para descrever a relação entre a CIM e o desfecho clínico devido à incompatibilidade entre o potencial *in vivo* e *in vitro* (EUCAST, 2013). Isto ocorre porque

pouco se conhece sobre a correlação clínico-microbiológica das infecções por CBc; ou seja, poucos estudos avaliaram o desfecho clínico dos pacientes que utilizaram determinados regimes de antibioticoterapia para o tratamento destas infecções baseado em testes de sensibilidade realizados por técnicas consideradas padrão-ouro (Leitão *et al.*, 2010; EUCAST, 2013). Portanto, neste estudo, comparamos os resultados do perfil de sensibilidade dos isolados clínicos do CBc entre quatro metodologias distintas (microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão) para os antimicrobianos preconizados pelo CLSI.

A acurácia dos resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos fornecidos pelos laboratórios clínicos é uma grande preocupação dos serviços de microbiologia. A escolha da melhor metodologia, além de todos os aspectos que impactam na qualidade do resultado deve ser observada antes da liberação do laudo para o clínico (Siqueira e Silva, 2010). Existem metodologias simples para determinar a sensibilidade aos antimicrobianos, como, por exemplo, a técnica de disco-difusão. Porém, esse método possui algumas limitações, fazendo com que seja necessária, muitas vezes, a utilização de outros testes para confirmação do fenótipo de resistência. Técnicas dilucionais mais acuradas, como diluição em ágar e microdiluição em caldo, são recomendadas pelo CLSI para determinação da CIM. Entretanto, essas técnicas são laboriosas, tornando difícil estabelecer sua utilização na rotina laboratorial. A metodologia de Etest é uma técnica dilucional alternativa para determinação da CIM, sendo mais simples de incorporar na rotina de laboratórios clínicos. Recentemente, as fitas Oxoid M.I.C.Evaluator (M.I.C.E., Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK) foram lançadas no mercado e têm apresentado resultados tão bons quanto aos do seu concorrente, o Etest (Campana *et al.*, 2011). No entanto, discordância entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias para outras espécies bacterianas tem sido frequentemente reportada na literatura (van der Heijden *et al.*, 2007).

Entre as técnicas dilucionais, diluição em ágar demonstrou melhor concordância que o Etest (CIM ±1log_2 >90%) na comparação com a técnica referência (microdiluição em caldo). As taxas de erros leves acima de 10% observadas para levofloxacina e minociclina na comparação microdiluição em caldo com diluição em ágar, e para cloranfenicol na comparação entre o teste referência com diluição em ágar e com Etest, pode ser consequência dos valores de CIMs próximos aos pontos de corte apresentado por estes isolados e, desta forma, a diferença ±1log_2 de diluição ocasionou uma mudança na categoria de sensibilidade. Entretanto, os erros muito graves (>1,5%) observados para ceftazidima, levofloxacina e especialmente cloranfenicol não poderiam ser justificados por esta diferença nos valores das CIMs.

As diferentes técnicas de sensibilidade apresentaram boa acurácia na predição da sensibilidade a SXT. Embora a concordância de CIM (±1log_2) entre a microdiluição em caldo e o Etest ter sido inferior ao esperado (80,4%), esta diferença não ocasiou mudanças na categoria de sensibilidade. Apesar das discrepâncias observadas para alguns antimicrobianos entre os testes avaliados, o CLSI considera ambas as técnicas, microdiluição em caldo e diluição em ágar, aceitáveis como referência para testes de sensibilidade para estes patógenos, desde que a concentração de cálcio seja ajustada no meio de Müeller-Hinton caldo utilizado para a microdiluição (CLSI, 2014). Na literatura, são descritos vários relatos de que diferentes marcas de meio de cultura, assim como diferentes lotes do mesmo fabricante, que apresentam resultados discordantes nos testes de sensibilidade em decorrência da concentração alterada de íons nos meios de cultura (Andrews *et al.*, 2002; Fernández-Mazarassa *et al.*, 2009, Girardello *et al.*, 2012).

Neste estudo realizamos também a comparação entre a microdiluição em caldo e a técnica de disco difusão. Os resultados foram alarmantes e insatisfatórios especialmente

para cloranfenicol e SXT. Embora levofloxacina tenha apresentado concordância de categoria próxima à aceitável (83,3%), taxas de erros leves e muito graves inaceitáveis foram observadas para este antimicrobiano. É importante ressaltar que para este antimicrobiano, o CLSI não preconiza pontos de corte para disco difusão e a utilização dos pontos de corte preconizados para *P. aeruginosa* pode ter sido inadequada, interferindo de forma significativa nos resultados. Entretanto, para ticarcilina/ácido clavulânico, antimicrobiano o qual também foram aplicados os pontos de corte para *P. aeruginosa* para disco difusão, não podemos afirmar esta hipótese, uma vez que 100% dos isolados foram resistentes por esta técnica.

Em contrapartida, mesmo o CLSI preconizando pontos de corte para disco difusão, SXT apresentou um desempenho insatisfatório em comparação com as técnicas referências, sendo que apenas 74,4%, 74,4% e 72% dos isolados avaliados apresentaram concordância categórica entre a microdiluição em caldo, a diluição em ágar e o Etest, respectivamente, com a técnica de disco difusão. Um estudo conduzido na Austrália em 2002, o qual comparou os resultados obtidos para SXT para 80 isolados clínicos de *B. pseudomallei*, revelou que, enquanto 90%, 92,5% e 97,5% destes isolados apresentavam sensibilidade a SXT pelas técnicas de ágar diluição, pelo sistema automatizado MicroScan e pelo Etest, respectivamente, apenas 41,3% destes mesmos isolados foram sensíveis a este antimicrobiano pela técnica de disco difusão (Piliouras *et al.*, 2002). Um outro estudo realizado na Tailândia a partir de 144 isolados clínicos de *B. pseudomallei*, demonstrou discrepância significativa para a sensibilidade a SXT entre as técnicas de microdiluição em caldo (84%) e disco difusão (53,5%) (Lumbiganon *et al.*, 2000). Nossos resultados estão de acordo com outros estudos e sugerem que a sensibilidade a SXT não poderia ser predita pela técnica de disco difusão (Piliouras *et al.*, 2002). Isto pode ocasionar um impacto significante

uma vez que maioria dos laboratórios utiliza a técnica de disco difusão para predizer o perfil de sensibilidade ao SXT, além deste antimicrobiano ser o mais utilizado para o tratamento das infecções causadas por CBc. Mesmo após a suplementação do Müeller-Hinton ágar, os resultados discordantes foram confirmados (dados não mostrados).

Cloranfenicol foi o antimicrobiano que apresentou a pior performance independentemente da técnica avaliada. Entretanto, o CLSI não preconiza pontos de corte para este antimicrobiano para a técnica de disco difusão e, assim como levofloxacina, isto pode ter contribuído de forma significativa para os resultados desastrosos apresentados por esta técnica em comparação com a microdiluição em caldo. Apesar de não ser utilizado comumente para o tratamento da maioria das infecções causadas por CBc, constitui uma terapia alternativa para o tratamento de isolados multirresistentes e de infecções oculares causadas por este patógeno (Sunenshine *et al.*, 2009). Talvez, as espécies que causam este tipo de infecção sejam mais susceptíveis a este antimicrobiano. Porém, na coleção estudada este fato não pode ser observado. Ou ainda a mudança nos pontos de corte e/ou no procedimento da leitura para este antimicrobiano poderia aumentar a concordância entre os testes de sensibilidade.

Os resultados obtidos pela comparação entre as técnicas de microdiluição em caldo e disco difusão corroboram com os dados disponíveis pelo EUCAST, que demonstram que o disco difusão é uma técnica pouco reprodutível em comparação com ágar diluição e/ou BSAC (ágar Isosensitest) (EUCAST, 2013). Entretanto, estudos futuros são necessários para confirmar nossos achados.

Apesar dos grandes avanços sobre a taxonomia das espécies do CBc, o conhecimento sobre a epidemiologia das infecções, dos determinantes de resistência e virulência ainda é escasso. Embora as infecções causadas pelo CBc ainda respondam bem ao

tratamento com SXT, meropenem e ceftazidima, este estudo demonstrou que a técnica de sensibilidade utilizada para a determinação da categoria de sensibilidade ou da CIM pode influenciar substancialmente a seleção da terapia mais adequada. Este fato nos coloca em atenção, pois o estudo de regimes terapêuticos adequados é indiretamente proporcional à emergência cada vez mais rápida de patógenos multirresistentes. Este fato produz, ainda, a necessidade de se reavaliar a farmacocinética e farmacodinâmica de "antigos" antimicrobianos que caíram em desuso por muitos anos e, atualmente, constituem a terapia de escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, como por exemplo, o uso das polimixinas para *P. aeruginosa* (Levin *et al.*, 1999). E, não menos importante, estudos que enfoquem em novas estratégicas terapêuticas ou mesmo aqueles que são direcionados à descoberta de novos agentes terapêuticos, são de fundamental importância para o combate (ou pelo menos a minimização) das infecções causadas por espécies multirresistentes ou ainda pouco estudadas, como o CBc.

7 Conclusões

* A espectrometria de massas MALDI-TOF demonstrou ser uma técnica satisfatória para a identificação do CBc;

* *B. contaminans* foi a única espécie não identificada pelo MALDI-TOF MS devido a ausência de espectros de massas correspondentes a esta espécie no banco de dados utilizado neste estudo (Biotyper 3.0);

* *B. cenocepacia* e *B. contaminans* foram as espécies mais frequentes no hospital A, enquanto *B. cenocepacia* e *B. multivorans* foram as mais frequentes no hospital B;

* Embora o número de amostras testadas tenha sido muito pequeno, os isolados de *B. multivorans* apresentaram maior sensibilidade, que os isolados de *B. cepacia* aos antimicrobianos avaliados no estudo;

* SXT foi o antimicrobiano que apresentou a maior atividade *in vitro* contra os isolados do CBc. Por outro lado, ticarcilina/ácido clavulânico foi o antimicrobiano que apresentou a maior taxa de resistência;

* Dois isolados do CBc foram resistentes a SXT. Estas cepas carreavam o gene *dhfr22*, inserido em um integron de classe 1 que não possuía o gene *sul1* na sua porção 3'CS;

* Um único isolado de *B. cenocepacia* carreava o gene $bla_{\text{OXA-10-like}}$, inserido em um integron de classe 1, o qual carreava também *aadA1,* gene que confere resistência aos aminoglicosídeos. Este determinante de resistência estava localizado em um plasmídeo de ~70 Kb;

*Os dois isolados de *B. cenocepacia* que carreavam determinantes de resistência apresentaram perfil clonal fracamente relacionado;

* Na comparação entre as técnicas de sensibilidade quantitativas aos antimicrobianos, os resultados da diluição em ágar foram mais concordantes com os resultados da técnica referência, quando comparados com os do Etest;

* Os resultados para SXT foram insatisfatórios pela técnica de disco difusão, uma vez que as taxas de erros leves estavam acima dos limites aceitáveis;

* Cloranfenicol foi o antimicrobiano que apresentou os piores resultados de concordância entre as diferentes técnicas de sensibilidade, independentemente da metodologia utilizada.

8 Referências Bibliográficas

1.**Aaron SD, W Ferris, DA Henry, DP Speert, NE MacDonald.** Multiple combination bactericidal antibiotic testing patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. Am J Respir Crit Care Med. 162: 1206-1212, 2000.

2.**Abe K, MT D'Angelo R Suneshine, J Noble-Wang, J Cope, B Jensen, A Srinivasan.** Outbreak of *Burkholderia cepacia* bloodstream infection at an outpatient hematology and oncology practice. Infect Control Hosp Epidemiol. 28:1311-1313, 2007.

3.**Alekshun MN, SB Levy.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 23: 1037-1050, 2007.

4.**Almeida LA, R Araújo.** Highlights on molecular identification of closely related species. Infections, Genetics and Evolution. 13: 67-75, 2013.

5.**Alvarez-Lerma F, E Maull, R Terradas, C Segura, I Planells, P Coll, H Knobel, A Vázquez.** Moisturizing body milk as a resevoir of *Burkholderia cepacia:* outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. Crit Care, 12:R10, 2008.

6.**Ambler RP.** The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 289: 321-331, 1980.

7.**Andrews J, R Walker, A King.** Evaluation of media available for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by BSAC methodology. J Antimicrob Chemother. 50: 479-486, 2002.

8.**Antunes P, J Machado, JC Sousa, L Peixe.** Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul 1, sul2* and *sul3*) in Portuguese *Salmonella entérica* strains and relation with integrons. Antimicr Agents Chemother. 49: 836-839, 2005.

9.**Anzai Y, H Kim, JY Park, H Wakabayashi, H Oyaizu.** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol. 50: 1563-1589, 2000.

10.**Assis DM, L Juliano, MA Juliano.** A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. Rev Univ Vale Rio Verde. 9: 344-355, 2011.

11.**Avgeri SG, DK Matthaiou, G Dimopoulos, AP Grammatikos, ME Falagas.** Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. Inter J Antimicrob Agents. 33: 394-404, 2009.

12.**Baldwin A, PA Sokol, J Parkhill, E Mahenthiralingam.** The *Burkholderia cepacia* Epidemic Strain Marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. Infect Immun. 73: 1537-1547, 2004.

13.**Baldwin A, E Mahenthiralingam, KM Thickett, D Honeybourne, MCJ Maiden, JR Govan, DP Speert, JJ LiPuma, P Vandamme, CG Downson.** Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol. 43: 4665-4673, 2005.

14.**Baldwin A, E Mahenthiralingam, P Drevinek, C Pope, DJ Waine, DA Henry, DP Speert, P Carter, P Vandamme, JJ LiPuma, CG Dawson.** Elucidating global epidemiology of

Burkholderia multivorans in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 46: 290- 295, 2008.

15. **Barbosa PP.** Caracterização genética e bioquímica da GES-16, uma nova variante de betalactamase do tipo GES com atividade carbapenemase em *Serratia marcescens*. Dissertação de mestrado. Unifesp, São Paulo, 161 pp., 2011.

16. **Barrado L, MT Martinez, J Villa, A Orellana, E Viedma, F Chaves.** Clonas diversity among *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic fibrosis patients in a reference unit. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31: 665-668, 2013.

17. **Bauer AW, WM Kirby, JC Sherris, M Turck.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Tech Bull Regist Med Technol. 36: 49-52, 1966.

18. **Bazzini S, C Udine, G Riccardi.** Molecular approaches to pathogenesis study of *Burkholderia cenocepacia,* an important cystic fibrosis opportunistic bacterium. Appl Microbiol Biotechnol. 92: 887-895, 2011.

19. **Benagli C, V Rossi, M Dolina, M Tonolla, O Petrini.** Matrix-laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. PlosOne. 6e:16424, 2011.

20. **Bittar F, JM Rolain.** Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 16: 809-820, 2010.

21. **Bizzini A, C Durussel, J Bille, G Greub, G Prod'hom.** Performance of matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry for identification of bacteria strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 48: 1549-1554, 2010.

22. **Bosshard PP, R Zbinden, S Abels, B Boddinghaus, M Altwegg, EC Bottger.** 16SrRNA gene sequencing versus the API 20NE system and the VITEK 2 ID_GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 44: 1359-1366, 2006.

23. **Boszczowski I, GV do Prado, MF Dalben, RC Telles, MP Freire, T Guimarães, MS Oliveira, JF Rosa, RE Soares, PE Llacer, FL Dulley, SF Costa, AS Levin.** Polyclonal outbreak of bloodstream infections caused by *Burkholderia cepacia* complex in hematology and boné marrow transplant outpatient units. Rev Inst Med Trop São Paulo. 56: 71-76, 2014.

24. **Brisse S, S Stefani, J Verhoef, A van Belkun, P Vandamme, W Goessens.** Comparative evaluation of the BD Phoenix and Vitek 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol. 40: 1743-1748, 2002.

25. **Brisse S, C Cordevant, P Vandamme, P Bidet, C Loukil, G Chabanon, M Lange, E Bingen.** Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 42: 4824–4827, 2004.

26. **Brown AR, JR Govan.** Assessment of fluorescente *in situ* hybridization and PCR-based methods for rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex organisms directly from sputum samples. J Clin Microbiol. 45: 1920-1926, 2007.

27. **Buchan B, K Riebe, A Ledeboer.** Blood culture bottles identification of bacteria from positive routine microbiological methods for using sepsityper specimen processing to comparison of the MALDI biotyper system. J Clin Microbiol. 50: 346-352, 2012.

28. **Burkholder WH.** Sour skin, a bacterial ort of onions bulbs. Phytophatology. 40: 115-117, 1950.

29. **Buroni S, MR Pasca, RS Flannagan, S Bazzini, A Milano, I Bertani, V Venturi, MA Valvano, G Riccardi.** Assessment of three resistance-nodulation-cell division drug efflux transporters of *Burkholderia cenocepacia* in intrinsic antibiotic resistance. BMC Microbiol. 9: 200, 2009.

30. **Bush K, GA Jacoby.** Update functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54: 969-976, 2010.

31. **Bushby SRM, GH Hitchings.** Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. Br J Pharmacol Chemother. 72-90, 1968.

32. **Campana S, G Taccetti, N Ravenni, F Favari, L Cariani, A Sciacca, D Savoia, A Collura, E Fiscarelli, G De Intinis, M Busetti, A Cipolloni, A d'Aprile, E Provenzano, I Collebrusco, P Frontini, G Stassi, M Trancassini, D Tovagliari, A Lavitola, CJ Doherty, T Coenye, JR Govan, P. Vandamme.** Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. J Clin Microbiol. 43: 5136–5142, 2005.

33. **Campana EH, CG Carvalhaes, PP Barbosa, AMO Machado, AM de Paula, AC Gales.** Evaluation of M.I.C.E, Etest and CLSI broth microdilution methods for antimicrobial susceptibility testing of nosocomial bacterial isolates. J Bras Patol Med Lab. 47: 157-164, 2011.

34. **Carvalhaes CG, R Cayô, AC Gales.** MALDI-ToF MS aplicado à microbiologia clínica: uma ferramenta revolucionária para os laboratórios. Prática Hospitalar, 82: 1-5, 2012.

35. **Carvalhaes CG, R Cayô, DM Assis, ER Martins, L Juliano, MA Juliano, AC Gales.** Detection for SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 51: 287-290, 2013.

36. **Carvalho GMV, APDA Carvalho, TW Folescu, L Higa, LM Teixeira, MCM Plotkowski, VL Melquior, RM Albano, EA Marques.** Transient isolation of *Bulkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from Brazilian cystic fibrosis chronically colonized with *Burkholderia vietnamiensis.* J Cyst Fibr. 4: 267-270, 2005.

37. **Carvalho APD, GMC Ventura, CB Pereira, RS Leão, TW Folescu, L Higa, LM Teixeira, MCM Plotkowski, VLC Merquior, RM Albano, EA Marques.** *Burkholderia cenocepacia, B. multivorans, B ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have diferente profiles of exoenzyme production. APMIS. 115: 311-318, 2007.

38. **Cesarini S, A Bevivino, S Tabacchioni, L Chiarini, C Dalmastri.** *recA* gene sequence and multilocus sequence typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. Lett Appl Microbiol. 49: 580-588, 2009.

39. **Chen JS, KA Witzmann, T Spilker, RJ Fink, JJ LiPuma.** Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. J Pedratr. 139: 643-649, 2001.

40. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Development of *in vitro s*usceptibility testing criteria and quality control parameters. Document M23-A3. Wayne, PA, 2008.

41. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard; ninth edition. Document M07-A9. Wayne, PA, 2012a.

42. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard – eleventh edition. Document M02-A11. Wayne, PA, 2012b.

43. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-four informational supplement. Document M100-S24. Wayne, PA, 2014.

44. **Coenye T, S Laevens, A Willems, M Ohlen, W Hannant, JR Govan, M Gillis, E Falsen, P Vandamme.** *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 1099–1107, 2001a.

45. **Coenye T, E Mahenthiralingam, D Henry, JJ LiPuma, S Laevens, M Gillis, DP Speert, P Vandamme.** *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 51: 1481–1490, 2001b.

46. **Coenye T, P Vandamme.** Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environ Microbiol. 5: 719-729, 2003.

47. **Coenye T, T Spilker, A van Schoor, JJ LiPuma, P Vandamme.** Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. Thorax. 59: 952-954, 2004.

48. **Compant S, J Nowak, T Coenye, C Clément, EA Barka.** Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. FEMS Microbiol Rev. 32: 607-626, 2008.

49. **Crowley D, M Daly, B Lucey, P Shine, JJ Collins, B Cryan, JE Moore, P Murphy, G Buckley, S Fanning.** Molecular epidemiology of cystic fibrosis linked *Burkholderia cepacia* complex from three national referral centers in Ireland. J Appl Microbiol. 92: 992-1004, 2002.

50. **Cunha MV, A Pinto-de-Oliveira, L Meirinhos-Soares, MJ Salgado, J Melo-Cristino, S Correia, C Barreto, I Sa-Correia.** Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. J Clin Microbiol. 45:1628–1633, 2007.

51. **Degand N, E Carbonnelle, B Dauphin, JL Beretti, M Le Bourgeois, I Sermet-Gaudelus, C Segonds, P Berche, X Nassif, A Ferroni.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 46: 3361-3367, 2008.

52. **Detsika MG, JE Corkill, M Magalhães, KJ Glendinning, CA Hart, C Winstaley.** Molecular typing of and distribution of genetic markers among *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. J Clin Microbiol. 41: 4148-4153, 2003.

53. **Desai AP, T Stanley, M Atuan, J McKey, JJ LiPuma, B Rogers, R Jerris.** Use of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Pathol. 65: 835-838, 2012.

54. **Dias MBS, LGT Cavassin, V Stempliuk, LS Xavier, RD Lobo, JLM Sampaio, ACC Pignatari, VL Borrasca, AL Bierrenbach, CM Toscano.** Multi-institutional outbreak of *Burkholderia cepacia* complex associated with contaminated mannitol solution prepared in compounding pharmacy. Amer J Infect Control. 41: 1038-1042, 2013.

55. **Drevinek P, O Cinek, J Melter, L Langsadl, Y Navesnokava, V Vavrova.** Genomovar distribution of the *Burkholderia cepacia* complex differs significantly between Czech and Slovak patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol. 52: 603-604, 2003.

56. **Drevinek P, S Vosahlikova, O Cinek, V Vavrova, J Bartosova, P Pohunek, E Mahenthiralingam.** Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. J Med Microbiol. 54: 655-659, 2005.

57. **Drevinek P, E Mahenthiralingam.** *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. Clin Microbiol Infect. 16: 821-830, 2010.

58. **European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex (BCC) (2013). Disponível em http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/BCC_susceptibility_testing_130719.pdf. Acesso em 01/02/2014

59. **Faucz FR, DA Souza, M Olandoski, S Raskin.** CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. J Hum Genet. 55: 71-76, 2010.

60. **Fehlberg LCC, R Cayô, LHS Andrade, DM Assis, RHV Pereira, L Juliano, AC Gales, EA Marques.** Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species using MALDI-ToF-MS. Anais do 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy – ICAAC. Poster #731, p.93. San Francisco EUA, 2012.

61. **Fernandéz L, REW Hancock.** Adaptative and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clin Microbiol Rev. 25: 661-681, 2012.

62. **Fernandez-Mazarrasa C, O Mazarrasa, J Calvo, A Del Arco, L Martínez-Martínez.** High concentrations of maganese in Muller-Hinton agar increase MICs of tygecycline determined by Etest. J Clin Microbiol. 47: 827-829, 2009.

63. **Fernandez-Olmos A, M Garcia-Castillo, MI Morosini, A Lamas, L Máiz, R Cantón.** MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram-negative isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibrosis. 11: 59-62, 2012.

64. **Ferri L, E Perrin, S Campana, S Tabacchioni, C Taccetti, P Cocchi, N Ravenni, C Dalmastri, L Chiarini, A Bevivino, G Manno, M Mentasti, R Fani.** Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: the *Burkholderia cepacia* complex case. J Microbiol Meth. 80: 251-256, 2010.

65. **Ford BA, CAD Bumham.** Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria using MALDI-TOF MS and the Bruker Biotyper. J Clin Microbiol. 51: 1412-1420, 2013.

66. **Gales AC, RN Jones, SS Andrade, HS Sader.** Antimicrobial susceptibility patterns os unusual Nonfermentative Gram-negative bacilli isolated from Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). Mem Inst Oswaldo Cruz. 100: 571-577, 2005.

67. **Garrity GM, JA Bell, T Lilburn.** The *Proteobacteria* part C: The *Alpha-, Beta-, Delta,* and *Epsilonproteobacteria. In:* Garrity G, DJ Brenner, NR Krieg, JT Staly. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – volume 2. 2ªed: 575-600, 2005.

68. **Gillis M, TV Van, R Bardin, M Goor, P Hebbar, A Willems, P Segers, K Kersters, T Heulin, MP Fernandez**. Pholyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N2-fixing isolates from rice in Vietnam. Int J Syst Bacteriol. 45: 274, 1995.

69. **Girardello R, PJ Bispo, TM Yamanaka, AC Gales.** Cation concentration variability of four distinct Muller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. J Clin Microbiol. 50: 2414-2418, 2012.

70. **Golini G, G Cazzola, R Fontana.** Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Italian cystic fibrosis center. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 25: 175-180, 2006.

71. **Govan JR, JE Hughes, P Vandamme.** *Burkholderia cepacia:* medical, taxonomic and ecological issues. J Med Microbiol. 45: 395-407, 1996.

72. **Govan JR, AR Brown, AM Jones.** Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex in cases of cystic fibrosis lung infection. Future Microbiol. 2: 153-164, 2007.

73. **Hanulik V, MA Webber, M Chroma, R Uvizl, O Holy, RN Whitehead, S Baugh, I Matousskova, M Kolar.** An outbreak of *Burkholderia multivorans* beyond cystic fibrosis patients. J Hosp Infect. 84: 248-281, 2013.

74. **Hanulik V, MA Webber, O Holy, M Roterva, M Kolar.** Epidemiology of *Burkholderia multivorans* strains obtained from non-cystic fibrosis patients isolated in large hospitals across the Czech Republic. J Hosp Infect. 86: 74-75, 2014. J Hosp Infect. 84: 248-251, 2014.

75. **Havermans T, K Colpaert, K De Boeck, L Dupont, J Abbott.** Pain in CF: a review of the literature. J Cyst Fibros. 5: 423-430, 2013.

76. **Hawser S, S Lociuro, K Islam.** Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. Bioch Pharmacol. 71: 941-948, 2006.

77. **Ho CC, CC Lau, P Martelli, SY Chan, CW Tse, AK Wu, KY Yuen, SK Lau, PC Woo.** Novel pan-genomic analysis approach in target selection for multiplex PCR identification and detection of *Burkholderia pseudomallei, Burkholderia thailandensis,* and *Burkholderia cepacia* complex: a proof-of-concept study. J Clin Microbiol. 49: 814-821, 2011.

78. **Horsley A, AM Jones.** Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. Cochrane Database Syst Rev. 10: CD009529. doi:10.1002/14651858.CD009529.pub2, 2012.

79. **Hrábak J, R Walková, V Studentová, E Chudácková, T Bergerová.** Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 49: 3222-3227, 2011.

80. **Huovinen P, L Sundstrom, G Swedberg, O Skold.** Trimethoprim and sulfonamide resistance. Antimicrob Agents Chemother. 39: 279-289, 1995.

81. **Huovinen P.** Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. 21: 1608-1614, 2001.

82. **Isles A, I Maclusky, M corey, R Gold, C Prober, P Fleming, Levison H.** *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emergent problem. J Pediatr. 104: 206-2010, 1984.

83. **Jassen AN, CM Forbes, DP Speert.** Investigation of aminoglycosides resistance inducing conditions and a putative AmrAB-OprM efflux system in *Burkholderia vietnamiensis.* Ann Clin Microbiol Antimicrob. 13:2, 2014.

84. **Jones AM, ME Dodd, AK Webb.** *Burkholderia cepacia:* current clinical issues, environmental controversies and ethical delimmas. Eur Respir J. 17: 295-301, 2001.

85. **Jones AM, ME Dodd, JR Govan, V Barcus, CJ Doherty, J Morris, AK Webb.** *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans:* influence on survival in cystic fibrosis. Thorax. 59: 948-951, 2004.

86. **Jordá-Vargas L, J Degrossi, NC Castañeda, M D'Aquino, MA Valvano, A Procopio, L Galantemik, D Centrón.** Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. J Clin Microbiol. 46: 1151-1152, 2008.

87. **Kalish LA, DA Waltz, M Dovey, G Potter-Bynoe, AJ McAdam, JJ LiPuma, C Gerard, D Goldmann.** Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. Am J Respirat Crit Care Med. 173: 421-425, 2006.

88. **Kersters K, W Ludwing, M Vancanneyt, P de Vos, M Gillis, KH Schleifer.** Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. Syst Appl Microbiol. 19: 465-477, 1996.

89. **Kidd TJ, JM Douglas, HA Bergh, C Coulter, SC Bell.** *Burkholderia cepacia* complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. Res Microbiol. 159: 194-199, 2008.

90. **Kieser T.** Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli.* Plamid. 12:19-36, 1984.

91. **Koh SF, ST Tay, R Sermswan, S Wongratanacheewin, KH Chua, SD Puthucheary.** Development of a multiplex PCR assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei, Burkholderia thailandensis, Burkholderia mallei* and *Burkholderia cepacia* complex. J Microbiol Meth. 90:305-308, 2012.

92. **Khot PD, MR Couturier, A Wilson, A Croft, MA Fisher.** Optimization of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. J Clin Microbiol. 50: 3845-3852, 2012.

93. **Lambiase A, M Del Pezzo, D Cerbone, V Raia, F Rossano, MR Catania.** Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Meth. 92: 145-149, 2013.

94. **Lay JO.** MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev. 20: 172-194, 2001.

95. **Lee MA, D Wang, EH Yap.** Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. FEMS Immunol Med Microbiol. 43: 413-417, 2005.

96. **Leitão JH, AS Sousa, MV Cunha, MJ Salgado, J Melo-Cristino, MC Barreto, I Sá-Correia.** Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex

clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese cystic fibrosis center. J Clin Microbiol. 45: 1628-1633, 2007.

97. **Leitão JH, SA Sousa, AS Ferreira, CG Ramos, IN Silva, LM Moreira.** Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. Appl Microbiol Biotechnol. 87: 31-40, 2010.

98. **Leite FC, ABMP Machado, L Lutz, MI Vieira, AL Barth.** Molecular identification of *Burkholderia cepacia* complex and species distribution among cystic fibrosis patients seen at the Reference Center in Southern Brazil. Rev HCPA. 31: 138-144, 2011.

99. **Lekkas A, KM Gyi, ME Hodson.** Temocillin in the treatment of *Burkholderia cepacia* infection in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 5: 121-124, 2006.

100. **Levin AS, AA Barone, J Penco, MV Santos, IS Marinho, EA Arrusa, EI Manrique, SF Costa.** Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis. 28: 1008-1011, 1999.

101. **LiPuma JJ.** The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 23: 299-323, 2010.

102. **LiPuma JJ, BJ Currie, SJ Peacook, PAR Vandamme.** *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia* and *Acidovorax. In:* Versalovic J, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, ASM Press, 10ª ed., c. 41: 692-713, 2011.

103. **Livermore DM, PM Tulkens.** Temocillin revived. J Antimicrob Chemother. 63: 243-245, 2009.

104. **Lomaestro BM, EH Tobin, W Shang, T Gootz.** The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. Clin Infect Dis. 43: 26-28, 2006.

105. **Loutet SA, MA Valvano.** A decade of *Burkholderia cepacia* virulence determinant research. Infect Immun. 78: 4088-4100, 2010.

106. **Lynch JP.** *Burkholderia cepacia* complex: impact on the cystic fibrosis lung lesion. Semin Respirat Crit Care Med. 30: 596-610, 2009.

107. **Lucero CA, AL Cohen, I Trevino, AH Rupp, M Harris, S Forkan-Kelly, J Noble-Wang, B Jensen, A Shams, MJ Arduino, JJ LiPuma, SI Gerber, A Srinivasan.** Outbreak of *Burkholderia cepacia* complex among ventilated pediatric patients linked to hospital sinks. Am J Infect Control. 39: 775-778, 2011.

108. **Lumbiganon P,U Tattawasatra, P Chetchotisaki, S Wongratanacheewin, B Thinkhamrop.** Comparison between the antimicrobial susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* to trimethoprim-sulphametoxazole by standard disk diffusion method and by minimal inhibitory concentration determination. J Med Assoc Thai. 83:856-860, 2000.

109. **Magalhães M, MCA Britto, P Vandamme.** *Burkholderia cepacia* genomovar III and *Burkholderia vietnamiensis* double infection in cystic fibrosis child. J Cyst Fibr. 1: 292-294, 2002.

110. **Magalhães M, C Doherty, JRW Govan, P Vandamme.** Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. J Hosp Infect. 54: 120-123, 2003.

111. **Mahenthiralingam E, J Bischof, SK Byrne, C Radomski, JE Davis, Y Av-Gay, P Vandamme.** DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia multivorans, Burkholderia stabilis,* and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. J Clin Microbiol. 38: 3165-3173, 2000.

112. **Mahenthiralingam E, P Vandamme, ME Campbel, DA Henry, AM Gravelle, LT Wong, AG Davidson, PG Wilcox, B Nakielna, DP Speert.** Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovars III can replace *Burkholderia multivorans*. Clin Infect Dis. 33: 1469-1475, 2001.

113. **Mahenthiralingam E, A Baldwin, P Vandamme.** *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol. 51: 533-538, 2002.

114. **Mahenthiralingam E, P Vandamme.** Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. Chron Resp Dis. 2: 209-217, 2005a.

115. **Mahenthiralingam E, TA Urban, JB Goldberg.** The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nature Rev. 3: 145-156,2005b.

116. **Mahenthiralingam E, A Baldwin, CG Dowson.** *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J Appl Microbiol. 104: 1539-1551, 2008.

117. **Manno D, C Dalmatri, S Tabacchioni, P Vandamme, R Lorini, L Minicucci, L Romano, A Giannattasio, L Chiarini, A Bevivino.** Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particulary those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italia Cystic Fibrosis Center. J Clin Microbiol. 42: 1491-1497, 2004.

118. **Marko DC, RT Saffert, SA Cunningham, J Hyman, J Walsh, S Arbefeville, W Howard, J Pruessner, N Safwat, FR Cockerill, AD Bossler, R Patel, SS Richter.** Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 50: 2034-2039, 2012.

119. **Marra AR, LF Camargo, AC Pignatari, T Sukiennik, PR Behar, EA Medeiros, J Ribeiro, E Girão, L Corrêa, C Guerra, C Brites, CA Pereira, I Carneiro, M Reis, MA de Souza, R Tranchesi, CU Barata, MB Edmond, Brazilian SCOPE Study Group.** Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2563 cases from a prospective Nationwide surveillance study. J Clin Microbiol. 49: 1866-1871, 2011.

120. **Martin M, B Christiansen, G Caspati, M Hogardt, AJ von Thomsen, E Ott, F Mattner.** Hospital-wide outbreak of *Burkholderia contaminans* caused by prefabricated moist washcloths. J Hosp Infect. 77: 267-270, 2011.

121. **Martina P, M Bettiol, C Vescina, P Montanaro, MC Mannino, CL Pietro, C Vay, D Naumann, J Schmitt, O Yantorno, A Lagares, A Bosch.** Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. J Clin Microbiol. 51: 339-344, 2013.

122. **Martins KM, GF Fongaro, ABD Rodrigues, AF Tateno, AC Azzuz-Chernishev, D Oliveira-Garcia, JC Rodrigues, LVF Silva Filho.** Genomovar status, virulence markers and genotyping of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from Brazilian cystic fibrosis patients. J Cyst Fibr. 7: 336-339, 2008.

123. **Martins IS, FLPC Pellegrino, AD Freitas, MS Santos, GID Ferraiuoli, MRG Vasques, ELT Amorim, S Oliveira, SA Nouér, FLL Cardoso, LA Mascarenhas, ACG Magalhães, IB Cleinman, MAS Figueiredo, BM Moreira.** Case-crossover study of *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infection associated with contaminated intravenous bromopride. Infect Control Hosp Epidemiol. 31: 516-521, 2010.

124. **Masters PA, TA O'Bryan, J Zurlo, DQ Miller, N Joshi.** Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. Arch Intern Med. 163: 402-410, 2003.

125. **McDowell A, E Mahenthiralingam, JE Moore, KE Dunbar, AK Webb, ME Dodd, SL Martin, BC Millar, CJ Scott, M Crowe, JS Elborn.** PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 39: 4247-4255, 2001.

126. **Medina-Pascual MJ, S Valdezate, P Villalón, N Garrido, V Rubio, JA Saez-Nieto.** Identification, molecular characterizaton and antimicrobial susceptibility of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31: 3385-3396, 2012.

127. **Mendes RE, KA Kiyota, J Monteiro, M Castanheira, SS Andrade, AC Gales, ACC Pignatari, S Tufik.** Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol. 45: 544-547, 2007.

128. **Minán A, A Bosh, P Lasch, M Stammler, DO Serra, J Degrossi, B Gatti, C Vay, M D'aquino, O Yantorno, D Naumann.** Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. Analyst. 134: 1138-1148, 2009.

129. **Moreira BM, MBGP Leobons, FLPC Pellegrino, M Santos, LM Teixeira, EA Marques, JLM Sampaio, CL Pessoa-Silva.** *Ralstonia pickettii* and *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections related to infusion of contamined water for injection. J Hosp Infect. 60: 51-55, 2005.

130. **Nagano, N, Y Nagano, C Cordevant, N Shibata, Y Arakawa.** Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing in *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. J Clin Microbiol. 42: 3978-3984, 2004.

131. **Nair BM, KJ Cheung, A Griffith, JL Burns.** Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III. J Clin Investig. 113: 464-473, 2004.

132. **Norskov-Lauritsen N, HK Johansen, MG Fenger, XC Nielsen, T Pressler, HV Olesen, N Hoiby.** Unuseual distribution of *Burkholderia cepacia* complex species in Danish cystic fibrosis clinics may stem from restricted transmission between patients. J Clin Microbiol. 48: 2981-2983, 2010.

133. **Olland A, PE Falcoz, R Kessler, G Massard.** Should cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex be listed for lung transplantation? Interact Cardiovasc Thorac Sur. 13: 631-634, 2011.

134. **Palleroni NJ, R Kunisawa, R Contopoulo, M Doudoroff.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. Int J Syst Bacteriol. 23: 333-339.

135. **Papaleo MC, E Perrin, I Maida, M Fondi, R Fani, P Vandamme.** Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by analysis of the *hisA* gene. J Med Microbiol. 59: 1163-1170, 2010.

136. **Parr TR Jr, RA Moore, LV Moore, REW Hancock.** Role of porins in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas cepacia.* Antimicrob Agents Chemother. 31: 121-123, 1987.

137. **Patel R.** Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis. 57: 564-572, 2013.

138. **Peterson AE, AS Chitnis, N Xiang, JM Scaletta, R Geist, J Schwartz, J Dement, E Lawlor, JJ LiPuma, H O'Connell, J Noble-Wang, AJ Kallen, DC Hunt.** Clonally related *Burkholderia contaminans* among ventilated patients without cystic fibrosis. Am J Infect Control. 41: 1298-1300, 2013.

139. **Petrolini FVB.** Estudo da frequência temporal e padronização de uma PCR Multiplex para a detecção de oxacilinases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de mestrado. Unifesp, São Paulo, 130 pp., 2013.

140. **Peeters C JE Zlosnik, T Spiker, TJ Hird, JJ LiPuma, P Vandamme.** *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. Syst Appl Microbiol. 36: 483-489, 2013.

141. **Perreten V, P Boerlin.** A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicr Agents Chemother. 47: 1169-1172, 2003.

142. **Pfaller MA, RJ Hollis, HS Sader.** Molecular Biology - PFGE Analysis of chromossomal restriction fragments. *In:* Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, ASM Press, p.10.5.c.1-10.5.c.11, 1992.

143. **Picão RC.** Estudo das betalactamases envolvidas na resistência à cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Tese de doutorado. Unifesp, São Paulo, 121pp., 2009.

144. **Piliouras P, GC Ulett, C Ashhurt-Smith, RG Hirst, RE Norton.** A comparison of antbiotic susceptibility testing methods for cotrimoxazole with *Burkholderia pseudomallei.* Inter J Antimicrob Agents. 19: 427-429, 2002.

145. **Pimentel JD, SM Dubedat, ELN Dodds, RAV Been.** Identification of isolates within the *Burkholderia cepacia* complex by multiplex *recA* and *16S rRNA* gene real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 45: 3853-3854, 2007.

146. **Poirel L, I Le Thomas, T Naas, A Karim, P Nordmann.** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum betalactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 44: 622-632, 2000.

147. **Poirel L, D Girlich, T Naas, P Nordmann.** OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob Agents Chemother. 45: 447-453, 2001.

148. **Poirel L, JM Martinez-Martinez, P Plésiat, P Nordmann.** Naturally occurring class A beta-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. Antimicrob Agents Chemother. 53: 876-882, 2009.

149. **Poirel L, T Naas, P Nordmann**. Diversity, epidemiology, and genetics of class betalactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54: 24-38, 2010.

150. **Porter LA, JB Goldberg.** Influence of neutrophil defects on *Burkholderia cepacia* complex pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 18: 1-9, 2011.

151. **Pretto L, F de-Paris, ABMP Machado, AF Martins, AL Barth.** Genetic similarity of *Burkholderia cenocepacia* from cystic fibrosis patients. Braz J Infect Dis. 17: 86-89, 2013.

152. **Prince A, MS Wood, GS Cacalano, NX Chin.** Isolation and characterization of a penicillinase from *Pseudomonas cepacia* 249. Antimicrob Agents Chemother. 32: 838-843, 1988.

153. **Proença R, WW Niu, G Cacalano, A Prince.** The *Pseudomonas cepacia* 249 chromosomal penicillinase is a member of the AmpC Family of chromosomal beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 37: 667-674, 1993.

154. **Ramírez MS, LJ Vargas, V Cagnoni, M Tokumoto, D Centrón.** Class 2 integron with a novel cassete array in *Burkholderia cenocepacia* isolate. Antimicrob Agents Chemother. 49: 4418-4420, 2005.

155. **Reik R, T Spilker, JJ Lipuma.** Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 43: 2926–2928, 2005.

156. **Romero-Gómez MP, MI Quiles-Melero, P Peña Garcia, A Gutiérrez Altes, MA García de Miguel, C Jiménez, S Valdezate, JA Sáez Nieto.** Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia caused by contaminated chlorezidine in a hemodialysis unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 29: 377-378, 2008.

157. **Sader HS, RN Jones.** Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated noin-enteric Gram negative bacilli. Inter J Antimicrob Agents. 25: 95-109, 2005.

158. **Saffert RT, SA Cunninghan, SM Ihde, KE Jobe, J Mandrekar, R Patel.** Comparison of Burker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry to BD Phoenix automated microbiology system for identification of Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 49: 887-892, 2011.

159. **Saika T, I Kobayashi, M Hasegawa, M Nishida.** Antimicrobial resistance and DNA-fingerprinting pattern of *Burkholderia cepacia* blood isolates. J Infect Chemother. 8: 341-344, 2002.

160. **Santini AC, HR Santos, E Gross, RX Corrêa.** Genetic diversity of *Burkholderia* (Proteobacteria) species from the Caatinga and Atlantic raisnforest biomes in Bahia, Brazil. Genet Mol Res. 11: 655-664, 2011.

161. **Sass A, A Marchbank, E Tullis, JJ LiPuma, E Mahenthiralingam.** Spontaneous and evolutionary changes in the antibiotic resistance of *Burkholderia cenocepacia* observed by a global gene expression analysis. BMC Genomics. 12: 373, 2013.

162. **Schweizer HP.** Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei:* implications for treatment of melioidosis. Future Microbiol, 7: 1389-1399, 2012.

163. **Silva Filho LVF, LF Velloso, CON Bento, E Gytin, AF Tateno, JE Levi, JC Rodrigues, SRTS Ramos.** Use of selective médium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. Rev Inst Med Trop S Paulo. 44: 203-208, 2002.

164. **Siqueira e Silva, IG.** Influência dos métodos de sensibilidade aos antimicrobianos no uso clínico das polimixinas. Dissertação de mestrado. Unifesp, São Paulo, 88 pp., 2010.

165. **Sköld O.** Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. Drug Resist Updates. 3: 155-160, 2000.

166. **Souza AV, CR Moreira, J Pasternak, ML Hirata, DA Saltini, VC Caetano, S Ciosak, FM Azevedo, P Severino, P Vandamme, VD Magalhães.** Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit. J Med Microbiol. 53: 999-1005, 2004.

167. **Speert DP, D Henry, P Vandamme, M Corey, E Mahenthiralingam.** Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. Emerg Infect Dis. 8: 181-187, 2002.

168. **St Denis M, K Ramotar, K Vandemheen, E Tullis, W Ferris, F Chan, C Lee, R Slinger, SD Aaron.** Infection with *Burkholderia cepacia* complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. Chest. 131: 1188-1196, 2007.

169. **Steers E, EL Foltz, BS Graves.** An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiotic Chemother. 9: 307-311, 1959.

170. **Sunenshine R, M Schultz, MG Lawrence, S Shin, B Jensen, S Zubairi, AM Labriola, A Shams, J Noble-Wang, MJ Arduino, F Gordin, A Srinivasan.** An outbreak of postoperative Gram-negtaive bacterial endophthalmitis associated with contaminated trypan blue ophthalmic solution. Clin Infect Dis. 48: 1580-1583, 2009.

171. **Tabacchioni S, L Ferri, G Manno, M Mentasti, P Cocchi, S Campana, N Ravenni, G Taccetti, C Dalmastri L Chiarini, A Bevivino, R Fani.** Use of the *gyrB* gene to discriminate among species of the *Burkholderia cepacia* complex. FEMS Microbiol Lett. 281: 175-182, 2008.

172. **Taylor RF, H Gaya, ME Hodson.** Temocillin and cystic fibrosis: outcome of intravenous administration in patients infected with *Pseudomonas cepacia*. J Antimicrob Chemother. 29: 341-344, 1992.

173. **Tenover FC, RD Arbeit, RV Goering, PA Mickelsen, BE Murray, DH Persing, B Swaminathan.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239, 1995.

174. **Trépanier S, A Prince, A Huletsky.** Characterization of the *penA* and *penR* genes of the *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its Lys-R type transcriptional regulator. Antimicrob Agents Chemother. 41: 2399-2405, 1997.

175. **Turton JF, ME Kaufmann, N Mustafa, S Kawa, FE Clode, TL Pitt.** Molecular comparison of isolates of *Burkholderia multivorans* from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 41: 5750–5754, 2003.

176. **Turton JF, E O'Brien, B Megason, ME Kaufmann, TL Pitt.** Straisn of *Burkholderia cenocepacia* genomovar IIIA possessing the *cblA* gene that are distinct from ET12. Diagn Microbiol Infect Dis. 64: 94-97, 2009.

177. **Vakulenko SB, S Mobashery.** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 16: 430-450, 2003.

178. **van Acker H, E van Snick, HJ Nelis, T Coenye.** *In vitro* activity of temocillin against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. J Cyst Fibr. 9: 450-454, 2010.

179. **van Veen SQ, EC Claas, EJ Kuijper.** High throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 48: 900-907, 2010.

180. **van der Heijden IM, AS Levin, EH De Pedri, L Fung, F Rossi, G Duboc, AA Barone, SF Costa.** Comparison of disc diffusion, Etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 15: 6-8, 2007.

181. **Vandamme P, B Holmes, M Vacanneyt, T Coenye, B Hoste, R Coopman, H Revets, S Lauwers, M Gillis, K Kersters, JR Govan.** Occurrence of multiple genomovares of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 47: 1188-1200, 1997.

182. **Vandamme P, E Mahenthiralingam, B Holmes, T Coenye, B Hoste, P DeVos, D Henry, DP Speert.** Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J Clin Microbiol. 38: 1042–1047, 2000.

183. **Vandamme P, D Henry, T Coenye, S Nzula, M Vancanneyt, JJ LiPuma, DP Speert, JR Govan, E Mahenthiralingam.** *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. FEMS Immunol Med Microbiol. 33: 143–149, 2002.

184. **Vandamme P, B Holmes, T Coenye, J Goris, E Mahenthiralingam, JJ LiPuma, JR Govan.** *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. Res Microbiol. 154: 91–96, 2003.

185. **Vandamme P, K Opelt, N Knochel, C Berg, S Schomman, E De Brandt, L Eberl, E Falsen, G Berg.** *Burkholderia bryophila* sp. Nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. Nov. moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. Int J Syst Evol Microbiol. 57: 2228-2235, 2007.

186. **Vanlaere E, JJ LiPuma, A Baldwin, D Henry, E De Brandt, E Mahenthiralingam, D Speert, C Dowson, P Vandamme.** *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 1580–1590, 2008a.

187. **Vanlaere E, K Sergeant, P Dawyndt, W Kallow, M Erhard, H Sutton, D Dare, B Devreese, B Samyn, P Vandamme.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. J Microbiol Meth. 75: 279-286, 2008b.

188. **Vanlaere E, A Baldwin, D Gevers, D Henry, E De Brandt, JJ LiPuma, E Mahenthiralingam, DP Speert, C Dowson, P Vandamme.** Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 59: 102–111, 2009.

189. **Vermis K, M Brachkova, P Vandamme, H Nelis.** Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. Syst Appl Microbiol. 26: 595–600, 2003.

190. **Vermis K, T Coenye, E Mahenthiralingam, HJ Nelis, P Vandamme.** Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. J Med Microbiol. 51: 937-940, 2002.

191. **Versalovic J, T Koeuth, JR Lupski.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl Acids Res. 19: 6823-6831, 1991.

192. **Versalovic J, M Schneider, FJ De Bruijn, JR Lupski.** Genomics fringerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth Mol Cell Biol. 5: 25-40, 1994.

193. **Vial L, A Chapalain, MC Groleau, E Déziel.** The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. Enviromn Microbiol. 13: 1-12, 2011.

194. **Waters V.** New treatments for emerging cystic fibrosis pathogens other than *Pseudomonas.* Curr Pharmaceut Design. 18: 696-725, 2012.

195. **Waters V, F Ratjen.** Multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis: management and infection-control issues. Expert Rev Anti Infect Ther. 4: 807-819, 2006.

196. **Wieser A, L Schneider, J Jung, S Schubert.** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol. 93: 965-974, 2012.

197. **Wigley P, NF Burton.** Genotypic and phenotypic relationships in *Burkholderia cepacia* isolated from cystic fibrosis patients and the environment. J Appl Microbiol. 86: 460-468, 1999.

198. **Woodford N, MJ Ellington, JM Coelho, JF Turton, ME Ward, S Brown, SGB Amyes, DM Livermore.** Multiplex PCR for genes enconding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Inter J Antimicrob Agents. 27: 351-353, 2006.

199. **Yabuuchi E, Y Kosako, H Oyaizu, I Yano, H Hotta, Y Hashimoto, T Ezaki, M Arakawa.** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) com. nov. Microbiol Immunol. 36: 1251-1275, 1992.

200. **Yabuuchi E, Y Kawamura, T Ezaki, M Ikedo, S Dejsirilert, N Fujiwara, T Naka, K Kobayashi.** *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose- assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. Microbiol Immunol. 44: 307–317, 2000.

201. **Yang CJ, TC Chen, LF Liao, L Ma, CS Wang, PL Lu, YH Chen, JJ Hwan, LK Siu, MS Huang.** Nosocomial outbreak of two strains of *Burkholderia cepacia* caused by contaminated heparin. J Hosp Infect. 69: 398-400, 2008.

202. **Zhou J, Y Chen, S Tabili, L Alba, E Garber, L Saiman.** Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 51: 1085-1088, 2007.

203. **Zinner SH, KH Mayer.** Sulfonamides and Trimethoprim. *In:* Mandell GL, JE Bennett, R Dolin. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, PA, Churchill Linvingstone Elsevier, 7ª ed., c.34:475-486, 2010.

Apêndice

Artigo Científico

Performance of MALDI-TOF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates

Publicado em julho de 2013 no periódico "Diagnostic Microbiology and Infectious Disease" (v. 77, n. 22, p. 126-128).

Resultados parciais desse estudo também foram apresentados em dois eventos:

- Apresentação oral e em forma de pôster e premiado melhor trabalho na área de Microbiologia Clínica e Infecção Hospitalar no 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, ocorrido entre 2 a 6 de outubro de 2011

- Apresentação em forma de pôster "52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy", em San Francisco, CA, EUA, ocorrido entre 9 e 12 de setembro de 2012

Author's personal copy

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 77 (2013) 126–128

Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates ☆,☆☆

Lorena Cristina Corrêa Fehlberg [a,*], Lucas Henrique Sales Andrade [a], Diego Magno Assis [b], Rosana Helena Vicente Pereira [c], Ana Cristina Gales [a], Elizabeth Andrade Marques [c]

[a] Departamento de Medicina, Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil
[b] Bruker do Brasil, São Paulo, Brazil
[c] Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 March 2013
Received in revised form 6 June 2013
Accepted 12 June 2013
Available online 23 July 2013

Keywords:
Mass spectrometry
recA gene sequencing
Bacteria identification
Non-fermentative bacilli
Bruker

ABSTRACT

We evaluated the performance of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-ToF) for identification of Bcc species compared with that of *recA* sequencing. MALDI-ToF was able of identifying 100% of Bcc isolates at the genus level, but 23.1% of Bcc isolates tested were not correctly identified at the species level. The misidentification occurred most frequently with *Burkholderia contaminans* (100%) and *B. cepacia* (33.3%).

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Despite being spread in natural environments, *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) isolates can cause severe opportunistic infections, especially in cystic fibrosis (CF) and immunocompromised patients (LiPuma, 2010; Torbech et al., 2011). Currently, Bcc comprises 17 genetically related species that show similarity of *recA* ≥95% (Mahenthiralingam et al., 2008; Torbech et al., 2011). Manual and/or automated commercial systems have been used to identify non-fermenting Gram-negative bacilli (NF-GNB) in routine clinical laboratories. However, by using these methods, the identification at the species level is problematic because of the similarity of the biochemical test results obtained among some species. (Fernández-Olmos et al., 2011; Mellmann et al., 2008). Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) has been shown to be a reliable and rapid technique for accurate bacterial identification (Bizzini & Greub, 2010; Martiny et al., 2012). In fact, many clinical laboratories have completely changed their working practices by adopting MALDI-ToF instruments. Although MALDI-ToF MS has demonstrated good performance in identifying NF-GNB (Bizzini et al., 2010; Degand et al., 2008; Desai et al., 2012; Marko et al., 2012; Mellmann et al., 2008; Neville et al., 2011), its performance has not been compared for identification of Bcc species using *recA* sequencing, the gold-standard methodology for identifying Bcc isolates at the species level (Lambiase et al., 2013). Therefore, the aim of the present study was to compare the performance of MALDI-ToF MS with that of *recA* sequencing for identification of Bcc clinical isolates.

Ninety-one Bcc clinical significant isolates were collected from patients hospitalized at two Brazilian tertiary teaching hospitals located in Rio de Janeiro (n = 57) and São Paulo (n = 34). The organisms were collected from various clinical specimens, mainly sputum (56; 61.5%) and blood (27; 29.7%), and only one isolate per patient was included in this analysis. All isolates were identified by manual methods at the institutions of origin and properly stored at −20 °C. The isolates were subcultured on *B. cepacia* medium supplemented with *B. cepacia* Selective Supplement according to the manufacturer's instructions (Oxoid, Basingstoke, England), and species identification was confirmed by *recA* sequencing. PCR amplification was performed at 95 °C for 5 minutes; 35 cycles of 94 °C for 1 minute, 58 °C for 45 seconds, 72 °C for 1 minute, followed by a final step at 72 °C for 10 minutes using specific primers (Bcc-*recA*-F 5′ TGACCGCCGAGAAGAGCAA 3′; Bcc-*recA*-R 3′ CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC 5′; this study). DNA sequencing was performed by automated ABI 3500 Genetic Analyzers using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The nucleotide sequences were analyzed by using the Lasergene software package (DNASTAR, Madison, WI, USA), and

☆ Transparency declarations: None to declare.
☆☆ Part of this study was presented at the 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), in San Francisco, USA, September 9–12, 2012.

* Corresponding author. Tel.: +55-11-55764748.
E-mail address: lorenafehlberg@gmail.com (L.C.C. Fehlberg).

0732-8893/$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.011

Author's personal copy

compared to those sequences available over the internet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

For bacteria identification by MALDI-ToF MS, the protein extraction method was performed as previously described (Khot et al, 2012). Bacterial extract (1 μL) was spotted in triplicate onto a stainless steel MALDI target, air dried, and overlaid by 1 μL of matrix solution HCCA (saturated solution of α-4-cyano-hydrocycinnamic acid in 50% acetonitrile and 2.5% tri-fluor-acetic acid solution). Mass spectrums were determined by the Bruker Daltonics Microflex LT instrument using MALDI Biotyper software 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The MALDI Biotyper system was calibrated with the Bruker Bacterial Test Standard (*Escherichia coli* DH5α), and the spectra from 2 to 20 kDa protein mass was obtained by 240 shots for ionization. Species and genus identification were achieved when the scores were ≥2.0 and between ≥1.7 and <2.0 interval, respectively, as recommended by the manufacturer. *B. cepacia* ATCC 25608, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *E. coli* ATCC 25922 were tested as quality control strains.

A total of 48 *B. cenocepacia* (52.7%), 14 *B. multivorans* (15.3%), 12 *B. contaminans* (13.2%), 11 *B. vietnamiensis* (12.0%) and 6 *B. cepacia* (6.6%) were identified by *recA* sequencing. The results of MALDI-ToF MS were 100% concordant with those of *recA* sequencing for identification at the genus level of the 91 Bcc clinical isolates, with 76.9% (n = 70) of these isolates also correctly identified at the species level as shown in Table 1. The identification at the species level was discordant for 21 (23.1%) Bcc isolates. These isolates were re-identified by the methodologies *recA* sequencing and MALDI-ToF MS, which confirmed the initial results. Most of the misidentifications occurred with *B. contaminans*. All *B. contaminans* isolates were not correctly identified at the species level but were mostly recognized as *B. cepacia* (n = 6). On the other hand, all isolates of *B. vietnamiensis* were correctly identified at the species level by MALDI-ToF MS.

The most frequent body sites of the Bcc isolation were respiratory tract (65.9%) and blood (29.7%). Most of the respiratory specimens, especially sputum (94.7%), were recovered from patients admitted to Rio de Janeiro hospital (98.2%), while most of the Bcc isolated from São Paulo Hospital were collected from blood (73.5%). In general, *B. cenocepacia* (68.7%), *B. multivorans* (78.5%) and *B. vietnamiensis* (72.7%) were mostly Bcc species recovered from sputum, whereas *B. contaminans* (83.3%) and *B. cepacia* (50.0%) were mostly isolated from blood.

Infections by Bcc species are associated with increased morbidity and mortality rates, especially in CF patients (LiPuma, 2010). The distinction between Bcc and other NF-GNB is of crucial importance to guide correct antimicrobial therapy and implementation of adequate infection control measures. In addition, the identification of Bcc species is important when considering lung transplantation as therapy for Bcc infected or colonized cystic fibrosis patients since *B. cenocepacia* infected cystic fibrosis patients may have a higher risk of fatal outcomes after lung transplantation (Olland et al., 2011). According to our results, MALDI-ToF MS is an efficient and rapid system that simplifies the identification of Bcc species. A previous study reported a slightly higher agreement rate (83%) for the identification of Bcc at species level than that observed by the current study when analyzing well-characterized Bcc isolates with the Bruker system (Desai et al., 2012). In contrast, Lambiase and colleagues (2013) reported 100% concordance between MALDI-ToF MS (Biotyper 2.0) and PCR-RFLP results for identification of 57 Bcc at the species level.

In the current study, *B. contaminans* clinical isolates were not identified by MALDI-ToF MS, as also previously reported by Desai and colleagues (2012) who also interpreted their results by using Biotyper 3.0 version. This finding could be explained by the absence of a mass spectrum profile of some Bcc species in the Biotyper 3.0, the most updated software version. Recently, *B. contaminans* has gained more importance. Prefabricated moist washcloths contaminated with *B. contaminans* were documented to be the source of a wide outbreak in a German university hospital (Martin et al., 2011). In addition, *B. contaminans* was recently reported as the most frequent Bcc species (57.6%) isolated from 66 CF patients in Argentina (Martina et al., 2013). The misidentification at the species level observed for the remaining Bcc species could be attributed to the high degree of genetic homology shared by Bcc isolates resulting in very similar or identical MALDI-ToF MS mass spectrum profiles.

We have demonstrated that MALDI-ToF MS was able to correctly identify most Bcc clinical isolates at the species level. Thus, this methodology could be a useful tool to help in the establishment of the real prevalence and epidemiological role of the distinct Bcc species in the clinical setting. However, MALDI-ToF MS instruments will require improvement by including the mass spectra of species that are infrequently isolated by the routine clinical microbiology laboratories (Lau et al., 2012). In addition, progress in the development of the MALDI-ToF MS software for bacterial identification must be achieved for better discrimination of species that exhibit similar mass spectra.

Table 1
Comparison of MALDI-ToF MS and *recA* sequencing methodologies for identification of *B. cepacia* complex clinical isolates.

Nº of isolates	*recA* sequencing identification	MALDI-ToF MS identification			% of agreement by identification at species level
		Overall correct identification at genus level (N)	Overall correct identification at species level (N)[a]	Misidentification[a] (N = 21)	
48	*B. cenocepacia*	48	46	*B. cepacia/B. stabilis* (01)[b] *B. cenocepacia/B. cepacia* (01)[b]	95.8
14	*B. multivorans*	14	11	*B. cepacia/B. stabilis* (01)[b] *B. cenocepacia* (02)	78.5
12	*B. contaminans*	12	0	*B. cepacia* (06) *B. cenocepacia* (02) *B. multivorans* (01) *B. cenocepacia/B. cepacia* (02)[b] *B. cepacia/B. pyrrocinia* (01)[b]	0
11	*B. vietnamiensis*	11	11	None	100
06	*B. cepacia*	06	02	*B. cenocepacia/B. vietnamiensis* (01)[b] *B. cenocepacia/B. cepacia* (02)[b] *B. cenocepacia* (01)	33.3
% of agreement MALDI-ToF vs. *recA* sequencing		100%	76.9%		

[a] All isolates were identified by MALDI-ToF MS with scores ≥2.0.
[b] MALDI-ToF could not distinguish between two species.

Author's personal copy

Acknowledgments

We would like to thank Débora Okamoto for her technical assistance with the MALDI-ToF MS methodology.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP process #2012/04910-9). LCCF is a PhD student financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). ACG is a researcher from the National Council for Science and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil (process #307816/2009-5).

References

Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect 2010;16:1614–9.

Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of bacteria strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010;48:1549–54.

Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2008: 3361–7.

Desai AP, Stanley T, Atuan M, McKey J, Lipuma JJ, Rogers B, Jerris R. Use of matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients. J Clin Pathol 2012;65:835–8.

Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini MI, Lamas A, Máiz L, Cantón R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting gram-negative isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2011;11:59–62.

Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. Optimization of matrix-assisted laser desorpotion ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. J Clin Microbiol 2012;50:3845–52.

Lambiase A, Del Pezzo M, Cerbone D, Raia V, Rossano F, Catania MR. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Methods 2013;92:145–9.

Lau SK, Tang BS, Curreem SO, Chan TM, Martelli P, Tse CW, Wu AK, Yuen KY, Woo PC. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*: importance of expanding databases with pathogens endemic to different localities. J Clin Microbiol 2012;50:3142–3.

LiPuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2010;23:299–323.

Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J Appl Microbiol 2008;104:1539–51.

Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, Howard W, Pruessner J, Safwat N, Cockerill FR, Bossler AD, Patel R, Richter SS. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2012;50:2034–9.

Martin M, Christiansen B, Caspari G, Hogardt M, von Thomsen AJ, Ott E, Mattner F. Hospital-wide outbreak of *Burkholderia contaminans* caused by prefabricated moist washcloths. J Hosp Infect 2011;77:267–70.

Martina P, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, Vay C, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O, Lagares A, Bosch A. Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. J Clin Microbiol 2013;51:339–44.

Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012;50:1313–25.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, LaSala P, Kostrzewa M, Harmsen D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to *16S rRNA* gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. J Clin Microbiol 2008;46:1946–54.

Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, van Hal SJ. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial. J Clin Microbiol 2011;49: 2980–4.

Olland A, Falcoz PE, Kessler R, Massard G. Should cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex be listed for lung transplantation? Interact Cardiovasc Thorac Surg 2011;13(6):631–4.

Torbech L, Raccasi D, Guilfoyle D, Friedman R, Hussong D. *Burkholderia cepacia*: the decision is overdue. J Pharm Sci Technol 2011;65:535–43.

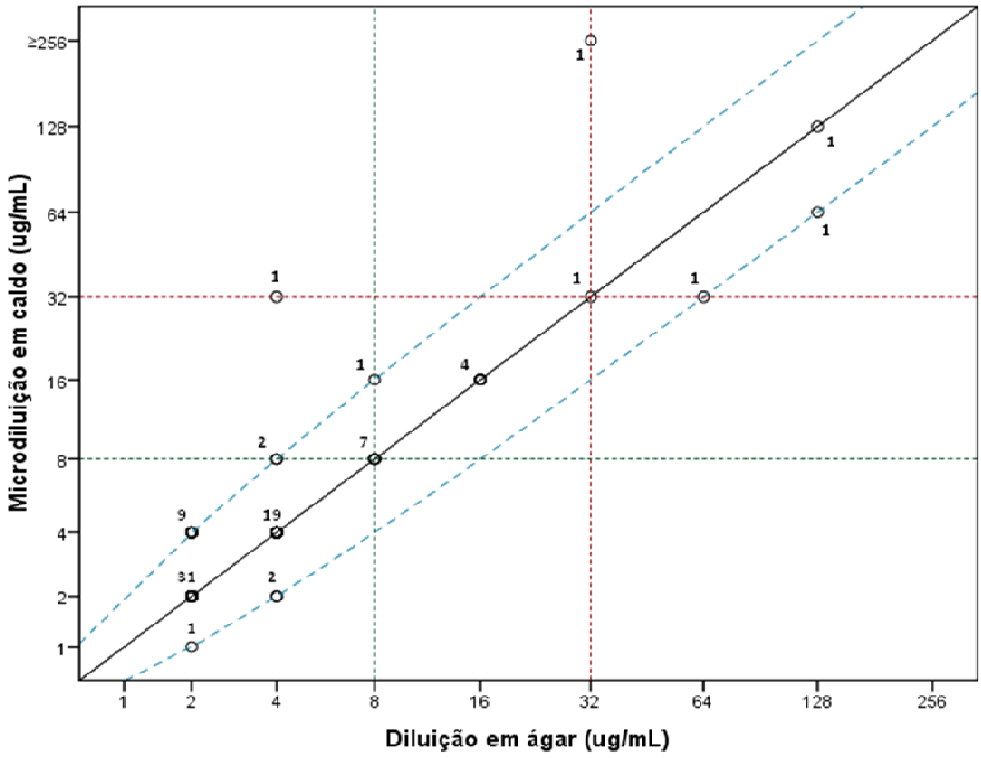
Anexos

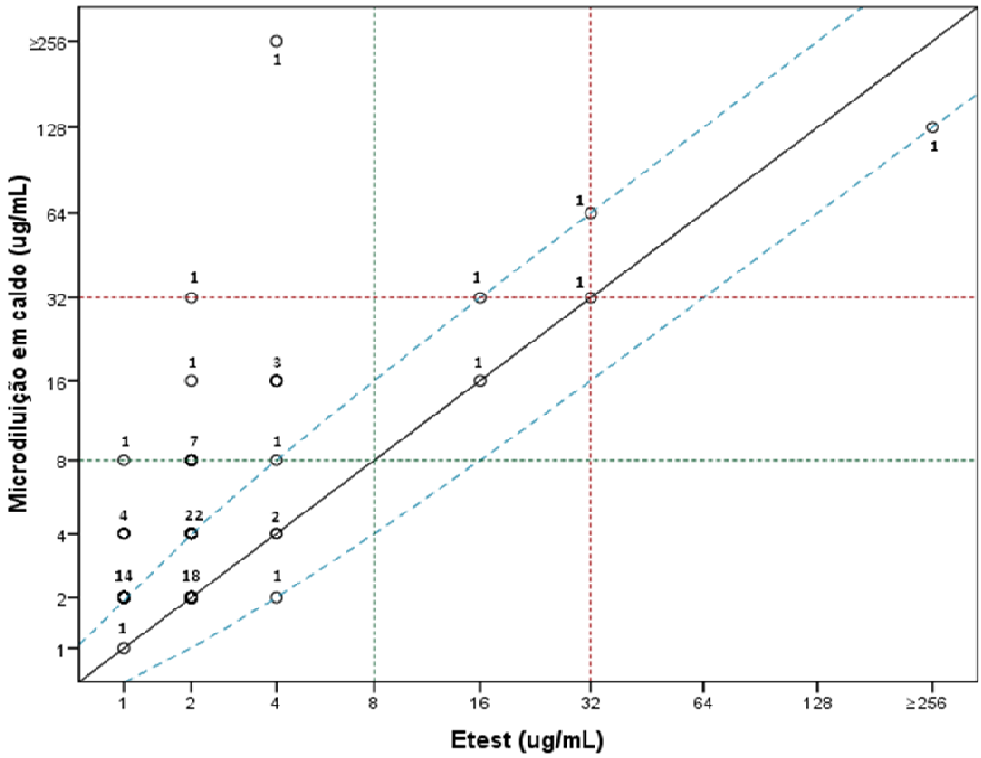
Anexo 1

Scatergramas dos resultados obtidos na comparação entre as quatro técnicas de sensibilidade avaliadas neste estudo: microdiluição em caldo, diluição em ágar, Etest e disco difusão.

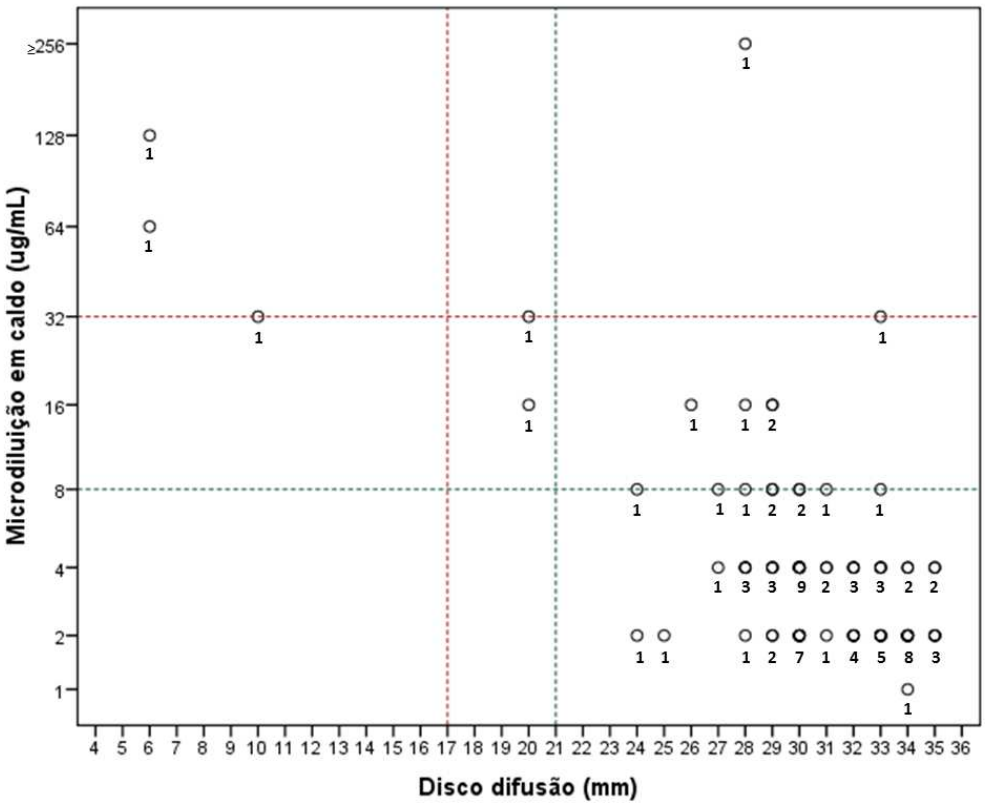
Legenda: A linha diagonal preta representa a concordância geral entre os dois testes comparados; a linha diagonal tracejada em azul representa os limites para a variação da CIM $\pm 1\log^2$. As linhas horizontais e verticais indicam os pontos de corte de sensibilidade (verde) e resistência (vermelho) para cada antimicrobiano testado. O número de isolados está representado próximo a cada círuculo.

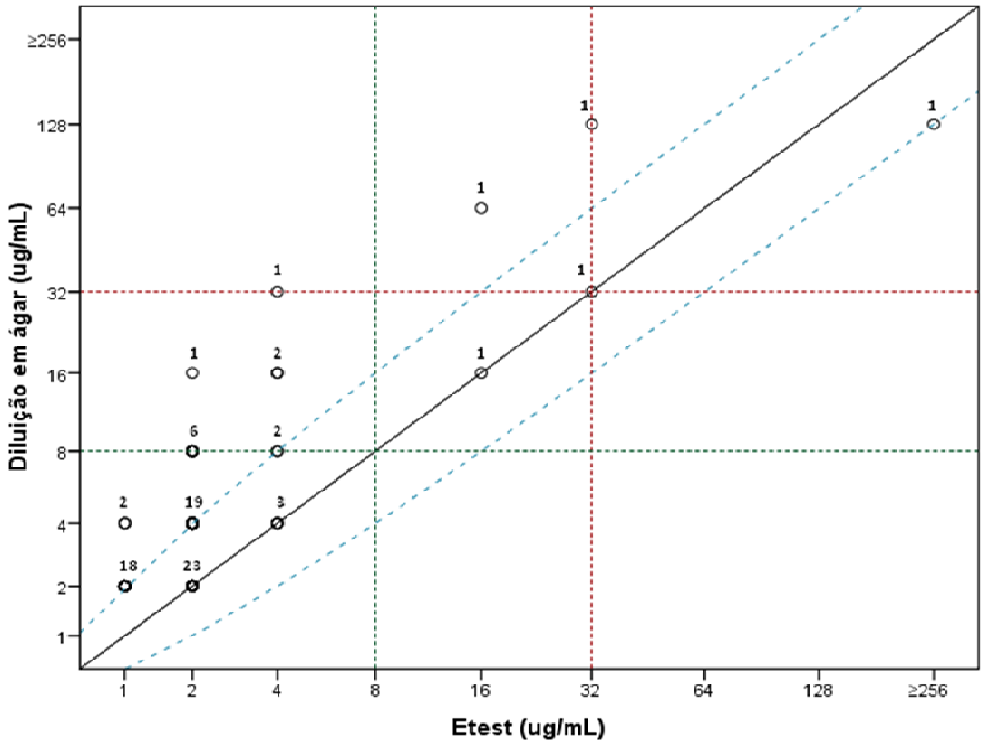
Ceftazidima



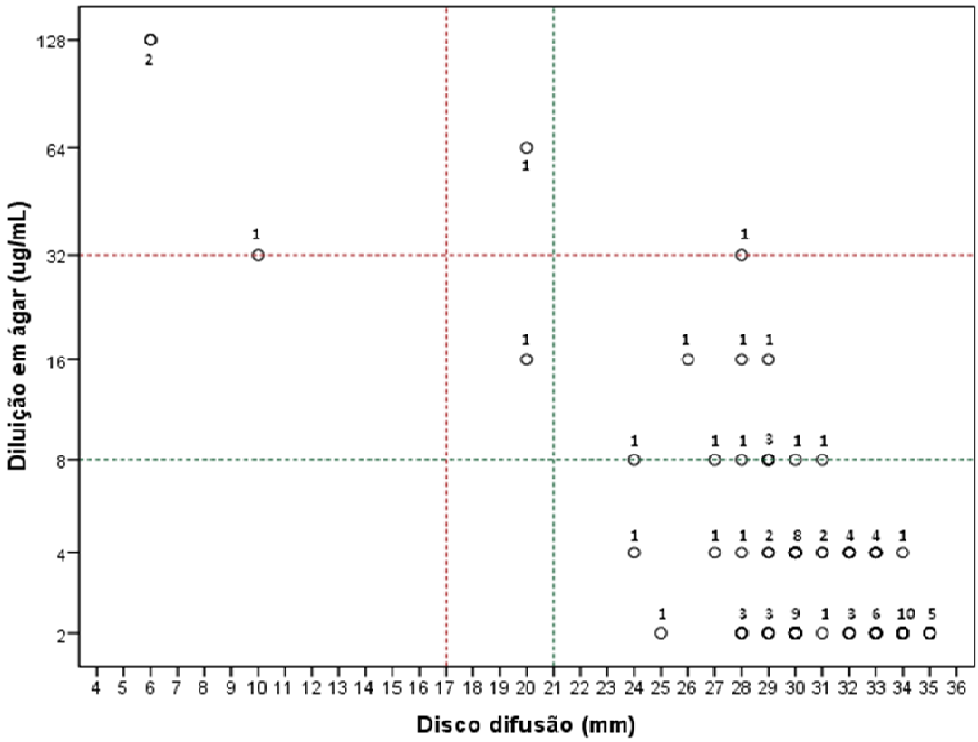


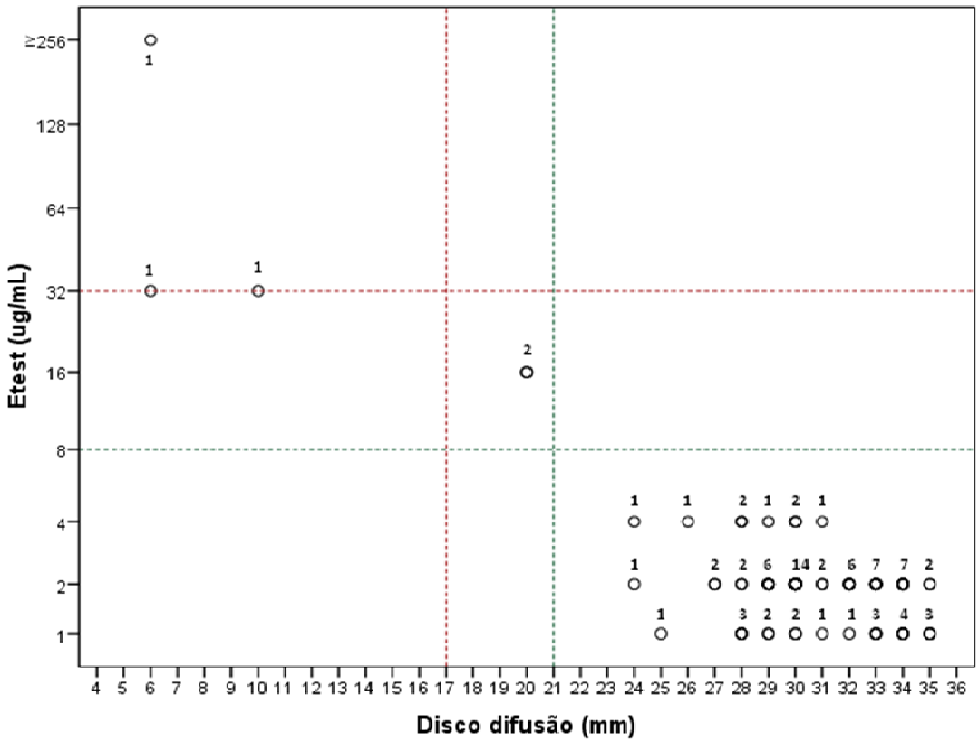
Ceftazidima



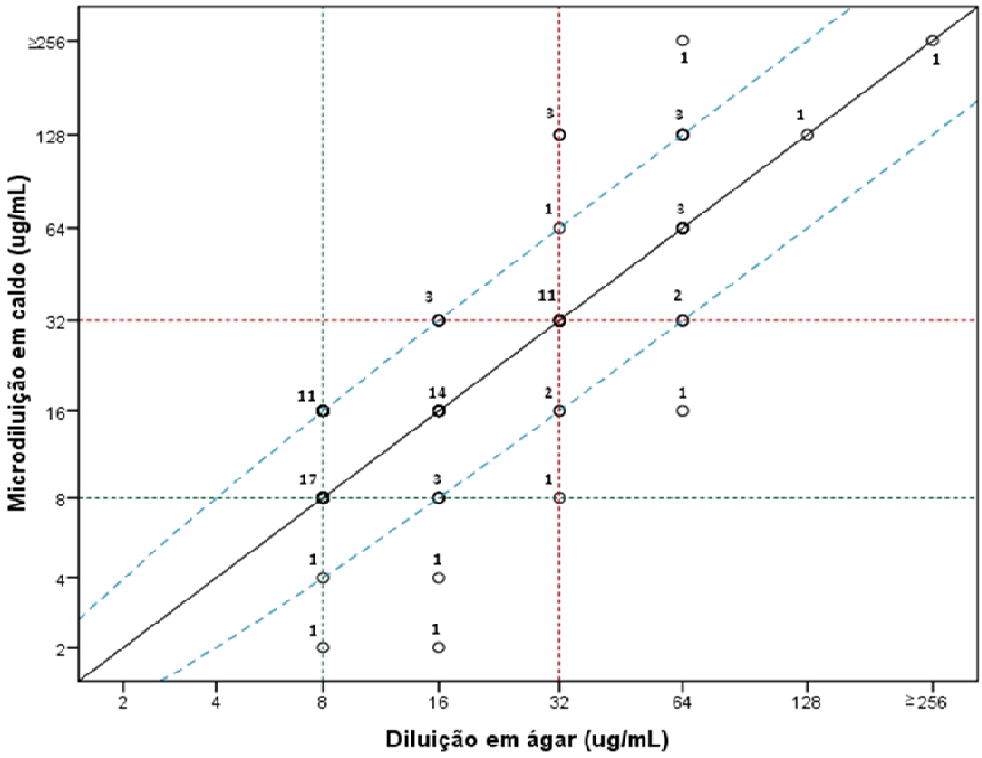


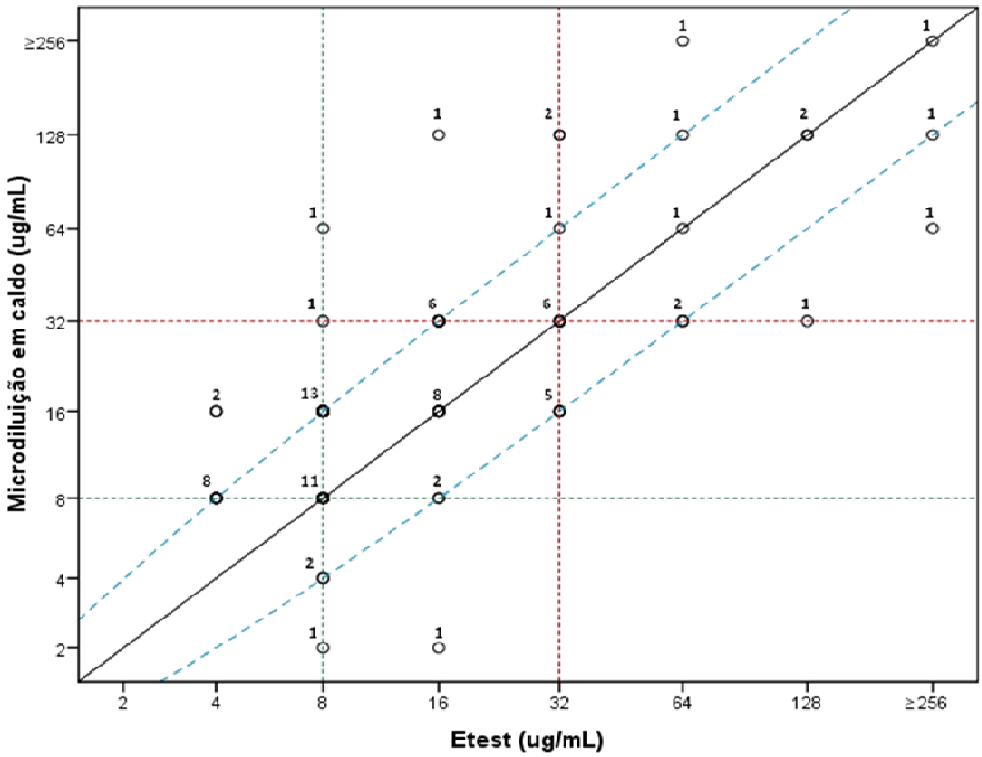
Ceftazidima



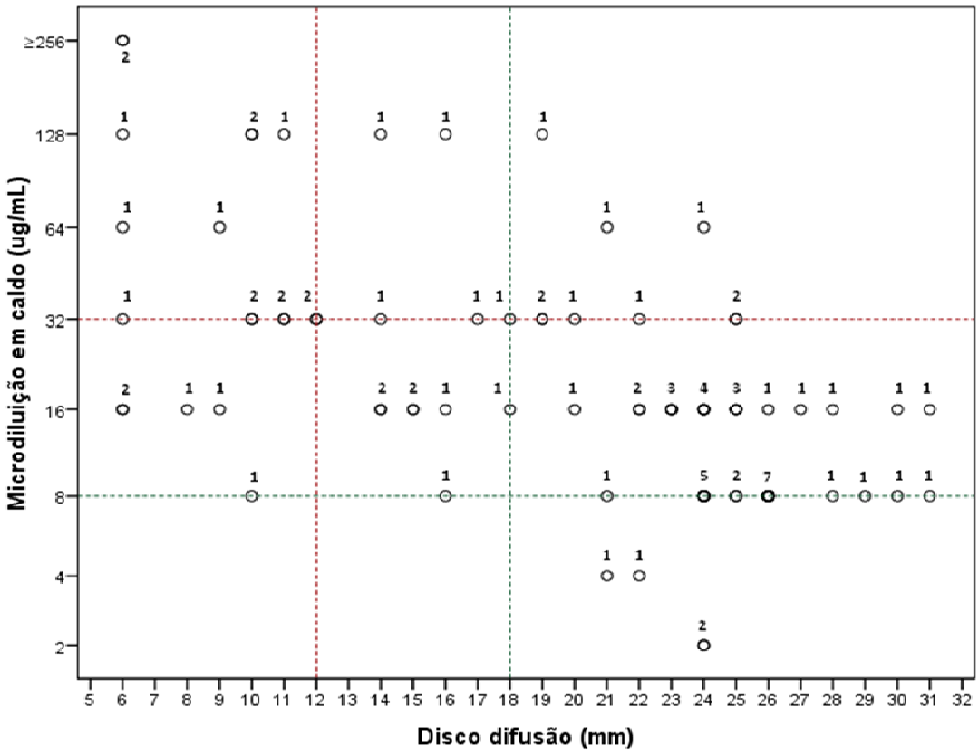


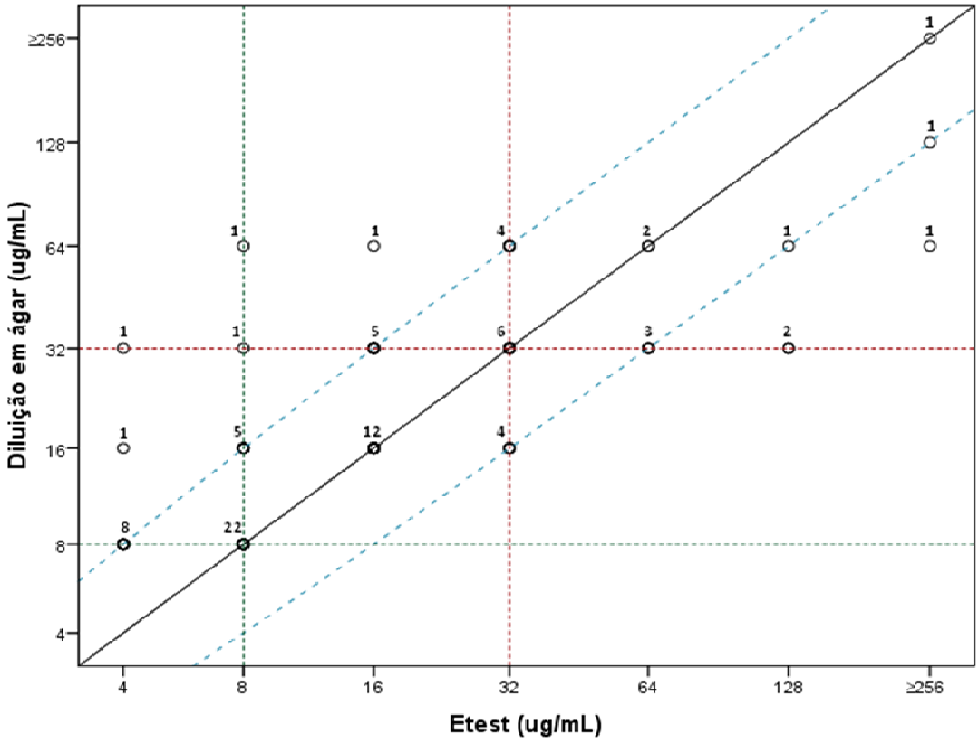
Cloranfenicol



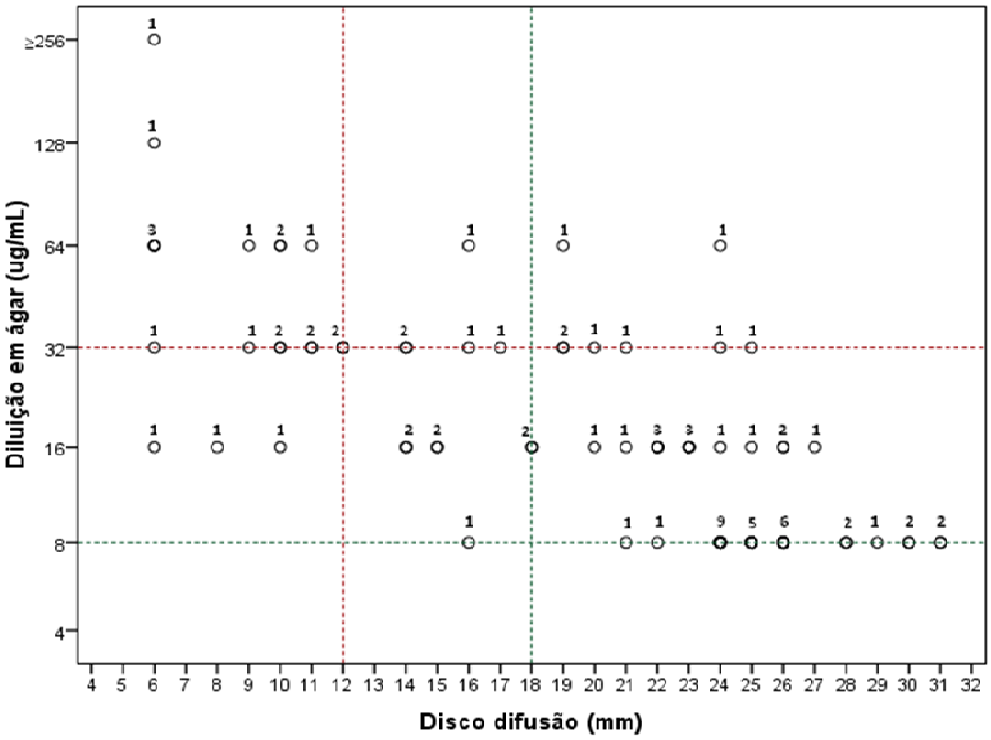


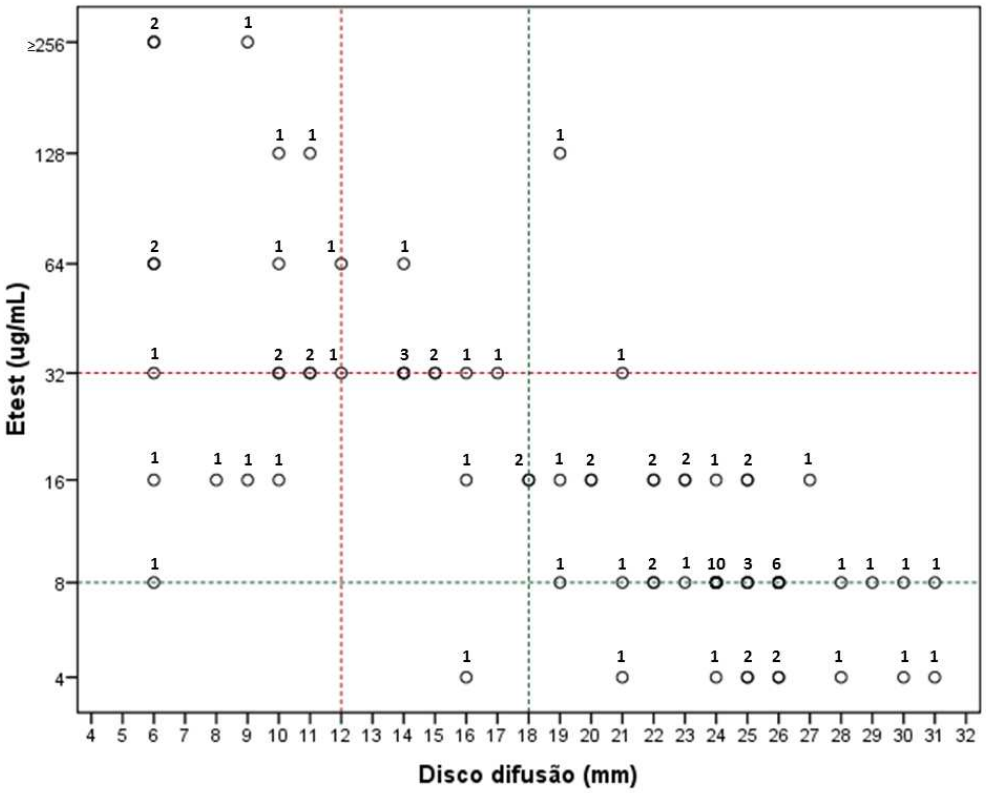
Cloranfenicol



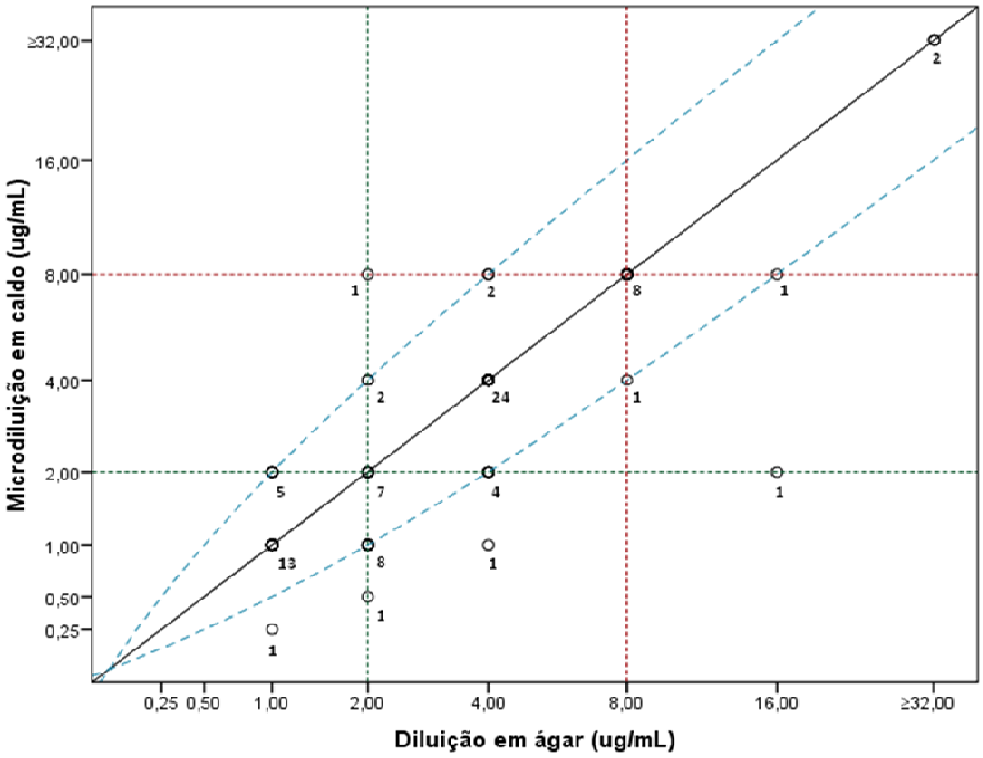


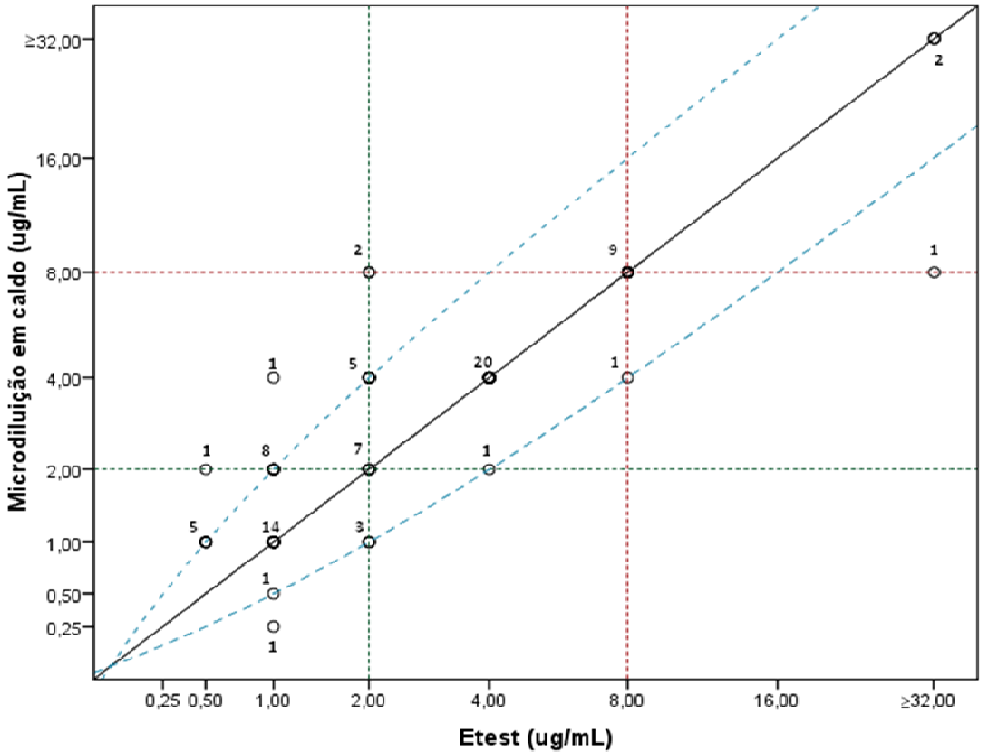
Cloranfenicol



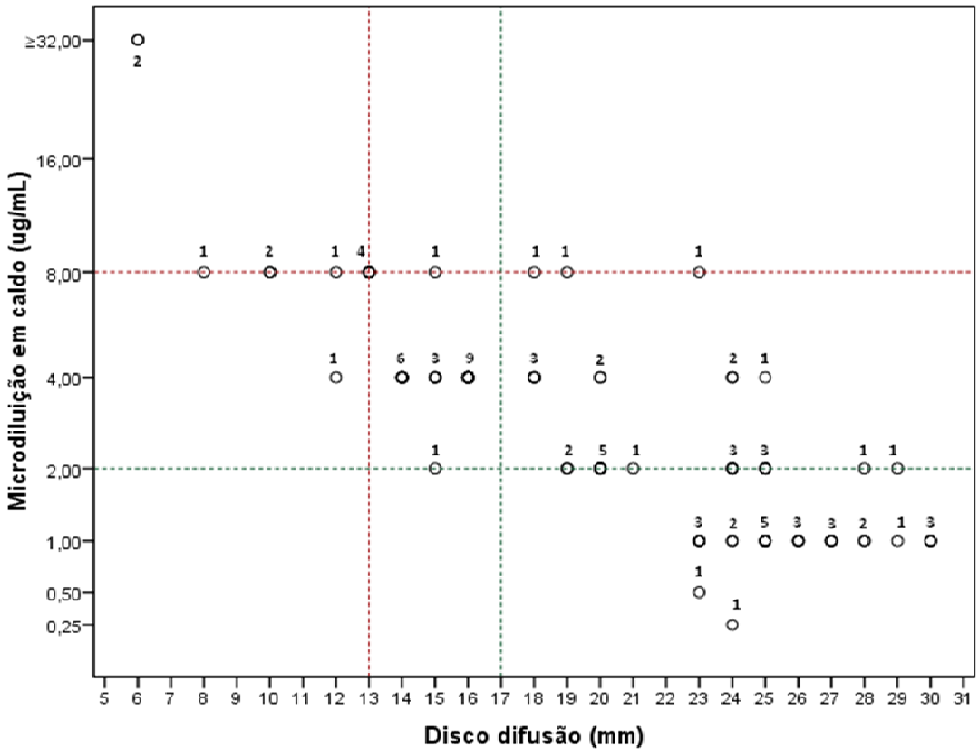


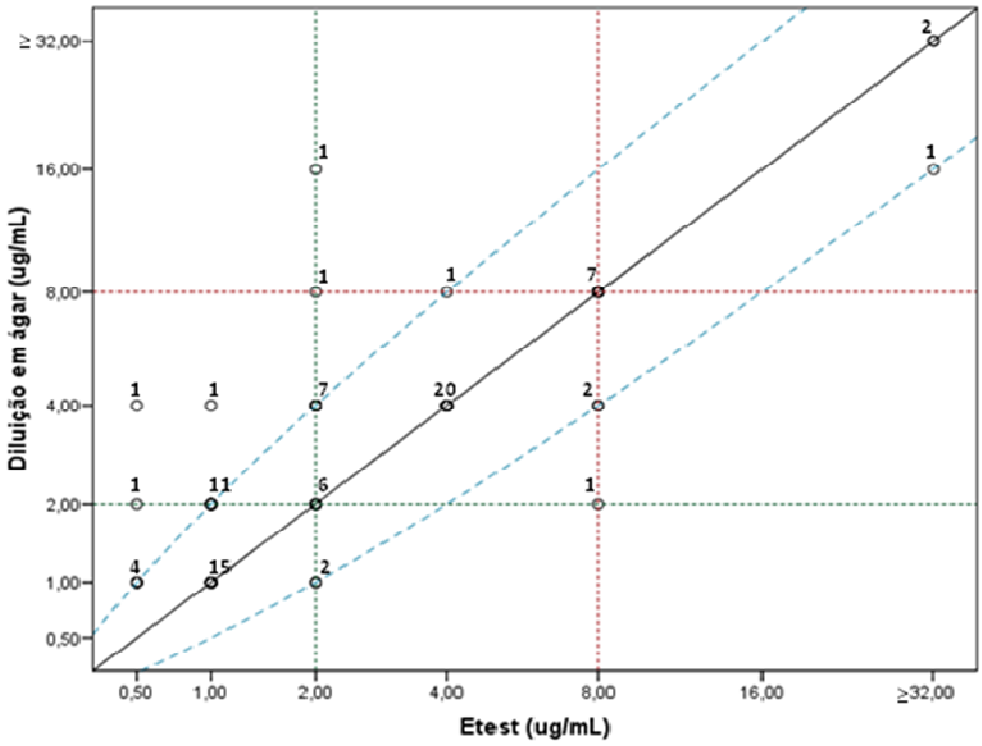
Levofloxacina



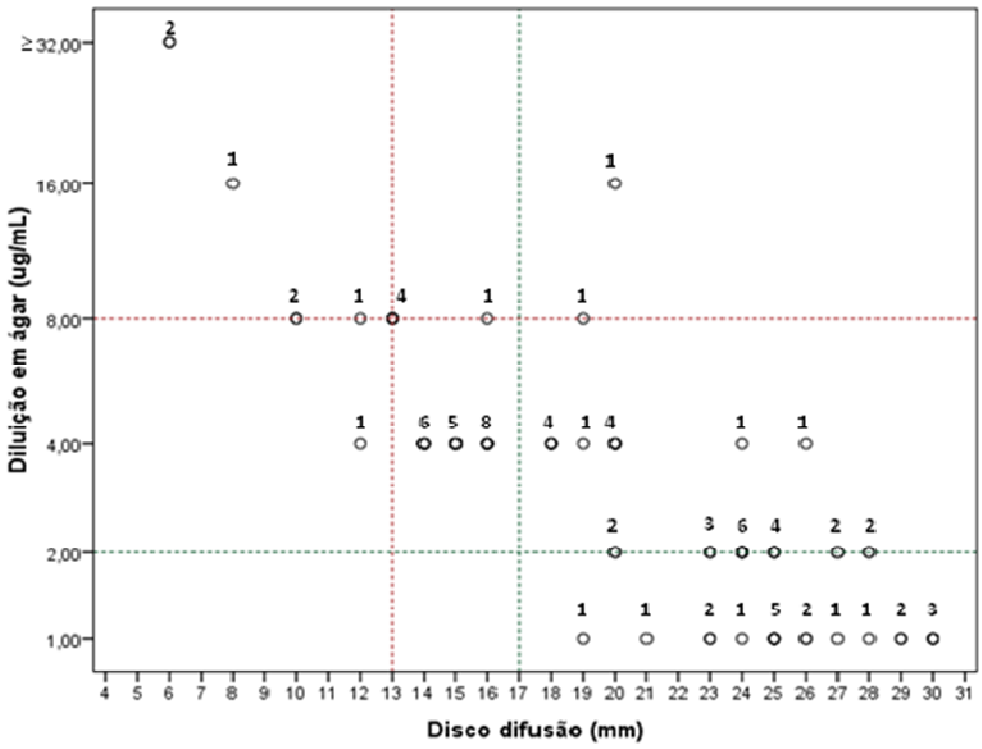


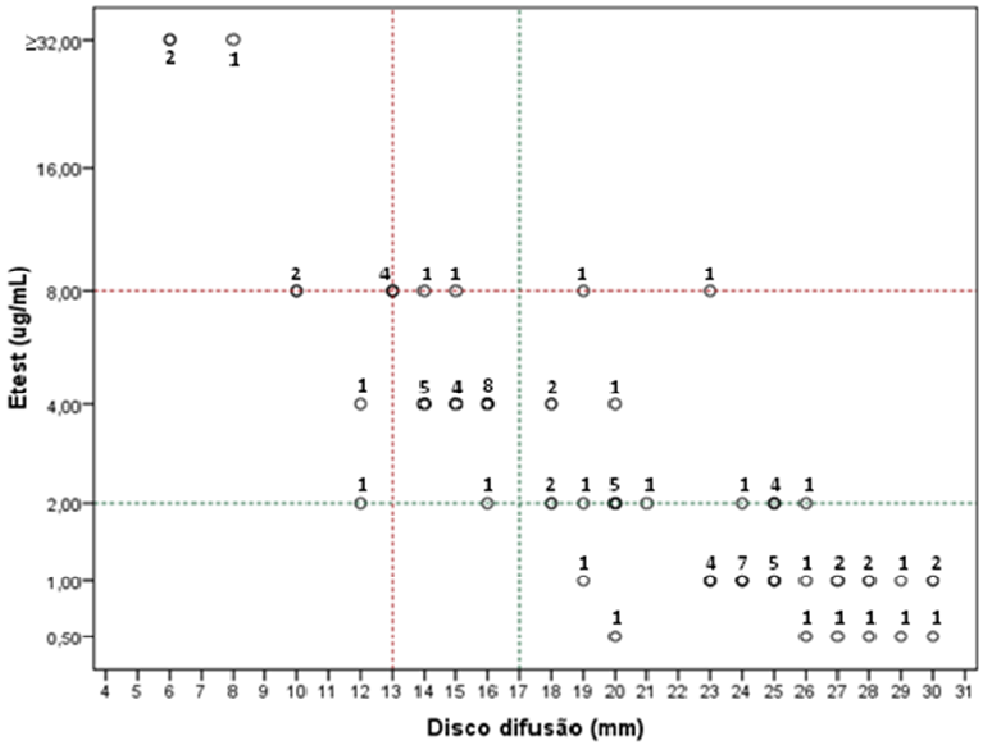
Levofloxacina



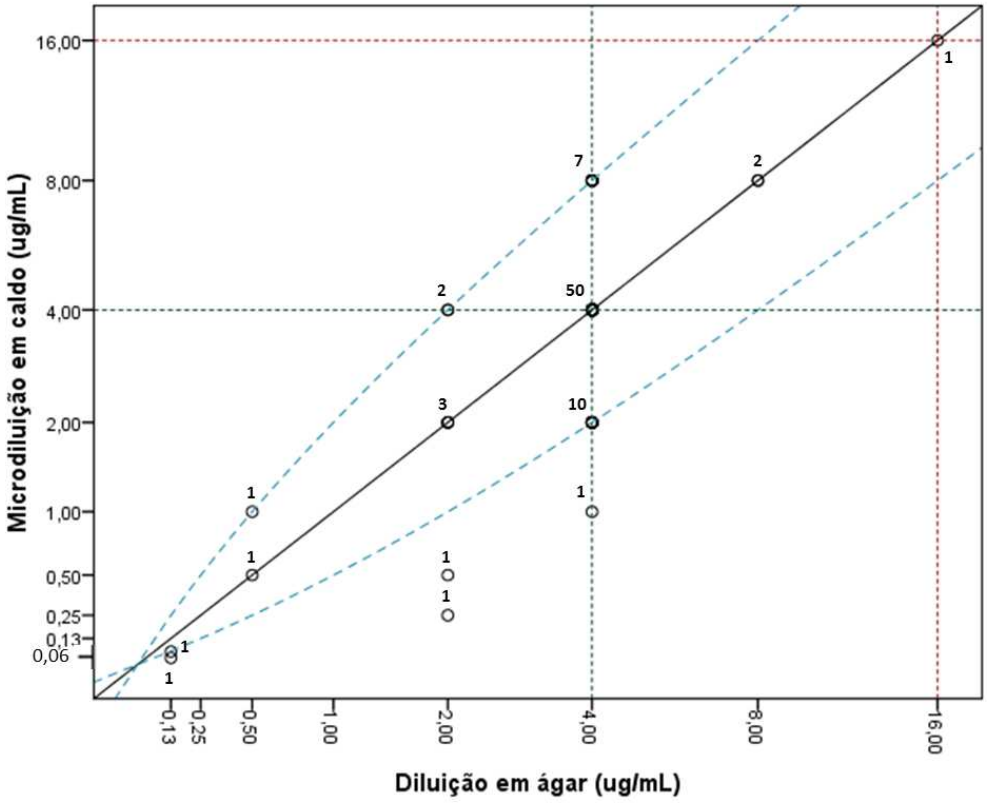


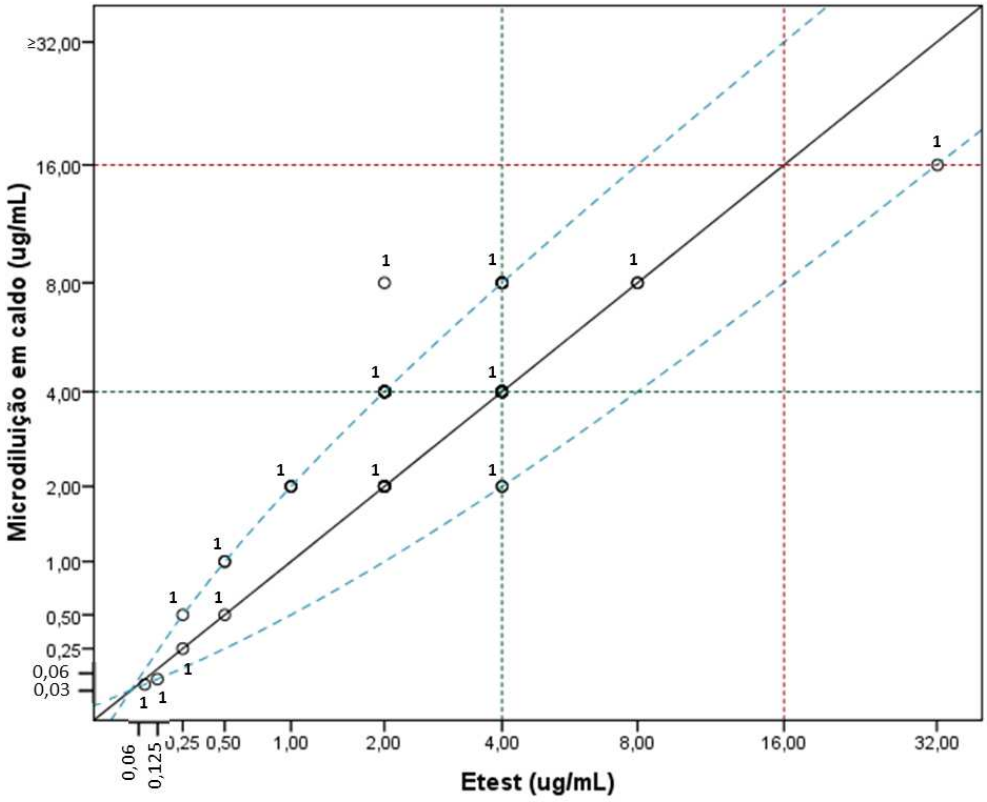
Levofloxacina



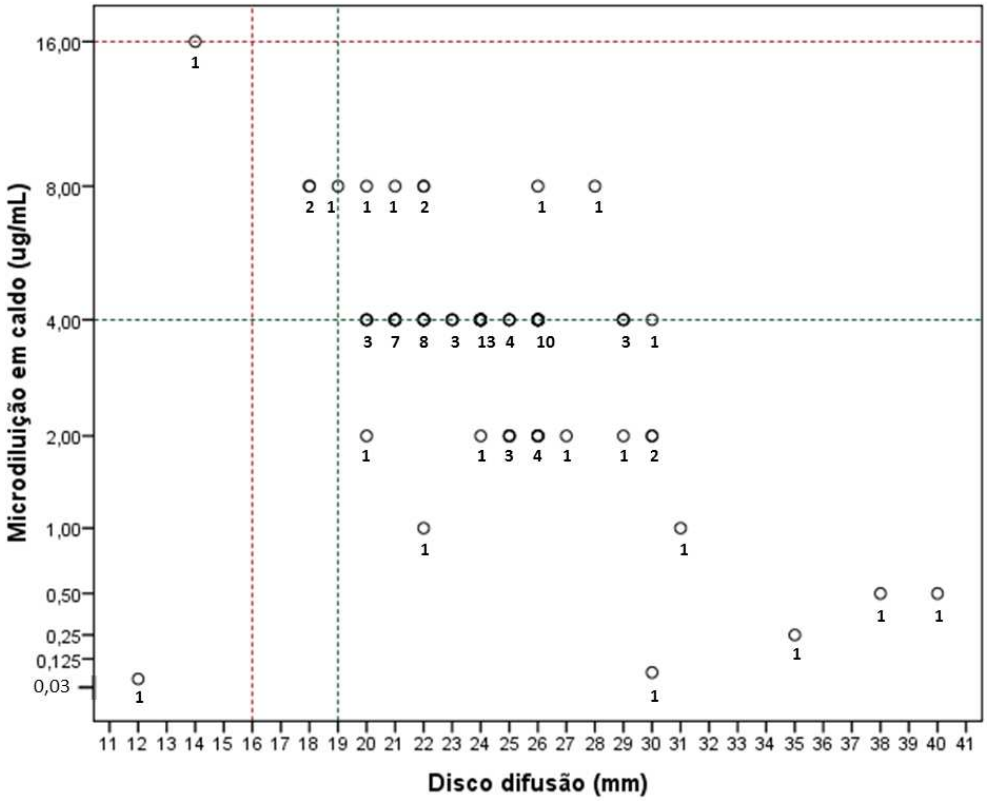


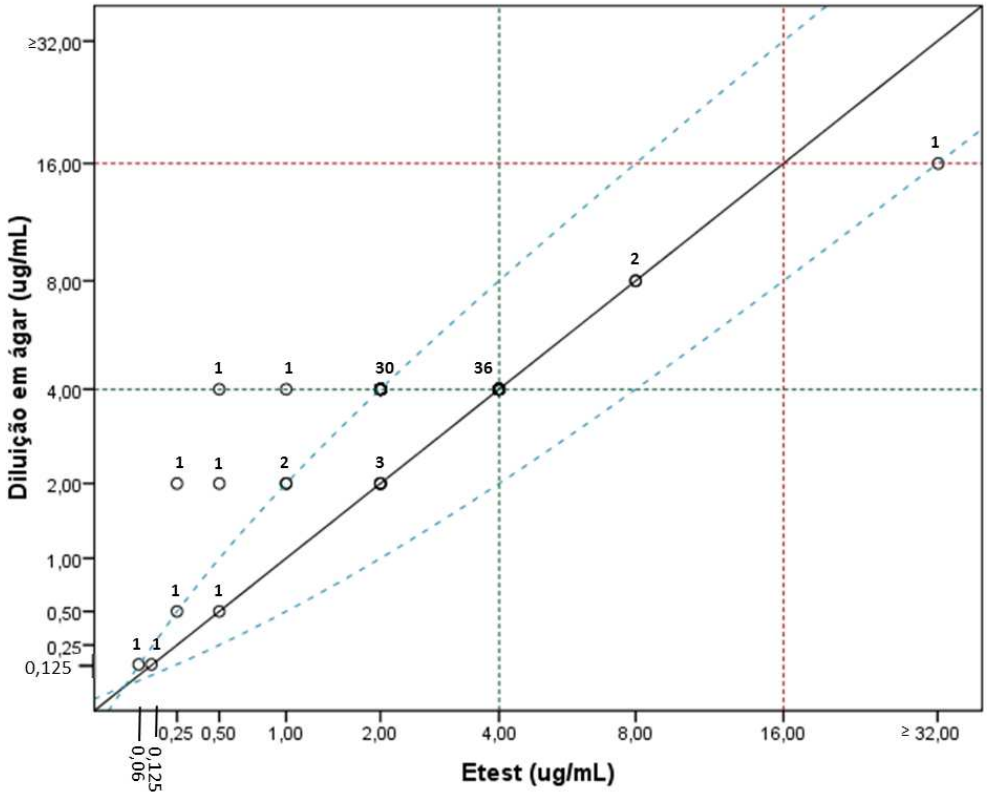
Meropenem


Microdiluição em caldo (ug/mL)
16,00
8,00
4,00
2,00
1,00
0,50
0,25
0,13
0,06
Diluição em ágar (ug/mL)
0,13
0,25
0,50
1,00
2,00
4,00
8,00
16,00

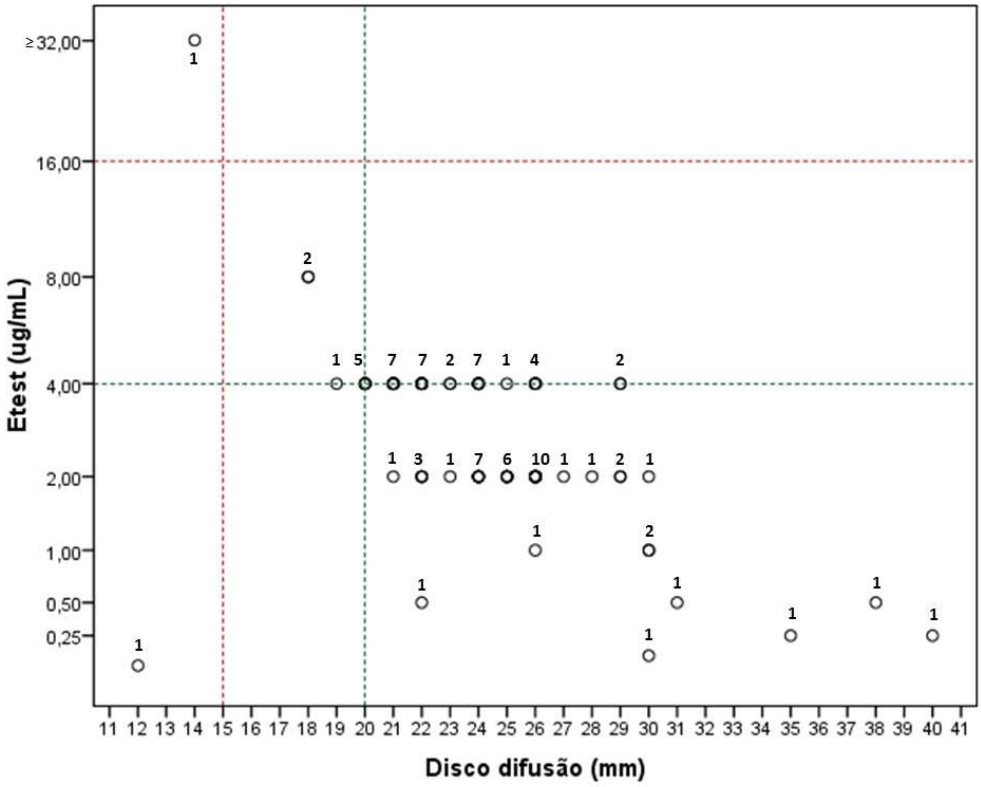

Microdiluição em caldo (ug/mL)
≥32,00
16,00
8,00
4,00
2,00
1,00
0,50
0,25
0,06
0,03
Etest (ug/mL)
0,06
0,125
0,25
0,50
1,00
2,00
4,00
8,00
16,00
32,00

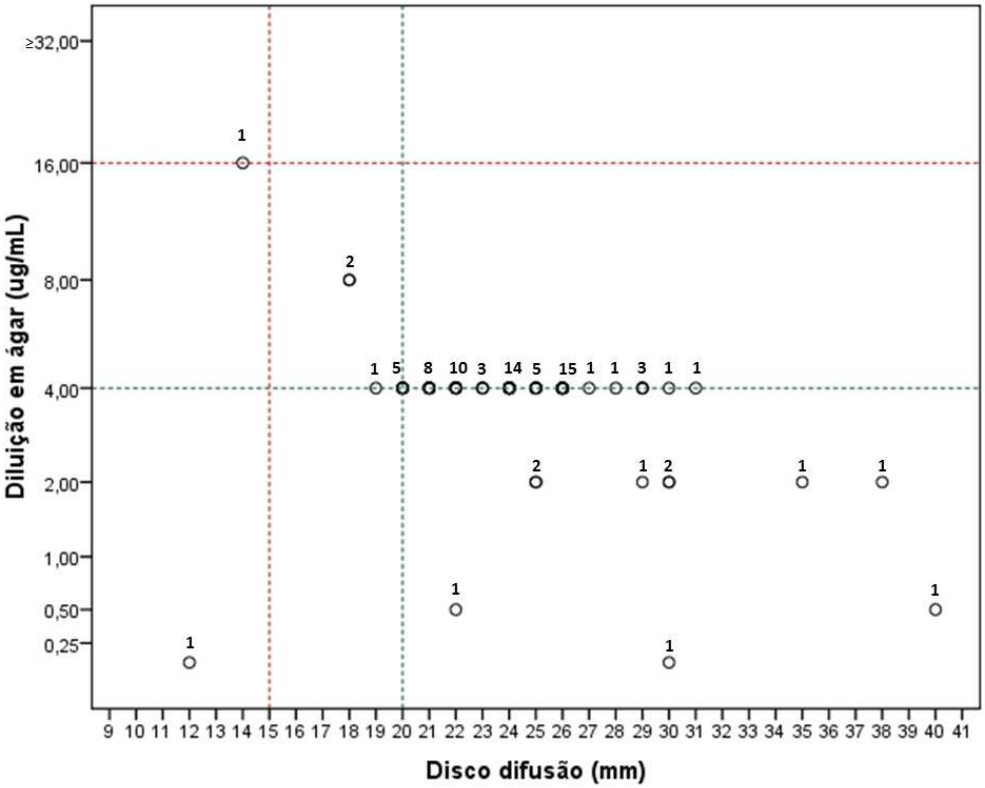
Meropenem


Microdiluição em caldo (ug/mL)
16,00
8,00
4,00
2,00
1,00
0,50
0,25
0,125
0,03
Disco difusão (mm)
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

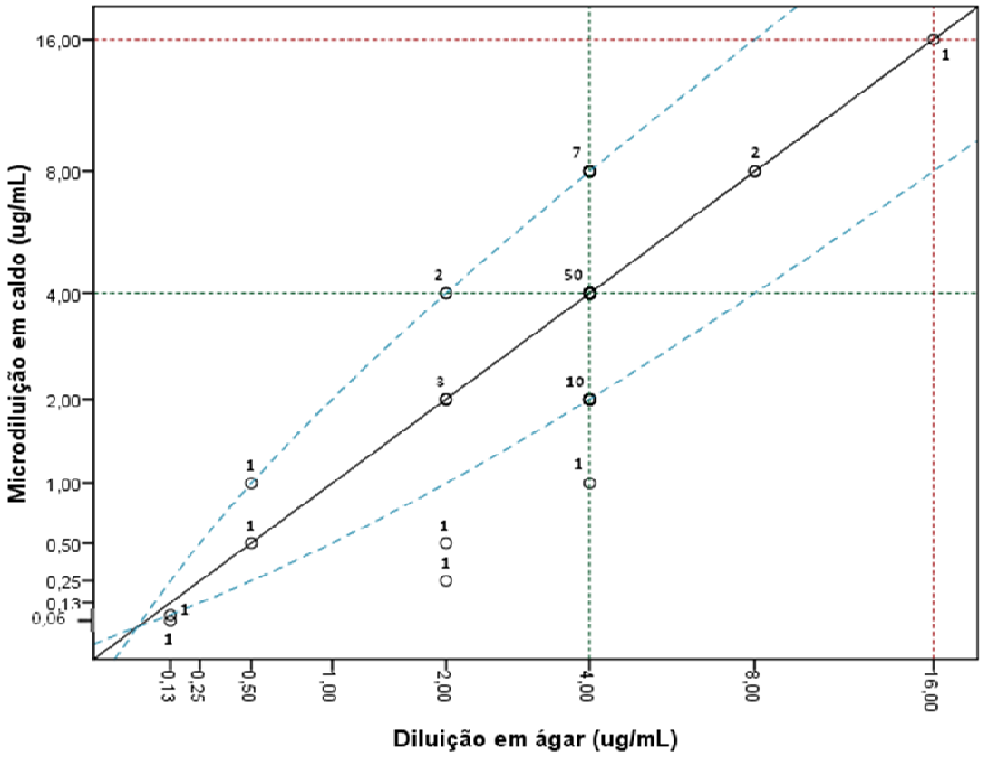

Diluição em ágar (ug/mL)
≥32,00
16,00
8,00
4,00
2,00
1,00
0,50
0,25
0,125
Etest (ug/mL)
0,06
0,125
0,25
0,50
1,00
2,00
4,00
8,00
16,00
≥ 32,00

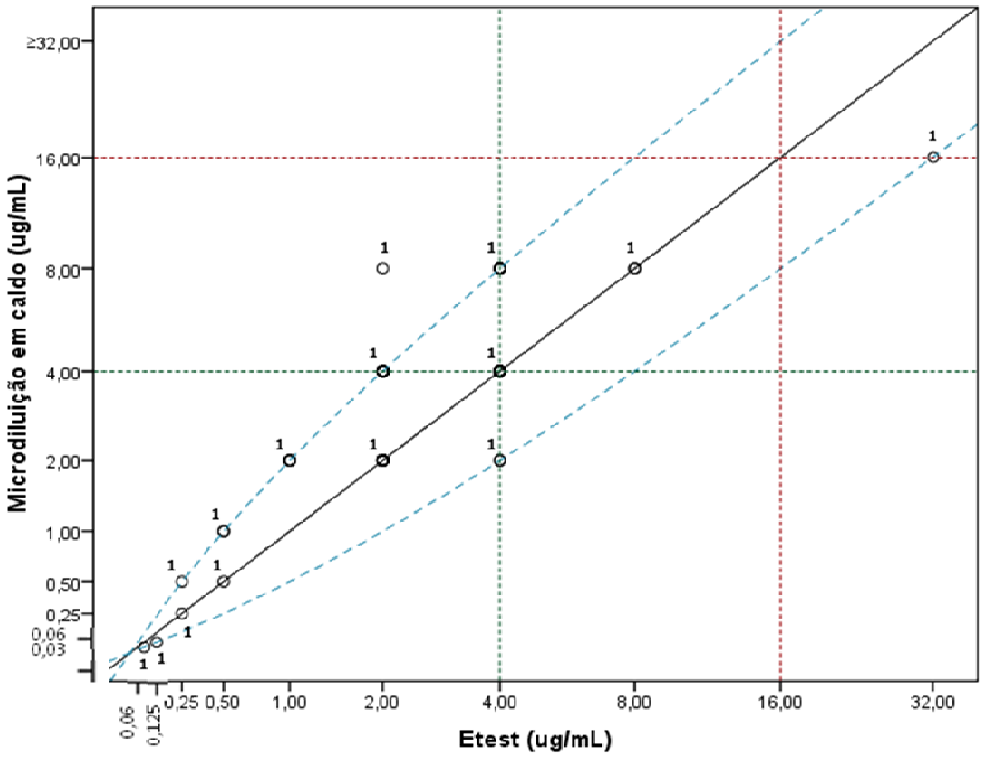
Meropenem


Etest (ug/mL)
≥32,00
16,00
8,00
4,00
2,00
1,00
0,50
0,25
Disco difusão (mm)

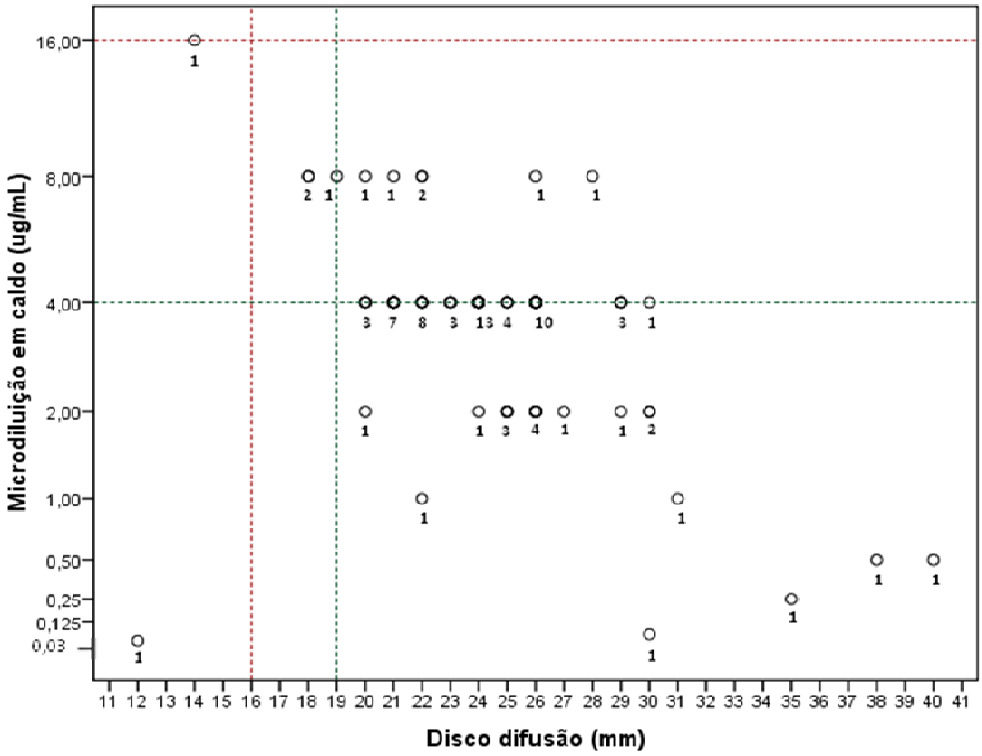

Diluição em ágar (ug/mL)
≥32,00
16,00
8,00
4,00
2,00
1,00
0,50
0,25
Disco difusão (mm)

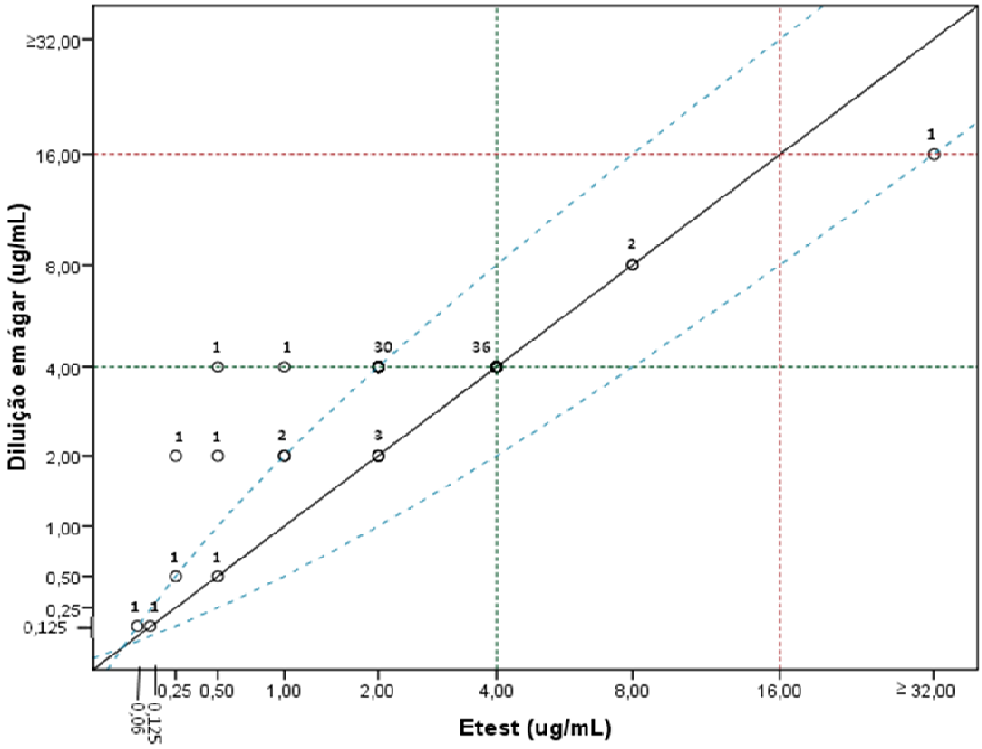
Minociclina



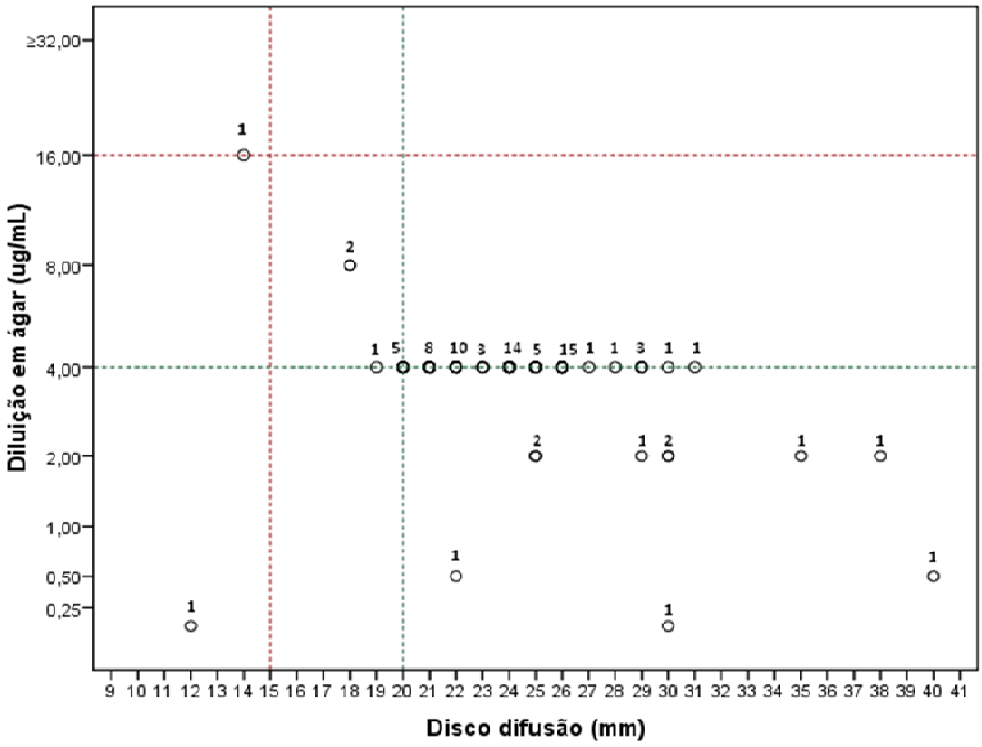


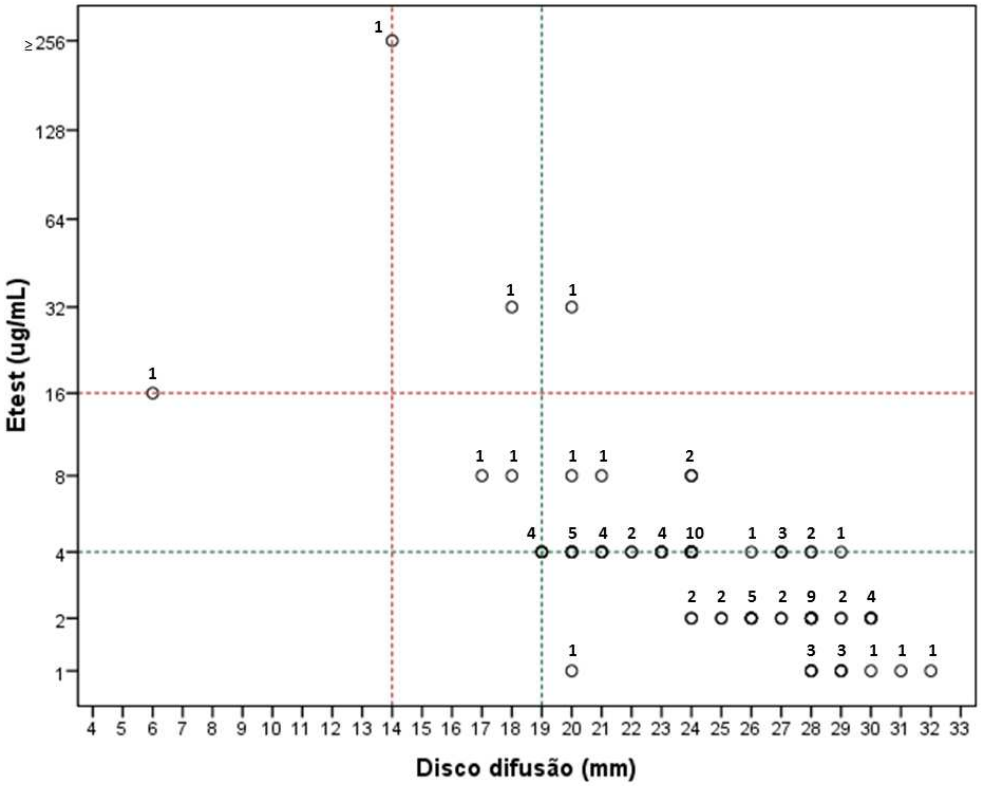
Minociclina



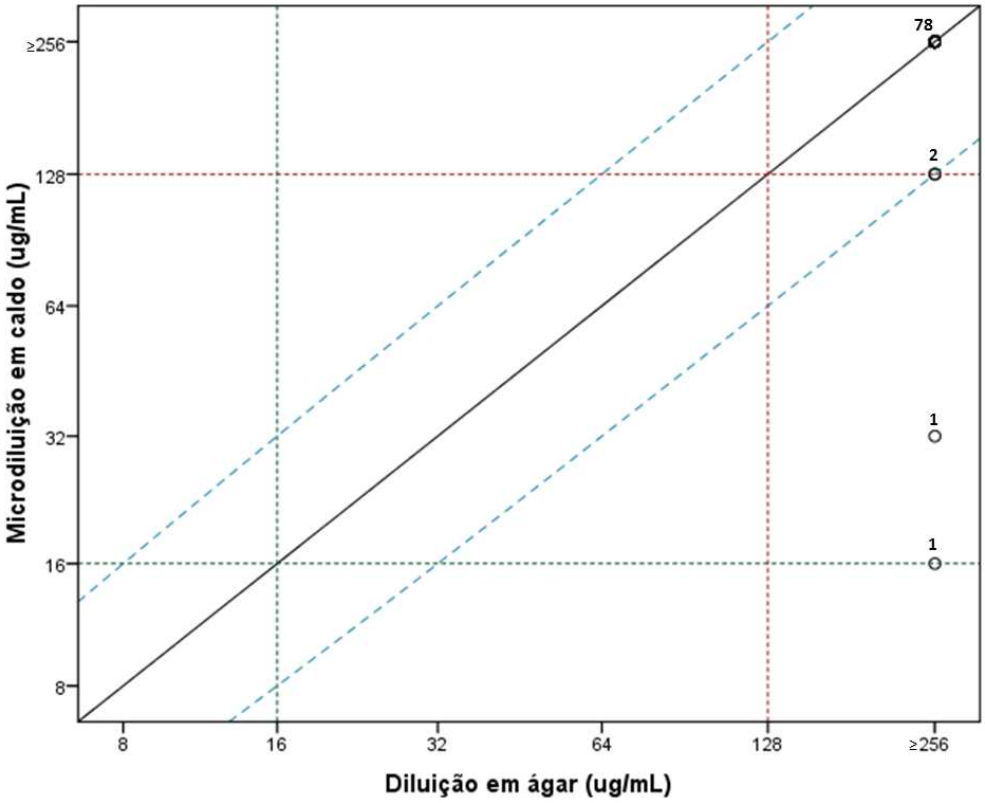


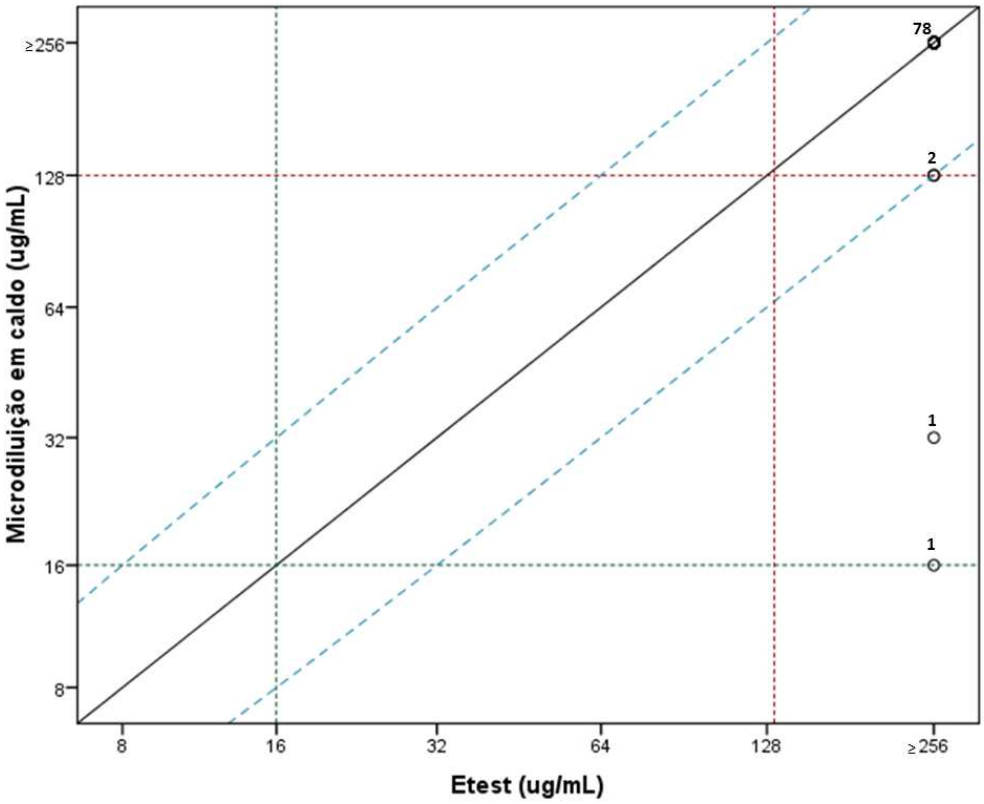
Minociclina



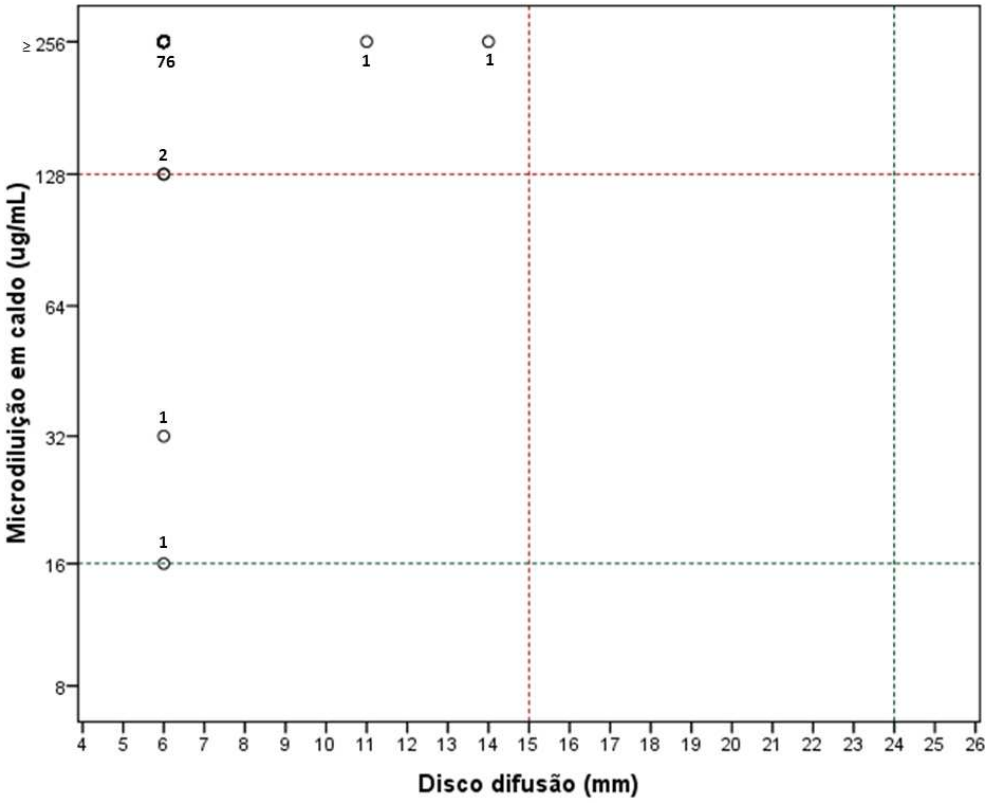


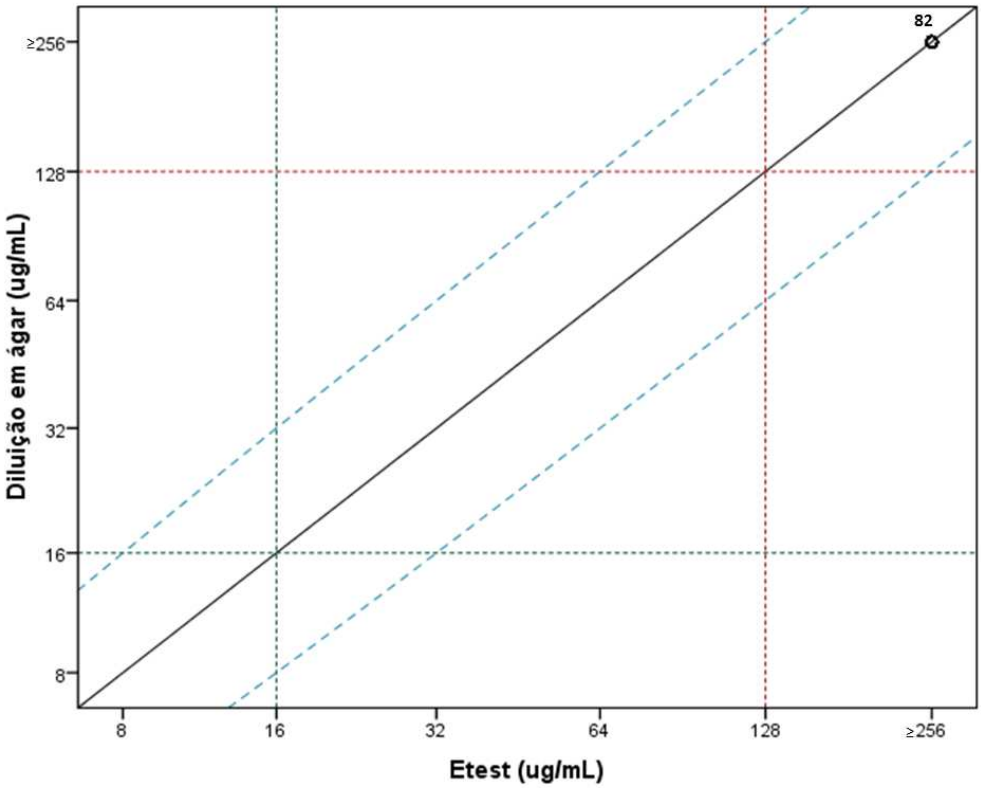
Ticarcilina/ácido clavulânico



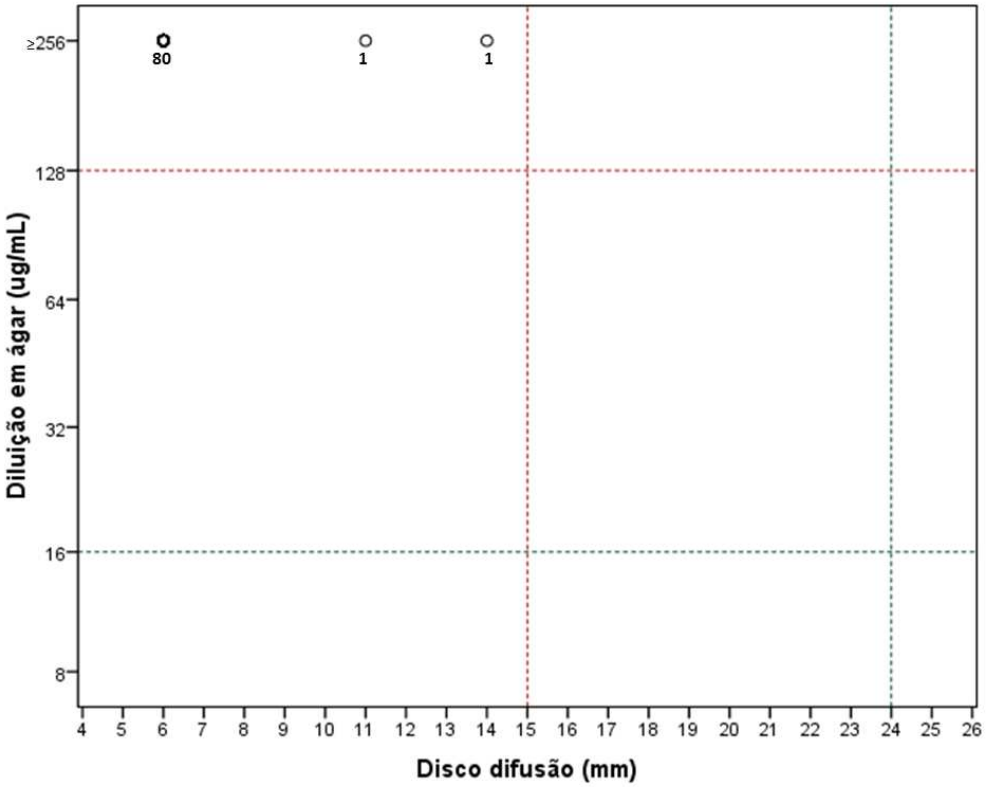


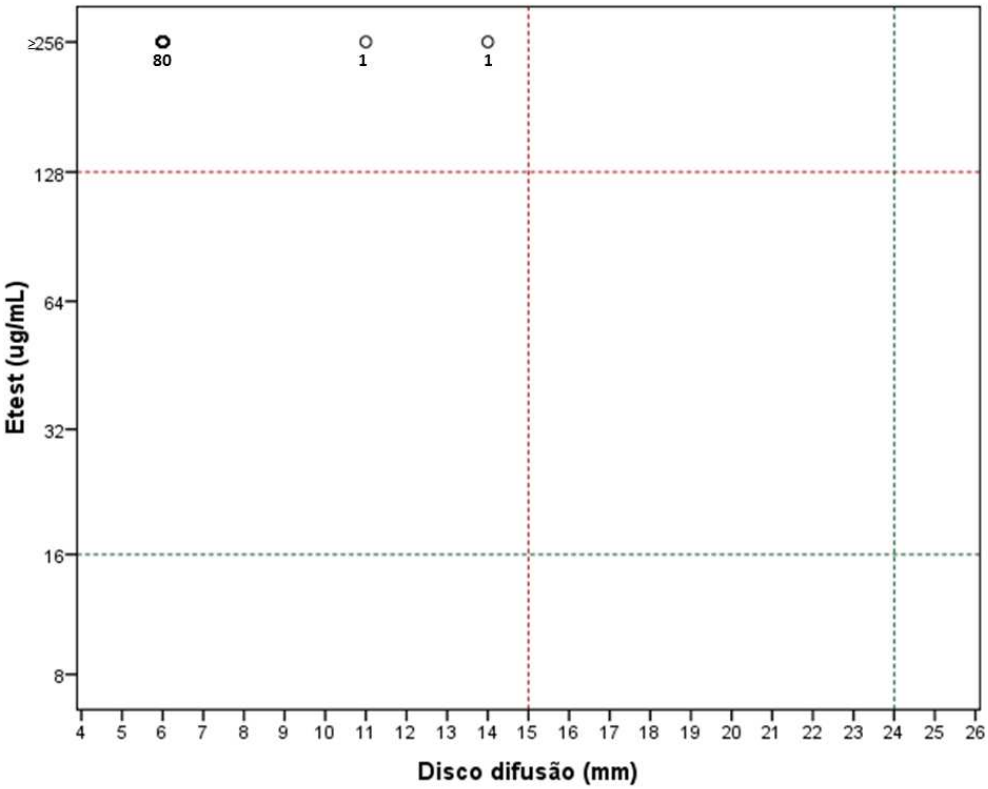
Ticarcilina/ácido clavulânico



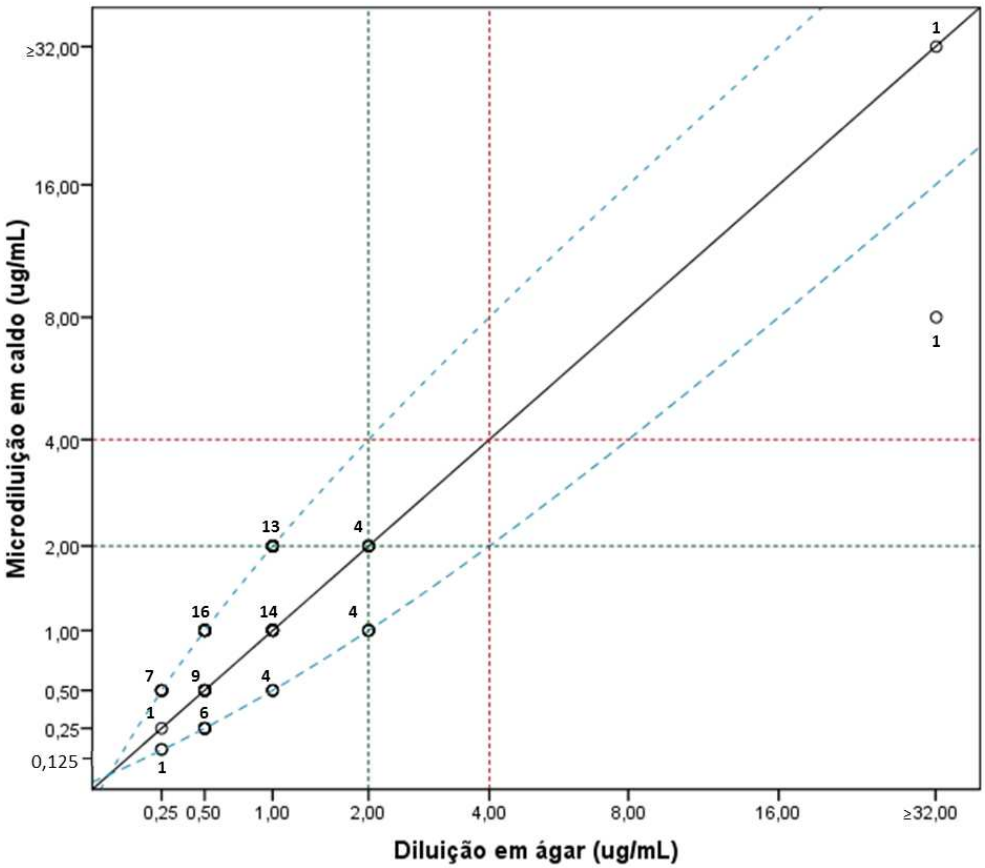


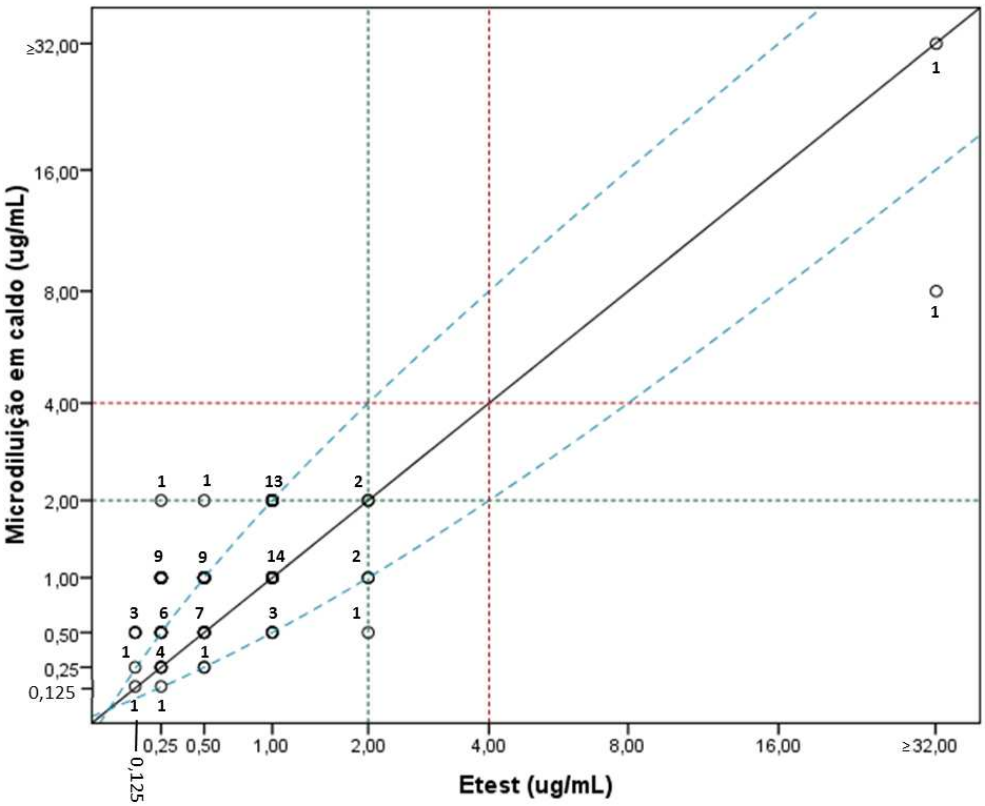
Ticarcilina/ácido clavulânico



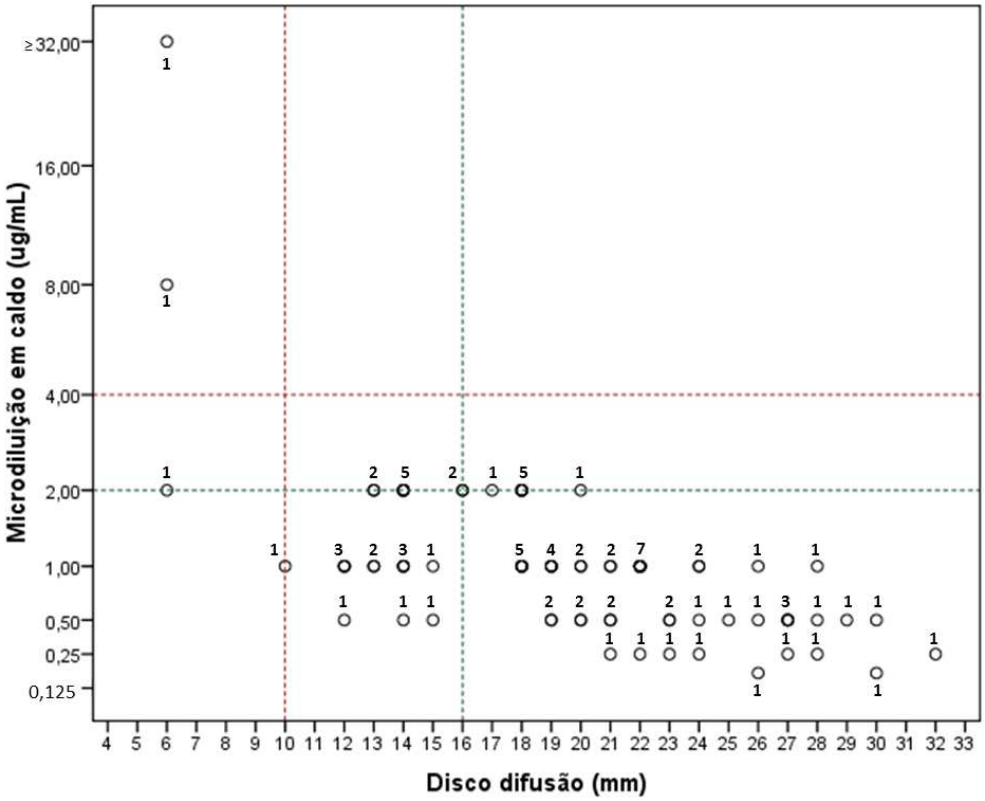


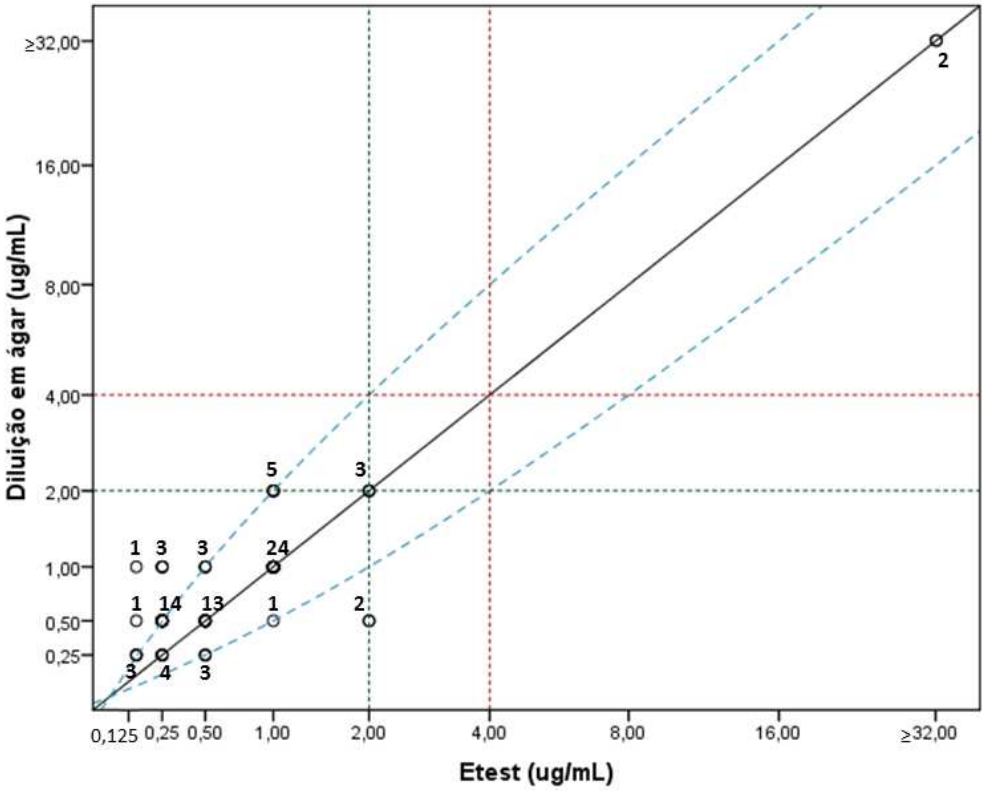
Trimetoprim/sulfametoxazol



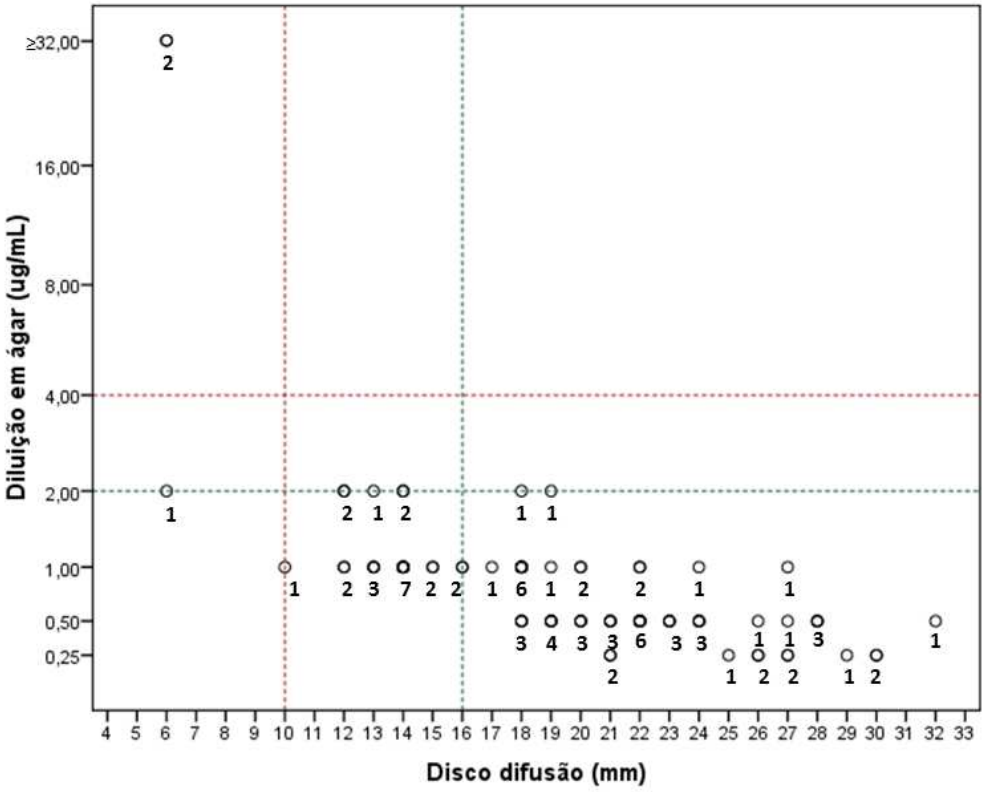


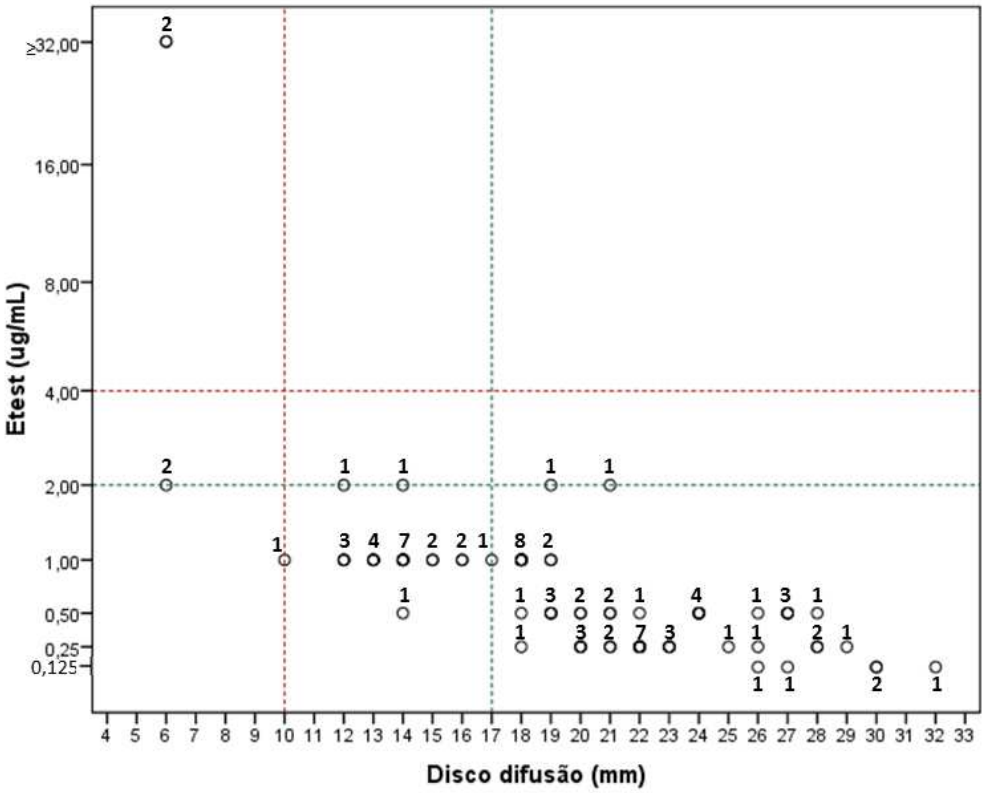
Trimetoprim/sulfametoxazol





Trimetoprim/sulfametoxazol





Anexo 2

Laudo do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas para a dosagem de cálcio e magnésio realizada no Müeller-Hinton caldo utilizado neste estudo

RESULTADO DE ANÁLISE CA 376/12

Empresa	**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO / ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**
Endereço	Rua: Pedro de Toledo, 781 - 6º andar/fundos - Vila Clementino CEP: 04039-032 - São Paulo / SP
A/C	Lorena Cristina
E-mail	*lolobiologa@gmail.com*
Telefone	(11) 5576 - 4748

1. Problema Analítico

Determinação de cálcio e magnésio por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado em amostras de meio de cultura.

2. Amostras e Padrões

As amostras foram recebidas em 05 de Dezembro de 2012 a temperatura ambiente. A amostragem foi de responsabilidade do cliente e as identificações das amostras estão apresentadas na Tabela 1. Os padrões utilizados estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 1 – Legenda de identificação das amostras.

Central Analítica	Cliente
AM 1326/12	Mueller-Hinton Agar (CM337) OXOID - Lote: 1150501 Val: 02/2017
AM 1327/12	Mueller-Hinton Broth (CM405) OXOID - Lote: 1035177 Val: 04/2016

Tabela 2 – Padrões utilizados.

Solução Padrão de Cálcio 1000 µg/mL, marca Accu Trace, rastreável ao material de referência NIST / USA 3109a, Lote B6115053-1A, válida até dezembro de 2013.
Solução Padrão de Magnésio 1002 µg/mL, marca Ultra Scientific, rastreável ao material de referência NIST / USA 3131a, Lote J00348, válida até maio de 2015.

3. MÉTODO DE ANÁLISE

A análise foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado após a digestão ácida das amostras em forno de micro-ondas. A quantificação foi realizada através das curvas analíticas preparadas com os padrões descritos na Tabela 2.
Equipamento: Perkin Elmer – 3000 DV.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos nas amostras. [1]

Parâmetros	Cálcio, mg/kg	Magnésio, mg/kg
Mueller-Hinton Agar (CM337) OXOID - Lote: 1150501 Val: 02/2017	480 (± 20)	250 (± 2)
Mueller-Hinton Broth (CM405) OXOID - Lote: 1035177 Val: 04/2016	171 (± 8)	142 (± 2)

[1] Resultados expressos como média e desvio da média de duas determinações.

Obs.1: Os resultados referem-se exclusivamente à análise em amostras entregues pelo cliente à Central Analítica – IQ/UNICAMP.

Obs.2: Fica o cliente notificado que o uso do nome do Instituto de Química da UNICAMP e a reprodução deste resultado de análise somente podem ser feitos sob prévia autorização.

Obs.3: O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a compromete.

Campinas, 21 de Janeiro de 2013.

Susanne Rath
Profª. Dra. Susanne Rath
Comissão Gestora
CRQ: 04162641 - 4ª Região
21 / 01 / 13

Sabrina Rosa
Sabrina Barboza Rosa
Gerente Técnico Substituto
CRQ: 04263563 - 4ª Região
21 / 01 / 13

Central Analítica
Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química - CP 6154 - 13084-971 Campinas, SP
Fone: (019) 3521-3007 FAX: (019) 3521-3052
E-mail: ca@iqm.unicamp.br

Anexo 3

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa emitido pela Universidade Federal de São Paulo (#0071/12)

São Paulo, 15 de junho de 2012
CEP Nº: **0071/12**

Ilmo(a) Sr(a

Pesquisador(a): ANA CRISTINA GALES

Disciplina/Departamento Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina

Pesquisadores associados: Ana Cristina Gales (orientadora); Lorena Cristina Correa Fehlberg (aluna de doutorado); Cecilia Helena V Franco de Godoy Carvalhaes;Elizabeth de Andrade Marques

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização do perfil de sensibilidade a antimicrobianos e avaliação dos mecanismos de resistência à sulfametoxazol/trimetoprim :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental em amostras bacterianas

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Caracterizar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, a similaridade genética e os mecanismos de resistência à sulfametoxazol/trimetoprim entre os isolados clínicos do CBc recuperados de pacientes atendidos no complexo do Hospital São Paulo, São Paulo, e no Hospital Pedro Ernesto, Rio de Janeiro.

RESUMO: Serão avaliadas amostras clínicas pertencentes ao CBc recuperadas de diferentes sítios corpóreos de pacientes atendidos no Hospital São Paulo/UNIFESP entre 2007 e 2011. Adicionalmente, será incluída no estudo uma coleção de 86 isolados clínicos do CBc proveniente de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Em ambas as coleções, apenas uma amostra por paciente será incluída no estudo. A identificação das espécies do CBc será realizada pelos seguintes métodos: Identificação fenotípica das espécies do CBc; Identificação pelo sequenciamento do gene recA (com a Extração do DNA bacteriano e Reações de sequenciamento; Identificação pela espectrometria de massa por MALDI-TOF (matrix assisted lazer desorption/ionization) e realizada a avaliação da sensibilidade in-vitro aos antimicrobianos. Será realizada a caracterização genotípica e avaliação da similaridade genética das amostras estudadas e a detecção dos genes de resistência pela reação da polimerase em cadeia (PCR).

FUNDAMENTOS E RACIONAL: As infecções causadas por espécies do CBc tem causado um aumento significativo na morbidade e na mortalidade prematura de pacientes com FC, representando uma contra-indicação para possíveis casos de transplante pulmonar. Além disso, o risco de disseminação destas cepas requer políticas de controle de infecção hospitalar eficazes, sendo a identificação rápida e confiável de agentes infecciosos a partir de amostras clínicas um fator de extrema importância para introdução da terapia antimicrobiana adequada e a diminuição de surtos hospitalares. Entretanto, a identificação laboratorial do CBc, bem como outras espécies de Burkholderia, é dificultada pelo seu crescimento lento em meios convencionais utilizados nos laboratórios de rotina de microbiologia clínica, tais como ágar sangue e ágar MacConkey. Frequentemente o seu isolamento é comprometido pela presença de outros microrganismos de crescimento mais rápido na amostra, como por exemplo P. aeruginosa, mascarando o crescimento de colônias de Burkholderia spp. Estudos demonstram que a tobramicina, um aminoglicosídeo, quando utilizado na forma inalatória, tem sido um antimicrobiano promissor para o tratamento eficaz e até mesmo a erradicação de infecções pulmonares por CBc em pacientes com FC. Esses achados sugerem que estudos multicêntricos os quais avaliem um número maior e mais diversificado de espécies de Burkholderia são necessários para estabelecer os antimicrobianos e os pontos de corte atualmente preconizados para o tratamento destas infecções. Baseado nos resultados desta infecção, pretendemos caracterizar um extenso grupo de bactérias pertencentes ao CBc quanto ao seu perfil de sensibilidade e a presença de genes que conferem resistência aos antimicrobianos usualmente empregados no tratamento das infecções causadas por este grupo de bactérias. Adicionalmente, avaliaremos a eficácia da espectrometria de massas na identificação destas espécies.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos laboratoriais moleculares que serão realizados. Apresenta carta de concordância com o estudo , da profª. Elizabeth de Andrade Marques, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 MESES

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 10/06/2013 e 05/06/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil