UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos

Natália Candido Caçador

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Natália Candido Caçador

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Candido Caçador, Natália
Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos. Ribeirão Preto, 2016.

77 p. : il. ; 30cm.
Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa.
1. Fibrose cística. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3.Infecção crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Candido Caçador

Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho à minha amada família, meus pais Conceição e Ronaldo, meus irmãos Elton e Felipe e meu noivo Getúlio. Obrigada por todo amor e carinho, pela força e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guardar, iluminar e guiar em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Conceição Candido Caçador e Ronaldo Caçador, por acreditarem em mim e nunca colocarem limites nos meus sonhos. Aos meus irmãos, Elton Candido Caçador e Felipe Candido Caçador, pelo companheirismo de sempre.

Agradeço ao meu amado noivo, Getúlio Guedes de Souza, por toda amizade, amor e compreensão nesses longos anos de distância.

Agradeço às amigas Camila Sayuri Matsumoto, Franciele Przygodda, Fernanda Gomes Cardoso, Letícia Magalhães Arruda e Patrícia Reis por dividirem comigo o árduo caminho da pós-graduação, tornando a jornada mais prazerosa. E ao meu amigo Hudson Caetano Polonini por sempre me socorrer e incentivar nos momentos de dificuldade.

À Profª. Drª. Ana Lúcia da Costa Darini, por acreditar em mim, conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todos os ensinamentos. Minha enorme gratidão.

À Dra. Lidia Alice Gomes Monteiro Marin Torres, do Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo incansável acompanhamento e discussões sobre os dados clínicos dos pacientes.

Agradeço ao Prof. Dr. Niels Høiby, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, supervisão e grande colaboração ao meu crescimento profissional. Sua calma e compreensão fizeram com que a adaptação ao novo ambiente de trabalho fosse fácil. Agradeço também à Profª. Drª. Oana Ciofu pelos ensinamentos e constante discussão dos resultados.

Agradeço às microbiologistas Ulla Rydahl Johansen e Tina Wassermann pela paciência, troca de experiências e acompanhamento constante nos experimentos. Também agradeço à Tina Rathmann por facilitar as burocracias, sempre com um sorriso no rosto.

Agradeço aos pesquisadores da Universidade de Copenhague, Mette Kolpen e Hengzhuang Wang pela parceria e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos Wenna Gleyce Nascimento Araújo e Patrick S. Melsted por tornarem meus dias longe de casa mais curtos e prazerosos.

Aos amigos do LEBEM, Anelise Ballaben, Carolina P. C. Capizzani, Joseane Cristina Ferreira, Isabela Araújo, Leonardo Neves de Andrade, Ludmilla Tonani, Renata Galetti, Rubens Eduardo da Silva pela amizade, ótimos momentos, ajudas e sugestões. Com vocês o trabalho em equipe é sempre divertido.

Ao Ambulatório de Fibrose Cística e Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por permitirem o acompanhamento das coletas dos espécimes clínicos de pacientes com fibrose cística e por cederem o material clínico para esta pesquisa.

Aos pacientes com fibrose cística atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por confiarem neste trabalho e manifestarem interesse em participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

À Lucélia Aparecida Pereira, biologista do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio e informações fornecidas.

Ao Henrique Theodoro, funcionário do Serviço de Pós-graduação desta Unidade, por todos os serviços prestados.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto (Projeto Temático 2014/14494-8), pela bolsa de Doutorado concedida (2013/13358-0) e pela bolsa de estágio no exterior - BEPE (2014/19310-2).

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota"

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

CAÇADOR, N. C. **Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos. 2016**. 77 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

A infecção crônica das vias aéreas por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC), devido à contínua degradação do tecido pulmonar, que leva ao declínio da função pulmonar, gerada pela infecção e pelo processo inflamatório. O objetivo do presente estudo foi analisar características genéticas de PA que levam à sua adaptação às vias aéreas destes pacientes com infecção pulmonar crônica, atendidos no Centro de Referência em FC do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e relacionar com resultados de tipagem molecular, resistência a antibióticos, cronicidade e dados clínicos dos pacientes em acompanhamento clínico no período de julho/2011 a abril/2014. As características genéticas dos isolados investigados englobam pesquisa de 18 genes de virulência e genes do sistema *quorum sensing* (genes *lasR* e *rhlR*), associação entre mutações e conversão para fenótipo mucoide (*operon algTmucABD*) e caracterização de linhagens hipermutantes (genes *mutS* e *mutL*). A identificação de *P. aeruginosa* foi realizada por PCR e MALDI-TOF, que mostraram alta concordância. Foram considerados os dados clínicos dos pacientes: índice de massa corpórea, escore de Shwachman, medidas de capacidade vital forçada e volume expiratório forçado no primeiro segundo. A porcentagem de pacientes com infecção pulmonar crônica por PA observada foi similar aos dados disponíveis na literatura, entretanto, a alta incidência em pacientes jovens foi preocupante. O perfil de macrorrestrição do DNA genômico por PFGE se mostrou útil para definição de colonização crônica/intermitente em associação com critérios clínicos e, juntamente com a detecção de mutações nos genes *mucA* e *mucD* confirmaram transmissão interpacientes. Foi observada alta ocorrência dos genes de fatores de virulência pesquisados para grande maioria dos isolados de pacientes crônicos. A resistência aos antibióticos pesquisados dos isolados de *P. aeruginosa* foi baixa e está de acordo com a literatura nacional e internacional e com a antibioticoterapia adotada no hospital. Não foi observada resistência aos carbapenêmicos e às fluoroquinolonas devido à presença de genes de resistência plasmideais. As mutações no gene *mucA* foram o principal mecanismo de conversão para o fenótipo mucoide e o fenótipo revertente não-mucoide ocorreu principalmente por mutações no gene *algT*. Foram detectadas novas mutações nos genes *mutS* e *mutL* que também suportam a ideia que hipermutação em PA está associada com mutações do sistema *mismatch* de reparo do DNA. O sistema *quorum sensing* dos isolados estudados está parcialmente prejudicado devido às várias mutações no gene *lasR*, mas todos conservam o gene *rhlR* intacto, que sustenta alguma atividade *quorum sensing* envolvida na produção de fatores de virulência importantes. Pacientes com infecção pulmonar crônica por PA com isolamento de outros bacilos gram-negativos não-fermentadores apresentaram maior alteração da função pulmonar quando comparados com pacientes com infecção pulmonar crônica por PA com ou sem isolamento de *Staphylococcus aureus.* As alterações presentes no *operon algTmucABD*, *quorum sensing* e hipermutabilidade contribuem para a cronicidade dos pacientes com FC em relação à infecção por *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Fibrose cística, *Pseudomonas aeruginosa*, infecção crônica.

ABSTRACT

CAÇADOR, N. C. **Molecular epidemiology and adaptive genetic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* related to chronic infection in patients with Cystic Fibrosis and their correlation with clinical data. 2016**. 77 f. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

The chronic airway infection by *P. aeruginosa* (PA) is the leading cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients, due to continuous degradation of the pulmonary tissue. This leads to decline in lung function, which is generated by the related infection and inflammation. The aim of this study was to analyze genetic characteristics associated with the adaptation of PA to the airways of patients with chronic pulmonary infection attended at the CF Reference Center from the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; and to correlate these findings with the results of molecular typing, antibiotic resistance, chronicity and clinical data of patients in clinical follow-up from July/2011 to April/2014. The genetic characteristics of isolates investigated includes the research of 18 virulence genes and the quorum sensing system genes (*lasR* and *rhlR* genes), association between mutations and conversion to the mucoid phenotype (*algTmucABD* operon), and characterization of hypermutable strains (*mutS* and *mutL* genes). Identification of PA was performed by PCR and MALDI-TOF, which showed a high correlation. The patients' clinical data considered were: body mass index, Shwachman score, forced vital capacity measures and forced expiratory volume in one second. The percentage of patients with chronic PA infection observed was similar to the data available in the literature; however, a worrying high incidence in young patients was noticed. The macrorestriction profile of genomic DNA by PFGE proved to be useful to define chronic/intermittent colonization in association with clinical criteria and it confirmed interpatient transmission, in combination with the detection of mutations in the *mucA* and *mucD* genes. High occurrence of virulence genes was detected for the vast majority of isolates from chronic CF patients. Antibiotic resistance for PA isolates was low and is in accordance with national and international literature and antibiotic therapy adopted in the hospital. There was no resistance to carbapenems and fluoroquinolones by the presence of plasmid mediated resistance genes. Mutations in the *mucA* gene were the main mechanism to conversion to mucoidy, and the non-mucoid revertants occurred mainly by mutations in the *algT* gene. New mutations in *mutS* and *mutL* genes were detected, which support the idea that hypermutation in PA is associated with mutations in the DNA mismatch repair system. The quorum sensing system of the isolates is partially damaged due to several mutations in the *lasR* gene, but all isolates maintain an intact *rhlR* gene, which holds some quorum sensing activity with production of important virulence factors. Patients with chronic PA infection with isolation of other non-fermenting gram-negative rods had greater change in lung function compared with patients with chronic PA infection with or without isolation of *Staphylococcus aureus*. The changes presented in the *algTmucABD* operon, quorum sensing and hypermutability contribute to the chronicity of CF patients in relation to infection by *P. aeruginosa*.

Keywords: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, chronic infection.

RESUMEN

CAÇADOR, N. C. **Epidemiología molecular y características genéticas de adaptación de *Pseudomonas aeruginosa* causando infección crónica en pacientes con Fibrosis Quística y su correlación con datos clínicos. 2016**. 77 f. Tesis (Doctoral). Facultad de Farmacia de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

La infección crónica de las vías aéreas por *P. aeruginosa* (PA) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ, debido a la continua degradación del tejido pulmonar, que lleva a la disminución de la función pulmonar, generada por la infección y por el proceso inflamatorio. El objetivo del presente estudio fue analizar características genéticas de la PA que llevan a su adaptación a las vías aéreas de estos pacientes con infección pulmonar crónica, atendidos en el Centro de Referencia de FQ del Hospital das Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto – USP, y relacionarlas con resultados de tipificación molecular, resistencia a antibióticos, cronicidad y datos clínicos de los pacientes con acompañamiento clínico en el período de julio/2011 a abril/2014. Las características genéticas de los aislados investigados engloban una investigación de 18 genes de virulencia y genes del sistema *quorum sensing* (genes *lasR* y *rhlR*), la asociación entre mutaciones y la conversión al fenotipo mucoide (*operon algTmucABD*), y la caracterización de cepas hipermutantes (genes *mutS* y *mutL*). La identificación de *P. aeruginosa* fue realizada por PCR y MALDI-TOF, que mostraron alta concordancia. Fueron considerados los datos clínicos de los pacientes: índice de masa corporal, puntaje de Shwachman, medidas de capacidad vital forzada y volumen espiratorio forzado en el primer segundo. El porcentaje de pacientes con infección pulmonar crónica por PA observado fue similar al de los datos disponibles en la literatura, sin embargo, la alta incidencia en pacientes jóvenes fue preocupante. El perfil de macro-restricción del ADN genómico por PFGE se mostró útil para la definición de la colonización crónica/intermitente en asociación con criterios clínicos y, junto con la detección de mutaciones en los genes, confirmaron la transmisión entre pacientes. Fue observada una alta ocurrencia de los genes de factores de virulencia investigados en la gran mayoría de pacientes crónicos aislados. La resistencia a los antibióticos investigados de los aislados por *P. aeruginosa* fue baja y está de acuerdo con la literatura nacional e internacional y con la antibióticoterapia adoptada en el hospital. No fue observada resistencia a los carbapenémicos ni a las fluoroquinolonas debido a la presencia de genes de resistencia en plásmidos. Las mutaciones en el gen *mucA* fueron el principal mecanismo de conversión para el fenotipo mucoide; y el fenotipo revertiente no-mucoide ocurrió principalmente por mutaciones en el gen *algT*. Fueron detectadas nuevas mutaciones en los genes *mutS* y *mutL* que también soportan la idea de que la hipermutación en PA está asociada con mutaciones del sistema *mismatch* de reparación del ADN. El sistema *quorum sensing* de los aislados estudiados está parcialmente perjudicado debido a las varias mutaciones en el gen *lasR*, pero todos conservan el gen *rhlR* intacto, lo cual sustenta alguna actividad *quorum sensing* envuelta en la producción de factores de virulencia importantes. Los pacientes con infección pulmonar crónica por PA con aislamiento de otros bacilos gramnegativos no fermentadores presentan mayor alteración de la función pulmonar cuando comparados con pacientes con infección pulmonar crónica por PA con o sin aislamiento de *S. aureus.* Las alteraciones presentes en el *operon algTmucABD*, *quorum sensing* y la hipermutabilidad contribuyen a la cronicidad de los pacientes con FQ en relación con la infección por *P. aeruginosa*.

Palabras-clave: Fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa*, infección crónica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da complexa regulação de produção de alginato 5

Figura 2. Perfil de não-sensibilidade aos antimicrobianos testados 24

Figura 3. Presença de genes relacionados com fatores de virulência 25

Figura 4. Diferentes morfotipos de alginato em isolados de *P. aeruginosa* 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados para pesquisa de genes de resistência aos carbapenêmicos e quinolonas 14

Tabela 2. Pares de *primers* utilizados na detecção de genes de virulência 15

Tabela 3. Distribuição por faixa etária dos pacientes e isolamento de *P. aeruginosa* em amostras de escarro 22

Tabela 4. Dados clínicos de 31 pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa*, dados bacteriológicos e epidemiológicos dos isolados de *P. aeruginosa* 23

Tabela 5. Mutações e alterações ocorridas na sequência do gene *mucA* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes com FC 29

Tabela 6. Mutações e alterações ocorridas na sequência dos genes *mucB* e *mucD* nos 19 isolados de *P. aeruginosa* classificados como tipo IV de produção de alginato .. 30

Tabela 7. Mutações e alterações ocorridas na sequência do gene *algT* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes com FC 31

Tabela 8. Mutações e respectivas alterações determinadas na sequência do gene *lasR* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* 31

Tabela 9. Determinação da CIM de 9 antimicrobianos para isolados de *P. aeruginosa* 32

Tabela 10. Mutações e alterações ocorridas nos genes *mutS* e *mutL* de isolados de *P. aeruginosa* com fenótipo hipermutável 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

USP	Universidade de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
A	Adenina
Ala	Alanina
AMK	Amicacina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATM	Aztreonam
BGN-NF	Bacilo gram-negativo não-fermentador
BHI	*Brain Heart Infusion*
C	Citosina
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo *Burkholderia cepacia*
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFTR	*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
Cl^-	Íons cloro (cloreto)
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CVF	Capacidade vital forçada

Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo tri-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ES	EDTA sarcosil
FC	Fibrose Cística
FEP	Cefepima
G	Guanina
GEN	Gentamicina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HCl	Cloreto de hidrogênio
His	Histidina
Hp	Hipermutável, frequência de mutação fortemente aumentada
I	Resistência intermediária
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IMI	Imipenem
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Luria Bertani
Leu	Leucina
LEV	Levofloxacina
LPS	Lipopolissacarídeo
Lys	Lisina
M	Mucoide

MALDI-TOF	*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*
MDR	*multidrug-resistant*
MEM	Meropenem
Met	Metionina
mg	Miligrama(s)
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro(s)
MLST	*Multi-Locus Sequence Typing*
mM	Milimolar
MMR	*Mismatch-repair system*
Na^+	Íons sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma(s)
nHp	frequência de mutação não aumentada
nm	Nanômetro
NM	Não-mucoide
PA	*P. aeruginosa*
PAB	*Pseudomonas* ágar base
pb	Pares de bases
PCR	*Polymerase chain reaction*
PFGE	*Pulsed-field gel electrophoresis*
pH	Potencial de hidrogênio
Phe	Fenilalanina
PIA	*Pseudomonas isolation agar*
PIV	Tris NaCl
pmol	Picomol

PMQR	*Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*
Pro	Prolina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	Resistente
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
Ser	Serina
SS	Escore de Shwachman
T	Timina
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thr	Treonina
TIC	Ticarcilina ácido-clavulânico
TOB	Tobramicina
Tyr	Tirosina
TZP	Piperacilina-tazobactam
U	Unidade
UFC	Unidade(s) formadora(s) de colônia
Val	Valina
VEF_1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
wHp	frequência de mutação fracamente aumentada

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Micrograma(s)
®	Marca Registrada
β	Beta
X	Vezes
ºC	Graus Centígrados
µL	Microlitro(s)
%	Porcentagem
g	Força centrífuga relativa
M	Molar

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Resumen iii
Lista de Figuras iv
Lista de Tabelas v
Lista de Abreviaturas e Siglas vi
Lista de Símbolos x

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Fibrose cística 1
1.2. Fibrose cística e *Pseudomonas aeruginosa* 2
1.3. Infecção crônica por *P. aeruginosa* e o fenótipo mucoide..... 4
1.4. Fenótipo bacteriano hipermutante 6
1.5. Fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* 6

2. OBJETIVOS 8
2.1. Objetivo geral 9
2.2. Objetivos específicos 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 10
Parte I 11
3.1. Pacientes e dados clínicos..... 11
3.1.1. Critério de infecção crônica 12
3.2. Isolados bacterianos 12
3.2.1. Identificação dos isolados 13
3.3. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos 13
3.4. Investigação de genes de resistência 14
3.5. Pesquisa de genes de virulência 15
3.6. Eletroforese em campo pulsado 16
3.7. Análise estatística 17
Parte II 17
3.8. Identificação dos isolados por espectrometria de masssa MALDI-TOF 18
3.9. Investigação dos fenótipos de produção de alginato 18
3.10. Análise da sequência do *operon algTmucABD* 19
3.11. Determinação da concentração inibitória mínima 19
3.12. Investigação de mutabilidade 20
3.12.1. Frequência de mutação 20
3.12.2. Sequenciamento de genes anti-mutação 20
3.13. Sequenciamento de genes do sistema *quorum sensing* 20

4. RESULTADOS 21
Parte I **22**
4.1. Pacientes e isolados bacterianos 22
4.2. Sensibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência 24
4.3. Genes relacionados com fatores de virulência 25

4.4. Similaridade genômica dos isolados 26
Parte II 26
4.5. Identificação dos isolados bacterianos 26
4.6. Distribuição em diferentes fenótipos de produção de alginato 26
4.7. Mutações no *operon algTmucABD* 29
4.8. Alterações genéticas nos genes *lasR* e *rhlR* 31
4.9. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos 32
4.10. Frequência de mutação dos isolados de *P. aeruginosa* e sequências de genes anti-mutação 34

5. DISCUSSÃO 35

6. CONCLUSÕES..... 48

7. REFERÊNCIAS 51

APÊNDICES 59

ANEXOS 71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose cística

Fibrose cística (FC) é uma doença hereditária autossômica recessiva que acomete principalmente a população de raça branca. Trata-se de uma doença com baixa taxa de sobrevida, na qual somente metade dos pacientes sobrevive até a terceira década de vida. Ela ocorre devido a mutações no gene *cftr* (do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane condutance Regulator*), que leva à codificação de proteína CFTR modificada ou até mesmo à sua ausência. A proteína CFTR é responsável pelo efluxo de cloreto (Cl^-), sódio (Na^+) e água através da membrana celular, e consequentemente, responsável pela manutenção do equilíbrio iônico e osmótico da célula. Alterações em sua atividade, por mutação levam à disfunção das glândulas de secreção exócrina, caracterizando a doença como crônica, complexa e grave, pois compromete os sistemas digestivo, respiratório e reprodutor (ANTUNES, 2009; RODRIGUES et al., 2008). Apesar das manifestações clínicas da doença serem variáveis, 80 a 95% dos pacientes sucumbem devido à insuficiência respiratória (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002).

Em condições normais de saúde, a superfície das vias aéreas é coberta por uma fina película de líquido, chamado fluído periciliar, que desempenha papel fundamental na depuração mucociliar. O fluído periciliar também está envolvido na captura e remoção de patógenos inalados sem desencadear resposta imunológica inata. Nos pulmões de pacientes com FC, este fluído é mais fino do que em condições normais e desidrata como resultado da função CFTR deficiente. O cloreto não é eliminado e para compensar esse excesso e manter o equilíbrio iônico a célula absorve sódio e água, levando à desidratação da superfície celular. Isto resulta na secreção de muco mais espesso do que em indivíduos normais e uma drástica diminuição na sua remoção, que podem facilitar colonização/infecção bacteriana crônica e também inflamação. Consequentemente, ocorre um ciclo vicioso de retenção de muco, infecção e inflamação. Os sintomas respiratórios mais comuns em pacientes com FC são devidos à deterioração progressiva da função pulmonar por infecções patogênicas crônicas, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* com fenótipo mucoide (CANTON; DEL CAMPO, 2010; RATJEN, 2009).

1.2. Fibrose cística e *Pseudomonas aeruginosa*

Os microrganismos que mais acometem as vias aéreas dos pacientes com FC são *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e bactérias do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc). Outros microrganismos também têm sido isolados destes pacientes, são os chamados

patógenos emergentes (oportunistas), mas a importância clínica destes isolados ainda está sendo investigada (LYCZAK et al., 2002). Os pacientes mais jovens (até a primeira década de vida) costumam ter infecções causadas por *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* e, ocasionalmente, por *P. aeruginosa*. Quando os pacientes atingem a adolescência, *P. aeruginosa* passam a ser mais frequentes como agentes de infecção nestes pacientes. As infecções por *P. aeruginosa* podem se tornar crônicas, principalmente devido ao fenótipo mucoide, que ocorre pela produção de cápsula polissacarídica (alginato mucoide) que protege a bactéria da fagocitose e ação de antibióticos, podendo ainda fixá-la às superfícies celulares, sobretudo em pacientes com FC (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; ZOCCOLI et al., 2009). A infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC, devido à contínua degradação do tecido pulmonar, que leva ao declínio da função pulmonar, devido em parte pela infecção e em parte pelo processo inflamatório gerado (BURMOLLE et al., 2010).

Com o intuído de eliminar *P. aeruginosa* não-mucoide e evitar (ou adiar) a transição para o fenótipo mucoide, o uso prolongado de antibióticos é inevitável. No entanto, o uso contínuo destas drogas, pode selecionar naturalmente bactérias resistentes (MARTHA et al., 2010). *P. aeruginosa* possui notável resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos, restringindo as opções de antibioticoterapia. Em adição a esta característica, mutações em genes conferindo fenótipo de resistência e aquisição horizontal de genes de resistência carreados por plasmídeos têm contribuído amplamente para a seleção de *P. aeruginosa* multirresistentes. Os principais mecanismos de resistência desta bactéria são: (i) alteração na permeabilidade da membrana externa que dificulta ou impede a entrada do antibiótico na célula, (ii) hiperexpressão de sistemas de efluxo que excretam o antibiótico do interior para o exterior da célula, (iii) alteração do sítio alvo que dificulta ou impede a ligação do antibiótico e (iv) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, como por exemplo as β-lactamases, que degradam antibióticos β-lactâmicos (HENRY; SPEERT, 2011; NORMARK; NORMARK, 2002). As carbapenemases constituem o grupo mais versátil de β-lactamases, tendo capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β-lactâmicos, com destaque para a classe dos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). A resistência às quinolonas em *P. aeruginosa* é normalmente causada por mutações cromossômicas e por hiperexpressão de sistemas de efluxo. Atualmente, genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos têm sido crescentemente reportados em enterobactérias. A pesquisa desses genes em *Pseudomonas* tem sido pouco realizada e/ou relatada, merecendo maior

atenção, pois, a ampla utilização do antibiótico ciprofloxacina (fluoroquinolona) no tratamento de infecções por esta bactéria contribuiria para a seleção desses determinantes de resistência (COBAN et al., 2011).

1.3. Infecção crônica por *P. aeruginosa* e o fenótipo mucoide

O início da infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* em pacientes com FC é geralmente precedido por um período de recorrente colonização intermitente das vias aéreas, na maioria das vezes por linhagens ambientais (FOLKESSON et al., 2012). Durante a infecção pulmonar crônica, *P. aeruginosa* é capaz de persistir e sobreviver por décadas sob pressão seletiva imposta por resposta inflamatória oscilante, exposição contínua à antibióticos e disponibilidade variável de nutrientes. Isto é devido principalmente a um modo de crescimento em biofilme com contribuições de fatores de virulência, tais como alginato, e evolução adaptativa mediada por variação genética. As condições de estresse encontradas por *P. aeruginosa* levam a mutações nos genes reguladores globais, como *mucA* e *lasR*, e essas linhagens acabam sendo selecionadas durante a fase de adaptação (BJARNSHOLT; JENSEN; et al., 2010; FOLKESSON et al., 2012; YANG et al., 2011).

Tem sido demonstrado que estas condições de estresse, que ocorrem nos pulmões de fibrocísticos, podem afetar a produção de alginato. Uma vez que a bactéria se torna mucoide é muito difícil erradicar a infecção, devido ao modo de crescimento em biofilme (BJARNSHOLT; TOLKER-NIELSEN; et al., 2010; BURMOLLE et al., 2010). Clinicamente, a presença do fenótipo mucoide está associada a um pior prognóstico, devido à deterioração progressiva da função pulmonar (CANTON; DEL CAMPO, 2010). A principal característica do fenótipo mucoide é a produção do exopolissacarídeo alginato, uma camada espessa de mucopolissacarídeo. Isolados mucoides e não-mucoides de pacientes com FC têm mostrado grande heterogeneidade fenotípica, incluindo morfologia da colônia, resistência aos antibióticos e capacidade de formação de biofilme (CIOFU et al., 2008).

Para melhor compreensão da formação de biofilme é importante ressaltar que o *operon* de biossíntese do alginato está sob o controle do promotor *algD*, o qual é controlado por genes de vários *loci* (Figura 1). Uma proteína importante na regulação *algD* é AlgT (também conhecida como AlgU ou σ^{22}), o fator sigma alternativo, que induz a expressão *algD* e aumenta a expressão de proteínas reguladoras que aumentam a transcrição de *algD* (WOOD; OHMAN, 2015). O gene *algT* pertence a um *operon* com quatro outros genes, *mucABCD*. Mutações em *mucA*, *mucB* ou *mucD* podem levar à conversão para o fenótipo mucoide,

sugerindo que os produtos destes genes têm efeito regulador negativo sobre *algT* (CIOFU et al., 2008; SAUTTER et al., 2012). Os isolados com mutações em *mucA* apresentam fenótipo altamente mucoide, enquanto mutantes em *mucB* ou *mucD* são levemente mucoides e apresentam produção de alginato durante crescimento em meios específicos, com indutores de alginato (BOUCHER et al., 1996; MATHEE; MCPHERSON; OHMAN, 1997).

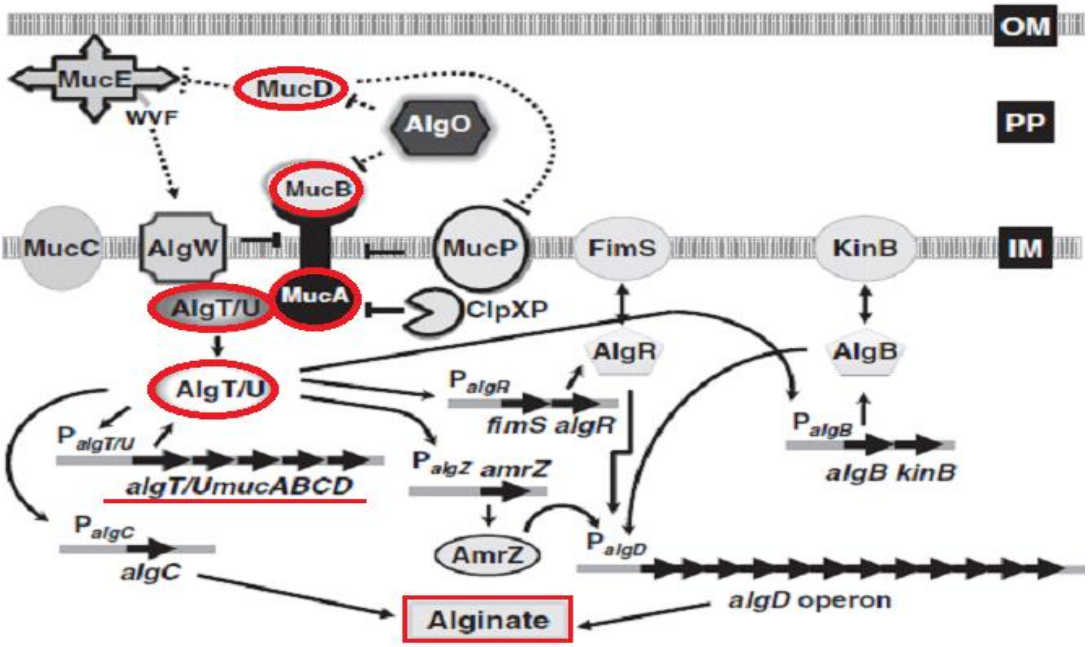

Figura 1. Ilustração da complexa regulação de produção de alginato. Resumidamente: A produção de alginato é controlada pelo *operon algD*. A expressão de *algD* é regulada por AlgR, AlgB, AmrZ e fator sigma AlgT/U. A atividade de AlgT é inibida por MucB, MucD e pelo fator antissigma MucA. A atividade de MucA é regulada por MucD (entre outras proteases). Em uma linhagem com mutação em *mucA*, como PDO300 (PAO*mucA*22), a inibição de AlgT por MucA, MucB e MucD é removida. AlgT livre ativa todos os genes no *regulon alg*: *operons fimS-algR*, *algB-kinB*, *amrZ*/*algZ* e *algD*, inclusive a si mesmo. Fonte: SAUTTER et al., 2012.

Em adição à produção de alginato, AlgT regula grande número de resposta ao estresse e genes associados à virulência e, também, está envolvida na regulação da motilidade em *P. aeruginosa* (FOLKESSON et al., 2012). Portanto, quando AlgT não é controlada, ou seja, está em excesso, representa vantagem seletiva à bactéria e aparenta ser vital para que esta seja capaz de persistir em pacientes com FC com infecção crônica (SCHURR et al., 1994). No entanto, é comum observar *P. aeruginosa* mucoide em co-infecções com revertentes, isolados não-mucoides que contêm mutação em *mucA*. Os revertentes podem ocorrer por mutações secundárias em *algT* ou em outros genes reguladores do alginato (CIOFU et al., 2008).

1.4. Fenótipo bacteriano hipermutante

Considera-se que a hipermutabilidade desempenha papel importante na evolução adaptativa das bactérias, em particular em doenças infecciosas. O acúmulo de mutações leva a alterações fenotípicas em isolados de pacientes com FC, como aumento da produção de alginato e ocorrência do fenótipo mucoide, perda de motilidade, perda do sistema *quorum sensing*, redução da virulência, capacidade reduzida de formação de biofilme *in vitro* e aumento da resistência aos antibióticos (CIOFU et al., 2010; CIOFU et al., 2005).

Um dos mecanismos mais importantes de reparo do DNA em bactérias é o sistema MMR (do inglês, *mismatch-repair system*), que inclui os genes *mutS* e *mutL*. A inativação deste sistema conduz ao aumento da taxa de mutação, devido à sua incapacidade para reparar erros no pareamento de bases nucleotídicas de forma eficiente. A remoção do sistema MMR aumenta a frequência de transferência horizontal de genes, mecanismo importante de aquisição de resistência aos antibióticos em bactérias (LUTZ, L. et al., 2013; OLIVER, 2000). Estudos têm mostrado que a prevalência de *P. aeruginosa* hipermutantes aumenta com a persistência da infecção crônica devido à seleção positiva de mutantes nos pulmões destes pacientes (CIOFU et al., 2005; MENA et al., 2008).

A inativação do sistema MMR também favorece o aparecimento *in vitro* de variantes fenotípicas consideradas marcadores típicos de infecção nos pulmões de pacientes com FC, como o fenótipo mucoide, devido a mutações no gene *mucA* e perda de sistema *quorum sensing*, devido a mutações nos genes *las* e *rhl* (BJARNSHOLT; JENSEN; et al., 2010; CIOFU et al., 2010).

1.5. Fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa pode sobreviver nos pulmões de pacientes fibrocísticos por anos e sofrer diversas adaptações para este ambiente, incluindo características de virulência citadas abaixo e a conversão para fenótipo mucoide (WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

Fatores de superfície bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS), pili e flagelo, assim como processos ativos como *quorum sensing*, formação de biofilme e secreção de toxinas (exotoxinas e citotoxinas) são determinantes de virulência que causam impacto nas infecções. A interação desses determinantes com o sistema imune do hospedeiro controla a sinalização de moléculas, modula a resposta do hospedeiro, o que impacta na gravidade da doença devido à influência na taxa de depuração bacteriana e por causar dano colateral aos tecidos do hospedeiro. Outros fatores de virulência também são secretados, como piocianinas

(pigmentos), proteases (elastases, por exemplo) e fosfolipases não específicas (VEESENMEYER et al., 2009).

Os fatores de virulência são requeridos nas infecções agudas, no entanto, durante as infecções crônicas eles podem sofrer mutações ou regulação. A explicação para este fato é, presumivelmente, a evasão da resposta imune do hospedeiro, pois este reconhece diversos fatores de virulência e tenta eliminar as células que os produzem, selecionando, portanto, as células que possuem mutações nos fatores ou reguladores de virulência, ou ainda, que simplesmente regulam a expressão destes fatores (SMITH et al., 2006).

Presença de genes que determinam fatores de virulência, presença de mutações que afetam a biossíntese, expressão e/ou regulação gênica e tipagem pela análise de macrorrestrição do DNA genômico, fornecem dados que englobam a epidemiologia molecular bacteriana e contribuem grandemente para a qualidade da análise da variabilidade genética dos isolados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar características genéticas de *P. aeruginosa* que levam à sua adaptação às vias aéreas de pacientes com FC, com infecção crônica, atendidos no Centro de Referência em FC do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e relacionar com resistência a antibióticos, dados clínicos e de tipagem molecular.

2.2. Objetivos específicos

- Confrontar a identificação de *P. aeruginosa* por PCR e MALDI-TOF;
- Investigar a similaridade genômica dos isolados para avaliação de cronicidade e presença de clones relacionados ou predominantes;
- Avaliar a ocorrência de pacientes com colonização crônica por *P. aeruginosa*;
- Avaliar fenotípica e molecularmente a resistência aos antibióticos carbapenêmicos e quinolonas em *P. aeruginosa*;
- Investigar a presença de genes de virulência e do sistema *quorum sensing*;
- Avaliar a associação entre mutações e conversão para fenótipo mucoide;
- Caracterizar linhagens bacterianas hipermutantes;
- Correlacionar os resultados obtidos com os dados clínicos dos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado, em 2011, pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP sob o nº 210 (Anexo 1) com concordância do CEP do HCFMRP-USP (Anexo 2). Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 3) foram obtidos por escrito dos pacientes ou de seus responsáveis.

Parte I

A primeira fase deste estudo foi desenvolvida no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) sob orientação da professora Ana Lúcia da Costa Darini. Nesta parte do estudo foram analisados 92 pacientes com FC atendidos no HCFMRP-USP, no período de julho de 2011 a outubro de 2012.

3.1. Pacientes e dados clínicos

Todos os pacientes foram diagnosticados com FC a partir da realização de duas dosagens alteradas de cloro no suor, obtidas pelo método da iontoforese por pilocarpina (GIBSON; COOKE, 1959), e apresentavam quadro clínico de FC, com pelo menos uma alteração clínica característica. Todos os pacientes estavam em acompanhamento clínico.

O índice de massa corpórea (IMC) e o escore de Shwachman (SS) foram obtidos a cada consulta, mas somente os valores obtidos próximos ao isolamento bacteriano foram incluídos no estudo (SHWACHMAN; LEUBNER; CATZEL, 1955). O SS é o sistema de pontuação clínico-radiológico mais utilizado em FC para avaliação da gravidade da doença; esse índice quantifica as modificações radiológicas, de bem-estar e do peso e permite compará-las em avaliações consecutivas (SANTOS et al., 2004; STOLLAR et al., 2011).

Foram consideradas exacerbações quando o paciente apresentava pelo menos um dos seguintes sinais: aumento da tosse, da produção de escarro ou modificação de suas características, febre não relacionada a outro fato clínico, perda de peso não associada à má-absorção, alteração da ausculta respiratória ou queda acentuada da função pulmonar (BILTON et al., 2011).

A função pulmonar foi medida em espirômetro sob selo d'água nos pacientes acima de 6 anos de idade, pelo menos uma vez ao ano, de acordo com as normas internacionais da *American Thoracic Society* (MILLER et al., 2005). Foram consideradas as medidas de

capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), em porcentagens do previsto, analisadas de acordo com Sherrill e colaboradores (1992).

3.1.1. Critério de infecção crônica

Os pacientes foram considerados com infecção crônica por *P. aeruginosa* quando atendiam a algum destes critérios: i) isolado com fenótipo mucoide; ii) pelo menos três culturas positivas para *P. aeruginosa*, com espaço de pelo menos um mês entre elas em um período de 6 meses (CANTON et al., 2005), com presença de isolados persistentes, ou seja, isolados geneticamente relacionados (FERNANDEZ-OLMOS et al., 2013); iii) isolamento contínuo desta bactéria em período de 6 meses anterior ao período do estudo (LEE et al., 2004).

3.2. Isolados bacterianos

Foram estudadas *P. aeruginosa* isoladas de escarros provenientes de pacientes com FC. Ainda no hospital, as amostras de escarro foram semeadas diretamente em placas contendo meio de cultura não seletivo ágar Müller-Hinton (Oxoid) acrescido de 5% de sangue de carneiro (ágar sangue - AS) e meios de cultura seletivos, ágar MacConkey (MC - Oxoid), *Pseudomonas* Agar Base (PAB - Oxoid) e *Burkholderia cepacia* Selective Agar (BCSA - Oxoid)[1]. A semeadura foi realizada pela técnica de esgotamento por estrias e as placas foram incubadas no LEBEM em aerobiose a 37ºC, por período de 24 a 72 horas. Foram considerados como "cultura negativa" placas de meios de cultura sem crescimento de microrganismos após 5 dias de incubação.

Foram estudados todos os morfotipos coloniais e todos foram avaliados quanto às características macroscópicas das colônias puras isoladas e às características microscópicas pela coloração de Gram. Os isolados também foram identificados por testes bioquímicos convencionais, como produção da enzima oxidase e capacidade de fermentação/oxidação de glicose (HENRY; SPEERT, 2011). Após esta identificação fenotípica inicial, os isolados considerados *P. aeruginosa* foram semeados em ágar Müller-Hinton e cultivados por 18 a 24 horas a 37ºC, sendo, então, transferidos para caldo BHI com glicerol a 15% e mantidos a -80ºC no LEBEM da FCFRP-USP.

[1] Este meio de cultura é recomendado para bactérias do complexo *B. cepacia*, objetivo de outro projeto do mesmo laboratório.

3.2.1. Identificação dos isolados

No LEBEM, com o objetivo de confirmar a identificação da espécie *P. aeruginosa* foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para sequência do DNA ribossômico (rDNA) 16S, de acordo com Spilker e colaboradores (2004).

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o método de Bolano (BOLANO et al., 2001) para uso do DNA na identificação da espécie de *P. aeruginosa* e nas pesquisas de genes de resistência e virulência (itens 3.4 e 3.5).

A quantificação e avaliação da pureza do DNA foram analisadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta com comprimentos de onda de 260nm e 280nm utilizando o aparelho Nanodrop (Thermo Scientific), sendo a concentração do DNA fornecida em ng/µL. O DNA foi diluído em água W-3500 (Sigma) à concentração de 30ng/µL e armazenado a -20ºC.

A PCR foi feita em volume final de 50µL: foi utilizada água duplamente processada "Qualidade PCR" q.s.p., solução tamponante de reação para concentração final 1x (Tris 20mM e KCl 50mM), 2mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,625U de *Taq* DNA polimerase, 0,2mM de cada um dos 4 nucleotídeos (dNTP), 25pmol dos *primers* para amplificação do gene alvo e 2µL de DNA. O termociclador utilizado foi Mastercycler Gardient (Eppendorf).

3.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram selecionados para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos utilizando o método de disco difusão os isolados de um mesmo paciente com colonização crônica que foram obtidos em intervalo de pelo menos 2 meses e isolados de uma mesma coleta que apresentaram características fenotípicas diferentes, como por exemplo, fenótipo mucoide (M) e não-mucoide (NM), totalizando 75 isolados. Para análise estatística foi considerado apenas um isolado (o mais resistente) de *P. aeruginosa* por paciente. O teste foi realizado como descrito e recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2013).

A leitura do antibiograma foi realizada após 24 horas de incubação a 37ºC. Os halos de inibição foram medidos e os resultados avaliados de acordo com CLSI (2013). Os discos de antimicrobianos (Oxoid) testados foram: ticarcilina-ácido clavulânico (75/10µg), piperacilina-tazobactam (100/10µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), aztreonam (30µg), gentamicina (10µg), amicacina (30µg), tobramicina (10µg), ciprofloxacina (5µg) e levofloxacina (5µg). Isolados não sensíveis a pelo menos um

antibiótico em três ou mais classes antimicrobianas foram considerados multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug-resistant*) (MAGIORAKOS et al., 2012). O controle de qualidade para o teste de sensibilidade foi feito com *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.4. Investigação de genes de resistência

Foram pesquisados, por PCR, genes codificadores de carbapenemases (bla_{KPC}, bla_{SPM}, bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{GIM}, bla_{SIM} e bla_{NDM}.) e genes responsáveis pela resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR, do inglês *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*: *qnrA, qnrB, qnrS, aac(6_)-Ib-cr* e *qepA*) nos isolados não-sensíveis aos carbapenêmicos imipenem e meropenem e às quinolonas ciprofloxacina e levofloxacina, pelo método de disco-difusão. Foram utilizados pares de *primers* específicos, conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados para pesquisa de genes de resistência aos carbapenêmicos e quinolonas

Gene Amplificado	Par de *primer*	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto da PCR (pb)	Temperatura de *annealing* (ºC)	Referências
bla_{IMP}	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATCT	188	52	(ELLINGTON et al., 2007)
bla_{VIM}	VIM-F VIM-R	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390	52	(ELLINGTON et al., 2007)
bla_{SPM}	SPM f SPM r	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	52	(ELLINGTON et al., 2007)
bla_{SIM}	SIM f SIM r	TACAAGGGATTCGGCATCG TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570	52	(ELLINGTON et al., 2007)
bla_{GIM}	GIM f GIM r	TCGACACACCTTGGTCTG AACTTCCAACTTTGCCATGC	477	52	(ELLINGTON et al., 2007)
bla_{KPC}	KPC-f KPC-r	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG GTTGACGCCCAATCCCTCGA	860	61	(CLIMACO, 2011)
bla_{NDM}	NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621	52	(POIREL et al., 2011)
qnrA	QNRA-F QNRA-R	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	54	(CATTOIR et al., 2007)
qnrB	QNRB-F QNRB-R	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA	264	54	(CATTOIR et al., 2007)
qnrS	QNRS-F QNRs-R	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	54	(CATTOIR et al., 2007)
aac(6_)-Ib-cr	aac(6_)-Ib_F aac(6_)-Ib_R	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	55	(PARK et al., 2006)
qepA	QEPA-F QEPA-R	GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG CTT CCT GCC CGA GTA TCG	300	61	(BAUDRY et al., 2009)

3.5. Pesquisa de genes de virulência

A pesquisa dos genes de virulência de *P. aeruginosa* foi realizada somente para um isolado de cada paciente colonizado crônico (isolado mais resistente, mesmos do item 3.3.1). A investigação foi feita por PCR utilizando pares de *primers*, específicos para cada gene, de acordo com a Tabela 2. As condições para reação de amplificação foram descritas acima (item 3.2.1).

Tabela 2. Pares de *primers* utilizados na detecção de genes de virulência

Gene Amplificado	Par de *primer*	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto da PCR (pb)	Temperatura de *annealing* (ºC)	Referências
Alginato	algDF algDR	CGTCTGCCGCGAGATCGGCT GACCTCGACGGTCTTGCGGA	313	55	(WOLSKA; SZWEDA, 2009)
Citotoxina	exoYF exoYR	TATCGACGGTCATCGTCAGGT TTGATGCACTCGACCAGCAAG	1,035	61,8	(FINNAN et al., 2004)
Citotoxina	exoTF exoTR	CAATCATCTCAGCAGAACCC TGTCGTAGAGGATCTCCTG	1,159	54	(FINNAN et al., 2004)
Citotoxina	exoSF exoSR	ATCCTCAGGCGTACATCC ACGACGGCTATCTCTCCAC	328	53	(FINNAN et al., 2004)
Quorum sensing	lasIF lasIR	ATGATCGTACAAATTGGTCGGC GTCATGAAACCGCCAGTCG	605	50	(SCHABER, 2004)
Quorum sensing	lasRF lasRR	ATGGCCTTGGTTGACGGTT GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA	725	50	(SCHABER, 2004)
Quorum sensing	rhlIF rhlIR	CTTGGTCATGATCGAATTGCTC ACGGCTGACGACCTCACAC	625	50	(SCHABER, 2004)
Quorum sensing	rhlRF rhlRR	CAATGAGGAATGACGGAGGC GCTTCAGATGAGGCCCAGC	730	50	(SCHABER, 2004)
Fenazina	phzHF phzHR	GGGTTGGGTGGATTACAC CTCACCTGGGTGTTGAAG	1,752	51	(FINNAN et al., 2004)
Fenazina	phzMF phzMR	ATGGAGAGCGGGATCGACAG ATGCGGGTTTCCATCGGCAG	875	54	(FINNAN et al., 2004)
Fenazina	phzSF phzSR	TCGCCATGACCGATACGCTC ACAACCTGAGCCAGCCTTCC	1,752	63	(FINNAN et al., 2004)
Elastase	lasBF lasBR	ACAGGTAGAACGCACGGTTG GATCGACGTGTCCAAACTCC	1,220	57	(FINNAN et al., 2004)
Protease	aprF aprR	TGTCCAGCAATTCTCTTGC CGTTTTCCACGGTGACC	1,017	51	(FINNAN et al., 2004)
Fímbria	pilAF pilAR	ACAGCATCCAACTGAGCG TTGACTTCCTCCAGGCTG	1,675	59	(FINNAN et al., 2004)
Fímbria	pilBF pilBR	TCGAACTGATGATCGTGG CTTTCGGAGTGAACATCG	408	54	(FINNAN et al., 2004)
L-ornitina hidrolase (pioverdina)	pvdAF pvdAR	GACTCAGGCAACTGCAAC TTCAGGTGCTGGTACAGG	1,281	59	(FINNAN et al., 2004)
Fosfolipase C hemolítica	plcHF plcHR	GCACGTGGTCATCCTGATGC TCCGTAGGCGTCGACGTAC	608	55	(WOLSKA; SZWEDA, 2009)
Fosfolipase C não-hemolítica	plcNF plcNR	TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG TCGCTGTCGAGCAGGTCGAAC	481	55	(WOLSKA; SZWEDA, 2009)

3.6. Eletroforese em campo pulsado

Com a finalidade de verificar a similaridade genômica das bactérias estudadas foi analisado o perfil de macrorrestrição do DNA genômico dos isolados de *P. aeruginosa* gerado com a enzima *SpeI*, após eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês *pulsed-field gel electrophoresis*). Foram selecionados isolados de um mesmo paciente que tiveram intervalo de coleta de pelo menos 2 meses e isolados de uma mesma coleta que apresentaram características fenotípicas diferentes (mucoide e não-mucoide, com ou sem produção de pigmento, dentre outras).

A PFGE foi realizada segundo Gautom (1997) usando o aparelho CHEF-DRIII (BioRad). Uma colônia de cada isolado foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubada a 37º C durante 24 horas. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo *eppendorf* e centrifugada por 2 minutos a 15.000 *g*. As células bacterianas foram lavadas com 500 µL da solução PIV (10mM Tris, pH 8,0, 1,0M NaCl), centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 200 µL de solução de suspensão, sendo 150 µL transferidos para um novo tubo, que foi colocado em banho de água a 45ºC, durante 5 a 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de agarose (2% Agarose Ultra Pure, Gbco BRL) para a confecção dos blocos de agarose.

Os blocos de agarose foram colocados em tubos contendo 1 mL de solução de lise EC (6 mM Tris, pH 8,0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8,0; 0,2% deoxycolato de sódio, 0,5%, 0,5% N-laurylsarcosine), acrescentando-se lisozima e RNase à concentração final de 1 mg/mL e 20 µg/mL, respectivamente. Os blocos foram incubados durante 4 a 5 horas a 37ºC. Em seguida a solução de lise foi retirada e foi adicionado 1 mL de solução tamponante ES (EDTA, pH9,0; sarcosil 1%) acrescida de 1 mg/mL de proteinase K e os tubos foram incubados a 50ºC durante 18 a 24 horas. Os blocos foram lavados 5 vezes com 13 mL da solução tamponante TE 1X (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH8,0) com intervalo de 30 minutos para cada lavagem. Os blocos foram mantidos em solução tamponante TE, a 4ºC, até o momento do uso.

Para a fragmentação do DNA, cada bloco foi colocado em 100 µL de solução tamponante 1X concentrada da enzima *Spe*I e mantida a 37ºC por 30 minutos. Essa solução foi desprezada e uma nova solução, preparada no momento do uso, acrescida de 27 U da enzima de restrição *Spe*I (Fermentas). A reação foi incubada em banho de água a 37ºC, por 18 a 20 horas.

Para a corrida eletroforética, foram preparados 150 mL de gel de agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Gibco BRL) em TBE 0,5X (0,89 M Tris; 0,89 M ácido bórico; 0,25 M EDTA; pH 8,0). A eletroforese foi realizada em TBE 0,5X à temperatura de 14º C, voltagem de 6 V por centímetro e pulsos de 5-40 por 24 horas no aparelho CHEF-DRIII (BioRad).

Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio a 1 μg/mL, por 30 minutos, e descorado em água por mais 30 minutos, sendo, em seguida, observado e fotografado utilizando o sistema AlphaImager® (Alpha Innotech).

O perfil eletroforético de macrorrestrição foi analisado visualmente e as interpretações realizadas de acordo com critérios sugeridos por Tenover e colaboradores (1995).

3.7. Análise estatística

Foi utilizado teste "t de Student" com correção de Welch para comparação entre grupos de pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* que apresentaram ou não isolamento de *S. aureus* e pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* que apresentaram outros BGN-NF (conforme item 3.2.), para as medidas de CVF%, VEF_1%, número de exacerbações, IMC e SS. Foram estabelecidos intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando programa GraphPad Prism versão 5.

Parte II

Na segunda fase deste estudo foram incluídos novos isolados provenientes de escarro de pacientes com FC atendidos no HCFMRP-USP, até abril 2014, totalizando 98 pacientes. Os isolados foram enviados ao LEBEM pelo Laboratório de Mibrobiologia do HCFMRP-USP já identificados pelo sistema Vitek® II versão 5.04 como *P. aeruginosa*. No LEBEM foram feitas confirmação da pureza e confirmação da espécie por PCR (de acordo com item 3.2.1). A análise do perfil de macrorrestrição do DNA genômico foi realizada de acordo com item 3.6.

Nesta segunda parte, para alcançar os objetivos propostos, uma nova seleção dos isolados foi realizada, com isolados mucoides e não-mucoides de pacientes com infecção pulmonar crônica.

Esta fase do estudo foi desenvolvida na Universidade de Copenhague, Dinamarca, sob a supervisão do professor Niels Høiby.

3.8. Identificação dos isolados por espectrometria de massa MALDI-TOF

A espectrometria de massa por MALDI-TOF (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) também foi utilizada para confirmar a identificação de *P. aeruginosa*.

Uma única colônia pura de cada isolado foi depositada diretamente sobre a placa de aço inoxidável (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany), e 1 µL da solução matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico diluída em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético 2,5%) foi adicionado às amostras, sendo a placa deixada à temperatura ambiente para secagem. Foi utilizado espectrômetro de massa MALDI-TOF LT Microflex Bruker equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa computacional FlexControl (Bruker Daltonics). Espectros de massa foram coletados na faixa de massas de 2.000-20.000m/z. Os espectros obtidos foram analisados pelo programa MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). O algoritmo utilizado pelo MALDI Biotyper confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras referência contidas em um banco de dados de referência. O procedimento de análise considera as massas e as intensidades relativas dos espectros desconhecidos, liberando a identificação dos microrganismos com zonas e escores (LARTIGUE et al., 2009):

1) 3.000 – 2.300 – Gênero e espécie confiável (Zona verde)
2) 2.299 – 2.000 – Gênero confiável e espécie provável (Zona verde)
3) 1.999 – 1.700 – Gênero provável (Zona amarela)
4) <1.699 – Não confiável (Zona vermelha)

3.9. Investigação dos fenótipos de produção de alginato

O fenótipo de produção de alginato foi realizado somente para os isolados de pacientes com FC com infecção pulmonar crônica. Primeiramente o fenótipo foi determinado em placas de ágar Chocolate (Statens Serum Institute) ou ágar Blue (meio seletivo Conrad Drigalski modificado para isolamento de BGN, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark). Posteriormente, a produção de alginato foi avaliada em placas de LB (Luria Bertani, BD Difco) e PIA (*Pseudomonas isolation agar*, BD Difco), que contém triclosan, um forte indutor de alginato. Com base nos fenótipos apresentados em PIA e ágar LB, os isolados foram classificados como tipo I: mucoide em ambos os meios, tipo II: mucoide em PIA, mas não-mucoide em LB, tipo III: não-mucoide em ambos, e tipo IV: produção fraca mas

detectável de alginato em ambas as placas após ≥ 4 dias de incubação (CIOFU et al., 2008; SCHURR et al., 1994).

3.10. Análise da sequência do *operon algTmucABD*

A extração de DNA foi realizada utilizando kit comercial (Gentra Puregene, Qiagen), de acordo com o fabricante. Para amplificação por PCR e sequenciamento dos genes *algT*, *mucA*, *mucB* e *mucD*, foram utilizados *primers* previamente descritos (CIOFU et al., 2008). A amplificação por PCR do *operon algTmucABD* foi realizada utilizando DYNAzyme EXT DNA polimerase (Thermo Scientific). Após purificação (Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega), os produtos de PCR foram sequenciados (sequenciador automático de DNA Macrogen ABI3700) e os resultados foram comparados com a sequência da linhagem padrão *P. aeruginosa* PAO1 (www.pseudomonas.com) utilizando o programa ChromasPro versão 1.7.6 (Technelysium Pty Ltda), a fim de determinar a ocorrência de variações na sequência do *operon*. Substituições sinônimas (mutações silenciosas) não foram apresentadas neste estudo.

Uma vez que mutações em *mucB* e *mucD* levam à um fenótipo levemente mucoide, alterações na sequência desses genes foram apenas investigadas em isolados previamente classificados como produção tipo IV de alginato (conforme item 3.9).

3.11. Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para os isolados de *P. aeruginosa* foi realizada utilizando fitas *MIC Test Strip* (Liofilchem), seguindo orientação do fabricante, para os seguintes antimicrobianos: piperacilina-tazobactam, ceftazidima, imipenem, meropenem, aztreonam, tobramicina, amicacina, ciprofloxacina e colistin. Os pontos de corte do EUCAST 2015 (www.eucast.org) foram utilizados para a interpretação dos valores da CIM.

3.12. Investigação de mutabilidade

3.12.1. Frequência de mutação

A frequência de mutação foi determinada após exposição à rifampicina. Os isolados bacterianos foram cultivados por aproximadamente 18 horas em 20 mL de caldo LB e posteriormente foram centrifugados a 10.000*g* por 10 minutos. O precipitado foi suspenso em 1 mL de caldo LB e foram realizadas diluições seriadas. Um volume de 100 μL das diluições 0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} foi plaqueado em ágar LB contendo 300 μg/mL de rifampicina. O número de UFC (unidades formadoras de colônia) foram determinadas após incubação a 37ºC por 48 horas. O número de mutantes foi calculado para cada amostra da seguinte forma: número de colônias com crescimento em LB acrescido de rifampicina dividido pelo número de colônias em LB sem o antimicrobiano e considerando o fator dilucional (BJARNSHOLT; JENSEN; et al., 2010; CIOFU et al., 2010).

Os isolados foram classificados de acordo com a frequência de mutação (*f*) em: fortemente aumentada (Hp) quando *f* foi 20 vezes a frequência de mutação de *P. aeruginosa* PAO1, ou seja, $\geq 2 \times 10^{-7}$; fracamente aumentada (wHp) quando *f* foi $< 2 \times 10^{-7}$ e $\geq 2 \times 10^{-8}$ e não-aumentada (nHp) quando *f* foi $< 2 \times 10^{-8}$, como proposto por Ciofu e colaboradores (2010). Uma amostra foi considerada hipermutável quando a frequência de mutação foi fortemente aumentada (Hp).

3.12.2. Sequenciamento de genes anti-mutação

As sequências dos genes anti-mutação *mutS* e *mutL* foram investigadas nos isolados classificados como Hp (de acordo com item anterior). Os *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento foram os mesmo descritos por Ciofu e colaboradores (2010).

3.13. Sequenciamento de genes do sistema *quorum sensing*

Os isolados selecionados para esta fase tiveram os genes relacionados com o sistema *quorum sensing* (*lasR* e *rhlR*) investigados por PCR, e os produtos da amplificação foram purificados e sequenciados. Os conjuntos de *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes foram os mesmos descritos anteriormente (CIOFU et al., 2010; YANG et al., 2011).

4. RESULTADOS

Parte I

4.1. Pacientes e isolados bacterianos

Na primeira fase do estudo foram atendidos no HCFMRP-USP 92 pacientes com FC. Destes, 71 tiveram mais do que uma amostra coletada e 10 pacientes tiveram culturas negativas. Dos pacientes estudados, 52 apresentavam pelo menos uma cultura com crescimento de *P. aeruginosa*, entre os quais 31 (34% de pacientes com FC) foram considerados cronicamente infectados por esta bactéria.

A idade média dos pacientes com infecção crônica foi de 14,7 anos e 58% (18/31) eram homens. O valor médio da CVF, em % do previsto, foi de 72 (30-107) e de VEF_1% foi de 56 (27-103), que é baixa, mas há pacientes com valores extremamente preocupantes, como 27%. Em média, 2 exacerbações por ano foram observadas. O escore de Shwachman apresentou níveis baixos, com uma média de 65,6, valores mínimo e máximo de 40 e 90, o IMC foi muito perto dos valores normais, com uma média de 19, mínimo de 14,2 e máximo de 29.

Dentre os pacientes crônicos, 18 (58%) apresentaram *P. aeruginosa* mucoide, entretanto 50% dos isolados com este fenótipo foi encontrado em pacientes jovens, com menos de 18 anos (Tabela 3). De 75 isolados, 29 (38,7%) eram mucoides e 46 (61,3%) não-mucoides. Em geral, os pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* apresentaram isolamento concomitante de outras bactérias, 74,2% (23/31, Tabela 4).

Em relação aos dois grupos, de acordo com isolamento de PA isoladamente ou em associação com *S. aureus* e PA com BGN-NF, a função pulmonar foi menor ($p \leq 0,05$) nos pacientes que apresentaram isolamento concomitante de BGN-NF, como *Achromobacter* sp. e *Burkholderia* spp. No entanto, para os outros parâmetros clínicos não foi observada diferença significativa.

Tabela 3. Distribuição por faixa etária dos pacientes e isolamento de *P. aeruginosa* em amostras de escarro

Pacientes				***P. aeruginosa* (PA)**
Idade (anos)	**Número Investigado**	**Cultura positiva para PA (%)**	**Colonizados crônicos por PA (%)**	**Mucoide/Não-mucoide (%)[1]**
0-5	33	15 (45)	5 (15)	1/4 (20/80)
6-10	24	13 (54)	7 (29)	4/3 (57/43)
11-17	19	14 (74)	9 (47)	4/5 (44/56)
≥18	16	10 (62)	10 (62)	9/1 (90/10)
Total	**92**	**52 (57)**	**31 (34)**	**18/13 (58/42)**

[1] Quando o paciente apresentou isolados com fenótipo mucoide e não-mucoide, somente o isolado mucoide foi considerado devido à sua importância

Tabela 4. Dados clínicos de 31 pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* e dados bacteriológicos e epidemiológicos dos isolados de *P. aeruginosa*

Dados clínicos de pacientes crônicos							Dados bacteriológicos		
Paciente	**Idade/ Gênero[1]**	**Exac/ ano[2]**	**CVF%[3]**	**VEF_1%[4]**	**SS[5]**	**IMC[6]**	***P. aeruginosa***		**Colonização crônica por PA e Isolamento de outras bactérias[9]**
							Pulsotipo[7]	**Fenótipo[8]**	
FC-92	4/M	1	-	-	80	15,6	V	NM	PA
FC-40	9/F	2	81	52	65	17	L/M	M, NM	PA
FC-44	12/M	1	99	103	75	20	N	NM	PA
FC-47	13/F	1	65	49	60	20	O	M, NM	PA
FC-114	16/M	0	96	100	70	22,2	Y	M	PA
FC-1	18/F	2	50	29	60	19,2	A/A_1	M, NM	PA
FC-22	20/F	2	71	61	55	19,4	"d"	M	PA
FC-3	39/M	4	65	37	40	23	C	M, NM	PA
FC-79	1/M	2	-	-	80	16,3	A/A_2	M, NM	PA+ *S. aureus*
FC-28	5/M	1	-	-	90	14,6	E_1	NM	PA + *S. aureus*
FC-65	9/M	4	67	32	60	16,4	B	NM	PA+ *S. aureus*
FC-73	9/M	1	93	83	70	22,2	α	NM	PA + *S. aureus*
FC-104	9/F	0	90	79	90	16,7	X	M, NM	PA+ *S. aureus*
FC-2	10/M	4	102	99	65	15,8	B	M	PA + *S. aureus*
FC-9	12/F	2	102	89	75	23,7	D/E	NM	PA+ *S. aureus*
FC-58	12/F	4	30	27	40	14,2	"d"	NM	PA + *S. aureus*
FC-45	20/M	2	55	40	45	18,5	β	M, NM	PA+ *S. aureus*
FC-62	25/M	2	80	51	70	29	P	M, NM	PA + *S. aureus*
FC-64	31/F	2	107	97	70	27	Q	M, NM	PA+ *S. aureus*
FC-27	0,6/M	1	-	-	95	17,7	H/H_1	NM	PA + *P. fluorescens*
FC-71	5/M	1	-	-	70	16,7	R	NM	PA + CBc
FC-38	6/F	5	40	25	40	15,4	K	NM	PA + *S. aureus* + CBc + *A. denitrificans*
FC-26	9/F	4	57	41	50	19	$H/I/J/I_1$	M, NM	PA + *S. aureus* + *A. xylosoxidans*
FC-12	12/M	1	63	58	75	18,3	F	M	PA + *S. aureus* + CBc
FC-33	13/F	1	85	85	80	21	γ	NM	PA + CBc
FC-78	17/F	2	49	32	60	17,7	S	NM	PA + *A. xylosoxidans* + *S. maltophilia*
FC-116	17/M	0	36	23	55	16	Z	M	PA + CBc
FC-88	20/M	2	90	59	65	22	U	NM	PA + *S. aureus* + CBc
FC-84	23/M	1	65	29	75	18	T	M, NM	PA + CBc
FC-19	28/M	4	-	-	-	-	G	M, NM	PA + *S. aureus* + *A. xylosoxidans*
FC-96	31/F	2	53	30	45	22,4	W	M, NM	PA + *A. xylosoxidans* + *A. denitrificans*

[1] Idade = anos, F = feminino, M = masculino, [2] Exacerbações por ano, [3] CVF% = capacidade vital forçada porcentagem do previsto, [4] VEF_1% = volume expiratório forçado no primeiro segundo porcentagem do previsto, [5] SS = escore de Shwachman, [6] IMC = índice de massa corpórea, [7] Pulsotipos de *P. aeruginosa* com mesma letra são indistinguíveis ou altamente relacionados, "d" = DNA degradado, [8] M = mucoide, NM = não-mucoide , [9] PA = *P. aeruginosa*; Identificação pelo Vitek® II versão 5.04 (bioMérieux); CBc = complexo *Burkholderia cepacia*. Para os dados clínicos de exacerbação, CVF%, VEF_1%, SS e IMC foi realizada análise estatística (teste "t de Student" com correção de Welch) para comparação entre grupos de pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* que apresentaram ou não isolamento de *S. aureus* e pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* que apresentaram outros BGN-NF.

4.2. Sensibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência

A sensibilidade antimicrobiana dos 75 isolados foi relatada como sensível ou não-sensível (intermediário e resistente). Cinco pacientes apresentaram um total de 8 isolados MDR (10,7%) durante o período do estudo. Estes pacientes, entre outros, foram aqueles que apresentaram isolados com resistência ao imipenem e/ou ciprofloxacina e sofreram com hospitalizações constantes (Apêndice 1 e 2). Genes que codificam resistência aos antibióticos β-lactâmicos ou genes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos não foram encontrados nos isolados que exibiram não-sensibilidade a pelo menos um dos carbapenêmicos (17 isolados) e fluoroquinolonas (18 isolados) testados.

Considerando apenas um isolado de *P. aeruginosa* por paciente, 39% (12) foram sensíveis a todos os antibióticos testados, ao passo que 61% (19) foram não-sensíveis a pelo menos um antibiótico. Os antibióticos tobramicina, meropenem e cefepima foram os mais eficazes *in vitro*, 97%, 96% e 96%, respectivamente. As drogas menos eficientes foram ticarcilina-ácido clavulânico com 35% de não-sensibilidade, imipenem (26%), levofloxacina (19%) e aztreonam (19%).

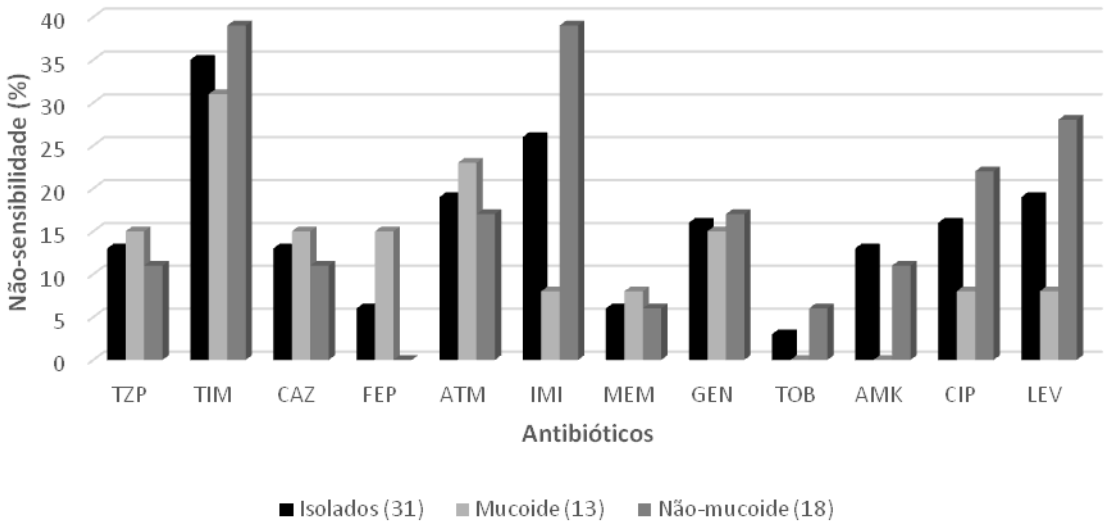

Figura 2. Perfil de não-sensibilidade aos antimicrobianos testados. TIM, ticarcilina-ácido clavulânico; TZP, piperacilina-tazobactam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; IMI, imipenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; (n), número de isolados não sensíveis.

4.3. Genes relacionados com fatores de virulência

Foram pesquisados 18 genes de virulência para 31 *P. aeruginosa*: gene *algD* que codifica alginato; genes *exoT*, *exoS* e *exoY* que codificam proteínas efetoras do sistema de secreção tipo III envolvidos na lesão pulmonar; genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR* que codificam o sistema *quorum sensing*; gene *apr* que codifica protease alcalina secretada pelo sistema de secreção tipo I, genes *pilA* e *pilB* que codificam um precursor fimbrial tipo IV e uma proteína motora, respectivamente; genes *plcH* e *plcN* que codificam fosfolipases C (hemolítica e não-hemolítica, respectivamente), genes *phzH*, *phzM* e *phzS* que codificam proteínas necessárias para produção de fenazinas, que causam morte celular; gene *lasB* que codifica enzima elastase do sistema de secreção tipo II e gene *pvdA* que codifica uma enzima (L-ornitina hidrolase) da via biossintética da pioverdina.

Nenhum isolado apresentou todos os genes pesquisados. Todos os isolados apresentaram os genes *algD* e *lasI*. Mais de 90% dos isolados apresentaram os genes *exoT*, *exoS*, *exoY*, *lasR*, *rhlI*, *plcH*, *phzH* e *lasB*. A grande maioria dos isolados apresentou os genes *plcN* (90%) e *rhlR* (87%). Os genes *apr*, *phzS* e *phzM* foram detectados em porcentagem muito menor de isolados, 71%, 55% e 55%, respectivamente, enquanto os genes *pilA*, *pvdA* e *pilB* foram os menos encontrados nos isolados deste estudo (23%, 19% e 3%, respectivamente) (Figura 1).

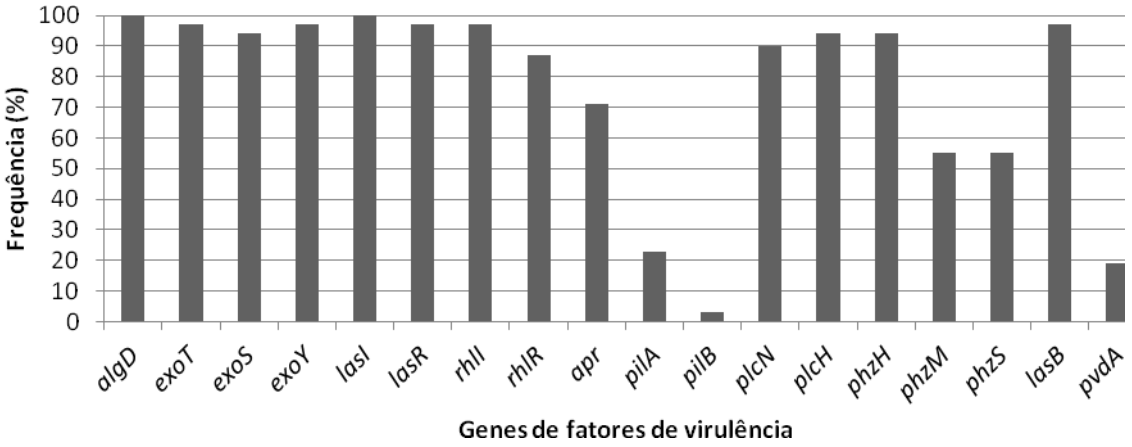

Figura 3. Presença de genes relacionados com fatores de virulência em 31 isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com FC com infecção crônica por esta bactéria atendidos no HCFMRP-USP.

4.4. Similaridade genômica dos isolados

Setenta e cinco isolados de *P. aeruginosa* provenientes de 31 pacientes com colonização crônica foram tipados pela PFGE. Foram visualizados 29 perfis de macrorrestrição. Isolados de um mesmo paciente apresentaram o mesmo pulsotipo ao longo do tempo – isolados persistentes; o mesmo ocorreu com isolados de uma mesma coleta com morfologia colonial diferente (M e NM) ou com teste de sensibilidade aos antimicrobianos diferentes. Quatro pulsotipos relacionados foram observados entre 8 pacientes (Tabela 4), no entanto, um desses pulsotipos (H) foi observado apenas uma vez em um dos pacientes (FC-26). Dois pacientes (FC-26 e FC-40) apresentaram linhagens diferentes durante o período de estudo – isolados não-persistentes; e um paciente (FC-9), que apresentou isolados de *P. aeruginosa* com morfologias coloniais diferentes, provenientes de uma mesma coleta, estava, ao mesmo tempo, com duas linhagens diferentes.

Os isolados MDR, observados em cinco pacientes, apresentaram pulsotipos diferentes (Apêndice 1).

Parte II

4.5. Identificação dos isolados bacterianos

Dos 260 isolados identificados por PCR como *P. aeruginosa*, 255 tiveram a identificação confirmada por MALDI-TOF, mostrando uma concordância de 98% entre as duas técnicas. Dos 5 isolados que divergiram na identificação, um foi identificado como *Stenotrophomonas maltophilia*, outro como *Pseudomonas* sp. (escore 1.961) e três como *A. xyloxosidans*.

4.6. Distribuição em diferentes fenótipos de produção de alginato

A pesquisa da presença do fenótipo de produção de alginato foi realizada para 64 isolados provenientes de 40 pacientes crônicos, sendo 27 isolados M e 37 NM.

Foram selecionados 48 isolados M e NM (vinte e quatro pares) provenientes de 24 pacientes com FC com infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*. Também foram incluídos 13 isolados NM e 3 isolados M de pacientes fibrocísticos com infecção crônica, dos quais apenas um fenótipo foi isolado no período do estudo.

Os resultados obtidos por PFGE foram utilizados para seleção dos isolados M e NM a serem estudados, somente foram selecionados os pares de isolados M e NM que apresentaram

perfis de macrorrestrição (PFGE) semelhantes e, portanto, foram considerados geneticamente relacionados.

Para os 24 pares de isolados M e NM observou-se que 96% dos mucoides mantiveram seu fenótipo nestes meios, mostrando tipo I de produção de alginato, enquanto apenas 37% dos isolados não-mucoides mostrou tipo III de produção de alginato. Nenhum isolado apresentou morfotipo II de produção de alginato. No entanto, um isolado mucoide (4%) e quinze não-mucoides (63%) apresentaram uma pequena, mas detectável produção de alginato após prolongado período de incubação (7 dias), o que corresponde ao tipo de produção tipo IV de alginato (ver Figura 1, exemplos dos diferentes morfotipos de produção de alginato).

Dos 13 isolados de *P. aeruginosa* NM de pacientes fibrocísticos com infecção crônica que apresentaram apenas um fenótipo bacteriano, onze isolados (85%) mantiveram o seu fenótipo em PIA e LB, mostrando produção tipo III de alginato, enquanto dois isolados apresentaram morfotipo IV de alginato. Dos três isolados M de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes que apresentaram somente este fenótipo, todos os três isolados foram classificados como tipo I.

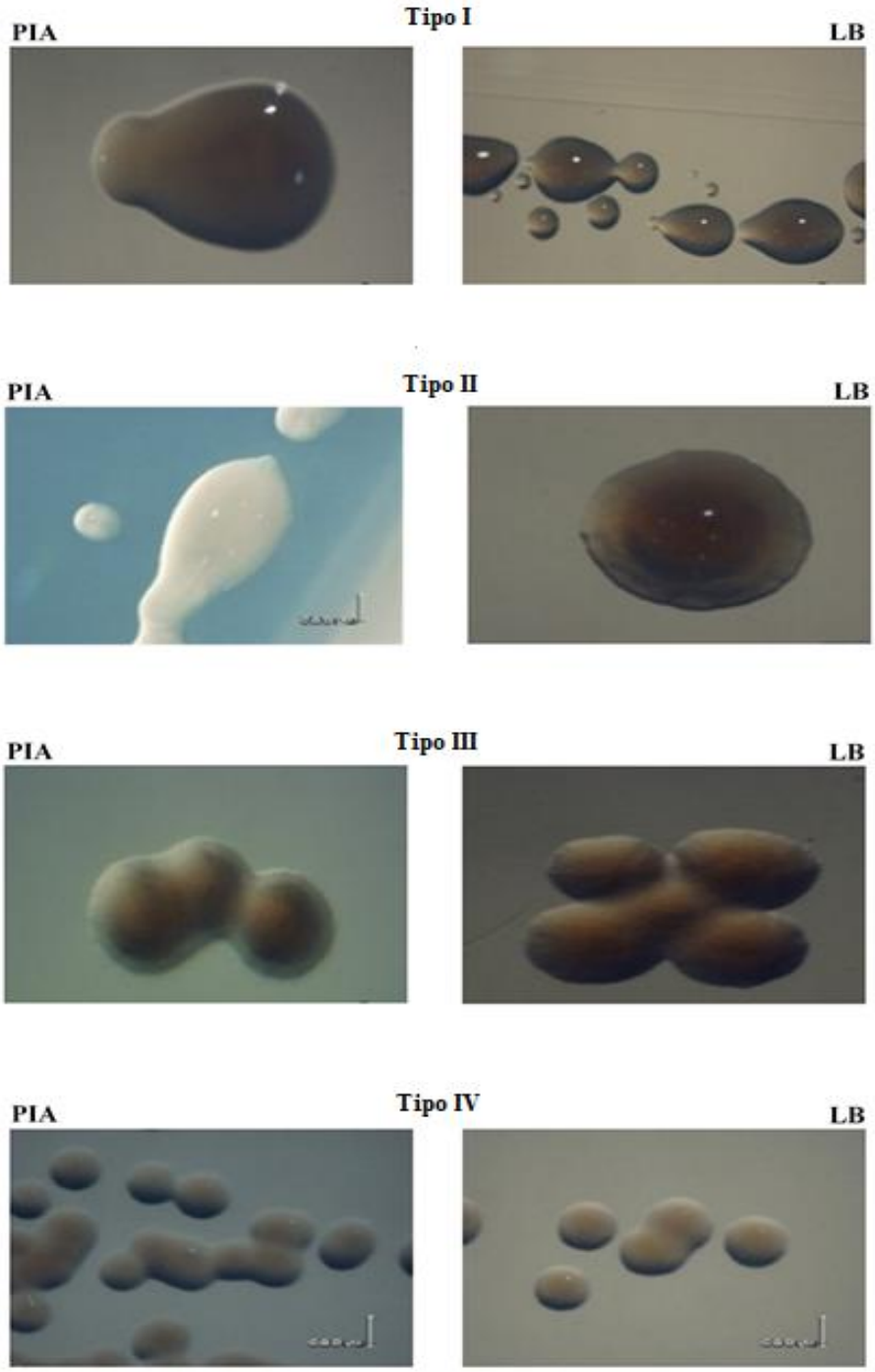

Figura 4. Diferentes morfotipos de alginato em isolados de *P. aeruginosa* em dois meios de cultura, PIA (à esquerda) e LB (à direita), após incubação a 37ºC. Tipo I mucoide em ambos os meios de cultura; tipo II mucoide em PIA, mas não-mucoide em LB; tipo III não-mucoide nos dois meios; e tipo IV produção muito baixa, mas detectável em ambos os meios de cultura após incubação prolongada. As imagens foram obtidas utilizando estereomicroscópio Olympus SZ61, com lentes objetivas 4,5X.

4.7. Mutações no *operon algTmucABD*

Dos 64 isolados de *P. aeruginosa*, 27 M e 37 NM, nos quais foram pesquisados o gene *mucA*, 93% (25) dos isolados mucoides e 54% (20) dos isolados não-mucoides apresentaram mutações em *mucA*. As mutações observadas nos isolados estão apresentadas na Tabela 5. A mutação mais comumente observada nos isolados foi a mutação *mucA22*, conhecida como a deleção de uma guanina em uma sequência de cinco localizada entre as posições 429-433 da região codificadora de *mucA* (ΔG430 na Tabela 5). A maioria dos isolados apresentou inserção ou deleção que levou a *frameshift* e/ou *stop codon* prematuro.

Tabela 5. Mutações e alterações ocorridas na sequência do gene *mucA* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes com FC

Mutações em *mucA*	Alteração de sequência	M (27)	NM (37)
C32T[*]	Ser/Phe	1	
C35G[1,2]	Ala/Gly	1	1
T45G	Asp/Glu	1	1
C137T[*]	Ala/Val	1	1
ΔG168	*Frameshift, stop codon* em 283	1	
Inserção C em 238	*Frameshift, stop codon* em 478	1	1
ΔC310	*Frameshift, stop codon* em 385	1	1
ΔC347	*Frameshift, stop codon* em 385	1	1
C349T[*]	*Stop codon*	2	1
C352T[*]	*Stop codon*	1	
ΔG357	*Frameshift, stop codon* em 385	1	1
C364T	Pro/Ser	1	1
ΔC365	*Frameshift, stop codon* em 385	1	1
C367T[1,2, *]	*Stop codon*	1	1
C382T[*]	*Stop codon*	1	1
G409T	Gly/Cys		1
C424T[*]	*Stop codon*	1	
ΔG430[*]	*Frameshift, stop codon* em 439	6	6
ΔA437	*Frameshift, stop codon* em 439	1	1
ΔA568	*Frameshift*	1	
ΔA578	*Frameshift*	1	1
Inserção GC em 583	*Stop codon*/Ala	1	1

M: mucoide, NM: não-mucoide, [(1-2)]: Isolados com mais de uma mutação em *mucA*, [(*)]: mutações previamente descritas

Quatro isolados (pares M e NM – 6A, 6B, 191 e 192, Apêndice 3) de dois pacientes (FC-1 e FC-79), que apresentaram o mesmo clone, também apresentaram o mesmo tipo de

mutação em *mucA* (inserção GC em 583). E os isolados não-mucoides também apresentaram a mesma mutação em *mucD* (A409G).

As alterações na sequência observadas em *mucB* e *mucD* nos 19 isolados classificados como produção tipo IV de alginato estão apresentados na Tabela 6. A maioria dos isolados apresentaram mutações pontuais que levaram à mudança de aminoácidos em MucB e/ou MucD. Um isolado apresentou quatro mutações diferentes em *mucB*, incluindo deleção, inserção e alteração de aminoácidos, localizadas em 41-56 pb (Tabela 6).

Entre os 19 isolados (tipo IV), somente quatro não apresentaram mutação simultânea em *mucA*. Um isolado, já foi mencionado acima, que apresentou diversas mutações em *mucB*; outro isolado apresentou ΔT733, levando a um *frameshift* e *stop codon* em 868 pb (*mucB* tem 951 pb), e, aparentemente essas mutações não foram descritas anteriormente. Os outros dois isolados apresentaram mutações pontuais em *mucB* (A631G) e *mucD* (A409G), resultando em mudanças de aminoácidos. Nenhum destes quatro isolados apresentou mutações em *algT*.

Tabela 6. Mutações e alterações ocorridas na sequência dos genes *mucB* e *mucD* nos 19 isolados de *P. aeruginosa* classificados como tipo IV de produção de alginato

Mutação	Alteração de sequência	M (2)	NM (17)
Mutações em *mucB*			
Inserção G em 41[1]	*Frameshift*		1
TCC47GAA[1]	*Frameshift*		1
ΔC56[1]	Thr/His		1
G68A[1]	Asp/Asn		1
C338T[*]	Ser/Phe		1
C611G[2]	Ala/Gly		1
A631G[2, *]	Thr/Ala	1	3
C643T	Arg/Cys		1
ΔT733	*Frameshift*, *stop codon* em 868		1
Mutações em *mucD*			
A409G[1, *]	Ile/Val		7
C1310G[2,3]	Thr/Ser	1	1
G1321A[1,2,3, *]	Val/Ile	1	4

M: mucoide, NM: não-mucoide, [(1-4)] Isolados com mais de uma mutação em *mucB* ou *mucD*, [(*):] mutações previamente descritas

As mutações em *algT* estão apresentadas na Tabela 7. Entre os 20 isolados NM com mutações em *mucA*, 11 tinham mutações em *algT*, representando 55% de revertentes não-

mucoides. De todos os isolados mucoides investigados, apenas um apresentou transição A/G na posição 11 pb, resultando em mudança de aminoácido.

Tabela 7. Mutações e alterações ocorridas na sequência do gene *algT* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes com FC

Mutações em *algT*	Alteração de sequência	M (27)	NM (37)
A11G	Gln/Arg	1	
G49A	Gly/Arg		1
A86G*	Tyr/Cys		3
C133T	*Stop codon*		1
Inserção 9pb em 138	*Frameshift, stop codon* 589		1
ΔG157	*Frameshift, stop codon* 295		1
A176G	Tyr/Cys		1
A508G	Thr/Ala		1
C528A	Phe/Leu		1
ΔC556	*Frameshift*		1

M: mucoide, NM: não-mucoide, (*): mutações previamente descritas

4.8. Alterações genéticas nos genes *lasR* e *rhlR*

As alterações observadas nas sequências do gene *lasR* estão apresentados na Tabela 8. Nenhum dos isolados apresentou mutações em *rhlR*.

Tabela 8. Mutações e respectivas alterações determinadas na sequência do gene *lasR* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa*

Mutações em *lasR*	Alteração de sequência	M (27)	NM (37)
Δ98pb em 36	*Frameshift, stop codon* 598		1
C211G	Arg/Gly	1	2
C224T[1,2]	Thr/Met	1	1
A242G	Gln/Arg	1	
Inserção 4 pb em 245	*Frameshift, stop codon* 700		2
C320T	Ala/Val	1	1
Δ58pb em 321	*Frameshift, stop codon* 325	1	1
Δ4pb em 461[1,2]	*Frameshift, stop codon* 526	1	1
A463G	Lys/Glu	1	1
G560A	*Stop codon*		1
A626G	Asn/Ser		1
C665T	Thr/Ile	1	1

M: mucoide, NM: não-mucoide, (1-2) Isolados com mais de uma mutação em *lasR*

4.9. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

De 64 isolados, apenas 2 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O antimicrobiano mais eficaz foi a colistina (98%) ─ com apenas um isolado apresentando perfil de resistência, seguido de piperacilina-tazobactam (92%), ceftazidima (92%), meropenem (86%), imipenem (83%) e tobramicina (75%). Por outro lado, as drogas menos eficientes foram amicacina (33%), aztreonam (42%) e ciprofloxacina (45%) (Tabela 9).

Tabela 9. Determinação da CIM (µg/mL) de 9 antimicrobianos para isolados de *P. aeruginosa*

Isolados	TZP	CAZ	IMI	MER	ATM	CIP	AMK	TOB	COL
6A	1	3	1	0,064	0,75	0,75	96*	8	0,75
6B	0,75	2	0,38	0,023	0,38	0,5	96	8	1
13	3	4	0,75	0,064	1,5	0,38	96*	16	1
14-2	4	3	1	0,047	2	3	> 256	16	1
30	3	1,5	16	6	3	4	48	2	0,5
31	4	2	12	6	4	6	24	3	0,5
39	6/24	2/>256	1,5	0,094	4/>256	0,25	8	4	0,75
40	2	2	0,5	0,032	4	0,64	16	4	1
45	1,5	1	2	0,047*	1	1,5*	32	6	1
47	2	1	0,75	0,047	2	0,19	4	1,5	3
56	2	1	0,75	0,064	3	0,38	6	1,5	1
57-2	2	1	0,5	0,023	4	0,38	3	1,5	0,75
58A	0,38	0,5	0,75	0,047	0,125	0,38	16	2	0,38
58B	0,38	1,5	0,5	0,047	0,38	0,5	16	3	0,75
59	8	3	0,38	1,5	12	2	12	1,5	1,5
65	64	16*	6	8*	24	1,5	6	0,75	0,5
66	96/> 256*	16	12*	> 32	24	1,5	16	0,75	1,5
79-2	24	12	0,75	0,38	48	4	16	2	1
84	1	1,5	3	0,064	1,5	8	4	1,5	1,5
94	4	3	0,5	0,19	8	0,5	16	3	2
110	2*	2*	16	6	3	0,75	64	8	2
114	0,25	0,38	0,5	0,016	0,125	6	96	8	0,75
116	1	2	1	0,032	0,5	1	48	6	1,5
122A	3	1	0,25	0,047	2	0,75	8	2	0,75
122	1,5	1	0,64	0,012	2	1,5	8	2	2
124	4	2	0,5	0,19	6	0,38	24	4	0,5
126	3	2	0,75	0,094	4	2	12	3	1
138	16	12	0,75	1	64	4	12	1,5	1,5
140	8	4	0,5	0,38	24	2	6	1	1
142-1	2	0,75	6	1,5	0,5	2	> 256	12	0,38
142-2	2*	1*	12	2/6	1*	2	64*/>256	12*	0,5
154	2	3	3	0,047	3	1	12	3	3
157	6	2	0,75	0,25	6	1	12	2	0,75

Isolados	TZP	CAZ	IMI	MER	ATM	CIP	AMK	TOB	COL
158	0,125	0,125	0,047	0,006	0,064	0,038	16	3	0,75
170	3	1,5	0,75	0,19	4	0,38	8	1,5	1
171	3	0,75	0,25	0,094	3	0,19	4	1	1,5
176	0,75	2	1	0,016	0,75	6	96	12	1,5
180	3	1,5	0,75	0,125	6	0,38	1	0,75	0,5
182	1	1	2	0,25	2	3	16	3	3
187	1,5	2	8	3	6	12	24	4	1,5
191	0,75	1,5	0,75	0,047	0,19	0,5	16	4	1
192	0,5	2	0,25	0,32	0,38	0,75	16	3	1
201	1,5	0,75	1,5	0,19	1,5	1,5	12	2	1
202	1	0,75	1	0,19	0,75	1	4	1,5	1
209	4	2	1	0,19	6	0,25	12	4	0,75
210	2	2	0,5	0,64	2	0,25	16	4	1,5
211	1,5	1,5	1	0,094	2	0,19	6	2	6
212	2	1,5	0,75	0,047	3	0,25	6	3	1
216	4	1,5	3	0,38	4	0,5	8	3	2
217	2	2	0,5	0,125	4	0,38	8	2	1,5
219	0,75*	3*	8*	6	0,75*	3	96*/>256	24*	0,5
219A	1,5*	4	8	4*	0,75*	3	> 256	12*	0,38
233	6	4	1	0,094	8	0,38	32	8	1,5
235	0,38	2	1	0,064	0,75	0,25	12	3	0,75
236	0,38	3	1	0,023	0,75	0,5	24	3	1
245A	4	3	0,38	0,047	3	2	16	2	0,75
245B	1,5	0,75	0,25	0,032	0,75	0,75	8	1,5	0,5
250	1,5	0,75	1	0,064	0,19	1	16	4	1
251	0,75	1,5	0,5	0,047	0,5	1	24	4	1,5
253	0,25	0,38	0,38	0,016	0,125	4	3	1	0,38
254	0,19	0,19	0,25	0,006	0,064	4	4	0,75	0,38
258	0,75	1,5	8*	2	0,25	8*/>32	48*	6	1,5
259	0,38	0,75	1	0,094	0,25	0,5	32	3	0,75
260	1,5	6	1,5	0,125	1,5	1	32	6	1,5

TZP: piperacilina-tazobactam, **CAZ**: ceftazidima; **IMI**: imipenem, **MER**: meropenem, **ATM**: aztreonam, **CIP**: ciprofloxacina, **AMK**: amicacina, **TOB**: tobramicina, **COL**: colistina, *: subpopulações no halo de inibição, /: zona de inibição dupla.

4.10. Frequência de mutação dos isolados de *P. aeruginosa* e sequências de genes anti-mutação

Entre os 64 isolados, 17% (11) apresentaram o fenótipo hipermutável (Hp), 33% (21) o fenótipo fracamente hipermutável (wHp) e 50% (32) o fenótipo não-hipermutável (nHp). Dos 40 pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa*, 20% (8) apresentaram isolados com fenótipo Hp.

O sequenciamento dos genes *mutS* e *mutL* dos isolados classificados como Hp mostraram mutações responsáveis por alterações de aminoácidos, devido à substituição de bases, algumas deleções e inserções com *frameshifts* e *stop codons* prematuros (Tabela 10).

Tabela 10. Mutações e alterações ocorridas nos genes *mutS* e *mutL* de isolados de *P. aeruginosa* com fenótipo hipermutável

Mutações	Alteração de sequência
Mutações em *mutS*	
A484G[1,2,3]	Thr/Ala
Δ11pb em 496	*Frameshift, stop codon* em 772
C560T[4,5]	Ala/Val
G581A[1,2,3]	Arg/His
Inserção 9pb em 767	*Frameshift*
C1609G	His/Asp
G2341A[4,5]	Ala/Thr
Mutações em *mutL*	
Inserção CA em 1335[1,2,3]	*Frameshift, stop codon* em 1711
Inserção 11pb em 1569[4,5]	*Frameshift, stop codon* em 1720
C1847T	Thr/Ile
G1216A[4,5]	Ala/Thr
C1295T[1,2,3]	Ala/Val
C1273A	Pro/Thr

[(1-5)] Isolados com mais de uma mutação em *mutS* ou *mutL*

5. DISCUSSÃO

P. aeruginosa é o patógeno mais comum em infecções do trato respiratório em indivíduos com FC. A infecção ocorre durante toda a infância, atingindo altos índices em pacientes adultos. Em geral, a colonização inicial leva à infecção crônica (ou em alguns casos, outras linhagens podem posteriormente estabelecer infecções crônicas), sem possibilidade de erradicação, sendo associada a altos índices de morbidade e mortalidade destes pacientes (BURMOLLE et al., 2010; RAU et al., 2010).

Dos 92 pacientes fibrocísticos que participaram inicialmente deste estudo, 34% apresentaram infecção crônica por *P. aeruginosa*. A porcentagem de colonização observada neste estudo foi similar à reportada no Reino Unido no relatório anual de 2012, que mostra porcentagem de colonização crônica em torno de 35% (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2012), e também foi semelhante aos 31% observados em um centro de FC na Bélgica (PROESMANS et al., 2006). Estes dados podem indicar que os pacientes com FC diferem pouco em relação ao aspecto de colonização, quando analisada a situação geográfica e mesmo socioeconômica, quando são obedecidas normas internacionais de seguimento desses indivíduos. Entretanto, dados brasileiros mais antigos mostravam porcentagem de colonização mais alta, 50% (DA SILVA FILHO et al., 2001), o que poderia indicar um fato observado no mundo todo: à medida que novas condutas terapêuticas são introduzidas, posterga-se o período de colonização dos indivíduos e aumenta-se a sobrevivência.

No entanto, quando se compara a faixa etária dos pacientes com infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* deste estudo com os dados Europeus (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2012), pode-se observar que os pacientes atendidos no HCFMRP-USP apresentam infecção crônica ainda muito jovens. No Brasil, 28% dos pacientes com idade <18 anos eram cronicamente infectados, enquanto apenas 10% dos pacientes <16 anos no Reino Unido e 12% com idade ≤18 anos na Bélgica eram infectados crônicos por *P. aeruginosa*. Este dado é muito preocupante, pois a colonização/infecção crônica precoce por *P. aeruginosa* contribui para um pior prognóstico da doença, com redução da expectativa de vida, especialmente quando associada com fenótipo mucoide (CIOFU et al., 2012; MCCULLOCH et al., 2011), como observado neste estudo (Tabela 3).

A microbiota das vias aéreas de pacientes com FC representa um ecossistema diverso e complexo, no qual uma variedade de microrganismos coexiste, e que tem sido denominada como microbioma da FC. Muitos artigos descreveram o isolamento simultâneo de *P. aeruginosa* e outros microrganismos, como observado neste estudo (Tabela 4), e é provável

que alguns processos de adaptação observados em *P. aeruginosa* sejam influenciados pela presença de outros microrganismos nas vias aéreas dos pacientes (FOLKESSON et al., 2012; FUGERE et al., 2014; MAHENTHIRALINGAM, 2014).

A presença mais elevada de *S. aureus* e reduzida de BGN-NF em pacientes mais jovens, com posterior diminuição do isolamento de *S. aureus* e aumento de BGN-NF em pacientes mais velhos observados neste estudo, está de acordo com dados da literatura (MURRAY et al., 2009; ZOCCOLI et al., 2009). A função pulmonar de pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* com isolamento concomitante de outros BGN-NF, como bactérias do CBc e do gênero *Achromobacter*, estava mais comprometida quando comparada com a função pulmonar de pacientes com colonização crônica por *P. aeruginosa* que apresentaram ou não isolamento de *S. aureus* ao mesmo tempo, resultado que também está de acordo com dados da literatura. Bactérias do CBc podem causar a síndrome cepácea, que leva ao rápido declínio da função pulmonar e acredita-se que *Achromobacter* sp. cause declínio da função pulmonar semelhante ou levemente mais acentuado ao causado por *P. aeruginosa* (DE BAETS et al., 2007; HANSEN et al., 2010; LOPES et al., 2012). Estudo recente de interação de linhagens de *P. aeruginosa*, adaptadas aos pulmões de pacientes fibrocísticos, com *S. aureus* demonstrou o desenvolvimento de potencial interação comensal entre estes dois microrganismos, com aumento da atividade de crescimento e prevenção de morte de *P. aeruginosa* pela presença de antibióticos promovida pelo estímulo de formação de *small-colony variant* na presença de *S. aureus* (MICHELSEN et al., 2014). Além disso, presença de *S. aureus* meticilina-resistentes (MRSA), está associada com piora da função respiratória dos pacientes quando comparada com *S. aureus* meticilina-sensíveis (MSSA) (HUBERT et al., 2013). No presente estudo houve apenas um paciente (FC-65), com *P. aeruginosa* e MRSA, e o valor de seu VEF_1 era bem baixo, 32%.

Embora a identificação de *P. aeruginosa* não seja considerada difícil pelos laboratórios de microbiologia, os isolados de pacientes fibrocísticos apresentam fenótipos atípicos, incluindo a perda de pigmentação ou pigmentação não característica, crescimento demorado e colônias mucoides, que podem dificultar a identificação por testes bioquímicos convencionais e testes comerciais que dependem do crescimento bacteriano. E, como já comentado anteriormente, pacientes com FC apresentam, muitas vezes, outros BGN-NF em suas secreções respiratórias fazendo com que o isolamento e a identificação de *P. aeruginosa* seja dificultado (QIN et al., 2003). Neste trabalho, a identificação de *P. aeruginosa* foi

realizada por PCR e MALDI-TOF. As técnicas apresentaram alta concordância de resultados, 98%. A identificação de microrganismos por MALDI-TOF tem se popularizado devido ao fato de ser rápida e acurada, em questão de poucos minutos após a obtenção de cultura pura (SINGHAL et al., 2015; TRAN et al., 2015). Vale ressaltar que esta técnica também pode ser usada para outros propósitos, não apreciados neste estudo. A identificação precisa de cada isolado é importante para que sejam adotadas medidas de controle mais efetivas e tratamentos mais adequados.

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua que pode ser encontrada em água, plantas, solo, causando infecções em humanos e colonizando os pulmões de pacientes com FC (FOLKESSON et al., 2012). O solo pode ser uma destas fontes. Em estudo que investigou o solo de diferentes regiões do Brasil, observou-se a presença de *P. aeruginosa* resistentes a antimicrobianos comumente utilizados e muito importantes na prática clínica, principalmente para o tratamento de pacientes com FC, tais como aztreonam e ticarcilina-ácido clavulânico (PITONDO-SILVA et al., 2014). Neste trabalho, considerando-se apenas um isolado por paciente, 35% dos isolados de pacientes com infecção crônica eram não-sensíveis à ticarcilina-ácido clavulânico, e 19% ao aztreonam. Estudos de análise genética confirmaram que as primeiras linhagens a colonizar os pacientes com FC são únicas e originárias de fontes ambientais não identificadas, embora a transmissão entre os pacientes podem ocorrer (FOLKESSON et al., 2012).

A água proveniente de piscinas, jacuzzis, banheiras de hidromassagem, pias (ralo) e água potável (para consumo) é outra possível fonte de aquisição de *P. aeruginosa* para pacientes com FC. Diversos trabalhos mostraram a presença desta bactéria nesses ambientes, até mesmo isolados MDR foram encontrados em banheiras de hidromassagem e piscinas recreacionais e públicas (DORING et al., 1996; LUTZ, J. K.; LEE, 2011; MARTINS et al., 2014).

Os testes de sensibilidade a antibióticos usados nos laboratórios de microbiologia utilizam culturas planctônicas e revelam alta sensibilidade aos antibióticos de isolados mucoides comparados com isolados não-mucoides. Neste estudo, isolados não-mucoides foram mais resistentes ao imipenem do que os isolados mucoides. Entretanto, ambos os fenótipos são capazes de formar biofilme, mas a determinação de sensibilidade aos antibióticos de isolados em forma de biofilme mostrou que biofilmes mucoides são mais tolerantes aos antibióticos do que biofilmes não-mucoides (CIOFU et al., 2012).

Poucos trabalhos no mundo investigaram ou relataram a resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) em *P. aeruginosa*, apesar de esta bactéria ter habilidade de adquirir este tipo de resistência (NORDMANN; POIREL, 2005). Como uma alta porcentagem de resistência às quinolonas foi observada nos isolados de pacientes com FC que fazem parte deste estudo, a investigação deste tipo de mecanismo de resistência se mostrou oportuno. Assim como a investigação de produção de β-lactamases – carbapenemases, devido à alta porcentagem de resistência observada aos antibióticos carbapenêmicos (Apêndice 1) e por já terem sido descritos isolados de pacientes FC produzindo carbapenemases, inclusive no Brasil (CARDOSO; ALVES; LEITAO, 2008; PEREZ et al., 2012; POLLINI et al., 2011). Estas investigações são especialmente importantes, porque estes mecanismos podem ser transmitidos via horizontal (entre diferentes bactérias) e, também, foi observado que alguns pacientes possuem a mesma linhagem bacteriana. Entretanto, nenhum gene PMQR ou codificador de carbapenemase investigado foi encontrado nos isolados. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, que mostram que os mecanismos de resistência mais encontrados em isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com FC são hiperprodução de β-lactamase constitutiva do tipo AmpC e hiperexpressão de sistemas de efluxo. Devido à pressão seletiva imposta pela antibioticoterapia, a ocorrência de linhagens de *P. aeruginosa* resistentes a todas as classes de antimicrobianos clinicamente relevantes é rotineiramente encontrada durante as infecções do trato respiratório nos pacientes com FC (CIOFU et al., 2012; FOLKESSON et al., 2012).

Alguns autores têm descrito a disseminação de clones MDR entre pacientes com FC (DETTMAN et al., 2013; FERNANDEZ-OLMOS et al., 2013). Apenas 10,7% dos isolados investigados neste trabalho apresentaram fenótipo MDR e não puderam ser associados à um clone transmissível. Este resultado está de acordo com outro estudo brasileiro (FERREIRA et al., 2015). No entanto, vale ressaltar que estes pacientes, entre outros, sofreram com constantes hospitalizações e apresentaram isolados com resistência ao imipenem e/ou fluoroquinolonas (Apêndice 1).

Tratamento precoce e regular com antibióticos é usado para tratar pacientes com *P. aeruginosa*. Os pacientes foram tratados com antibióticos β-lactâmicos (piperacilina-tazobactam, meropenem, ceftazidima e/ou aztreonam), aminoglicosídeos (tobramicina ou amicacina), fluoroquinolona (ciprofloxacina), macrolídeo (azitromicina - para controlar o

crescimento bacteriano, e não como anti-inflamatório) e peptídeo antimicrobiano (colistina). Os pacientes foram tratados de acordo com as diretrizes descritas a seguir.

Na primeira detecção de *P. aeruginosa* o tratamento foi iniciado através da administração de ciprofloxacina por via oral em combinação com colistina nebulizada por 3 semanas, sendo o mesmo tratamento mantido durante 3 meses se as amostras de escarro continuaram a apresentar *P. aeruginosa*. Após 3 meses, se a bactéria permaneceu nas amostras de expectoração, o tratamento intravenoso com ceftazidima em combinação com amicacina foi iniciada (tobramicina inalada pode ter sido utilizada). Se mais de 3 semanas se passaram antes de *P. aeruginosa* reaparecer, o tratamento com ciprofloxacina e colistina foi reiniciado. Em caso de resistência à ceftazidima ou presença de outros patógenos gram-negativos não-fermentadores, como *Achromobacter* sp., na amostra de escarro, foi utilizado meropenem ou imipenem em combinação com amicacina ou colistina. Portanto, a antibioticoterapia adotada pelo hospital explica o perfil de sensibilidade observado nos isolados. No entanto, a relativamente alta resistência à ticarcilina-ácido clavulânico foi intrigante, visto que seu uso é restrito no caso de resistência aos outros antibióticos usados: ciprofloxacina, ceftazidima e meropenem. Em estudo multicêntrico realizado na França, a diminuição de sensibilidade ou resistência à ticarcilina em isolados de *P. aeruginosa* foi atribuída a três mecanismos principais, já mencionados: hiperexpressão de sistemas de efluxo, produção de β-lactamase adquirida e hiperexpressão de AmpC cromossomal (CAVALLO et al., 2002).

A mudança que ocorre quando *P. aeruginosa* passa do ambiente para o trato respiratório de pacientes com FC envolve tanto alterações nutricionais quanto alterações fisicoquímicas na bactéria, para adaptar-se e sobreviver em condições estressantes que têm efeitos fundamentais na sua evolução. A exposição contínua a antibióticos, ao sistema imune e ao estresse oxidativo são desafios que precisam ser vencidos pela bactéria antes da colonização poder evoluir para infecção crônica. A habilidade de *P. aeruginosa* se adaptar a essas condições é devida, em parte, à sua extensa versatilidade genética, que contribui significativamente para sua patogenicidade (FINNAN et al., 2004; FOLKESSON et al., 2012). É provável que como parte desse processo *P. aeruginosa* utilize vários genes; no entanto, o preciso repertório de genes de virulência requeridos ainda são desconhecidos (FINNAN et al., 2004). Alguns trabalhos investigaram a presença de genes relacionados a fatores de virulência em isolados de *P. aeruginosa* provenientes do ambiente (plantas, solo,

água) e mostraram que estes isolados apresentam potencial patogênico necessário para causar doenças em humanos, como em pacientes com FC (LANOTTE et al., 2004; MARTINS et al., 2014).

No presente estudo foram investigadas, por PCR, dezoito regiões associadas à patogenicidade, ou seja, regiões que codificam genes necessários para virulência. Foi observada alta prevalência dos genes pesquisados (Figura 1), com exceção dos genes *pvdA*, *pilA* e *pilB*. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, exceto para a baixa presença do gene *pvdA*, relacionado com a produção de pioverdina (BRADBURY et al., 2010; FINNAN et al., 2004; SCHABER, 2004; WOLSKA; SZWEDA, 2009).

Durante os primeiros estágios de colonização de *P. aeruginosa* nos pulmões de pacientes com FC, diferentes clones não relacionados (isolados não-persistentes) podem ter acesso aos pulmões, enquanto nos estágios mais avançados de colonização o número de clones é reduzido, mas o trato respiratório já se encontra cronicamente colonizado (FERNANDEZ-OLMOS et al., 2013). Alguns pacientes neste estudo (FC-26, FC-40 e FC-9) apresentaram isolados não-persistentes que foram erradicados com o tempo (dados não mostrados). No entanto, a grande maioria dos pacientes apresentou isolados persistentes (único clone), que em alguns casos foram encontrados do início ao fim do período de coleta das amostras – cerca de 2 anos e meio. Outro estudo realizado com isolados de outras regiões do Brasil obteve resultado diferente, a grande maioria (95%) dos pacientes investigados apresentaram múltiplos genótipos; nos pacientes em que *P. aeruginosa* com mesmo genótipo foram isolados repetidamente, o clone foi detectado por no máximo 10 meses (FERREIRA et al., 2015).

Grande variação genética foi observada entre os isolados dos pacientes com colonização crônica, indicando que não existe um clone dominante entre os pacientes atendidos neste Centro de Referência, apesar de alguns pacientes compartilharem o mesmo clone ou clones altamente relacionados (Tabela 4). Isto pode ter ocorrido devido à: i) infecção cruzada entre os pacientes no ambulatório ou na enfermaria, (ii) transmissão indireta através de instrumentos clínicos ou exposição às mesmas fontes ambientais, ou (iii) existência de tipos clonais ambientais comuns (MARVIG et al., 2015). Apesar da existência de parentesco entre alguns pacientes atendidos no hospital do presente estudo, não houve isolamento de *P. aeruginosa* em mais de um membro da família com FC. Em estudo multicêntrico realizado no Brasil, pesquisadores não encontraram linhagens transmissíveis entre os pacientes com FC

investigados, apenas dois pacientes (irmãos) apresentaram o mesmo clone. (FERREIRA et al., 2015). Os resultados aparentemente confirmam que infecção cruzada é um evento raro nos centros brasileiros.

Alguns isolados de um mesmo paciente (Tabela 4 e Apêndice 1, paciente FC-3, por exemplo) apresentaram o mesmo pulsotipo apesar de terem morfologias coloniais diferentes e perfis de sensibilidade a antibióticos diferentes. Essas alterações em uma mesma linhagem são consequência da evolução de *P. aeruginosa* nas vias aéreas de fibrocísticos. Linhagens de *P. aeruginosa* de FC frequentemente apresentam notável diversidade fenotípica, como diversas morfologias coloniais (ex.: fenótipo M e NM), perfis diversos de resistência aos antimicrobianos e desenvolvimento de hipermutabilidade. Esta diversidade é associada à adaptação especializada aos diferentes compartimentos (sinus paranasais e zonas condutora e respiratória) nas vias aéreas (CIOFU et al., 2012; FOLKESSON et al., 2012).

A definição clínica de infecção crônica por *P. aeruginosa* é descrita como a presença contínua da bactéria por um período de no mínimo 6 meses e/ou por um aumento nos títulos de anticorpos contra *P. aeruginosa* (CANTON et al., 2005; PRESSLER et al., 2006), ou ainda, ≥ 50% das culturas positivas para *P. aeruginosa* em período de 12 meses (LEE et al., 2004). Essas definições clínicas são usadas no mundo todo e são importantes para os centros de tratamento de FC para o delineamento de estratégias terapêuticas, mas essas definições podem não abranger os eventos de colonização e infecção que ocorrem nas vias aéreas dos fibrocísticos, pois a transição adaptativa de *P. aeruginosa* para um estado de infecção crônica pode ter ocorrido antes da detecção de sinais clínicos. Por exemplo, em alguns pacientes *P. aeruginosa* coloniza os pulmões intermitentemente durante anos – apesar de ter sido aparentemente erradicada pela antibioticoterapia, mas posteriormente quando as amostras de escarro são cultivadas, os isolados sempre apresentam o mesmo genótipo. Se o mesmo clone persiste por um longo período, ele deve ser considerado crônico (FOLKESSON et al., 2012; JOHANSEN et al., 2012). Outro grupo de pesquisa implementou o uso dos termos “isolado persistente” e “isolado não-persistente” utilizando tipagem molecular (PFGE e *Muti Locus Sequence Type* - MLST) para distinguir esses isolados e caracterizar colonização crônica e não-crônica (FERNANDEZ-OLMOS et al., 2013). Essas observações demonstram a importância da utilização de técnicas de tipagem molecular para caracterização de colonização/infecção crônica, como feita nesse estudo.

O crescimento de colônias de *P. aeruginosa* com fenótipo mucoide é um marcador de infecção crônica por produção de biofilme nos pulmões de pacientes com FC (PRESSLER et al., 2006). A conversão do fenótipo não-mucoide para mucoide está relacionada com mutações no gene *mucA*, que codifica o fator antissigma para AlgT (SAUTTER et al., 2012).

A maioria das mutações observadas no presente estudo em *mucA* provavelmente resultaram em perda de função da proteína, visto que elas conduziram a *frameshifts* e/ou *stop codons* prematuros. As mutações mais observadas em *mucA* (transições C/T e mutação *mucA*22, Tabela 5) também foram relatadas em isolados mucoides da Austrália, Europa e Estados Unidos da América, e também puderam ser associadas com três clones dominantes na Escandinávia (ANTHONY et al., 2002; BOUCHER et al., 1997; BRAGONZI et al., 2006; CIOFU et al., 2008; FELIZIANI et al., 2010; JORGENSEN et al., 2015). No Brasil, não foram encontrados clones dominantes, no entanto, quatro isolados pertencentes ao mesmo clone apresentaram as mesmas mutações em *mucA* e *mucD*, sugerindo que infecção cruzada ocorreu entre os dois pacientes após a fase de adaptação de *P. aeruginosa* nos pulmões.

As mutações encontradas em isolados com *mucA* intacto (selvagem) e tipo IV de produção de alginato, sugerem que a transcrição do *operon* de alginato é aumentada após um longo período de incubação, devido à perda de função de MucB e MucD (reguladores negativos) causadas pelas mudanças na sequência nos genes. As mutações pontuais mais comuns encontradas nos genes *mucB* e *mucD* (Tabela 6) foram previamente descritas em isolados europeus (BRAGONZI et al., 2006; CIOFU et al., 2008).

Algumas outras mutações observadas nos genes *mucABD* nos isolados estudados neste trabalho foram anteriormente relatadas e estão marcadas nas tabelas, embora várias mutações são aqui descritas pela primeira vez. Nossos resultados suportam a hipótese de que esses *loci* representam regiões *hot-spot*, ou seja, regiões de maior incidência para mutação em *mucABD*.

Entre todos os 27 isolados mucoides analisados, apenas um mostrou uma transição (A11G) em *algT* que resultou em mudança de aminoácido. Uma vez que esta mutação não afetou o fenótipo tipo I de produção de alginato do isolado, pode-se sugerir que esta mutação não tem efeito na funcionalidade de AlgT.

O fenótipo mucoide é instável e aparentemente diferentes vias podem estar envolvidas na reversão da forma mucoide para não-mucoide (SAUTTER et al., 2012). A análise da sequência do *operon algT* em *P. aeruginosa* mucoide e não-mucoide de pacientes com FC infectados crônicos mostrou que a maioria (54%) dos isolados não-mucoides são revertentes

do fenótipo mucoide, pois apresentaram mutações em *mucA*. Nos isolados investigados verificou-se que mutações secundárias em *algT* foram responsáveis por 55% dos revertentes não-mucoides. Este achado foi maior do que para os isolados escandinavos, com apenas 30% de revertentes. No entanto, experimentos com revertentes espontâneos isolados *in vitro* mostraram percentagens maiores de inativação de *algT*, 67% (SCHURR et al., 1994), 86% (CIOFU et al., 2008) e 90% (SAUTTER et al., 2012).

Neste estudo foram encontradas nove novas mutações em *algT*. Curiosamente, uma inserção de 9 pb na posição 138 encontrada em 2 isolados, também foi descrita em 3 isolados provenientes de pacientes com FC da Escandinávia e em isolados obtidos *in vitro*, especialmente após crescimento aeróbio, sugerindo que esta possa ser uma região *hot-spot*. Outra mutação, transição A/G na posição 86 pb, também foi encontrada em isolados *in vitro* da Dinamarca e em revertentes não-mucoides de um estudo americano (CIOFU et al., 2008; DEVRIES; OHMAN, 1994). Tem sido demonstrado que revertentes *algT* tornam-se móveis e esta foi considerada uma medida de adaptação para permitir *P. aeruginosa* se locomover em direção a áreas com maior concentração de oxigênio (WYCKOFF et al., 2002).

Outro estudo também mostrou que linhagens com AlgT não funcional apresentam maior produção de fator de virulência, e isso é esperado uma vez que as células bacterianas gastam muita energia para produzir alginato (SAUTTER et al., 2012), que é direta e indiretamente envolvido na regulação da virulência e motilidade em *P. aeruginosa* (FOLKESSON et al., 2012; WOOD; LEECH; OHMAN, 2006). No entanto, foi sugerido que mutantes *algT* seriam menos bem-sucedidos no ambiente pulmonar fibrocístico e provavelmente seriam destruídos pela resposta imunológica do hospedeiro, uma vez que o AlgT desempenha um papel importante na adaptação ao estresse e à sensibilidade às espécies reativas de oxigênio (CIOFU et al., 2008).

A proteína AlgT regula os *operons algB*, *algR*, *algD* e *armZ*, dessa forma, vias alternativas poderiam explicar a reversão para o fenótipo não-mucoide no restante dos isolados (SAUTTER et al., 2012). Ciofu e colaboradores (2008) sugeriram que a investigação da produção de alginato nos meios de cultura LB e PIA poderiam sugerir mutações em *algB* e *algR*, o que explicaria a reversão *in vivo*. Isto seria possível uma vez que PIA contém triclosan, um forte indutor de alginato por mecanismo dependente de *algT*, *algB* e *algR* (WOOD et al., 2006). Portanto, a produção tipo III de alginato (sem produção de alginato) em placas de PIA pode caracterizar mutantes de um destes genes. Neste estudo, 7 (19%) dos

revertentes NM apresentaram fenótipo tipo III de produção de alginato e *algT* intacto, consequentemente, os resultados poderiam ser explicados por mudanças na sequência dos genes *algB* e/ou *algR*. Recentemente, uma protease putativa, AlgO, foi detectada regulando positivamente a produção de alginato, embora mais estudos sejam necessários para explicar como isso ocorre de fato, sabe-se que AlgO afeta a expressão de *algT* (SAUTTER et al., 2012).

Dezessete (46%) isolados NM provenientes de pacientes com FC com infecção crônica tinham o gene *mucA* intacto, sugerindo que estes isolados podem ser os isolados originais (selvagens) que infectaram os pacientes.

A partir deste estudo foi possível observar que, apesar da idade dos pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa*, o clima e a distância geográfica entre os isolados provenientes do HCFMRP-USP e os isolados da Argentina, América do Norte e Europa, mutações similares foram observados nos isolados. Isto reflete, provavelmente, um ambiente seletivo comum nos pulmões de pacientes com FC, que pode ser a resposta inflamatória que não é capaz de eliminar biofilmes de *P. aeruginosa* contendo alginato (BJARNSHOLT et al., 2009).

Foi demonstrado que *P. aeruginosa* de pacientes com FC são linhagens adaptadas. Isolados com mutações nos genes reguladores globais *mucA* e *lasR* são selecionados na fase de adaptação, durante os primeiros anos de colonização, em resposta ao ambiente estressante das vias aéreas destes pacientes (JORGENSEN et al., 2015; YANG et al., 2011).

Os isolados estudados apresentaram mutações em *lasR* mas nenhum apresentou mutações em *rhlR*, dessa forma, eles mantêm a capacidade de produzir vários fatores de virulência dependente de *rhlR*, que são importantes para causar danos ao hospedeiro, como raminolipídeos. Em um estudo realizado por Bjarnsholt e colaboradores (2010), foi observado que os isolados perdem a função de RhlR somente após vários anos de infecção crônica, em especial os isolados mucoides.

Durante a infecção crônica nos pulmões de pacientes com FC, *P. aeruginosa* pode sobreviver por longos períodos sobre a pressão seletiva imposta pelo sistema imune do hospedeiro e pela antibioticoterapia (BJARNSHOLT et al., 2009). Estudos demonstraram que isso é possível devido ao crescimento em forma de biofilme e evolução adaptativa mediada por variações genéticas, como os fenótipos adaptados caracterizados pela superprodução de alginato com ocorrência de variantes mucoides e desenvolvimento de hipermutabilidade

(BJARNSHOLT et al., 2009; CIOFU et al., 2012; OLIVER, 2000), dados também observados neste estudo.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os fenótipos mutantes conferem vantagem evolutiva às bactérias expostas ao ambiente desafiador das vias aéreas de fibrocísticos. Na coleção estudada, de isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com FC com infecção crônica por esta bactéria, foi verificada baixa prevalência (17%) de isolados com fenótipo hipermutante, Hp, quando comparada com isolados de pacientes com FC da Dinamarca, 54% (CIOFU et al., 2010). Entretanto, esta prevalência foi maior do que a observada em outro estudo brasileiro, que encontrou 6,2% de isolados hipermutantes na coleção estudada, considerando a frequência de mutação fortemente aumentada como critério (LUTZ, L. et al., 2013). A detecção de mutações nos genes *mutS* e *mutL* nos isolados Hp, confirma resultados anteriores que sugerem que a hipermutação é geralmente associada à alterações de sequência no sistema MMR (CIOFU et al., 2010). Apenas um outro estudo no Brasil investigou mutações em *mutS* em isolados de FC. Todas as mutações apresentadas no estudo brasileiro e em outros estudos realizados em diversas regiões do mundo foram diferentes das mutações relatadas no presente estudo, mostrando que não existem *loci* específicos para a ocorrência de mutação (CIOFU et al., 2010; LUTZ, L. et al., 2013).

A pressão seletiva exercida pelo uso contínuo de antibióticos em pacientes com FC pode resultar na ocorrência de linhagens resistentes (CIOFU et al., 2010). Dos 64 isolados, apenas 2 foram sensíveis, *in vitro*, a todos os nove antimicrobianos testados. Em 13 isolados foram observadas colônias no interior da zona de inibição de alguns dos antibióticos testados. Estas colônias foram coletadas, e outra determinação da CIM foi realizada. De um modo geral, elas eram mais resistentes do que a população original e apresentaram o mesmo perfil de mutação em *mutS* e *mutL* das linhagens originais (Apêndices 3 e 4).

Os dados gerados por este trabalho servem para compreendermos melhor as adaptações sofridas por *P. aeruginosa* para permanecer e colonizar por anos as vias aéreas dos pacientes com FC. Também servem para enriquecer a literatura nacional, que apresenta poucos trabalhos na área de microbiologia da FC. Diferenças foram observadas entre as regiões do país quanto à presença contínua ou não de um mesmo genótipo em pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa*. Os dados aqui apresentados também enriquecem a literatura internacional, pois 31 novas mutações foram descritas no operon *algTmucABD* e novas mutações descritas nos genes *mutS*, *mutL* e *lasR*. Apesar dos grandes avanços observados na

qualidade de vida e sobrevida dos pacientes brasileiros, os índices ainda estão muito abaixo dos observados em países desenvolvidos. O baixo perfil de resistência observado nos isolados, com poucos isolados MDR, hipermutantes, dentre outros, podem estar relacionados com a idade e tempo de infecção crônica dos pacientes brasileiros quando comparados com pacientes europeus, por exemplo.

6. CONCLUSÕES

- As técnicas de PCR e MALDI-TOF, utilizadas para de identificação de *P. aeruginosa*, apresentaram alta concordância;
- A porcentagem de pacientes fibrocísticos com infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* observada neste estudo é similar aos dados disponíveis na literatura, entretanto, a alta incidência em pacientes jovens merece atenção dos clínicos;
- Tipagem molecular por PFGE se mostrou útil para definição de infecção crônica/intermitente em associação com critérios clínicos;
- Linhagens idênticas ou altamente relacionadas em pacientes não relacionados por parentesco pode ser explicada por possível transmissão de linhagens bacterianas entre pacientes em alguma ocasião de contato ou por exposição a fontes comuns;
- Foi observada alta ocorrência dos genes de fatores de virulência pesquisados para grande maioria dos isolados de pacientes crônicos;
- Perfil de resistência aos antibióticos pesquisados dos isolados de *P. aeruginosa* foi baixo e está de acordo com as literaturas nacional e internacional e com a antibioticoterapia adotada no hospital;
- A resistência ao imipenem e meropenem observada nos isolados não ocorre pela produção de carbapenemases e a resistência às fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) não se dá pela presença de genes de resistência plasmideais, mas é importante monitorar estes mecanismos de resistência na população com FC;
- Nos pares de isolados NM e M de pacientes deste estudo, as mutações no gene *mucA* foram o principal mecanismo de conversão para o fenótipo mucoide; o mesmo foi observado nos isolados de pacientes que só apresentaram o fenótipo mucoide. Um dos fatores que explicam o fenótipo revertente NM destes pacientes foram as mutações encontradas no gene *algT*, resultados semelhantes aos encontrados em isolados de pacientes com FC da Escandinávia;
- O perfil de macrorrestrição do DNA genômico e mutações nos genes *mucA* e *mucD* confirmaram transmissão interpacientes;
- Foram detectadas novas mutações nos genes *mutS* e *mutL* que também suportam a ideia que hipermutação em *P. aeruginosa* está associada com mutações do sistema *mismatch* de reparo do DNA;
- O sistema *quorum sensing* dos isolados estudados está parcialmente prejudicado, devido às várias mutações no gene *lasR*, mas todos os isolados conservam o gene *rhlR* intacto,

que sustenta alguma atividade *quorum sensing* com produção de fatores de virulência importantes;

- Pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* com isolamento de outros BGN-NF apresentam maior alteração da função pulmonar do que pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* com ou sem isolamento de *S. aureus* concomitante;
- As alterações presentes no *operon algTmucABD*, *quorum sensing* e hipermutabilidade contribuem para a cronicidade dos pacientes com FC em relação à infecção por *P. aeruginosa*.

7. REFERÊNCIAS[2]

[2] As referências foram apresentadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 e organizadas pelo programa EndNote X7.

ANTHONY, M. et al. Genetic Analysis of Pseudomonas aeruginosa Isolates from the Sputa of Australian Adult Cystic Fibrosis Patients. **J Clin Microbiol,** v. 40, n. 8, p. 2772-2778, 2002.

ANTUNES, E. T. Epidemiologia. In: NETO, N. L. (Ed.). **Fibrose cística: enfoque multidisciplinar**. 2. Florianópolis, 2009. cap. 1, p.688.

BAUDRY, P. J. et al. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing Escherichia coli from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 63, n. 3, p. 319-26, Mar 2009.

BILTON, D. et al. Pulmonary exacerbation: towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials. **J Cyst Fibros,** v. 10 Suppl 2, p. S79-81, Jun 2011.

BJARNSHOLT, T. et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatr Pulmonol,** v. 44, n. 6, p. 547-58, Jun 2009.

BJARNSHOLT, T. et al. Quorum sensing and virulence of Pseudomonas aeruginosa during lung infection of cystic fibrosis patients. **PLoS One,** v. 5, n. 4, p. e10115, 2010.

BJARNSHOLT, T. et al. Interference of Pseudomonas aeruginosa signalling and biofilm formation for infection control. **Expert Rev Mol Med,** v. 12, p. e11, 2010.

BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from Cryptococcus neoformans. **FEMS Yeast Res,** v. 1, n. 3, p. 221-4, Dec 2001.

BOUCHER, J. C. et al. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. **J Bacteriol,** v. 178, n. 2, p. 511-23, Jan 1996.

BOUCHER, J. C. et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. **Infect Immun,** v. 65, n. 9, p. 3838-46, Sep 1997.

BRADBURY, R. S. et al. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. **J Med Microbiol,** v. 59, n. Pt 8, p. 881-90, Aug 2010.

BRAGONZI, A. et al. Sequence diversity of the mucABD locus in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. **Microbiology,** v. 152, n. Pt 11, p. 3261-9, Nov 2006.

BURMOLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunol Med Microbiol,** v. 59, n. 3, p. 324-36, Aug 2010.

CANTON, R. et al. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect,** v. 11, n. 9, p. 690-703, Sep 2005.

CANTON, R.; DEL CAMPO, R. Cystic fibrosis: deciphering the complexity. **Clin Microbiol Infect,** v. 16, n. 7, p. 793-7, Jul 2010.

CARDOSO, O.; ALVES, A. F.; LEITAO, R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in Pseudomonas aeruginosa isolates from a cystic fibrosis patient. **Int J Antimicrob Agents,** v. 31, n. 4, p. 375-9, Apr 2008.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J Antimicrob Chemother,** v. 60, n. 2, p. 394-7, Aug 2007.

CAVALLO, J. D. et al. Mechanisms of beta-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). **J Antimicrob Chemother,** v. 50, n. 6, p. 1039-43, Dec 2002.

CIOFU, O. et al. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. **Microbiology,** v. 154, n. Pt 1, p. 103-13, Jan 2008.

CIOFU, O. et al. Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants. **Microbiology,** v. 156, n. Pt 4, p. 1108-19, Apr 2010.

CIOFU, O. et al. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilm infections. **FEMS Immunol Med Microbiol,** v. 65, n. 2, p. 215-25, Jul 2012.

CIOFU, O. et al. Occurrence of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 49, n. 6, p. 2276-82, Jun 2005.

CLIMACO, E. C. Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter spp.. 08/07/2011. 77f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S23, v. 33, n. 1,. 2013.

COBAN, A. Y. et al. [Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients]. **Mikrobiyol Bul,** v. 45, n. 4, p. 602-8, Oct 2011.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. 2012. Disponível em: < http://www.cysticfibrosis.org.uk/ >.

DA SILVA FILHO, L. V. et al. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. **J Med Microbiol,** v. 50, n. 3, p. 261-7, Mar 2001.

DE BAETS, F. et al. Achromobacter xylosoxidans in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. **J Cyst Fibros,** v. 6, n. 1, p. 75-8, Jan 2007.

DETTMAN, J. R. et al. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of Pseudomonas aeruginosa. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 110, n. 52, p. 21065-70, Dec 24 2013.

DEVRIES, C. A.; OHMAN, D. E. Mucoid-to-nonmucoid conversion in alginate-producing Pseudomonas aeruginosa often results from spontaneous mutations in algT, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. **J Bacteriol,** v. 176, n. 21, p. 6677-87, Nov 1994.

DORING, G. et al. Distribution and transmission of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in a hospital ward. **Pediatr Pulmonol,** v. 21, n. 2, p. 90-100, Feb 1996.

ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **J Antimicrob Chemother,** v. 59, n. 2, p. 321-2, Feb 2007.

FELIZIANI, S. et al. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis chronic airways infections. **PLoS One,** v. 5, n. 9, 2010.

FERNANDEZ-OLMOS, A. et al. Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 8, p. 2761-5, Aug 2013.

FERREIRA, A. G. et al. Low-level resistance and clonal diversity of Pseudomonas aeruginosa among chronically colonized cystic fibrosis patients. **Apmis,** v. 123, n. 12, p. 1061-8, Dec 2015.

FINNAN, S. et al. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 12, p. 5783-92, Dec 2004.

FOLKESSON, A. et al. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nat Rev Microbiol,** v. 10, n. 12, p. 841-51, Dec 2012.

FUGERE, A. et al. Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus from adult cystic fibrosis patients. **PLoS One,** v. 9, n. 1, p. e86705, 2014.

GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **J Clin Microbiol,** v. 35, n. 11, p. 2977-80, Nov 1997.

GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatrics,** v. 23, n. 3, p. 545-9, Mar 1959.

HANSEN, C. R. et al. Inflammation in Achromobacter xylosoxidans infected cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros,** v. 9, n. 1, p. 51-8, Jan 2010.

HENRY, D. A.; SPEERT, D. P. *Pseudomonas*. In: VERSALOVIC, J.;CARROLL, K. C*., et al* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, 2011.

HUBERT, D. et al. Association between Staphylococcus aureus alone or combined with Pseudomonas aeruginosa and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros,** v. 12, n. 5, p. 497-503, Sep 2013.

JOHANSEN, H. K. et al. Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response. **J Cyst Fibros,** v. 11, n. 6, p. 525-31, Dec 2012.

JORGENSEN, K. M. et al. Diversity of metabolic profiles of cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa during the early stages of lung infection. **Microbiology,** v. 161, n. 7, p. 1447-62, Jul 2015.

LANOTTE, P. et al. Genetic features of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **J Med Microbiol,** v. 53, n. Pt 1, p. 73-81, Jan 2004.

LARTIGUE, M. F. et al. Identification of Streptococcus agalactiae isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol,** v. 47, n. 7, p. 2284-7, Jul 2009.

LEE, T. W. R. et al. Reduction in prevalence of chronic Pseudomonas aeruginosa infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. **Pediatric Pulmonology,** v. 37, n. 2, p. 104-110, 2004.

LOPES, A. J. et al. Is the type of chronic pulmonary infection a determinant of lung function outcomes in adult patients with cystic fibrosis? **Monaldi Arch Chest Dis,** v. 77, n. 3-4, p. 122-8, Sep-Dec 2012.

LUTZ, J. K.; LEE, J. Prevalence and antimicrobial-resistance of Pseudomonas aeruginosa in swimming pools and hot tubs. **Int J Environ Res Public Health,** v. 8, n. 2, p. 554-64, Feb 2011.

LUTZ, L. et al. Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 3, p. 927-30, Mar 2013.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev,** v. 15, n. 2, p. 194-222, 2002.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect,** v. 18, n. 3, p. 268-81, Mar 2012.

MAHENTHIRALINGAM, E. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. **Paediatr Respir Rev,** v. 15 Suppl 1, p. 13-5, Jun 2014.

MARTHA, B. et al. Factors associated with mucoid transition of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect,** v. 16, n. 6, p. 617-23, Jun 2010.

MARTINS, V. V. et al. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. **APMIS,** v. 122, n. 2, p. 92-100, Feb 2014.

MARVIG, R. L. et al. Convergent evolution and adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis. **Nat Genet,** v. 47, n. 1, p. 57-64, Jan 2015.

MATHEE, K.; MCPHERSON, C. J.; OHMAN, D. E. Posttranslational control of the algT (algU)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in Pseudomonas aeruginosa and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). **J Bacteriol,** v. 179, n. 11, p. 3711-20, Jun 1997.

MCCULLOCH, E. et al. Improved early diagnosis of Pseudomonas aeruginosa by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. **J Cyst Fibros,** v. 10, n. 1, p. 21-4, Jan 2011.

MENA, A. et al. Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. **J Bacteriol,** v. 190, n. 24, p. 7910-7, Dec 2008.

MICHELSEN, C. F. et al. Staphylococcus aureus alters growth activity, autolysis and antibiotic tolerance in a human host adapted Pseudomonas aeruginosa lineage. **J Bacteriol**, Sep 2 2014.

MILLER, M. R. et al. Standardisation of spirometry. **Eur Respir J,** v. 26, n. 2, p. 319-38, Aug 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R.;ROSENTHAL, K. S.*, et al* (Ed.). **Microbiologia Médica**. 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 33, p.329.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother,** v. 56, n. 3, p. 463-9, Sep 2005.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **J Intern Med,** v. 252, n. 2, p. 91-106, Aug 2002.

OLIVER, A. High Frequency of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis Lung Infection. **Science,** v. 288, n. 5469, p. 1251-1253, 2000.

PARK, C. H. et al. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 11, p. 3953-5, Nov 2006.

PEREZ, L. R. et al. When the resistance gets clingy: Pseudomonas aeruginosa harboring metallo-beta-lactamase gene shows high ability to produce biofilm. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 5, p. 711-4, May 2012.

PITONDO-SILVA, A. et al. High level of resistance to aztreonam and ticarcillin in Pseudomonas aeruginosa isolated from soil of different crops in Brazil. **Sci Total Environ,** v. 474, p. 155-8, 2014.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 70, n. 1, p. 119-23, May 2011.

POLLINI, S. et al. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo-beta-lactamase-producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype. **Clin Microbiol Infect,** v. 17, n. 8, p. 1272-5, Aug 2011.

PRESSLER, T. et al. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of pseudomonas aeruginosa are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. **J Cyst Fibros,** v. 5, n. 1, p. 9-15, Jan 2006.

PROESMANS, M. et al. Evaluating the "Leeds criteria" for Pseudomonas aeruginosa infection in a cystic fibrosis centre. **Eur Respir J,** v. 27, n. 5, p. 937-43, May 2006.

QIN, X. et al. Use of Real-Time PCR with Multiple Targets To Identify Pseudomonas aeruginosa and Other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli from Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol,** v. 41, n. 9, p. 4312-4317, 2003.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev,** v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, Jul 2007.

RATJEN, F. A. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. **Respir Care,** v. 54, n. 5, p. 595-605, May 2009.

RAU, M. H. et al. Early adaptive developments of Pseudomonas aeruginosa after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. **Environ Microbiol,** v. 12, n. 6, p. 1643-58, Jun 2010.

RODRIGUES, R. et al. Cystic fibrosis and neonatal screening. **Cad Saude Publica,** v. 24 Suppl 4, p. s475-84, 2008.

SANTOS, C. I. D. S. et al. Análise crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: estado da arte. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** v. 30, p. 286-298, 2004.

SAUTTER, R. et al. A complex multilevel attack on Pseudomonas aeruginosa algT/U expression and algT/U activity results in the loss of alginate production. **Gene,** v. 498, n. 2, p. 242-53, May 1 2012.

SCHABER, J. A. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. **J Med Microbiol,** v. 53, n. 9, p. 841-853, 2004.

SCHURR, M. J. et al. Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in Pseudomonas aeruginosa: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. **J Bacteriol,** v. 176, n. 11, p. 3375-82, Jun 1994.

SHERRILL, D. L. et al. Continuous longitudinal regression equations for pulmonary function measures. **Eur Respir J,** v. 5, n. 4, p. 452-62, Apr 1992.

SHWACHMAN, H.; LEUBNER, H.; CATZEL, P. Mucoviscidosis. **Adv Pediatr,** v. 7, p. 249-323, 1955.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Front Microbiol,** v. 6, p. 791, 2015.

SMITH, E. E. et al. Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 22, p. 8487-92, May 30 2006.

SPILKER, T. et al. PCR-Based Assay for Differentiation of Pseudomonas aeruginosa from Other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 5, p. 2074-2079, 2004.

STOLLAR, F. et al. Shwachman-Kulczycki score still useful to monitor cystic fibrosis severity. **Clinics (Sao Paulo),** v. 66, n. 6, p. 979-83, 2011.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol,** v. 33, n. 9, p. 2233-9, Sep 1995.

TRAN, A. et al. Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol,** v. 53, n. 8, p. 2473-9, Aug 2015.

VEESENMEYER, J. L. et al. Pseudomonas aeruginosa virulence and therapy: evolving translational strategies. **Crit Care Med,** v. 37, n. 5, p. 1777-86, May 2009.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases. **Respirology,** v. 15, n. 7, p. 1037-56, Oct 2010.

WOLSKA, K.; SZWEDA, P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. **Pol J Microbiol,** v. 58, n. 3, p. 255-60, 2009.

WOOD, L. F.; LEECH, A. J.; OHMAN, D. E. Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in Pseudomonas aeruginosa: Roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. **Mol Microbiol,** v. 62, n. 2, p. 412-26, Oct 2006.

WOOD, L. F.; OHMAN, D. E. Cell wall stress activates expression of a novel stress response facilitator (SrfA) under sigma22 (AlgT/U) control in Pseudomonas aeruginosa. **Microbiology,** v. 161, n. Pt 1, p. 30-40, Jan 2015.

WYCKOFF, T. J. et al. Static growth of mucoid Pseudomonas aeruginosa selects for non-mucoid variants that have acquired flagellum-dependent motility. **Microbiology,** v. 148, n. Pt 11, p. 3423-30, Nov 2002.

YANG, L. et al. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108, n. 18, p. 7481-6, May 3 2011.

ZOCCOLI, C. M. et al. Microbiologia. In: NETO, N. L. (Ed.). **Fibrose cística: enfoque multidisciplinar**. 2. Florianópolis, 2009. cap. 4, p.688.

APÊNDICES

Apêndice 1. Dados gerais de *P. aeruginosa* e dados clínicos dos pacientes com fibrose cística com colonização crônica

Idade/gênero paciente	Identificação *P. aeruginosa*	Fenótipo	Data isolamento	PFGE	Perfil de sensibilidade a antibióticos
18/F	FC-1	NM	06/07/11	A	S
	FC-1a	M	07/03/12	A1	S
10/M	FC-2	M	07/06/11	B	GEN^{I}, AMK^{I}
	FC-2b	M	12/07/11	B	GEN^{I}, AMK^{I}
	FC-2c	M	03/07/12	B	GEN^{I}, AMK^{I}
39/M	FC-3	M	06/07/11	C	CIP^{I}, LEV^{I}, IMI^{R}
	FC-3a	NM	07/03/12	C	*CIP^{I}, FEP^{I}, TZP^{I}, CAZ^{R}, TIC^{R}, ATM^{R}, LEV^{R}, IMI^{R}
	FC-3d (1)	M	27/06/12	C	*CIP^{I}, MEM^{I},TZP^{I}, FEP^{R}, CAZ^{R}, TIC^{R}, ATM^{R}, LEV^{R}, IMI^{R}
	FC-3d (2)	NM	27/06/12	C	*CIP^{I}, LEV^{I}, ATM^{I}
12/F	FC-9a-1	NM	03/08/11	D	S
	FC-9a-3	NM	03/08/11	E	IMI^{I}, AMK^{R}, GEN^{R}
12/M	FC-12-1	M	13/07/11	F	S
	FC-12-2	M	13/07/11	F	S
28/M	FC-19-1	M	13/07/11	G	S
	FC-19-3	NM	13/07/11	G	S
	FC-19-4	NM	13/07/11	G	S
	FC-19a (1)	M	06/06/12	G	S
	FC-19a (2)	NM	06/06/12	G	S
20/F	FC-22a	M	29/02/12	"d"	TIC^{I}
9/F	FC-26	NM	20/07/11	H	S
	FC-26b	M	18/04/12	I	*MEM^{I}, TIC^{R}, ATM^{R}
	FC-26c	NM	22/08/12	J	IMI^{I}, LEV^{I}, CIP^{I}
	FC-26d (1)	M	29/08/12	I	*TZP^{I}, IMI^{R}, ATM^{R}, TIC^{R}
	FC-26d (2)	NM	29/08/12	I1	*TZP^{R}, MEM^{R}, IMI^{R}, CAZ^{R}, ATM^{R}, TIC^{R}
0,6/M	FC-27	NM	20/07/11	H	S
	FC-27c	NM	16/05/12	H1	S
	FC-27d	NM	22/08/12	H1	TIC^{I}
5/M	FC-28	NM	27/07/11	E1	IMI^{I}, LEV^{I}, CIP^{I}
	FC-28c	NM	21/03/12	E1	IMI^{I}, LEV^{I}, CIP^{I}
	FC-28d	NM	22/05/12	E1	IMI^{I}, LEV^{I}, CIP^{I}
13/F	FC-33	NM	27/07/11	γ	S
	FC-33a	NM	29/02/12	γ	S
	FC-33b	NM	31/05/12	γ	S
6/F	FC-38	NM	03/08/11	K	S
	FC-38b	NM	29/02/12	K	TIC^{I}, IMI^{R}

Idade/gênero paciente	Identificação *P. aeruginosa*	Fenótipo	Data isolamento	PFGE	Perfil de sensibilidade a antibióticos
9/F	FC-40a	M	10/08/11	L	S
	FC-40b-1	M	14/03/12	L	S
	FC-40b-2	NM	14/03/12	L	TOB^{I}, GEN^{R}
	FC-40c	NM	24/05/12	M	TIC^{I}
12/M	FC-44	NM	03/08/11	N	S
20/M	FC-45-1	M	03/08/11	β	S
	FC-45-2	NM	03/08/11	β	LEV^{I}
	FC-45a (1)	M	06/06/12	β	AMK^{I}, GEN^{I}
	FC-45a (2)	NM	06/06/12	β	S
13/F	FC-47	M	03/08/11	O	LEV^{I}, TIC^{I}
	FC-47a	NM	14/03/12	O	ATM^{I}, TIC^{R}
	FC-47b	NM	05/06/12	O	*ATM^{I}, LEV^{R}, TIC^{R}
12/F	FC-58E	NM	20/06/12	"d"	TIC^{I}
25/M	FC-62a (1)	M	07/03/12	P	S
	FC-62a (2)	NM	07/03/12	P	S
31/F	FC-64	M	17/08/11	Q	S
	FC-64a	M	21/03/12	Q	S
9/M	FC-65b-1	NM	28/03/12	B	GEN^{I}
	FC-65b-3	NM	28/03/12	B	GEN^{I}, LEV^{R}
	FC-65c	NM	22/08/12	B	CIP^{R}, LEV^{R}
5/M	FC-71a	NM	28/03/12	R	TIC^{I}
9/M	FC-73b	NM	11/06/12	α	S
17/F	FC-78a	NM	18/04/12	S	IMI^{R}, CIP^{R}
	FC-78b	NM	04/07/12	S	IMI^{I}, CIP^{R}, LEV^{R}
	FC-78c	NM	24/09/12	S	CIP^{R}, LEV^{R}
1/M	FC-79a (1)	M	07/03/12	A	S
	FC-79a (2)	NM	07/03/12	A	S
	FC-79b	M	20/06/12	A2	*FEP^{I}, CAZ^{R}, ATM^{R}, TZP^{R}, TIC^{R}
23/M	FC-84 (1)	M	07/12/11	T	S
	FC-84 (2)	NM	07/12/11	T	S
20/M	FC-88	NM	14/12/11	U	S
4/M	FC-92	NM	29/02/12	V	S
31/F	FC-96 (A-2)	M	07/03/12	W	GEN^{I}, AMK^{R}
	FC-96a (A-2)	NM	21/03/12	W	*LEV^{I}, AMK^{R}, IMI^{R}, CAZ^{R}, ATM^{R}, TZP^{R}, GEN^{R}, CIP^{R}, TIC^{R}
9/F	FC-104-2	M	21/03/12	X	S
	FC-104-1	NM	21/03/12	X	IMI^{R}
	FC-104a	NM	30/05/12	X	IMI^{R}
16/M	FC-114	M	23/05/12	Y	S
	FC-114a	M	05/09/12	Y	ATM^{I}, TIC^{R}

Idade/gênero paciente	Identificação *P. aeruginosa*	Fenótipo	Data isolamento	PFGE	Perfil de sensibilidade a antibióticos
17/M	FC-116	M	22/08/12	Z	S

[1] Idade = anos, M = masculino, F = feminino, [2] M = mucoide, NM = não-mucoide, [3] Pulsotipos de P. aeruginosa com mesma letra são indistinguíveis ou altamente relacionados, "d" = DNA degradedo, [4] S = sensível a todos os antimicrobianos testados, I = resistência intermediária, R = resistência. TIM, ticarcilina-ácido clavulânico; TZP, piperacilina-tazobactam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; IMI, imipenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina.

Apêndice 2. Determinação da CIM (µg/mL) para os 8 isolados de *P. aeruginosa* MDR

P. aeruginosa MDR	Determinação da CIM (µg/mL)								
	TZP	CAZ	IMP	MER	ATM	CIP	AMK	TOB	COL
FC-3a	48/64	24	6	2	16	4	8	1,5	0,75
FC-3d (1)	64*	48	>32	6*	16	4/6	24	3	0,5
FC-26b	12/16	6	0,75	12*	32	3/4	12/16	1,5	1
26d (1)	64	16*	6	8*	24	1,5	6	0,75	0,5
26d (2)	96/> 256*	16	12*	> 32	24	1,5	16	0,75	1,5
FC-47b	8/12	6	0,75	0,19	24	4	4	1	1
FC-79b	4/6	3	3	0,38	6/8*	0,5	16/24	4	3/4
FC-96a (A-2)	1/1,5	4/6	8	6	0,75/1,5	4	>256	48	0,38

TZP: piperacilina-tazobactam, CAZ: ceftazidima; IMI: imipenem, MER: meropenem, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, AMK: amicacina, TOB: tobramicina, COL: colistina, *: subpopulações no halo de inibição, /: zona de inibição dupla.

Apêndice 3. Mutações observadas nos isolados de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
6A/M	Inserção GC em 583:*Stop codon*/Ala						
6B/NM	Inserção GC em 583:*Stop codon*/Ala			A409G:Ile/Val			
13/M					C211G:Arg/Gly		
14-2/NM	G409T:Gly/Cys				C211G:Arg/Gly, Inserção CAGA em 245:*Frameshift*, *stop codon* 700		
30/M	C35G:Ala/Gly, C364T:Pro/Ser, C367T:*Stop codon*						
31/NM	C35G:Ala/Gly, C364T:Pro/Ser, C367T:*Stop codon*						
39/M	C32T:Ser/Phe						
40/NM		A508G:Thr/Ala				C1609G:His/Asp	
45/NM			Inserção G em 41:*Frameshift*, ΔC57:Thr/His, G68A:Asp/Asn		A242G:Gln/Arg	C1609G:His/Asp	Inserção CA em 1335:*Frameshift*, *stop codon* 1711, C1295T:Ala/Val
47/M							
56/M	C382T:*Stop codon*						

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
57-2/NM	C382T:*Stop codon*	A86G:Tyr/Cys	C611G:Ala/Gly, A631G:Thr/Ala	A409G:Ile/Val, G1321A:Val/Ile			
58A/M	ΔC365:*Frameshift*, *stop codon* 385						
58B/NM	ΔC365:*Frameshift*, *stop codon* 385						
59/M	ΔG168:Frameshift, stop codon 283						
65/M	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439						
66/NM	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439		C338T:Ser/Phe				
79-2/NM							
84/NM							
94/NM							
110/NM						Δ11pb em 496:*Frameshift*, *stop codon* em 772	
114/M	ΔA568:*Frameshift*	A11G:Gln/Arg					
116/NM					A626G:Asn/Ser		
122A/M	C349T:*Stop codon*						
122/NM	C349T:*Stop codon*	Inserção 9pb em 140:*Frameshift*					
124/M	C349T:*Stop codon*						

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
126/NM			A631G:Thr/Ala, C643T:Arg/Cys	G1321A:Val/Ile			
138/M	ΔA578:*Frameshift*				Δ58pb em 321:*Frameshift*, *stop codon* 325		
140/NM	ΔA578:*Frameshift*	Inserção 9pb em 138:*Frameshift*			Δ58pb em 321:*Frameshift*, *stop codon* 325		
142-1/M	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439					A484G:Thr/Ala, G581A:Arg/His, Inserção 9pb em 767:*Frameshift*	C1273A:Pro/Thr
142-2/NM	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439					A484G:Thr/Ala, G581A:Arg/His, Inserção 9pb em 767:*Frameshift*	C1273A:Pro/Thr
154/NM							
157/M	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439						
158/NM	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439	A86G:Tyr/Cys					
170/M	T45G:Asp/Glu				C665T:Thr/Ile		
171/NM	T45G:Asp/Glu	ΔG157:*Frameshif t*, *stop codon* 295		A409G:Ile/Val	C665T:Thr/Ile		

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
176/NM					C211G:Arg/Gly, Inserção CAGA em 245:*Frameshift, stop codon* 700		
180/NM							
182/NM				A409G:Ile/Val			
187/NM							
191/M	Inserção GC em 583:*Stop codon*/Ala						
192/NM	Inserção GC em 583:*Stop codon*/Ala	G49A:Gly/Arg		A409G:Ile/Val			
201/M	C137T:Ala/Val, ΔA437:*Frameshift, stop codon* 439						
202/NM	C137T:Ala/Val, ΔA437:*Frameshift, stop codon* 439	A86G:Tyr/Cys		A409G:Ile/Val			
209/M	ΔG357:*Frameshift, stop codon* 385						
210/NM	ΔG357:*Frameshift, stop codon* 385	ΔC556:*Frameshif t*		G1321A:Val/Ile	Δ98pb em 36:*Frameshift, stop codon* 598		
211/NM							
212/NM							

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
216/M	ΔC310:*Frameshift*, *stop codon* 385						
217/NM	ΔC310:Framieshift, stoip *codon* 385	C133T:*Stop codon*					
219/M	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439				C224T:Thr/Met, Δ4pb em 461:*Frameshift*, *stop codon* 526		C1847T:Thr/Ile
219A/NM	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439				C224T:Thr/Met, Δ4pb em 461:*Frameshift*, *stop codon* 526		C1847T:Thr/Ile
233/M	C424T:Stop codon						
235/M	Inserção C em 238:*Frameshift*, *stop codon* 478						
236/NM	Inserção C em 238:*Frameshift*, *stop codon* 478			A409G:Ile/Val			
245A/M	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439						
245B/NM	ΔG430:*Frameshift*, *stop codon* 439	C528A:Phe/Leu					
250/M	ΔC347:*Frameshift*, *stop codon* 385						

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
251/NM	ΔC347:*Frameshift, stop codon* 385	A176G:Tyr/Cys					
253/M	ΔG430:*Frameshift, stop codon* 439		A631G:Thr/Ala	C1310G:Thr/Ser, G1321A:Val/Ile	C320T:Ala/Val	C560T:Ala/Val, G2341A:Ala/Thr	Inserção 11pb em 1569:*Frameshift, stop codon* em 1720, G1216A:Ala/Thr
254/NM	ΔG430:*Frameshift, stop codon* 439		A631G:Thr/Ala	C1310G:Thr/Ser, G1321A:Val/Ile	C320T:Ala/Val	C560T:Ala/Val, G2341A:Ala/Thr	Inserção 11pb em 1569:*Frameshift*, G1216A:Ala/Thr
258/NM					G560A:*Stop codon*		
259/M	C352T:*Stop codon*				A463G:Lys/Glu		
260/NM			ΔT733:*Frameshift, stop codon* 868		A463G:Lys/Glu		
45 MER/NM						C1609G:His/Asp	Inserção CA em 1335:*Frameshift, stop codon* 1711, C1295T:Ala/Val
45 CIP/NM						C1609G:His/Asp	Inserção CA em 1335:*Frameshift, stop codon* 1711, C1295T:Ala/Val
110 CAZ/NM						Δ11pb em 496:*Frameshift, stop codon* em 772	

***P. aeruginosa*/ fenótipo**	***mucA* (64)**	***algT* (64)**	***mucB* (18)**	***mucD (18)***	***lasR* (64)**	***mutS* (18)**	***mutL* (18)**
110 CIP/NM						Δ11pb em 496:*Frameshift, stop codon* em 772	
142-2 ATM/NM						A484G:Thr/Ala, G581A:Arg/His, Δ9pb em 767: *Frameshift*	C1273A:Pro/Thr
219 ATM/M							C1847T:Thr/Ile
219A ATM/NM							C1847T:Thr/Ile

Apêndice 4. Determinação da CIM de 9 antimicrobianos para subpopulações de *P. aeruginosa*

Isolados[#]	**TZP**	**CAZ**	**IMI**	**MER**	**ATM**	**CIP**	**AMK**	**TOB**	**COL**
6A AMK	1	3	1	0,094	0,75	1,5	> 256	24	1
13 AMK	3	6	1	0,064	1,5	0,75	> 256	24	0,75
14-2 CIP	8	8	1	0,064	3	12*	96*	16	
39 ATM	24	> 256	1	0,5	> 256	0,125	0,25	0,25	3
45 MER	1,5	2	> 32	3	1,5	2	16	4	1
65 TZP	64	24	4	6	24	2	8/12	1	0,75
66 TZP	> 256	16	12/>32	> 32	24	2	8	0,75	2
110 CAZ	64*	24*	12	6	24	0,75	48	8	1,5
142-2 ATM	32	24	12	3	12	2	64	8	0,38
187 CIP	3	3	8	3	4	12*	16	3	1
219 ATM	>256	>256	>32	12	128*/>256	4	>256	32	0,38
219A ATM	48*/>256	48/>256	6	1,5	32	1,5	96*/>256	24*	0,38
258 IMI	0,75	1	12	2	0,38	16*	32	8	1

[#]: subpopulações retiradas de dentro do halo de inibição do respectivo antimicrobiano, **TZP**: piperacilina-tazobactam, **CAZ**: ceftazidima; **IMI**: imipenem, **MER**: meropenem, **ATM**: aztreonam, **CIP**: ciprofloxacina, **AMK**: amicacina, **TOB**: tobramicina, **COL**: colistina, *****: subpopulações no halo de inibição, /: zona de inibição dupla.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer ético do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 56/2011
kms

Ribeirão Preto, 20 de julho de 2011.

À
PROFA. DRA. ANA LÚCIA DA COSTA DARINI
Pós-graduandas Carolina Paulino Da Costa Capizzani e
Natália Candido Caçador
DACTB / FCFRP / USP

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP **aprovou**, em sua 89ª Sessão Ordinária, realizada em 20/05/2011, o projeto de pesquisa intitulado "EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA ENVOLVENDO BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS NÃO FERMENTADORAS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 210.**

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 – Fax: (16) 3602-4892

Anexo 2. Parecer ético do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2011

Projeto de pesquisa: "EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES BACTERIANAS EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA ENVOLVENDO BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS NÃO FERMENTADORAS".

Pesquisadoras responsáveis: Ana Lúcia da Costa Darini (Orientadora) e Carolina Paulino da Costa Capizzani e Natália Candido Caçador (Mestrandas da FCFRP).

Instituição Proponente:Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

Drª Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador da Unidade de Pesquisa Clínica – UPC - HCFMRP-USP

1/1

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do HCFMRP-USP
(16) 3602-2228
cep@hcrp.fmrp.usp.br

Anexo 3. Termos de consentimento livre e esclarecido entregue aos pais ou responsáveis pelos pacientes com FC.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO:

"Epidemiologia clássica e molecular de bactérias não fermentadoras isoladas de pacientes com fibrose cística"

Sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e tenho uma investigação científica junto com os médicos do Ambulatório de Fibrose Cística. Quero estudar as bactérias que causam infecção ou catarro com pus em todos os pacientes com fibrose cística atendidos neste hospital, por isso convido seu(sua) filho(a) a participar desta pesquisa. Como vocês sabem, a cada 2 meses já é feito uma coleta de escarro de seu filho(a), e eu queria usar este mesmo escarro para pesquisar a bactéria que está causando infecção pulmonar nele(a), sem ter a necessidade de colher outro escarro. Para este estudo não será necessário examinarmos seu filho(a), e tudo será feito como já era feito antes neste ambulatório, só usarei o escarro, depois que o laboratório do hospital não mais precisar dele. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estou fazendo; leia atentamente e, caso tenha dúvidas, vou esclarecê-las (se não souber ler, fique tranquilo(a) que leio para você). Se concordar em usarmos o material colhido de seu filho(a), o documento será assinado e só então darei início à pesquisa. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para mim, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você, nem ao seu(sua) filho(a).

Eu, ...(inserir o nome), RG ....., CPF....., nascido(a) em _____ / _____ /_____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que o material colhido (escarro, secreção de orofaringe) do meu(minha) filho(a)..... nascido(a) em _____ / _____ /_____, seja usado no estudo "*Epidemiologia clássica e molecular de bactérias não fermentadoras isoladas de pacientes com fibrose cística*". Declaro que obtive todas as informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas e estou ciente que:

1) O estudo poderá beneficiar meu(minha) filho(a) e outros pacientes com fibrose cística, identificando as bactérias que causam infecções e os antibióticos que agem sobre elas, fornecendo informações aos médicos responsáveis pelo atendimento do meu(minha) filho(a);
2) A coleta de escarro será realizada no ambulatório de fibrose cística e ou enfermaria de FC do HCFMRP-USP conforme tem sido feita rotineiramente, caso meu(minha) filho(a) já esteja em acompanhamento neste hospital. Não será feita nenhuma outra coleta além da de costume;
3) Se meu(minha) filho(a) não estiver ainda em acompanhamento, e se ele(a) tiver condições de colher escarro, este escarro também será colhido em vasilhinhas de plásticos, sem qualquer ajuda de aparelhos cirúrgicos. Se meu(minha) filho(a) não conseguir colher, um cotonete esterilizado pode ajudar a colher escarro ou saliva da garganta dele(a);
4) Essas coletas serão feitas e em nada influenciarão no atendimento de meu(minha) filho(a); não vai curá-lo(a) e não causará nenhum problema;

5) A participação neste projeto não tem objetivo de submeter a um tratamento terapêutico ou mudar os remédios que ele(ela) vem tomando e será sem custo algum para mim;
6) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
7) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu(minha) filho(a), e não irá interferir no atendimento ou tratamento médico;
8) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em segredo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu(minha) filho(a) sejam mencionados;
9) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa;
10) Eu receberei uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar minhas dúvidas sobre o projeto e minha participação, agora ou a qualquer momento.

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Ribeirão Preto, de de 2011

_____
Responsável: assinatura / nome / telefone / grau de parentesco

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pela Pesquisa:

_____
Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini

Assinatura dos responsáveis pela execução do Projeto e apresentação do TCLE:

_____
Carolina Paulino da Costa Capizzani

_____
Natália Candido Caçador

Farmacêuticas e alunas da FCFRP-USP
Telefone para contato: 16 3602 4290

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(para maiores de 18 anos)

ESTUDO:

"Epidemiologia clássica e molecular de bactérias não fermentadoras isoladas de pacientes com fibrose cística"

Sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e tenho uma investigação científica junto com os médicos do Ambulatório de Fibrose Cística. Quero estudar as bactérias que causam infecção ou catarro com pus em todos os pacientes com fibrose cística atendidos neste hospital, por isso convido você a participar desta pesquisa. Como você sabe, a cada 2 meses já é feito uma coleta de escarro sua, e eu quero usar este mesmo escarro para pesquisar a bactéria que está causando infecção pulmonar em você, sem ter a necessidade de colher outro escarro. Para este estudo não será necessário te examinar, e tudo será feito como já era feito antes neste ambulatório, só usarei o escarro, depois que o laboratório do hospital não mais precisar dele. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estou fazendo; leia atentamente e, caso tenha dúvidas, vou esclarecê-las (se não souber ler, fique tranquilo(a) que leio para você). Se concordar em usarmos o material colhido de você, o documento será assinado e só então darei início à pesquisa. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para mim, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, ...(inserir o nome), RG....., CPF....., nascido(a) em _____ / _____ /_____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "Epidemiologia clássica e molecular de bactérias não fermentadoras isoladas de pacientes com fibrose cística". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

1) O estudo poderá beneficiar a mim e aos outros pacientes com fibrose cística, identificando as bactérias que causam infecções e os antibióticos que agem sobre elas; fornecendo informações aos médicos que me atendem;
2) A coleta de escarro será realizada no ambulatório de fibrose cística e ou enfermaria de FC do HCFMRP-USP conforme tem sido feita rotineiramente, caso eu já esteja em acompanhamento neste hospital. Não será feito nenhuma outra coleta além da de costume;
3) Se eu não estiver ainda em acompanhamento, e tiver condições de colher escarro, este escarro será colhido em vasilhinhas de plásticos, sem qualquer ajuda de aparelhos cirúrgicos. Se eu não conseguir colher, um cotonete esterilizado pode ajudar a colher escarro ou saliva da minha garganta;
4) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará no meu atendimento; não irá me curar e nem causará nenhum problema a mim;
5) A participação neste projeto não tem objetivo de submeter a um tratamento terapêutico e será sem custo algum para mim;
6) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
7) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, e não irá interferir no atendimento ou tratamento médico;

8) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em segredo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que o meu nome não seja mencionado;
9) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa;
10) Eu receberei uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar minhas dúvidas sobre o projeto e minha participação, agora ou a qualquer momento.

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Ribeirão Preto, de de 2011

_____
Responsável: assinatura / nome / telefone / grau de parentesco

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pela Pesquisa:

_____
Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini

Assinatura dos responsáveis pela execução do Projeto e apresentação do TCLE:

_____
Carolina Paulino da Costa Capizzani

_____
Natália Candido Caçador

Farmacêuticas e alunas da FCFRP-USP
Telefone para contato: 16 3602 4290