UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose
cística envolvendo bactérias gram-negativas não fermentadoras
emergentes**

Carolina Paulino da Costa Capizzani

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com
fibrose cística envolvendo bactérias gram-negativas não
fermentadoras emergentes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Carolina Paulino da Costa Capizzani

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2013

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.

Paulino da Costa Capizzani, Carolina

Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose cística envolvendo bactérias gram-negativas não fermentadoras emergentes. Ribeirão Preto, 2013.

80 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, 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. Epidemiologia. 3. Patógenos emergentes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Carolina Paulino da Costa Capizzani

Título de trabalho: Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose cística envolvendo bactérias gram-negativas não fermentadoras emergentes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Carolina Paulino da Costa Capizzani

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. (a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. (a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. (a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha mãe,
minha maior incentivadora e amiga em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini, pela oportunidade em trabalhar em seu laboratório, pela confiança depositada em mim e por todos os momentos de compreensão e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy, professor do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e ao Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ, pela disponibilização das linhagens controle para o estudo.

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.

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

À Ludmilla Tonani e Joseane Cristina Ferreira, técnicas do laboratório, pela colaboração em vários procedimentos práticos e conselhos durante a execução deste trabalho.

Ao Rubens Eduardo da Silva, pelo auxílio técnico laboratorial.

Aos amigos do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, André, Eduardo, Leonardo, Leila, Renata, Natália, Juliana e Milena, pelo carinho, acolhimento e auxílios científicos.

À Rosana Florêncio e Henrique Theodoro, funcionários do Serviço de Pós-graduação desta Unidade, por todos os serviços prestados.

À CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior), pelo auxílio financeiro.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela atenção dada ao projeto de pesquisa durante a análise e aprovação do projeto de pesquisa referente a este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação, Biociências Aplicadas à Farmácia, pela oportunidade concedida.

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.

***“O segredo é não correr atrás das borboletas...é
cuidar do jardim para que elas venham até você.”***

(Mário Quintana)

RESUMO

CAPIZZANI, C. P. C. **Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose cística envolvendo bactérias gram-negativas não fermentadoras emergentes.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A infecção crônica do trato respiratório é responsável pela grande morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC). *P. aeruginosa*, *S. aureus* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) estão entre os patógenos mais encontrados em pulmões de pacientes com FC, mas também são encontradas outros bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) emergentes como *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia* sp., *Pandoraea* sp., entre outros. A correta caracterização desses patógenos impacta na sobrevida e qualidade de vida desses pacientes, e é um dos grandes desafios para laboratórios de microbiologia clínica devido à similaridade fenotípica entre eles. Este estudo tem como objetivo avaliar e propor estratégias e esquema de identificação acessível à maioria dos laboratórios para a identificação de BGN-NF emergentes e listar bactérias isoladas de pacientes com FC atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (HCFMRP-USP), com ênfase nos BGN-NF emergentes. Foram utilizados meios de cultura seletivos, reação em cadeia da polimerase (PCR), análise de polimorfismos (RFLP). Foram coletadas 264 amostras clínicas de 107 pacientes com FC no HCFMRP-USP entre julho/2011 a setembro/2012. Inicialmente, para selecionar os BGN-NF dos pacientes com FC, deve ser realizada triagem fenotípica (coloração de Gram, teste da oxidação/fermentação de glicose e produção de oxidase). Devido à dificuldade de identificação dos BGN-NF emergentes por provas bioquímicas, deve ser realizada PCR com DNA destes microrganismos para identificação de gênero e/ou espécie, utilizando os *primers* específicos, nas condições estabelecidas pela padronização, a qual foi realizada para aumentar a especificidade de alguns *primers* que apresentaram amplificação de produtos inespecíficos. Provas bioquímicas convencionais devem ser realizadas para confirmar gêneros e identificar algumas espécies não detectadas por PCR, e para resultados fenotípicos diferente da PCR deve ser realizado API® - NE. Para identificação das bactérias do CBc, deve ser realizado análise de polimorfismo, o qual se mostrou mais efetivo do que PCR para identificação de espécies e genótipos. Dos 107 pacientes, 17 estavam colonizados por bactérias do CBc, 13 colonizados por *Achromobacter* sp., 10 colonizados por *S. maltophilia*, 2 colonizados por *Ralstonia* sp. e um paciente colonizado por *Cupriavidus* sp. e *Pandoraea* sp., com um isolamento de cada gênero. Os genótipos mais prevalentes foram *B. cenocepacia* IIIB, seguido de *B. vietnamiensis*, *B. pyrrocinia*, *B. cepacia* e *B. multivorans*. A maioria dos BGN-NF esteve presente em crianças com idade até 17 anos. Os meios de cultura seletivos foram extremamente necessários por permitir o isolamento de vários BGN-NF, não isolados em outros meios de cultura utilizados. A metodologia de identificação empregada foi capaz de identificar todos BGN-NF isolados e pode ser muito útil e acessível à maioria dos laboratórios clínicos.

Palavras-chave: Fibrose cística, Epidemiologia, Patógenos emergentes

ABSTRACT

CAPIZZANI, C. P. C. **Epidemiology of bacterial infections in patients with cystic fibrosis involving emergent non-fermenting gram-negative bacteria.** 2013. 80 f. Dissertation (Master's). Ribeirão Preto School of Pharmacological Sciences – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Chronic infection of the respiratory tract accounts for the high rate of morbidity and mortality of patients suffering from cystic fibrosis (CF). *P. aeruginosa*, *S. aureus* and bacteria of the *Burkholderia cepacia* (BCc) complex are among the pathogens most commonly found in the lungs of CF patients, but other emergent non-fermenting gram-negative bacilli (NFGNB), such as *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia* sp., *Pandoraea* sp., among others, are found as well. The correct identification of these pathogens affects the survival rate of patients and, due to their phenotypic similarity, presents itself as one of the great challenges that clinical microbiology laboratories face. The purpose of this study is to evaluate and propose strategies and methods that are accessible to the majority of laboratories for identifying emergent NFGNBs and listing isolated bacteria (with a focus on emergent NFGNB) in CF patients receiving routine care at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP (HCFMRP-USP). The study employed selective culture media, polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). From July 2011 to September 2012, 264 clinical samples were gathered from 107 CF patients at the HCFMRP-USP. A phenotypic screening (Gram staining, oxidase production and oxidation/fermentation of glucose) should be conducted as the first step to select the NFGNBs of CF patients. Due to the difficulty in identifying emergent NFGNBs via biochemical tests, a PCR using the DNA of these microorganisms should be carried out to identify their genus and/or species. The PCR should utilize the specific *primers*, at conditions established by this study, which was performed to increase the specificity of some *primers* that showed nonspecific amplification products. Conventional biochemical tests should be conducted to confirm genera and identify some species that the PCR failed to detect, and, in the case of phenotypic results that differ from those of the PCR, an API bacterial identification test should be conducted. RFLP analysis proven more effective than PCR in identifying species and genomovars, should be conducted to identify BCc bacteria. Of the 107 patients, 17 had positive cultures for BCc, 13 for *Achromobacter* sp., 10 for *S. maltophilia*, two for *Ralstonia* sp. and one patient had positive culture for *Cupriavidus* sp. and *Pandoraea* sp., with the genera isolated from each other. The most prevalent genomovar was the *B. cenocepacia* IIIB, followed by *B. vietnamiensis*, *B. pyrocinia*, *B. cepacia* and *B. multivorans*. The majority of the NFGNBs were present in children up to age 17. Selective culture media were extremely necessary to allow the isolation of various NFGNBs that could not be isolated via alternative culture media. The identification methodology employed enabled the identification of all isolated NFGNBs and can be very useful and accessible to the majority of clinical laboratories.

Key words: Cystic fibrosis, Epidemiology, Emergent pathogens

RESUMEN

CAPIZZANI, C. P. C. **Epidemiología de las infecciones bacterianas en pacientes con fibrosis quística con bacterias gram-negativas no fermentadoras emergentes. 2013.** 80 f. Disertación (Maestría). Facultad de Farmacia de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

La infección crónica del tracto respiratorio es responsable de la gran morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística (FC). *P. aeruginosa*, *S. aureus* y bacterias del complejo *Burkholderia cepacia* (CBc) están entre los patógenos más encontrados en el pulmón de pacientes con FC pero también se encuentran otros bacilos gram-negativos no fermentadores (BGN-NF) emergentes como *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia* sp., *Pandoraea* sp., entre otros. La correcta caracterización de estos patógenos tiene un impacto en la supervivencia y calidad de vida de dichos pacientes y es uno de los grandes desafíos para los laboratorios de microbiología clínica debido a la similitud fenotípica entre ellos. Este estudio tiene como objetivo evaluar y proponer estrategias y un esquema de identificación accesible para la mayoría de los laboratorios para la identificación de BGN-NF emergentes y enumerar las bacterias aisladas de pacientes con FC atendidos en el hospital de las clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto – USP (HCFMRP-USP), con especial énfasis en los BGN-NF emergentes. Se utilizaron medios de cultivo selectivos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de polimorfismos (RFLP). Se recogieron 264 muestras clínicas de 107 pacientes con FC en HCFMRP-USP entre julio/2011 y septiembre/2012. Inicialmente, para seleccionar los BGN-NF de los pacientes con FC, hay que realizar un triage fenotípico (coloración de Gram, test de oxidación/fermentación de glucosa y producción de oxidasa). Debido a la dificultad de identificación de los BGN-NF emergentes por pruebas bioquímicas, se debe realizar una PCR con ADN de estos micro organismos para la identificación del género y/o especie, utilizando los *primers* específicos, en las condiciones establecidas por la patronización, la cual fue realizada para aumentar la especificidad de algunos *primers* que presentaban una amplificación de productos inespecíficos. Las pruebas bioquímicas convencionales deben ser realizadas para confirmar el género e identificar algunas especies no detectadas por la PCR, y para resultados fenotípicos diferentes de la PCR se debe realizar un API® - NE. Para la identificación de las bacterias del CBc, se debe realizar un análisis de polimorfismo, el cual resultó ser más efectivo que la PCR para la identificación de especies y genomovares. De los 107 pacientes, 17 estaban colonizados por bacterias del CBc, 13 colonizados por *Achromobacter* sp., 10 colonizados por *S. maltophilia*, 2 colonizados por *Ralstonia* sp. y un paciente colonizado por *Cupriavidus* sp. e *Pandoraea* sp., con un aislamiento de cada género. Los genomovares mas prevalentes fueron *B. cenocepacia* IIIB, seguido de *B. vietnamiensis*, *B. pyrrocinia*, *B. cepacia* e *B. multivorans*. La mayoría de los BGN-NF estuvieron presentes en niños con edades de hasta 17 años. Los medios de cultivos selectivos fueron extremadamente necesarios para permitir el aislamiento de varios BGN-NF, no aislados en otros medios de cultivo utilizados. La metodología de identificación empleada hizo que fuera posible identificar todos los BGN-NF aislados y puede ser muy útil y accesible para la mayoría de los laboratorios clínicos.

Palabras-clave: Fibrosis quística, epidemiología, patógenos emergentes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da localização do gene e da proteína responsáveis pela FC.....	2
Figura 2. Fluxograma das atividades realizadas no HCFMRP-USP e LEBEM	15
Figura 3. Fragmentos de restrição do gene <i>recA</i> amplificado de linhagens padrão gerados por digestão com <i>HaeIII</i>	31
Figura 4. Esquema de identificação de BGN-NF isolados de pacientes com FC	32
Figura 5. Distribuição da idade dos 107 pacientes, por gênero.....	33
Figura 6. Microrganismos isolados dos 107 pacientes com FC atendidos ou internados no HCFMRP-USP	34
Figura 7. BGN-NF emergentes isolados de 36 pacientes com FC atendidos ou internados no HCFMRP-USP	35
Figura 8. Número de pacientes colonizados por <i>P. aeruginosa</i> e BGN-NF emergentes	36
Figura 9. Distribuição dos genotipos de bactérias do CBc em pacientes com FC	37
Figura 10. Distribuição dos microrganismos isolados nas diferentes faixas etárias	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens controle utilizadas nos experimentos	16
Tabela 2. Características fenotípicas para identificação de gêneros e espécies de BNG-NF emergentes.....	18
Tabela 3. Sequências iniciadoras utilizadas na realização da PCR	19
Tabela 4. Resultado da amplificação para os <i>primers</i> relacionados com gêneros/espécies de linhagens padrão de BGN-NF emergentes	24
Tabela 5. Resultado da amplificação para os <i>primers</i> relacionados com as espécies de bactérias do CBc.....	27
Tabela 6. Triagem e identificação dos BNG-NF emergentes	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABC	<i>ATP – Binding Cassete</i>
AS	Ágar sangue
ASS	Assacarolítico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BC	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective agar
BGN-NF	Bacilo gram-negativo não fermentador
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosine
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CBIA	<i>pili</i> do complexo <i>B. cepacia</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
Cl⁻	Íons cloro
Cit	Citrato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo tri-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>esmR</i>	<i>B. cepacia epidemic strain marker</i>
ET12	<i>Electrophoretic type 12</i>
EUA	Estados Unidos da América
F508del	Deleção de resíduo de fenilalanina no códon 508
FC	Fibrose Cística
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
G	Guanina

GBEFC	Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HCl	Cloreto de hidrogênio
HUPE-UERJ	Hospital Universitário Pedro Ernesto – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IFF– FIOCRUZ	Instituto Fernandes Figueira - Fundação Oswaldo Cruz
K	Potássio
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Kilodalton
Lac	Lactose
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
LGM	<i>Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms</i>
M	Molar
Mal	Maltose
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>
MC	Ágar MacConkey
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
mM	Milimolar
N	Número
Na⁺	Íons sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Não determinado
Ng	Nanograma
Nit	Nitrato
Nm	Nanômetro
O	Oxidativo
O/F	Oxidação/fermentação

OXI	Oxidase
P.a.	<i>P. aeruginosa</i>
PAB	<i>Pseudomonas</i> ágar base
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio
Pmol	Picomol
Pos	Positivo
PYR	L-pirrolidonil-B-naftilamida
Q	Quantidade
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
S	Segundos
Sac	Sacarose
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Temp	Temperatura
U	Unidade
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
V	Variável
Xil	Xilose

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
®	<i>Marca registrada</i>
B	Beta
X	Vezes
°C	Graus Centígrados
Λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
%	Porcento
+	Positivo
-	Negativo
G	Giro

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
Lista de símbolos	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fibrose Cística	2
1.1.1. Fibrose cística no Brasil	5
1.1.2. Bactérias envolvidas	5
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Pacientes envolvidos.....	14
3.2. Coleta dos espécimes clínicos	14
3.3. Processamento dos espécimes clínicos e dos isolados	15
3.4. Padronização da identificação de gêneros/espécies dos isolados	16
3.5. Triagem e identificação fenotípica dos isolados.....	17
3.6. Identificação genotípica.....	19
3.6.1. Reação em Cadeia da Polimerase	19
3.6.2. Análise de polimorfismos	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Padronização da identificação em gênero/espécie.....	23
4.2.BGN-NF dos pacientes atendidos no HCFMRP-USP	29
4.2.1. Identificação em gênero/espécie.....	29
4.2.2. Análise dos polimorfismos de isolados do CBc	31
4.3. Esquema de identificação de BGN-NF emergentes	32
4.4. Dados epidemiológicos.....	33
4.4.1. Pacientes envolvidos.....	33
4.4.2. Microrganismos identificados	33
4.4.3. Pacientes colonizados por <i>P. aeruginosa</i> e BGN-NF emergentes	36
4.4.4. Prevalência de bactérias isoladas por faixa etária	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	66
ANEXOS.....	69

1.INTRODUÇÃO

1.1 Fibrose cística

O conhecimento sobre fibrose cística (FC) vem passando por importantes transformações desde os primeiros anos após sua descrição em 1938. Logo quando foi descoberta, era tida como uma doença pouco frequente e, consequentemente, pouco diagnosticada; os pacientes apresentavam sobrevida mediana baixa sendo que apenas poucos chegavam à vida adulta. Atualmente, encontra-se um aumento significativo na sobrevida destes pacientes sendo o diagnóstico diferencial um dos mais comumente investigados em pacientes com doença pulmonar crônica (ANTUNES, 2009).

FC consiste em uma doença genética comum causada por mutação do gene regulador de condutância transmembranar da FC, o qual se encontra localizado no braço longo do cromossomo 7 no *locus* 7q31, contém 250 kb e codifica proteína de 1480 aminoácidos com massa molecular de 168.138 KDa (proteína CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*). Essa proteína pertence ao grupo ABC (*ATP – Binding Cassete*), participando da regulação do transporte de íons, e apresenta diversos domínios, sendo o domínio de ligação nucleotídica 1 (codificado pelos exons 9-12 e 19-23) o que confere atividade ao canal de cloreto regulado por cAMP. A regulação deste canal iônico de cloro regula o balanço hídrico e iônico através do epitélio. Localiza-se na membrana apical das células epiteliais de alguns órgãos, como intestino, vias biliares, aparelho reprodutor, glândulas sudoríparas, pâncreas, túbulos renais e aparelho respiratório (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008; LUCA; MENEZES; OCAMPOS, 2009).

Figura 1. Ilustração da localização do gene e da proteína responsáveis pela FC. **A.** Gene regulador de condutância transmembranar da FC localizado no braço longo do cromossomo 7 (GENE GATEWAY, 2011). **B.** Proteína CFTR (GRIFFITHS et al., 1999).

Desde a descoberta do gene da FC em 1989, já foram descritas mais de 1800 mutações responsáveis pela transmissão autossômica recessiva da doença (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011). Mutação neste gene pode levar à redução ou eliminação da proteína CFTR (PETTIT, 2012). A mutação mais frequente do gene *CFTR* em todo o mundo é F508del, a qual consiste na deleção de três pares de bases que resulta na exclusão de um resíduo de fenilalanina no códon 508 da proteína CFTR. Essa mutação é responsável por 66% dos casos de FC em todo mundo (ANDERSON, 2010) e leva à formação de uma proteína CFTR inadequadamente dobrada sobre si mesma, a qual é degradada por proteossomas, resultando na ausência da proteína CFTR madura na membrana celular apical (PROESMANS; VERMEULEN; BOECK, 2008).

Esta mutação faz com que haja interrupção da transferência normal dos íons cloro (Cl^-) e sódio (Na^+) através das membranas celulares levando à desidratação e ao aumento da viscosidade das secreções celulares, ocasionando diminuição da superfície líquida das vias respiratórias (*air liquid surface*), volume e subsequente falência do *clearance* mucociliar normal (PANZNER et al., 2009; PROESMANS; VERMEULEN; BOECK, 2008). Essas alterações podem provocar doença pulmonar obstrutiva crônica progressiva, insuficiência pancreática exócrina e desnutrição, além de concentração elevada de cloro no suor (ROSENSTEIN; CUTTING, 1998). Os pacientes também podem apresentar diabetes, desordens biliares e infertilidade (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008).

O envolvimento dos órgãos e a gravidade da doença correlacionam com a sensibilidade do órgão para a disfunção da CFTR e com a quantidade de CFTR funcional, que é influenciada pelo tipo de mutação (PARANJAPÉ; ZEITLIN, 2008).

No trato gastrointestinal, fígado e pâncreas exócrino, o espessamento das secreções viscosas leva à obstrução intestinal, colestase e má absorção de gordura e proteína, respectivamente, e no trato reprodutivo masculino, pode ocasionar azoospermia obstrutiva e levar a infertilidade. Na glândula sudorípara a perda de função da CFTR impede a entrada de íons cloro (e consequentemente íons sódio, que está na sua dependência) na célula, originando um suor salgado. Nos pulmões de pacientes com FC, este aumento na viscosidade do muco leva à obstrução das vias aéreas, que cria um ambiente mais propício a colonização/infecção por bactérias (PANZNER et al., 2009).

A infecção crônica do trato respiratório é responsável pela grande morbidade e mortalidade da FC (FLUME et al., 2010). A inflamação é o evento patológico mais importante nesses pacientes. Inicia-se logo no começo da doença, antes mesmo de uma

possível infecção, como observado no lavado brônquio-alveolar coletados de lactentes com FC. É ainda mais amplificado por infecções bacterianas recorrentes (GAMBARI et al., 2010). Os quadros normalmente evoluem para bronquiectasias que podem culminar em destruição pulmonar, levando à insuficiência respiratória crônica e morte (ROSENSTEIN; CUTTING, 1998).

De acordo com “*Cystic Fibrosis Foundation*”, uma fundação localizada dos Estados Unidos da América (EUA) que credencia mais de 110 centros de atendimento de FC no país, cerca de 27.000 pacientes foram atendidos no ano de 2011. Dados recentes de 2010 revelam que a idade média de sobrevivência destes pacientes foi de 38.3 anos, bem maior quando comparada ao ano de 2005, quando a idade média era em torno de 33 anos. Diagnóstico precoce devido à triagem neonatal em todo o país desempenha papel fundamental, sendo mais de 800 pessoas diagnosticadas com a doença a cada ano (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011).

No Reino Unido, o relatório de dados anuais de FC, aponta 9385 pacientes atendidos no ano de 2010. A idade média de sobrevivência foi de 34.4 anos no ano de 2009 e aumentou significativamente no ano de 2010 para 41.4 anos. Em 2010, 189 pacientes foram diagnosticados com FC, sendo a idade de diagnóstico em torno de 3 meses de idade (UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY, 2010).

O diagnóstico precoce e o tratamento com antibiótico apropriado das exacerbações são cruciais para manter a função respiratória nesses pacientes (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008).

Na Europa e EUA, FC geralmente acomete mais indivíduos da raça branca, com incidência aproximada de 1:3000 indivíduos nascidos vivos (GOETZINGER; CAHILL, 2010).

O tratamento da FC inclui o uso de antibióticos intravenosos, enzimas pancreáticas, o uso de agentes mucolíticos, broncodilatadores, oxigenoterapia, terapia antiinflamatória, transplante pulmonar e suporte nutricional, sendo que, triagem neonatal, melhoria dos padrões de cuidado e desenvolvimento de novas terapias são fatores fundamentais no aumento da expectativa de vida (ANDERSON, 2010).

1.1.1 Fibrose cística no Brasil

No Brasil, FC ainda não tem incidência e prevalência mapeadas, assim como existem dificuldades de realização de diagnóstico em várias regiões. De modo geral, em países em desenvolvimento, 40 a 50% dos casos são diagnosticados após três anos de idade. Nos países desenvolvidos, a maioria dos pacientes tem diagnóstico firmado antes dos dois anos de idade (ANTUNES, 2009). Estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) em 2010, mostra dados de diagnóstico precoce, aos 6 meses de idade (CIAMPO et al., 2010).

O Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (GBEFC), organização sem fins lucrativos criada em 2003, elaborou o registro de FC no Brasil, no qual constam centros de atendimentos de FC localizados em várias partes do país, inclusive o HCFMRP-USP. Até o final do ano de 2009, dados de 1249 pacientes foram enviados e analisados pelo grupo. A idade média destes pacientes foi de 12.96 anos, incluindo desde pacientes recém-nascidos até pacientes com idade em torno de 79.5 anos, sendo a idade média de diagnóstico em torno de 5.36 anos. A grande maioria dos pacientes registrados é da raça branca com idade menor que 18 anos (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009).

1.1.2 Bactérias envolvidas

Quase todos pacientes com FC possuem bactérias em secreção pulmonar em algum momento de sua vida. Para a maioria, tal infecção inicia na infância e se torna crônica no início da vida adulta (DAVIES; BILTON, 2009).

Geralmente *Staphylococcus aureus* está envolvido na infecção em pacientes jovens com FC, enquanto que, em indivíduos mais velhos, *Pseudomonas aeruginosa* é o principal agente responsável. Várias outras espécies como, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia* spp e *Stenotrophomonas maltophilia*, bem como várias espécies de *Ralstonia* e *Pandoraea* também são responsáveis por tais infecções (LIPUMA et al., 2009). O aparecimento desses microrganismos emergentes em pacientes com FC provavelmente vem ocorrendo devido à melhoria nas estratégias de detecção nos laboratórios e à pressão seletiva exercida sobre as populações bacterianas através do uso de antimicrobianos contra *P. aeruginosa* (POMPILIO et al., 2012). A frequência de infecção do trato respiratório por estas espécies aumenta com a idade do paciente, o que representa risco significativo para a saúde devido ao crescente número de pacientes com FC sobrevivendo até a idade adulta (LIPUMA et al., 2009).

P. aeruginosa, *S. aureus* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) estão entre os patógenos mais encontrados em pulmões de pacientes com FC e são responsáveis pela maior parte da mortalidade e morbidade associada à doença. Tratamentos atuais para essas infecções incluem o uso de doses altas e contínuas dos antibióticos β -lactâmicos e aminoglicosídeos, em especial a nebulização com tobramicina. Uma das maiores preocupações é o aumento de resistência aos antibióticos, fato que está se tornando cada vez mais frequente devido à capacidade de alguns agentes de formar biofilme (DAVIES; BILTON, 2009). Atualmente é conhecida capacidade de formação de biofilme em algumas espécies do CBc, *Pseudomonas* sp., *S. aureus*, e também *S. maltophilia*, em menor quantidade (COENYE, 2011; POMPILIO, 2012).

P. aeruginosa é patógeno gram-negativo, flagelado, oportunista de plantas e animais, encontrado naturalmente no solo e na água. Devido à produção de alginato, à baixa permeabilidade de sua membrana externa e à presença de bombas de efluxo, *P. aeruginosa* exibe alta resistência intrínseca a antibióticos, tornando infecções por essa bactéria, grave preocupação para pacientes com FC (PHENNICIE et al., 2010).

Embora *P. aeruginosa* não seja considerada como um organismo de difícil identificação em laboratórios de microbiologia, isolados de pacientes com FC muitas vezes tem fenótipos únicos, incluindo a perda da produção de pigmentos, síntese de lipopolissacarídeo bruto desprovido de cadeias laterais O e o desenvolvimento de cápsula mucóide. Além disso, pacientes com FC têm, muitas vezes, outros bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNF-NF) isolados de suas secreções respiratórias, tornando o isolamento e a identificação rápida de *P. aeruginosa* ainda mais difíceis (QIN et al., 2003). A colonização ocorre inicialmente com os fenótipos não-mucóides e posteriormente com fenótipos mucóides, sendo esta associada à colonização crônica (VALENZA et al., 2010).

Bactérias do CBc compreende um grupo de bacilos gram-negativos, móveis que podem ser encontrados em todo ambiente, e têm sido isolados de fontes como solo, água e plantas. O CBc também se tornou conhecido como um importante grupo de patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos, especialmente naqueles com FC ou doença granulomatosa crônica (GOUDIE et al., 2008).

Este complexo compreende pelo menos 17 espécies, e é particularmente significativo por apresentar linhagens altamente resistentes a antibióticos, além de muitas delas serem transmissíveis (MCKEON; MCCLEAN; CALLAGHAN, 2010), podendo propagar-se de um

paciente para o outro (CARVALHO et al., 2007) levando à necessidade de isolamento dos pacientes infectados (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008).

Até 2008 eram conhecidas as espécies *B. cepacia* (genomovovar I), *B. multivorans* (genomovovar II), *B. cenocepacia* (genomovovar III), *B. stabilis* (genomovovar IV), *B. vietnamensis* (genomovovar V), *B. dolosa* (genomovovar VI), *B. ambifaria* (genomovovar VII), *B. anthina* (genomovovar VIII) e *B. pyrrocinia* (genomovovar IX) como componentes do CBc. Estudos recentes, como semelhança de sequências do gene *recA*, tipagem de sequência multilocus e hibridação DNA-DNA, aumentou o número de espécies do complexo para 17, sendo as novas espécies descritas *B. ubonensis*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans* e *B. lata* (MEDINA-PALCUAL et al., 2012).

A identificação fenotípica de bactérias do CBc é difícil, e erros de identificação são frequentemente relatados à medida que essa espécie é facilmente confundida com outros BGN-NF. Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando sequências iniciadoras, aqui referidas como *primers*, que exploram diferenças na sequência dos genes rRNA 16S e *recA* do complexo *B. cepacia* mostraram-se eficazes e rápidos para a caracterização dos genomovares. O genomovar mais prevalente nos pacientes com FC é *B. cenocepacia*, causador de mais de 50% das infecções seguido de *B. multivorans*, e também é a espécie mais relacionada com síndrome cepácia. Supõe-se ainda que algumas linhagens possam ser mais transmissíveis que outras, e dois genes têm sido utilizados como marcadores de linhagem epidêmica do complexo *B. cepacia*: os genes *cbIA* (que codifica o *pili* do complexo *B. cepacia*) e *esmR* (que codifica uma proteína reguladora de função ainda não completamente estabelecida) que é também conhecido como *B. cepacia epidemic strain marker* – BCESM) (ROSENSTEIN; CUTTING, 1998).

Um dos resultados mais dramáticos foi relacionado com um clone altamente transmissível de *B. cenocepacia* chamado ET12 (*electrophoretic type 12*). Linhagens do complexo clonal ET12 possuem propriedades incomuns, como o “*cable pili*” pelo gene *cbIA*, estrutura responsável pela aderência da bactéria na célula epitelial (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008). Outros clones epidêmicos de *B. cenocepacia* isolados de pacientes de FC têm sido relatados e mostraram propriedades e genomas com diferenças significativas em relação às do clone ET12 (GRAINDORGE et al., 2010).

Espécies do CBc produzem determinantes de virulência como a hemolisina, protease, lipase, catalase e endotoxinas, mas não é estabelecido claramente como esses fatores estão relacionados com a patogênese da FC (CARVALHO et al., 2007).

A maioria das espécies de *Burkholderia* também parece ser capaz de formar biofilme, o que provavelmente também impede a ação de antimicrobianos em pacientes infectados (LIPUMA et al., 2009).

Infecções por bactérias do CBc estão relacionadas com lento declínio da função pulmonar (como é característico de infecção por *P. aeruginosa*) a uma septicemia incontrolável que pode ser fatal, conhecida como síndrome cepácia. Essa síndrome é caracterizada por pneumonia necrotizante com febre, bacteremia, elevação da média de sedimentação de eritrócitos e leucocitose, que culminavam em rápida e fatal deterioração clínica (GOVAN; DERETIC, 1996; ZLOSNIK; SPEERT, 2010).

Bactérias do CBc são intrinsecamente resistentes a vários antibióticos pela presença de porinas, e a existência de anticorpos específicos anti-porinas está correlacionada com bom prognóstico. Essa resistência está relacionada também com a permeabilidade seletiva da membrana externa, bombas de efluxo e a produção de β -lactamases (MEDINA-PALCUAL et al., 2012).

S. maltophilia é bacilo gram-negativo aeróbio móvel com flagelos multitríquios. Também é considerado patógeno de difícil identificação, podendo ser confundido com outros BGN-NF. Até o momento, estudos não demonstraram nenhum sinal de infecção cruzada entre pacientes colonizados por este microrganismo (HANSEN, 2012). A prevalência de *S. maltophilia* em pacientes com FC aumenta com a idade e parece estar relacionado com história de exposição a antibióticos (DAVIES; BILTON, 2009).

Uma das características de *S. maltophilia* é sua alta resistência intrínseca a vários antibióticos. Esta resistência intrínseca é pelo menos parcialmente, devido à presença no genoma de *S. maltophilia*, de genes que codificam enzimas inativadoras de antibiótico e bombas de efluxo (TURRIENTES et al., 2010).

S. maltophilia é encontrado no solo e na água, e rotineiramente reside em chuveiros e outros lugares úmidos, onde permanece como biofilme. A sequência do genoma de *S. maltophilia* revela a capacidade do organismo para adaptações ambientais que provavelmente contribuem para sua persistência em ambientes diversos. Como esperado de um verdadeiro patógeno oportunista, o genoma de *S. maltophilia* não sugere um organismo altamente virulento. No entanto, o grande número de genes de *pili*/fimbria indica forte capacidade de adesão a cateteres e dispositivos de ventilação, o que pode provocar infecções sanguíneas ou pulmonares. Isso deixa claro porque esse organismo é persistente e difícil de erradicar (CROSSMAN et al., 2008).

Recentemente, *S. maltophilia* tem ganhado considerável atenção como patógeno importante capaz de causar infecções em pacientes debilitados e imunodeprimidos, bem como em pacientes com FC. A persistente colonização por *P. aeruginosa* provoca danos na mucosa epitelial devido à liberação de exoprodutos, podendo aumentar a probabilidade de *S. maltophilia* colonizar o trato respiratório de pacientes com FC e contribuir significativamente para a deterioração progressiva das funções pulmonares. No entanto, o mecanismo de patogenicidade que permite que *S. maltophilia* estabeleça infecção e colonização crônica do trato respiratório de pacientes com FC permanece largamente inexplorada (POMPILIO et al., 2010).

Qualquer impacto possivelmente negativo da infecção crônica por *S. maltophilia* em pacientes com FC tem sido muito difícil de ser confirmado já que, embora pacientes infectados por *S. maltophilia* geralmente apresentam pior estado pulmonar do que os pacientes não infectados, nenhum efeito negativo em adquirir infecção crônica por este microrganismo pode ser encontrado quando se compara sintomas clínicos antes e durante o desenvolvimento da infecção crônica (HANSEN, 2012).

A. xylosoxidans é bacilo gram-negativo não fermentador aeróbico, produtor de oxidase e catalase, é amplamente distribuído no ambiente natural e está sendo, cada vez mais, reconhecido como patógeno nosocomial clinicamente significativo. Atualmente são descritas sete espécies diferentes do gênero *Achromobacter*: *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. insolitus*, *A. marplatensis*, *A. piechaudii*, *A. ruhlandii* e *A. spanius*. Infecção crônica por *A. xylosoxidans* pode resultar em acelerado declínio de resposta inflamatória e da função pulmonar de acordo com alguns especialistas. *A. xylosoxidans* é naturalmente resistente a cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, aztreonam e os aminoglicosídeos. Também é frequentemente relatado transmissão de *A. xylosoxidans* de paciente para paciente, o que torna ainda mais preocupante a infecção por este microrganismo (AMOUREUX et al., 2012; RIDDERBERG; WANG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2012).

Por sua tendência em contaminar fluidos, muitos surtos têm sido relatados, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, causando infecções graves como bacteremia. É frequentemente confundido com espécies do CBc. Erros na identificação de *A. xylosoxidans* e de espécies não fermentadores comprometem seriamente as medidas de controle de infecção e confunde os esforços para compreender mais claramente a epidemiologia e história natural de infecção na FC. Obviamente, a identificação precisa de espécies de não fermentadores em amostras de escarro de pacientes com FC é fundamental

para esses esforços. Neste sentido, vários ensaios de PCR baseados na sequência do gene rRNA 16S têm sido desenvolvidos recentemente para a identificação de bactérias do CBc, bem como outros patógenos de FC incluindo *Burkholderia gladioli*, *S. maltophilia* e espécies de *Pandoraea*. Ensaio de PCR confiável para *A. xylosoxidans* também permitirá melhor diferenciação dessa espécie de outras fenotipicamente similares que também infectam na FC. Isso poderá aumentar significativamente a gestão clínica e o controle de infecção nestes pacientes vulneráveis da população (DOI et al., 2008; LIU et al., 2002).

Pandoraea sp. tem sido principalmente isolado de secreções das vias respiratórias dos pacientes com FC. Com base nas sequências de rRNA 16S, foi desenvolvido o uso de PCR para a identificação de espécies de *Pandoraea*. O uso de PCR facilita a identificação de espécies de *Pandoraea* sp e evita o erro na sua identificação como isolado do CBc (COENYE et al., 2001b).

Ralstonia sp. e *Cupriavidus* sp. são bacilos gram-negativos pouco comuns em pacientes de FC. *Ralstonia* sp. foi descrita pela primeira vez em 1995 por Yabuuchi e colaboradores. Entre as estirpes de importância clínica, quatro espécies de *Ralstonia* foram isoladas a partir de pacientes com FC: *R. pickettii*, *R. mannitolilytica*, *R. gilardii* e *R. taiwanensis*. *Cupriavidus* sp. também é considerado patógeno oportunista e seu papel na doença da FC ainda não foi elucidado. No entanto, devido à rápida evolução taxonômica destes gêneros e a falta de métodos rápidos e confiáveis para a identificação dessas espécies, a ocorrência e o papel clínico destas bactérias não foram até então sistematicamente investigados (COENYE et al., 2005; SEGONDS; PAUTE; CHABANON, 2003).

Existem poucos trabalhos analisando a população de fibrocísticos dos países em desenvolvimento. Desta forma, o tratamento e as medidas de saúde pública oferecidos aos fibrocísticos de tais países são baseados em dados internacionais, sem se levar em conta suas peculiaridades (ALVAREZ et al., 2004).

A correta caracterização desses patógenos impacta na sobrevida e qualidade de vida desses pacientes. Devido à similaridade fenotípica entre as espécies do CBc e outros BGN-NF, a maioria dos sistemas utilizados em laboratórios clínicos para identificação dos microrganismos não fornece uma identificação precisa e confiável. Este é um dos grandes desafios para os laboratórios de microbiologia clínica (ZOCCOLI et al., 2009).

2.OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Conhecer a ocorrência de infecções por bactérias, com ênfase em BGN-NF emergentes, em pacientes com FC atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Objetivos Específicos:

- Avaliar vantagens no uso de meios de cultura seletivos para BGN-NF;
- Avaliar sensibilidade e especificidade de sequências iniciadoras (*primers*) já descritas para PCR utilizando todas as linhagens padrão disponíveis no laboratório;
- Padronizar a identificação de BGN-NF de pacientes com FC, que não sejam do gênero *Pseudomonas* e *Acinetobacter*;
- Propor um esquema de identificação que possa ser acessível à maioria dos laboratórios, incluindo triagem fenotípica e técnica molecular por PCR;
- Identificar os genovares do CBc utilizando análise de polimorfismos;
- Listar bactérias responsáveis por infecções respiratórias, em pacientes com FC no HCFMRP-USP, com ênfase na ocorrência de BGN-NF emergentes;
- Relacionar a distribuição de bactérias isoladas, com ênfase nos BGN-NF emergentes, por faixa etária dos pacientes com FC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes envolvidos

Foram investigados os espécimes respiratórios (escarro) provenientes de 107 pacientes atendidos no ambulatório de FC do HCFMRP-USP, independente da faixa etária, gênero ou raça dos pacientes (sujeitos da pesquisa), por período de 14 meses (julho/2011 a setembro/2012), sendo essa coleta parte da rotina do atendimento dos mesmos.

Os critérios de inclusão para os pacientes foram: ser paciente diagnosticado com FC atendido na enfermaria ou ambulatório do HCFMRP-USP e aceitar o convite para participar da pesquisa.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP sob o nº 210 com concordância do CEP do HCFMRP-USP (Anexo 2).

3.2 Coleta dos espécimes clínicos

De cada paciente foi coletado pelo menos um espécime clínico (escarro) em frasco esterilizado. De modo geral, foram coletadas amostras a cada 30/90 dias conforme rotina do hospital.

A coleta foi realizada, como tem sido feita rotineiramente, no ambulatório de FC e/ou enfermaria de FC do HCFMRP-USP e o material foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do hospital. Após o processamento dos espécimes clínicos pelo laboratório do hospital, os mesmos foram semeados em meios de cultura seletivos e não seletivos, e em seguida devidamente transportados ao Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) - FCFRP-USP, acondicionados em caixa térmica refrigerada, para isolamento e posterior identificação dos microrganismos.

Figura 2. Fluxograma das atividades realizadas no HCFMRP-USP e no LEBEM – FCFRP-USP. Laranja – etapa realizada no ambulatório de FC do HCFMRP-USP; azul – no laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP; vermelho – no LEBEM.

3.3 Processamento dos espécimes clínicos e dos isolados

Os espécimes clínicos foram semeados diretamente em placas contendo meios de cultura não seletivos como ágar Müller-Hinton (Oxoid) acrescido de sangue de carneiro a 5% (ágar sangue - AS) e em placas contendo meios de cultura seletivos como ágar MacConkey (MC - Oxoid), seletivo para bactérias gram-negativas; *Burkholderia cepacia* Selective ágar (BCSA - Oxoid), seletivo para bactérias do CBc; e *Pseudomonas* ágar Base (PAB - Oxoid), seletivo para *Pseudomonas* sp. A semeadura foi realizada pela técnica de esgotamento por estrias.

As placas semeadas foram incubadas em aerobiose a 35°C-37°C por um período de 24 a 72 horas, em atmosfera ambiente. A negatividade no meio de cultura BCSA só foi comprovada após 5 dias de incubação.

Após triagem fenotípica inicial, descrita posteriormente no item 3.5, todos BGN-NF isolados foram organizados e estocados a -80°C no LEBEM da FCFRP-USP.

Foram investigadas BGN-NF oportunistas como bactérias do CBc, *Pandoraea* sp., *Cupriavidus* sp., *Ralstonia* sp., *Achromobacter* sp. e *S. maltophilia*.

Devido a não inclusão de dados clínicos, a expressão “colonização” neste trabalho se refere à cultura positiva, independente se o paciente está colonizado ou infectado.

3.4 Padronização da identificação de gêneros/espécies dos isolados

A padronização da técnica de PCR para a identificação da maioria dos gêneros/espécies descritos na FC foi realizada com linhagens padrão (Tabela 1) como controle para os *primers* utilizados (Tabela 3). Foi necessário realizar gradiente de temperatura para otimizar as bandas de DNA obtidas pelas PCR.

Tabela 1. Linhagens controle utilizadas nos experimentos

Gêneros/espécies	Referência ¹
<i>Pandoraea pnomenusa</i>	LMG 18087
<i>Pandoraea pulmonicola</i>	LMG 18106
<i>Pandoraea apista</i>	LMG 16407
<i>Pandoraea norimbergensis</i>	LMG 18379
<i>Cupriavidus gillardi</i>	LMG 5886
<i>Ralstonia picketti</i>	LMG 5942
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	LMG 958
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	LMG 10929
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	LMG 21462
<i>Burkholderia ambifaria</i>	LMG 19182
<i>Burkholderia dolosa</i>	LMG 18943
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	LMG 14191
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	LMG 1863
<i>Achromobacter piechaudii</i>	LMG 1873
<i>Achromobacter denitrificans</i>	LMG 1231
<i>Burkholderia cepacia</i> Genomovar I	BC 1254
<i>Burkholderia multivorans</i> Genomovar II	BC 788
<i>Burkholderia cenocepacia</i> Genomovar IIIA	BC 818
<i>Burkholderia cenocepacia</i> Genomovar IIIB	BC 842
<i>Burkholderia cenocepacia</i> Genomovar IIIB	BC 805
<i>Burkholderia cenocepacia</i> Genomovar III	BC 17604 ET-12
<i>Burkholderia stabilis</i> Genomovar IV	BC 790
<i>Burkholderia stabilis</i> Genomovar IV	BC 825
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> Genomovar V	BC 1109
<i>Burkholderia dolosa</i> Genomovar VI	LMG-18943
<i>Burkholderia ambifaria</i> Genomovar VII	ATCC-53266
<i>Burkholderia ambifaria</i> Genomovar VII	BC AMMD
<i>Burkholderia anthina</i> Genomovar VIII	LMG-20980

(continua)

Tabela 1. Linhagens controle utilizadas nos experimentos (continuação)

Gêneros/espécies	Referência ¹
<i>Burkholderia anthina</i> Genomovar VIII	LMG-16670
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> Genomovar IX	ATCC-39227
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> Genomovar IX	LMG-14191

¹ LGM *Laboratory of Microbiology of Gent - Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms* (University of Gent - Belgium); ATCC *American Type Culture Collection*; BC Bactérias cedidas pelo Laboratório de Bactérias Gram-Negativas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

(Conclusão)

3.5 Triagem e identificação fenotípica dos isolados

No LEBEM foram avaliadas características macroscópicas de todas as colônias isoladas e características microscópicas por meio de esfregaço com coloração de Gram. A triagem fenotípica foi realizada por testes bioquímicos convencionais: produção da enzima oxidase e teste de oxidação e fermentação (O/F) de glicose (LIPUMA et al., 2011; KONIG, C. H. W.; RIFFELMANN, M.; COENYE, 2011).

Testes de O/F xilose, maltose, sacarose e lactose; redução do nitrato; descarboxilação da lisina; hidrólise do L-pirrolidonil-B-naftilamida (PYR); produção das enzimas DNase e urease; entre outros, foram utilizados como testes adicionais de identificação (Tabela 2), complementando dados de amplificação com os *primers* citados (LIPUMA et al., 2011; KONIG; RIFFELMANN; COENYE, 2011).

Bactérias que obtiveram resultados de identificação inconclusivos foram testadas utilizando o API[®]/NE - API (Biomérieux), sistema miniaturizado para identificação fenotípica de BGN não entéricos e não fastidiosos.

As bactérias isoladas no Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP foram identificadas pelo sistema Vitek[®] II versão 5.04 (Biomérieux).

Tabela 2. Características fenotípicas para identificação de gêneros e espécies de BNG-NF emergentes

BGN-NF emergentes	Crescimento nos Meios de cultura				Triagem do Gênero		PROVAS BIOQUÍMICAS									
	BCSA	MC	PAB	AS	Oxidase	O/F Gli	Xil	Mal	Lac	Sac	DNase	Lisina	PYR	Nitrato	Citrato	Urease
<i>A. xylosoxidans</i>	V	+	ND	+	+	O	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>A. denitrificans</i>	ND	+	ND	+	+	ASS	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	-
<i>A. piechaudii</i>	ND	+	ND	+	+	ASS	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND
<i>A. insolitus</i>	ND	+	ND	+	+	ASS	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	ND
<i>A. spanius</i>	ND	+	ND	+	+	ASS	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	ND
<i>B. cepacia</i>	+	V	ND	+	+	O	+	V	+	V	-	+	-	-	ND	ND
<i>B. multivorans</i>	+	+	ND	+	+	O	+	+	+	-	-	V	-	+	ND	ND
<i>B. cenocepacia</i>	+	V	ND	+	+	O	+	V	+	+	-	+	-	V	ND	ND
<i>B. stabilis</i>	+	+	ND	+	+	O	V	+	V	-	-	+	-	-	ND	ND
<i>B. vietnamiensis</i>	+	V	ND	+	+	O	V	+	+	+	-	+	-	V	ND	ND
<i>B. dolosa</i>	+	+	ND	+	+	O	+	+	+	-	-	-	-	+	ND	ND
<i>B. ambifaria</i>	+	+	ND	+	+	O	+	+	+	+	-	+	-	V	ND	ND
<i>B. anthina</i>	+	+	ND	+	+	O	+	+	+	V	-	V	-	V	ND	ND
<i>B. pyrrocinia</i>	+	+	ND	+	V	O	+	+	+	V	-	+	-	V	ND	ND
<i>S. maltophilia</i>	-	+	ND	+	-*	O*	-*	+	V	V	+	+	-	-*	-*	-*
<i>R. pickettii</i>	+	V	ND	ND	+	O	+	V	V	-	ND	-	+	+	ND	+
<i>R. mannitolilytica</i>	+	+	ND	ND	+	O	+	+	+	-	ND	-	+	-	ND	+
<i>R. insidiosa</i>	+	ND	ND	ND	+	ASS	ND	ND	V	-	ND	-	ND	+	ND	V
<i>Pandoraea</i> sp.	V	+	ND	ND	V	O	-	-	-	-	ND	-	ND	V	ND	ND
<i>C. respiraculis</i>	-	V	ND	ND	+	ASS	-	V	-	-	ND	-	ND	V	ND	-
<i>C. gillardii</i>	-	V	ND	ND	+	ASS	-	V	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>C. pauculus</i>	V	V	ND	ND	+	ASS	-	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	+

-* maioria negativo; ND não determinado; V variável; BCSA *Burkholderia cepacia* Selective Agar; MC macConkey, PAB *Pseudomonas* Agar Base; AS ágar Sangue; O/F gli oxidação/fermentação da glicose; O oxidativo; O* maioria oxidativo; ASS assacarolítico; Xil xilose; Mal maltose; Lac lactose; Sac sacarose. Fontes: VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington, DC, 2011. cap. 43, p. 692-713. OPLUSTIL, C. P. ; ZOCCOLI, C. M. ; TOBOUTI, N. R. ; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2010. p. 77-125.

3.6 Identificação genotípica

3.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A identificação genotípica foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os *primers* específicos dos gêneros/espécies de interesse de acordo com a padronização realizada com as linhagens padrão (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências iniciadoras utilizadas na realização da PCR

Gene Amplificado	Par de Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto da PCR (pb) ¹	Temp. (°C) ²	Referência
<i>B. cepacia</i> (Genomovar I)	BCRG11 BCRG12	CAGGTCGTCTCCACGGGT CACGCCGATCTTCATACGA	492	62*	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
<i>B. multivorans</i> (Genomovar II)	BCRBM1 BCRBM2	CGGCGTCAACGTGCCGGAT TCCATCGCCTCGGCTTCGT	714	62*	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
<i>B. cenocepacia</i> (Genomovar III-A)	BCRG3A1 BCRG3A2	GCTCGACGTTCAATATGCC TCGAGACGCACCGACGAG	378	62*	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
<i>B. cenocepacia</i> (Genomovar III-B)	BCRG3B1 BCRG3B2	GCTGCAAGTCATCGCTGAA TACGCCATCGGGCATGCT	781	60*	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
<i>B. stabilis</i> (Genomovar IV)	BCRG41 BCRG42	ACCGGCGAGCAGGCGCTT ACGCCATCGGGCATGGCA	647	64	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
<i>B. vietnamiensis</i> (Genomovar V)	BCRBV1 BCRBV2	GGGCGACGGCGACGTGAA TCGGCCTTCGGCACCACT	378	62*	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
<i>B. dolosa</i> (Genomovar VI)	G6N BCR1	CGAGCGAGCCGGTCGAT TGACCGGCGAGAAGAGCAA	135	67	VERMIS et al., 2004
<i>B. ambifaria</i> (genomovar VII)	BCRGC1 BCRGC2	GTCGGGTAAAACACGCTG ACCGCAGCCGCACCTTCA	810	62	COENYE et al., 2001 ^a
<i>B. anthina</i> (genomovar VIII)	BCRG81 BCRG82	TACGGTCCGGAATCGTCG CGCACCGACGCATAGAAT	473	61*	VANDAMME et al., 2002
Complexo <i>B. cepacia</i> – Gene <i>recA</i>	BCR1 BCR2	TGACCGGCGAGAAGAGCAA CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	1043	58*	MAHENTHIRALIN GAM et al., 2000
Gênero <i>Achromobacter</i>	AX-F1 AX-B1	GCAGGAAAGAAACGTCGCGGGT ATTTCACATCTTTCTTTCCG	163	56	LIU et al., 2002
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SM1 SM4	CAGCCTGCGAAAAGTA TTAAGCTTGCCACGAACAG	531	58	WHITBY et al., 2000
<i>Pandora</i> <i>Sputorum</i>	spuF spuR	CTCGCGTACAAGAGCGGCCGATA CGAGCACATCCGCCTCTCAGCAGAC	813	63*	COENYE et al., 2001b
Gênero <i>Ralstonia</i>	RalGS-F RalGS-R	CTGGGGTCGATGACGGTA ATCTCTGCTTCGTTAGTGCC	546	58	COENYE et al., 2005
Gênero <i>Cupriavidus</i>	ral2f ral2r	GCGAACTGAAACATCTAAGTAGC TGTCGYACCTAGTTCCACA	187	58 a 61*	BARRET et al., 2006

¹ Tamanho do produto amplificado pela PCR; ² Temperatura de *annealing*; *Modificações constam no Apêndice A.

A PCR foi realizada em volume de 25µL adicionando-se 2,5µL de tampão PCR 10x concentrado, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,625U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,2mM de cada um dos 4 nucleotídeos (dNTP), 20pmol dos *primers* (Tabela 3) para amplificação dos genes, 60ng de DNA e água ultrapura (q.s.p. 25, sigma). Foi utilizado o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o método de Gianni-Rossolini (ROSSOLINI et al., 1993). Os microrganismos foram cultivados 18 horas em caldo BHI (Oxoid) utilizando tubos cônicos. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 20.000g (Centrífuga *Eppendorf* 5804 R) durante 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso com 250µL de solução 1 (sacarose 20%, Tris HCl 1M pH 8 e EDTA 0,5M) resfriada a 6-8°C e incubado, em gelo, durante 10 minutos. Após esse período foi adicionada 500µL de solução 2 (NaCl, 1% de sarcosil e proteinase K), misturada por inversão e os tubos foram incubados em banho de água, por 2 horas, a 50°C. Em seguida foi adicionada 750µL de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos foram agitados manualmente por 15 minutos, seguido de centrifugação por 20 minutos a 20.000g. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo no qual foi adicionado 750µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados manualmente por 15 minutos e centrifugados novamente a 20.000g, durante 20 minutos. Foi coletado o sobrenadante, e transferido para um novo tubo no qual foi adicionado 1mL de etanol resfriado a 6-8°C, que foi misturado por inversão. Os tubos foram mantidos a -20°C durante aproximadamente 18 horas e depois foram centrifugados a 20.000g durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi seco em *Speed-Vac* (Eppendorf). O sedimento foi suspenso em água W-3500 (Sigma) adicionando-se 1µL de RNase 50µg/mL (Invitrogen) e deixado no banho de água, durante uma hora, a 37°C.

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

3.6.2 Análise de polimorfismos

Todas as bactérias isoladas e identificadas, por PCR e provas bioquímicas, como pertencentes ao CBc foram analisadas quanto ao polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*) com o intuito de identificar os genótipos de cada bactéria (LEITE et al., 2011).

Produtos gerados por PCR, utilizando-se os *primers* BCR1 e BCR2, após purificação com o Kit “GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare), foram digeridos com endonuclease de restrição *HaeIII* (Fermentas). Dependendo da concentração de DNA (20 a 60 µg/mL), cerca de 10 µL a 15 µL de amplicons gerados foram adicionados à enzima de restrição e à solução tamponante apropriada de acordo com as instruções do fabricante, e a mistura foi incubada a 37 °C durante 4 horas.

Os fragmentos de restrição gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Foram utilizados marcadores de tamanho molecular 100pb (GeneRuler 100 pb DNA ladder; Fermentas). Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (1 µg/mL) e visualizados e fotografados pelo sistema AlphaImager[®] (Alpha Innotech).

4. *RESULTADOS*

4.1. Padronização da identificação em gênero/espécie

A Tabela 4 ilustra os resultados da amplificação com cada *primer* utilizado para cada uma das linhagens controle usadas na padronização das reações, ou seja, mostra os *primers* que geraram produtos amplificados para cada gênero/espécie de BGN-NF emergente de todas as linhagens padrão utilizadas para a padronização das PCR. Ressalta-se que todos os amplicons gerados com um mesmo par de *primer* foram de mesmo tamanho e intensidade no gel, nas condições descritas no Apêndice A.

A PCR, com os *primers* em questão, possibilitou o reconhecimento somente do gênero para a maioria dos BGN-NF, exceto o par de *primer* SM-1/SM-4 que foi específico para gênero e espécie *S. maltophilia*.

Os *primers* BCR1/BCR2, AX-F1/AX-B1 e SM-1/SM4 usados na identificação de bactérias do CBc, *Achromobacter* sp. e *S. maltophilia*, respectivamente, geraram produtos de amplificação de tamanhos esperados e todos mostraram 100% de especificidade e sensibilidade.

Alguns pares de *primers*, recomendados para identificação de *P. sputorum*, *Ralstonia* sp. e *Cupriavidus* sp., possibilitaram a amplificação de fragmentos de mesmo tamanho para algumas linhagens padrão, diferente do esperado, relatados a seguir:

- *primers* spuF/spuR foram considerados apropriados para identificação do gênero *Pandoraea* sp. e não somente para *P. sputorum*, além de terem dado amplicons também para *R. picketti* LMG 5942;
- *primers* RalGS-F/RalGS-R proporcionaram amplicons para o gênero *Ralstonia* sp., além de terem dado amplicons também para *Cupriavidus gillardi* LMG 5886;
- *primers* ral2f/ral2r específicos para *Cupriavidus* sp., proporcionaram amplificação também para bactérias de outros 3 gêneros bacterianos: *Achromobacter* sp., *Pandoraea* sp. e *Ralstonia* sp.

Tabela 4. Resultado da amplificação para os *primers* relacionados com gêneros/espécies de linhagens padrão de BGN-NF emergentes

Linhagens padrão	Gêneros/espécies					
	<i>Primers</i> ^a					
	CBc BCR1/BCR2	<i>P. sputorum</i> spuF/spuR	<i>Ralstonia</i> sp. RalGS-F/RalGS-R	<i>Achromobacter</i> sp. AX-F1/AX-B1	<i>S. maltophilia</i> SM-1/SM4	<i>Cupriavidus</i> sp. ral2f/ral2r
<i>A. denitrificans</i> LMG 1231	-	-	-	Pos	-	Pos ^b
<i>A. piecharedii</i> LMG 1873	-	-	-	Pos	-	Pos ^b
<i>A. xylosoxidans</i> LMG 1863	-	-	-	Pos	-	Pos ^b
<i>C. gillardi</i> LMG 5886	-	-	Pos ^b	-	-	Pos
<i>P. norimbergensis</i> LMG 18379	-	Pos	-	-	-	Pos ^b
<i>P. pnomenusa</i> LMG 18087	-	Pos	-	-	-	Pos ^b
<i>P. pulmonicola</i> LMG 18106	-	Pos	-	-	-	Pos ^b
<i>P. apista</i> LMG 16407	-	Pos	-	-	-	Pos ^b
<i>R. picketti</i> LMG 5942	-	Pos ^b	Pos	-	-	Pos ^b
<i>S. maltophilia</i> LMG 958	-	-	-	-	Pos	-
<i>B. cepacia</i> Genomovar I BC 1254	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. multivorans</i> Genomovar II BC 788	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar IIIA BC 818	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar IIIB BC 842	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar IIIB BC 805	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar III BC 17604 ET-12	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. stabilis</i> Genomovar IV BC 790	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. stabilis</i> Genomovar IV BC 825	Pos	-	-	-	-	-

(continua)

Tabela 4. Resultado da amplificação para os *primers* relacionados com gêneros/espécies de linhagens padrão de BGN-NF emergentes (continuação)

Linhagens padrão	Gêneros/espécies					
	<i>Primers</i> ^a					
	CBc BCR1/BCR2	<i>P. sputorum</i> spuF/spuR	<i>Ralstonia</i> sp. RalGS-F/RalGS-R	<i>Achromobacter</i> sp. AX-F1/AX-B1	<i>S. maltophilia</i> SM-1/SM4	<i>Cupriavidus</i> sp. ral2f/ral2r
<i>B. vietnamiensis</i> Genomovar V BC 1109	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. dolosa</i> Genomovar VI BC LMG-18943	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. ambifaria</i> Genomovar VII BC ATCC-53266	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. ambifaria</i> Genomovar VII BC AMMD	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. anthina</i> Genomovar VIII BC LMG-20980	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. anthina</i> Genomovar VIII BC LMG-16670	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. pyrrocinia</i> Genomovar IX BC ATCC-39227	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. pyrrocinia</i> Genomovar IX BC LMG-14191	Pos	-	-	-	-	-

- ausência de bandas amplificadas; ^b reações inespecíficas; Pos produção de amplicons.

(conclusão)

A Tabela 5 ilustra os resultados da amplificação com cada *primer* específico para espécies de bactérias do CBc, utilizado para cada uma das linhagens controle usadas na padronização das reações. Não houve reações inespecíficas para outros gêneros que não fossem bactérias do CBc.

Os *primers* BCRG3A1/BCRG3A2, BCRG3B1/BCRG3B2, BCRG41/BCRG42, G6N/BCR1 e BCRG81/BCRG82, usados na identificação de *B. cenocepacia* (IIIA), *B. cenocepacia* (III-B), *B. stabilis* (IV), *B. dolosa* (VI) e *B. anthina* (VIII) respectivamente, geraram produtos de amplificação de tamanhos esperados com 100% de especificidade. Porém, o *primer* para *B. cenocepacia* (III-B) não amplificou para linhagem *B. cenocepacia* (III, BC 17604 ET-12), e o *primer* para *B. anthina* (VIII) não amplificou para linhagem *B. anthina* (VII, BC AMMD). Já o *primer* BCRGC1/BCRGC2 referente à espécie *B. ambifaria* (VII) não gerou produtos de PCR amplificados.

Alguns pares de *primers*, recomendados para identificação de *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II) e *B. vietnamiensis* (V), possibilitaram a amplificação de fragmentos de mesmo tamanho e intensidade para algumas linhagens padrão, diferente do esperado, relatados a seguir:

- *primers* BCRG11/BCRG12 foram considerados apropriados para identificação de *B. cepacia*, além de terem dado amplicons também para *B. cenocepacia* (IIIA, BC 818), *B. pyrrocinia* (IX, ATCC 39227) e *B. pyrrocinia* (LMG 14191);
- *primers* BCRBM1/BCRBM2 foram considerados apropriados para identificação de *B. multivorans* (II, BC 788), mas produziram amplicons também para *B. cenocepacia* (IIIB, BC 842) e para *B. stabilis* (IV, BC 790);
- *primers* BCRBV1/BCRBV2 foram considerados apropriados para identificação de *B. vietnamiensis* (V, BC 1109), mas produziram amplicons também para *B. multivorans* (II, BC 788), *B. cenocepacia* (IIIB, BC 842), *B. stabilis* (IV, BC 790), *B. anthina* (VIII, BC 16670) e *B. pyrrocinia* (IX, BC 39227).

Tabela 5. Resultado da amplificação para os *primers* relacionados com as espécies de bactérias do CBc

Linhagens padrão	Gêneros/espécies <i>Primers</i> ^a								
	<i>B. cepacia</i> (Genomovar I) BCRG11/ BCRG12	<i>B. multivorans</i> (Genomovar II) BCRBM1 BCRBM2	<i>B. cenocepacia</i> (Genomovar III-A) BCRG3A1 BCRG3A2	<i>B. cenocepacia</i> (Genomovar III-B) BCRG3B1 BCRG3B2	<i>B. stabilis</i> (Genomovar IV) BCRG41 BCRG42	<i>B. vietnamiensis</i> (Genomovar V) BCRBV1 BCRBV2	<i>B. dolosa</i> (Genomovar VI) G6N BCR1	<i>B. ambifaria</i> (genomovar VII) BCRGC1 BCRGC2	<i>B. anthina</i> (genomovar VIII) BCRG81 BCRG82
<i>B. cepacia</i> Genomovar I BC 1254	Pos	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. multivorans</i> Genomovar II BC 788	-	Pos	-	-	-	Pos^b	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar IIIA BC 818	Pos^b	-	Pos	-	-	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar IIIB BC 842	-	Pos^b	-	Pos	-	Pos^b	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar IIIB BC 805	-	-	-	Pos	-	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i> Genomovar III BC 17604 ET-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. stabilis</i> Genomovar IV BC 790	-	Pos^b	-	-	Pos	Pos^b	-	-	-
<i>B. stabilis</i> Genomovar IV BC 825	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. vietnamiensis</i> Genomovar V BC 1109	-	-	-	-	-	Pos	-	-	-

(continua)

Tabela 5. Resultado da amplificação para os *primers* relacionados com as espécies de bactérias do CBc (continuação)

Linhasgens padrão	Gêneros/espécies <i>Primers</i> ^a								
	<i>B. cepacia</i> (Genomovar I) BCRG11/ BCRG12	<i>B. multivorans</i> (Genomovar II) BCRBM1 BCRBM2	<i>B. cenocepacia</i> (Genomovar III-A) BCRG3A1 BCRG3A2	<i>B. cenocepacia</i> (Genomovar III-B) BCRG3B1 BCRG3B2	<i>B. stabilis</i> (Genomovar IV) BCRG41 BCRG42	<i>B. vietnamiensis</i> (Genomovar V) BCRBV1 BCRBV2	<i>B. dolosa</i> (Genomovar VI) G6N BCR1	<i>B. ambifaria</i> (genomovar VII) BCRGC1 BCRGC2	<i>B. anthina</i> (genomovar VIII) BCRG81 BCRG82
<i>B. dolosa</i> Genomovar VI BC LMG-18943	-	-	-	-	-	-	Pos	-	-
<i>B. ambifaria</i> Genomovar VII BC AMMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. anthina</i> Genomovar VIII BC LMG-20980	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. anthina</i> Genomovar VIII BC LMG-16670	-	-	-	-	-	Pos^b	-	-	Pos
<i>B. pyrrocinia</i> Genomovar IX BC ATCC-39227	Pos^b	-	-	-	-	Pos^b	-	-	-
<i>B. pyrrocinia</i> Genomovar IX BC LMG-14191	Pos^b	-	-	-	-	-	-	-	-

- ausência de bandas amplificadas; ^b reações inespecíficas; Pos produção de amplicons.

(conclusão)

4.2. BGN-NF dos pacientes atendidos no HCFMRP – USP

4.2.1 Identificação em gênero/espécie

Os BGN-NF emergentes são muito semelhantes microscopicamente. As características macroscópicas das colônias destas bactérias, quando cultivadas e isoladas nos meios de cultura AS, MC, BCSA e PAB, também são muito semelhantes.

A triagem dos BGN-NF emergentes foi realizada inicialmente, por testes bioquímicos convencionais com intuito de selecionar BGN-NF (Tabela 6).

Das 264 amostras clínicas (escarro) recebidas referentes aos 107 pacientes com FC no período de estudo, após a triagem foram analisadas 84 BGN-NF, excluindo *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter* sp.

Mediante os objetivos do estudo, o DNA de todos BGN-NF foi submetido à PCR utilizando todos os *primers* representados na Tabela 3, tal qual foi realizado para as linhagens padrão, com o intuito de identificar gênero/espécie. Os resultados foram semelhantes aos obtidos na padronização, ou seja, apresentaram a mesma especificidade e sensibilidade dos *primers* nas condições de reação apresentadas no Apêndice A.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de identificação fenotípica e molecular de todos BGN-NF estudados. A maioria dos resultados obtidos durante o estudo esteve de acordo com a Tabela 2, e particularidades de alguns resultados não esperados estão sendo apresentados e discutidos separadamente.

O API[®]/NE foi utilizado em alguns casos quando o resultado da PCR divergiu do esperado nas provas bioquímicas convencionais. Na maioria dos casos, o resultado deste método coincidiu com o resultado obtido pela PCR. Houve dois casos em que o resultado obtido pelo API foi inconclusivo: FC-36b BCSA que foi identificado como bactéria do CBc por PCR e FC-71 BCSA que foi identificado como *S. maltophilia*. Nestes casos foi considerado o resultado da PCR. Em apenas um caso, o resultado obtido pela PCR foi diferente do resultado obtido pelo API, FC-6a AS2 foi identificado como *S. maltophilia* por PCR, mas como *Elizabethkingia* no API. Como produção de oxidase foi positiva, descarboxilação da lisina foi negativa e hidrólise do PYR positiva, este microrganismo foi identificado como *Elizabethkingia*.

Tabela 6. Triagem e identificação dos BNG-NF emergentes isolados

BGN-NF emergentes isolados ¹ (n)	Crescimento nos Meios de cultura (q)				Triagem do Gênero		Gêneros/espécies Primers						PROVAS BIOQUÍMICAS				API NE ²
	BCSA	MC	PAB	AS	OXI	O/F GLI	BCR1/B CR2	spuF/spuR	RalGS-F/RalGS-R	AX-F1/AX-B1	SM1/SM4	ral2f/ral2r					
<i>A. xylosoxidans</i> (23)	+	+	+	+	+	O	-	-	-	+	-	+	Xyl + (23)	DNase - (23)	PYR + (23)		
<i>A. denitrificans</i> (9)	-	+	+	+	+	ASS	-	-	-	+	-	+	Xyl - (9)	Nit + (9)	Cit + (9)		
CBC (32)	+	+	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	DNase - (32)	Lisina + (29)	PYR - (30)		5
<i>S. maltophilia</i> (14)	+	+	+	+	-	O	-	-	-	-	+	-	DNase + (12)	Lisina + (13)	PYR - (14)		3
<i>R. pickettii</i> (2)	+	+	-	-	+	O	-	+	+	-	-	+	Xyl + (2)	Mal - (2)	Lac - (2)	Sac - (2)	Nit + (2)
<i>R. mannitolilytica</i> (1)	-	+	-	-	+	O	-	+	+	-	-	+	Xyl +	Mal +	Lac +	Sac -	Nit -
<i>Pandoraea</i> sp. (1)	+	-	-	-	-	O	-	+	-	-	-	+	Xyl -	Mal -	Lac -	Sac -	
<i>C. respiraculis</i> ou <i>C. gillardii</i> (1)	-	+	-	-	+	ASS	-	-	+	-	-	+	Urease -				
<i>Elizabethkingia</i> (1)	-	-	-	+	+	O	-	-	-	-	+	-	DNase +	Lisina -	PYR +		1

¹ identificação definitiva dos BGN-NF emergentes; (n) número de isolados de BGN testados/identificados para cada gênero/espécie; ² número de bactérias identificadas pelo API NE; q quantidade isolada em cada meio de cultura; BCSA *Burkholderia cepacia* Selective Agar; MC macConkey, PAB *Pseudomonas* Agar Base; AS ágar Sangue; OXI oxidase; O/F gli oxidação/fermentação da glicose; O oxidativo; ASS assacarolítico; Xil xilose; Mal maltose; Lac lactose; Sac sacarose; Nit nitrato; Cit citrato.

4.2.2 Análise dos polimorfismos de isolados do CBc

A análise dos padrões de RFLP gerado por digestão com a enzima de restrição *HaeIII* foi capaz de discriminar todos genótipos, com exceção dos genótipos I e IIIA. Este método também foi capaz de discriminar os subgrupos IIIA e IIIB de *B. cenocepacia*. A Figura 3 ilustra o perfil de polimorfismo produzido por cada genótipo.

Figura 3. Fragmentos de restrição do gene *recA* amplificado de linhagens padrão gerados por digestão com *HaeIII*. Pb, pares de base; M, molecular size marker (Fermentas); colunas I a IX, genótipos pertencentes a *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis* (V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII), *B. anthina* (VIII) e *B. pyrrocinia* (IX).

Foi possível determinar o genótipo de 31 dos 32 isolados de bactérias do CBc. Apenas um isolado de um paciente não apresentou amplificação do gene *recA* quando realizado PCR utilizando o par de *primers* BCR1 e BCR2, não permitindo a identificação do genótipo.

Figura 4. Esquema de identificação de BGN-NF isolados de pacientes com FC.
O/F oxidação/fermentação da glicose; - negativo; + positivo; PCR reação em cadeia da polimerase; RFLP *restriction fragment length polymorphism*.

4.4. Dados epidemiológicos

4.4.1. Pacientes envolvidos

No período de julho/2011 a setembro/2012, foram analisados espécimes clínicos de 107 pacientes. Destes, 47 (43.93 %) eram do gênero feminino e 60 (56.07 %) do gênero masculino. A faixa etária dos pacientes variou entre recém-nascido e 46 anos. A Figura 5 mostra a distribuição dos pacientes de acordo com gênero e idade, referentes à data da primeira coleta de cada paciente. A maioria dos pacientes era da raça branca (n= 69), 14 eram mulatos, 1 negro e 23 indefinidos.

Figura 5. Distribuição da idade dos 107 pacientes, por gênero.

4.4.2. Microrganismos identificados

Foram coletadas 264 amostras clínicas (escarros) referentes aos 107 pacientes com FC atendidos no período de estudo. A quantidade de amostras por paciente variou entre 1 e 7 escarros analisados. De modo geral, considerando todos os microrganismos isolados, 13 pacientes apresentaram somente culturas positivas para *P. aeruginosa*, 3 pacientes apresentaram somente culturas positivas para BGN-NF emergentes, 17 pacientes apresentaram culturas positivas para outros microrganismos incluindo fungos, *Streptococcus*

pyogenes, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Chryseobacterium indologenes*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola* e *Elizabethkingia* sp., 26 pacientes apresentaram cultura mista incluindo *P. aeruginosa* e outros, 9 pacientes apresentaram cultura mista de BGN-NF emergentes e outros, 7 pacientes apresentaram cultura mista de *P. aeruginosa* e BNG-NF emergentes, e 17 pacientes apresentaram cultura mista de *P. aeruginosa*, BGN-NF emergentes e outros¹. Apenas 15 pacientes apresentaram culturas negativas para todos os escarros analisados (Figura 6).

Figura 6. Microrganismos isolados dos 107 pacientes com FC atendidos ou internados no HCFMRP-USP. P.a., *P. aeruginosa*.

Desconsiderando os outros microrganismos isolados e comparando isolamentos de BGN-NF emergentes somente com *P.aeruginosa*, 36 pacientes apresentaram culturas positivas incluindo BGN-NF emergentes, destes, 12 pacientes apresentaram apenas culturas positivas para BGN-NF emergentes, 18 pacientes apresentaram cultura mista de BGN-NF emergentes e *P. aeruginosa*, e 6 pacientes apresentaram culturas positivas para mais de dois BGN-NF (Figura 7).

¹ Dados referentes às bactérias gram-positivas, enterobactérias, alguns BGN-NF (exceto emergentes e *Pseudomonas* sp) e fungos foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP.

Figura 7. BGN-NF emergentes isolados de 36 pacientes com FC atendidos ou internados no HCFMRP-USP

Dos 12 pacientes que apresentaram somente cultura positiva para BGN-NF emergentes, 6 apresentaram cultura positiva apenas para *S. maltophilia*, 2 apresentaram cultura positiva apenas para *A. xylosoxidans*, 2 apresentaram cultura positiva apenas para bactérias do CBc, um paciente apresentou cultura positiva apenas para *Cupriavidus*, e um paciente apresentou cultura positiva para dois BGN-NF emergentes, *S. maltophilia* e *Achromobacter* sp.

Dentre os 18 pacientes que apresentaram culturas mistas de BGN-NF emergentes e *P. aeruginosa*, 6 pacientes apresentaram cultura positiva para *P. aeruginosa* e *Achromobacter* sp., 9 pacientes apresentaram cultura positiva para *P. aeruginosa* e bactérias do CBc, apenas 1 paciente apresentou cultura positiva para *P. aeruginosa* e *Pandoraea* sp. e 2 pacientes apresentaram cultura positiva para *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*.

Já dentre os 6 pacientes que apresentaram culturas positivas para mais de 2 BGN-NF, 3 deles apresentaram *P. aeruginosa*, bactérias do CBc e *Achromobacter* sp.; um deles apresentou *R. pichetti*, *R. mannitolilytica* e bactérias do CBc; outro apresentou *P. aeruginosa*, bactérias do cBc, *Achromobacter* sp. e *R. pichetti* e outro apresentou *P. aeruginosa*, bactérias do CBc e *S. maltophilia*.

4.4.3. Pacientes colonizados por *P. aeruginosa* e BGN-NF emergentes

Dos 107 pacientes com FC atendidos no HCFMRP-USP, 63 pacientes (59%) estavam colonizados com *P. aeruginosa*, 17 colonizados por bactérias do cBc (16%); 13 colonizados por *Achromobacter* sp. (12%); 10 colonizados por *S. maltophilia* (9.3%), 2 colonizados por *Ralstonia* sp. (1.9%) e um paciente colonizado por *Cupriavidus* sp. e *Pandoraea* sp., com um isolamento de cada gênero (0.9%) (Figura 8).

Figura 8. Número de pacientes colonizados por *P. aeruginosa* e BGN-NF emergentes

Após observar os resultados obtidos por PCR e pelo RFLP, foi possível identificar os genótipos do CBC. Os genótipos mais prevalentes foram *B. cenocepacia* subgrupo IIIB (6 pacientes com 9 isolados), seguido de *B. vietnamiensis* (5 pacientes com 10 isolados), *B. pyrrocinia* (3 pacientes com 5 isolados), *B. cepacia* (2 pacientes com 1 isolado cada), *B. multivorans* (1 paciente com 5 isolados). Nenhum paciente apresentou isolados pertencentes aos genótipos *B. cenocepacia* subgrupo IIIA, *B. stabilis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* e *B. anthina*. Apenas um paciente (FC-7) apresentou mais de um genótipo diferente, *B. cenocepacia* (IIIB) e *B. vietnamiensis*, com distanciamento de 10 meses entre os períodos de isolamento (Figura 9).

Figura 9. Distribuição dos genomovares de bactérias do CBc em pacientes com FC.

4.4.4. Prevalência de bactérias isoladas por faixa etária

A Figura 10 representa a prevalência, por idade, de alguns microrganismos isolados dos pacientes com FC no HCFMRP-USP, incluindo os BGN-NF emergentes.

Com relação ao gênero *Pseudomonas* sp., houve 18 pacientes colonizados com idade até 5 anos, ocorrendo um aumento para 32 pacientes com idade entre 6 e 17 anos, seguido de uma redução para 11 pacientes com idade entre 18 a 34 anos. Somente 2 pacientes estavam colonizados por *Pseudomonas* sp. com idade superior a 34 anos.

Os BGN-NF emergentes estiveram mais presentes em pacientes com idade até 34 anos. O CBc esteve presente em maior número em pacientes com idade entre 6 a 17 anos, sendo que quantidade expressiva de recém-nascidos até 1 ano de idade também estavam colonizados por CBc. *S. maltophilia* esteve mais presente em crianças com idade entre 2 a 5 anos e *Achromobacter* sp. em crianças com idade entre 6 a 10 anos. Apenas um paciente com idade acima de 45 anos estava colonizado por *S. maltophilia*. *Ralstonia* sp. esteve presente em um paciente com idade até um ano e em outro paciente com idade entre 6 e 10 anos. *Cupriavidus* sp. e *Pandoraea* sp. estiveram presentes em apenas um paciente, com idade entre 6 a 10 anos e 25 a 34 anos, respectivamente.

Houve 14 crianças com idade até 5 anos colonizadas por *S. aureus*. O mesmo esteve mais presente (19 pacientes) em pacientes com idade entre 6 e 10 anos. A partir de então

houve uma redução para 6 pacientes com idade entre 18 a 24 anos e 5 pacientes com idade entre 25 e 34 anos.

Outros microrganismos como fungos, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii*, *A. faecalis*, *C. indologenes*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *R. planticola* e *Elizabethkingia* sp., estiveram mais presentes em pacientes com idade até 10 anos; destes, 11 pacientes com idade de até 1 ano, 8 pacientes com idade entre 2 a 5 anos e 6 pacientes com idade entre 6 e 10 anos. Estes microrganismos foram isolados em 6 pacientes com idade entre 11 e 34 anos e em apenas um paciente com idade acima de 45 anos. O número de pacientes por faixa etária está ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Distribuição dos microrganismos isolados nas diferentes faixas etárias.

5. DISCUSSÃO

O acompanhamento das coletas dos espécimes clínicos no ambulatório de FC do HCFMRP-USP foi essencial, por possibilitar assinatura e coleta dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1) dos pacientes fibrocísticos ou de seus responsáveis, e por proporcionar o contato com estes pacientes, o que tornou possível conhecer algumas particularidades de cada um e os procedimentos utilizados por eles para obter uma melhor qualidade de vida.

Os espécimes clínicos dos pacientes foram semeados em meios de cultura não seletivos e seletivos para isolamento dos BGN-NF. O meio de cultura seletivo BCSA é utilizado para isolamento de bactérias do CBc, mas de acordo com Lipuma e colaboradores (2011), este meio de cultura também permite o crescimento de outros BGN-NF emergentes como *B. gladioli*, espécies de *Ralstonia* e *Pandoraea*. O uso do meio de cultura BCSA foi extremamente necessário para isolamento da maioria dos BGN-NF emergentes, em especial bactérias do CBc, as quais na maioria das vezes, não foram isoladas em outros meios de cultura (Tabela 6). O meio de cultura seletivo PAB, apesar de específico para *Pseudomonas* (RAMALHO et al., 2002), possibilitou o crescimento de outros BGN-NF como *A. denitrificans* e *A. xylosoxidans*, bactérias do CBc e *S. maltophilia*, sendo que para três pacientes, *A. xylosoxidans* e *S. maltophilia* foram isolados somente no meio de cultura PAB. O meio de cultura seletivo MC também foi importante por permitir o isolamento de vários BGN-NF, não isolados em outros meios de cultura utilizados.

BGN-NF isolados de pacientes com FC apresentam características que tornam difícil sua identificação. Por exemplo, isolados de pacientes crônicos frequentemente perdem suas características fenotípicas e condições de crescimento em meios de cultura, tornando ainda mais árdua sua identificação (FERNÁNDEZ-OLMOS et al., 2012). Portanto, o uso de métodos moleculares pode ser muito útil para identificação, especialmente em casos nos quais características fenotípicas são confusas e inconclusivas.

Para identificação dos microrganismos por PCR, com o propósito de selecionar *primers* apropriados, inicialmente foi realizada triagem com todos os *primers* utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (dados não mostrados).

Por ter sido realizada PCR para todas as linhagens padrão na etapa de padronização, usando todos os *primers* descritos, houve, nas condições descritas pelos autores (Tabela 3), amplificação de bandas de mesmo tamanho para outros gêneros, para os quais não deveria ter

fragmento amplificado, caracterizando bandas inespecíficas. Este fato comprovou que alguns *primers* não eram tão específicos conforme as condições descritas.

Na tentativa de minimizar este problema, ou seja, para aumentar a especificidade de alguns *primers*, foram realizadas várias PCRs alterando concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), temperatura de *annealing* e número de ciclos. Deve ser ressaltado que a procedência (fabricante) entre os reagentes utilizados pode ter influenciado no resultado das amplificações durante esta etapa de identificação por PCR.

Os *primers* BCR1/BCR2 foram usados na identificação de bactérias do CBc. De acordo com Mahenthiralingam e colaboradores (2000), estes *primers* foram testados para os genomovares de *Burkholderia* de I a V, utilizando temperatura de *annealing* de 58°C, e produziram bandas para todos os genomovares testados, e não para *Ralstonia* sp. e *S. maltophilia*. Utilizando as mesmas condições do artigo referenciado, houve amplificação de fragmentos de tamanhos esperados para algumas espécies de *Burkholderia*, exceto para os genomovares I, II, V, VII e IX. Foram necessárias então, duas PCR, uma com diminuição da temperatura de *annealing* para 56 °C e outra para 55°C, para obter produtos amplificados para todos os genomovares. Além das bactérias já testadas pelo autor, foram analisadas também *Achromobacter* sp., *Pandoraea* sp. e *Cupriavidus* sp., e não houve fragmentos amplificados para nenhum destes gêneros. Provas bioquímicas como produção de DNase, hidrólise de PYR e descarboxilação da lisina foram realizadas para confirmação do gênero *Burkholderia*.

Devido à possibilidade de bactérias do CBc propagarem-se de um paciente para outro, identificação precisa destes microrganismos é extremamente importante (CARVALHO et al., 2007). Portanto, a alta especificidade do par de *primers* para o CBc, com uso das condições descritas neste trabalho durante a identificação por PCR, permite a adoção de política de segregação de indivíduos infectados por estas bactérias em qualquer hospital.

Testes bioquímicos não contribuem para identificação das espécies de *Burkholderia* já que apresentam número muito alto de características fenotípicas variáveis, sendo necessário, portanto, métodos moleculares para sua identificação. Além disso, novos *clusters* filogenéticos estão sendo descritos por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), o que dificulta ainda mais a diferenciação de bactérias desse complexo por características fenotípicas (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008).

Devido à complexidade em diferenciar os genomovares de bactérias do CBc por provas bioquímicas, dois métodos moleculares foram utilizados; PCR e RFLP.

Durante a padronização da técnica da PCR para identificação dos genômicos do CBc, *primers* específicos para cada espécie de *Burkholderia* foram testados com todas as linhagens padrão.

Os *primers* BCRG11/BCRG12, BCRBM1/BCRBM2, BCRG3A1/BCRG3A2, BCRG3B1/BCRG3B2, BCRG41/BCRG42 e BCRBV1/BCRBV2, foram utilizados na identificação de *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* (IIIA), *B. cenocepacia* (IIIB), *B. stabilis* (IV) e *B. vietnamiensis* (V), respectivamente (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000). O autor testou todos estes *primers* apenas para os genômicos de I a V, descritos até aquele momento, e todos eles obtiveram amplificação de fragmentos específicos. Neste estudo o par de *primers* referentes à espécie *B. stabilis* (IV) foi o único que amplificou produtos de tamanhos esperados nas condições descritas pelo autor. Os *primers* referentes à *B. cenocepacia* (IIIA) e *B. cenocepacia* (IIIB), nas condições descritas, não amplificaram para nenhuma linhagem. Foi necessário então diminuir a temperatura de *annealing* para 59°C e 58°C, respectivamente, para que produtos amplificados de tamanhos esperados fossem gerados sem haver produção de fragmentos inespecíficos. Os *primers* referentes à espécie *B. cepacia* e *B. multivorans* também não amplificaram para nenhuma das linhagens nas condições descritas pelo autor. Após diminuição da temperatura de *annealing* para 58°C estes *primers* geraram produtos de amplificação de tamanhos esperados para cada genômico em questão, mas também amplificaram fragmentos de mesmo tamanho e intensidade para outras linhagens. O par de *primers* BCRG11 e BCRG12 utilizado na identificação de *B. cepacia*, amplificou fragmentos inespecíficos para *B. cenocepacia* (IIIA – BC 818), *B. pyrrocinia* (IX – ATCC 39227) e *B. pyrrocinia* (IX – LMG 14191). O par de *primers* BCRBM1 e BCRBM2 utilizado na identificação de *B. multivorans*, amplificou fragmentos inespecíficos para *B. cenocepacia* (IIIB – BC 842) e *B. stabilis* (IV – BC 790). O par de *primers* utilizado na identificação de *B. vietnamiensis* gerou produtos de amplificação de mesmo tamanho e intensidade para *B. vietnamiensis*, mas também para outras linhagens. Mesmo aumentando a temperatura de *annealing* até 67°C, ainda ocorreram amplificações inespecíficas para *B. multivorans* (II – BC 788), *B. cenocepacia* (IIIB – BC 842), *B. stabilis* (IV – BC 790), *B. anthina* (VIII – LMG 16670) e *B. pyrrocinia* (IX – ATCC 39227).

O par de *primers* G6N e BCR1 utilizado na identificação de *B. dolosa*, adotando as mesmas condições descritas pelo autor, amplificou produtos de mesmo tamanho apenas para esta espécie (VERMIS et al., 2004).

O par de *primers* BCRGC1 e BCRGC2 utilizado na identificação de *B. ambifaria*, nas condições descritas por Coenye e colaboradores (2001a), não gerou produtos amplificados. Mesmo diminuindo a temperatura até 55°C, estes *primers* continuaram sem gerar nenhuma amplificação.

O par de *primers* BCRG81 e BCRG82 utilizado na identificação de *B. anthina*, nas condições descritas pelo autor, também não gerou nenhum produto de amplificação (VANDAMME et al., 2002). Após diminuir a temperatura para 59°C, fragmentos de tamanhos esperados foram amplificados para *B. anthina* (VIII – LMG 16670), mas nenhum produto foi gerado para *B. anthina* (VIII – LMG 20980), portanto este par de *primers* foi específico mas sem sensibilidade.

O método RFLP proporcionou identificação precisa de todas as linhagens do CBc de acordo com Leite e colaboradores (2011). Neste estudo, também foi possível a identificação de todos genovares analisados, exceto de *B. cepacia* (I) e *B. cenocepacia* (IIIA), que obtiveram o mesmo padrão de bandas tornando impossível sua diferenciação. As mesmas condições do artigo foram utilizadas, divergindo apenas o período de incubação a 37°C com a enzima de restrição *HaeIII*, o qual foi utilizado 4 horas ao invés de 2 horas e também realização de purificação dos amplificados gerados pela PCR com os *primers* BCR1 e BCR2. Alterações como mudança no período de incubação, mudança no tempo e condições de corrida foram feitas com o objetivo de diferenciar os genovares I e IIIA, mas não foi obtido sucesso.

Como o RFLP foi mais simples e específico do que a PCR para identificação dos genovares do CBc, este método pode ser utilizado como primeira escolha na identificação de bactérias do CBc. Porém, os *primers* utilizados na identificação de *B. cepacia* (I) e *B. cenocepacia* (IIIA) podem ser utilizados para diferenciar estas duas espécies já que por RFLP não foi possível.

Os *primers* AX-F1 e AX-B1, utilizados na identificação de *Achromobacter* sp., geraram produtos de amplificação de tamanhos esperados, adotando as mesmas condições descritas (LIU et al., 2002). Provas de O/F glicose e xilose, redução de nitrato, utilização do citrato, hidrólise do PYR e produção de DNase são necessárias para confirmação do gênero e identificação de espécies de *Achromobacter*.

Da mesma maneira, para identificação de *S. maltophilia*, utilizando os *primers* SM1/SM4, nas condições descritas por Whitby e colaboradores (2000), houve fragmento

amplificado somente para este gênero, mas o presente estudo proporcionou averiguar a especificidade deste *primer* contra outros gêneros e não somente para algumas espécies de *Burkholderia*, como descrito pelo autor (WHITBY et al., 2000). Como a PCR realizada para identificação de *S. maltophilia* permitiu a identificação de espécie, provas bioquímicas como produção de DNase, hidrólise de PYR e descarboxilação da lisina foram realizadas apenas para confirmação do gênero. Durante a identificação de gênero/espécie dos isolados dos pacientes com FC, um caso já relatado (FC-6a AS2) apresentou fragmentos amplificados utilizando o par de *primers* referentes a *S. maltophilia*, mas foi identificado como *Elizabethkingia* por provas bioquímicas. Este fato determina que os *primers* SM1/SM4 referentes à *S. maltophilia* podem amplificar fragmentos também para o gênero *Elizabethkingia*, o qual não tinha sido padronizado devido à ausência de linhagem padrão.

Os *primers* RalGS-F/RalGS-R usados para identificação de *Ralstonia* sp., proporcionaram resultados concordantes com o esperado (fragmento de 546 pb conforme Tabela 3). Usando estes mesmos *primers* nas mesmas condições de PCR, houve produtos de amplificação não esperados para *Cupriavidus* sp., com amplificação de mesmo tamanho de fragmento e intensidade, mesmo aumentando a temperatura de *annealing* de 58 até 62°C. De acordo com Coenye e colaboradores (2005), este par de *primers* gera fragmento amplificado apenas para *Ralstonia* sp., e não para bactérias do CBc, *Pandoraea* sp., *A. xylosoxidans* e *S. maltophilia*. Não há referência de que estes *primers* tenham sido testados para *Cupriavidus* sp. Suspeita-se de *Ralstonia* sp. quando, ao ser realizada PCR para *Pandoraea* sp. e *Ralstonia* sp., usando os *primers* spuF/spuR e RalGS-F/RalGS-R, respectivamente, há amplicons gerados pelos dois *primers*. Na tentativa de diferenciar *Ralstonia* sp. de *Cupriavidus* sp. também pode ser realizada provas bioquímicas como O/F glicose e crescimento em BCSA. Já para identificação da espécie de *Ralstonia* sp., devem ser realizadas provas bioquímicas como O/F xilose, maltose, sacarose e lactose, e redução do nitrato.

É recomendado o uso de cinco pares de *primers* diferentes para identificação de *Pandoraea* (COENYE et al., 2001), sendo um deles para o gênero, outro para as espécies *P. apista* e *P. pulmonicola*, outro para *P. sputorum*, outro para *P. norimbergensis* e outro para *P. pnomenusa*. De acordo com a ferramenta BLAST, apenas os *primers* para *P. sputorum* e *P. norimbergensis*, amplificam fragmentos do gênero *Pandoraea*. Os *primers* spuF/spuR, usados na identificação de *P. sputorum*, com temperatura de *annealing* de 63°C, geraram amplicons de tamanho esperado para esta espécie, mas também gerou produto amplificado de mesmo tamanho e intensidade para *R. pickettii*, mesmo aumentando a temperatura até 65°C. O autor

descreve que não obteve fragmento amplificado para *R. pickettii* usando estes mesmos *primers*. Com o intuito de selecionar todas as espécies de *Pandoraea*, alterações nas condições da PCRs foram realizadas. A diminuição do número de ciclos de 30 para 20, mantendo a temperatura de *annealing* em 63°C, possibilitou o aparecimento de bandas para todas as outras espécies de *Pandoraea* testadas, com uma menor intensidade, mas houve amplificação também para *R. pickettii* e *S. maltophilia*. Foi necessário então, aumentar a temperatura para obter maior especificidade. Utilizando temperatura de 65°C, foi mantido o sucesso na amplificação de fragmentos para todas as espécies de *Pandoraea* testadas, eliminando amplificação cruzada para *S. maltophilia*, mas não para *R. pickettii*, a qual continuou apresentando bandas. Com o intuito de diferenciar os gêneros *Pandoraea* e *Ralstonia* pode ser realizada PCR também para *Ralstonia* sp. utilizando o par de *primers* RalGS-F/RalGS-R, havendo amplicons apenas utilizando o par de *primers* spuF/spuR, usado na identificação de *Pandoraea* sp., existe uma grande suspeita de ser *Pandoraea* sp. Também podem ser realizadas provas bioquímicas como oxidase, O/F xilose, maltose, lactose e sacarose para auxiliar na identificação do gênero. Somente provas bioquímicas não são suficientes para identificação de espécie para o gênero *Pandoraea*.

O par de *primers* ral2f/ral2r específico para *Cupriavidus* sp., utilizado nas mesmas condições descritas pelo autor (BARRETT; PARKER, 2006), proporcionou amplificação para *Cupriavidus* sp., mas também para *Achromobacter* sp., *Pandoraea* sp. e *Ralstonia* sp. Mesmo aumentando a temperatura de *annealing*, não foi possível eliminar bandas inespecíficas, dificultando a identificação para este gênero por PCR. Para solucionar este problema, após realização de PCR para os gêneros *Pandoraea* sp. e *Ralstonia* sp., havendo positividade de amplicons somente para o par de *primers* RalGS-F/RalGS-R, utilizado na identificação de *Ralstonia* sp., a suspeita de ser bactéria pertencente ao gênero *Cupriavidus* sp. é muito grande. Provas bioquímicas como oxidase, O/F glicose, O/F xilose podem colaborar na identificação destes quatro gêneros, mas não são conclusivas. Já para identificação da espécie de *Cupriavidus*, produção de urease pode diferenciar *C. gilardii* e *C. respiraculi* de *C. pauculus*. Barrett e colaboradores (2006) incluíram em seu trabalho apenas linhagens de *Cupriavidus* e de algumas espécies de *Burkholderia*, com intuito de analisar especificidade do par de *primers* ral2f/ral2r, e obtiveram amplificação apenas para *Cupriavidus* sp., confirmando o resultado deste trabalho com relação a *Burkholderia* sp.

Com estes dados, pode ser recomendado que se faça, após a triagem fenotípica (coloração de Gram, teste da O/F de glicose e produção de oxidase), primeiramente PCR,

através da qual é identificado gênero e/ou espécie de BGN-NF emergentes. A ordem dos *primers* a serem utilizados na PCR deve ser selecionada de acordo com maior especificidade dos *primers* e maior probabilidade de encontrar os microrganismos a serem identificados em pacientes com FC. Secundariamente, provas bioquímicas convencionais devem ser realizadas com o objetivo de confirmar gêneros e identificar algumas espécies não detectadas por PCR e; para alguns BGN-NF emergentes que apresentem resultados fenotípicos diferente da PCR, pode ser realizado API[®]/NE, apesar de não ter funcionado em alguns casos. Este esquema de identificação pode ser muito útil e acessível à maioria dos laboratórios clínicos, já que o padrão ouro de identificação, sequenciamento de DNA, é um método muito caro.

Os dados obtidos na identificação bioquímica para confirmação da identificação dos gêneros, após PCR, estão de acordo com a literatura. O teste bioquímico de avaliação de produção da oxidase foi indispensável. Considerando que a grande maioria dos BGN-NF são produtores da oxidase, esta característica pode auxiliar na diferenciação principalmente de *S. maltophilia* pelo fato da maioria não produzir esta enzima, juntamente com *Pandoraea* sp. e algumas bactérias do CBc, que são variáveis com relação a este teste. Cerca de 64% das bactérias identificadas como *S. maltophilia* apresentaram negatividade para produção da oxidase, confirmando o que é descrito na literatura. O teste da descarboxilação da lisina, hidrólise do PYR e produção de DNase contribuíram muito para a identificação dos BGN-NF; *A. xylosoxidans* não descarboxila a lisina, não produz DNase mas hidrolisa o PYR, enquanto que *S. maltophilia* apresenta positividade para descarboxilação da lisina e hidrólise do PYR e negatividade para produção de DNase. Todas as espécies de *Burkholderia* não apresentam produção de DNase e hidrólise do PYR, e para maioria é constatada a descarboxilação da lisina.

Para resultados discrepantes entre provas bioquímicas e PCR foi realizado identificação pelo API. Este método foi realizado para 9 bactérias diferentes, dentre as quais, o resultado de seis delas foi igual ao resultado da PCR, confirmando o resultado de identificação já obtido. Em apenas um caso houve divergência entre estes dois resultados, amostra identificada como *S. maltophilia* por PCR e como *Elizabethkingia* através do API. Duas amostras obtiveram resultado inconclusivo utilizando o API. Apesar deste método bioquímico ter sido utilizado para poucas amostras, a maioria dos resultados estiveram de acordo com o resultado do PCR, mostrando-se útil na identificação de alguns BGN-NF.

Pelo menos uma amostra clínica de cada paciente foi identificada pelo método *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)

(dados não mostrados). Este método vem sendo utilizado em vários estudos para a identificação de alguns microrganismos, incluindo BGN-NF; e, atualmente tem sido incorporado em laboratórios de microbiologia clínica. Baseia-se em massas moleculares relativas de proteínas (incluindo proteínas ribossômicas), que produzem impressões digitais de massa espectral específicas para diferentes organismos, gerando um espectro único péptico para cada isolado testado. Este espectro é comparado com uma base de dados interna para identificação bacteriana e é necessária a medição de proteínas em abundância para que haja reprodutibilidade (FERNÁNDEZ-OLMO et al., 2012; DESAI et al., 2012). Foi possível identificação para isolados de apenas oito pacientes. O resultado obtido por este método foi similar ao resultado da PCR, havendo divergência em apenas um dos isolados (FC-78 BCSA), o qual foi identificado como bactérias do CBc tanto por PCR, quanto por provas bioquímicas; mas como *Ochrobactrum* pelo MALDI-TOF MS.

No período de estudo, julho/2011 a setembro/2012, foram analisados espécimes clínicos de 107 pacientes, sendo 43.93 % dos pacientes do gênero feminino e 56.07 % do gênero masculino. Estes dados estão de acordo com o Registro Brasileiro de FC, o qual constatou no ano de 2009/2010 que 51.8% dos pacientes de FC eram do gênero masculino e 46.2% eram do gênero feminino (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009). Dados internacionais também demonstram maior percentagem com relação ao gênero masculino, como mostra o Registro de FC do Reino Unido (53.2% do gênero masculino e 46.8% do gênero feminino) e o Registro de FC dos EUA (51.8% do gênero masculino e 48.2% do gênero feminino), enquanto que dois grupos de estudo de FC na Europa apresentaram percentagem maior para o gênero feminino, 54% em Portugal e 51.66% na Itália (COUTINHO et al., 2011; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; LAMBIASE et al., 2011; UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY). Neste trabalho foi observado número bem mais elevado de pacientes da raça branca (64.5%), dados que também se repetem no mundo todo (LEITE et al., 2011).

Com relação à idade, houve percentagem bem elevada de crianças (77.6%) quando comparada à percentagem de adultos, mas estes dados estão de acordo com o Registro Brasileiro de FC, o qual mostra 80.4% dos pacientes com idade menor que 18 anos (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009). Na Europa e nos EUA, a percentagem de crianças foi bem menor; no grupo de estudo de Portugal, 58% dos pacientes eram crianças (menor que 18 anos), no Reino Unido apenas 44.5% possuíam idade menor que 16 anos e nos EUA apenas 48.3% dos pacientes possuíam idade menor que 18 anos

(COUTINHO et al., 2011; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; LAMBIASE et al., 2011; UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY).

De acordo com a Figura 8, do total de 107 pacientes, 63 pacientes (59%) estavam colonizados por *P. aeruginosa*, 17 colonizados por bactérias do CBc (16%); 13 colonizados por *Achromobacter* sp. (12%), sendo 7.7% a prevalência de *A. xylosoxidans*; 10 colonizados por *S. maltophilia* (9.3%), 2 colonizados por *Ralstonia* sp. (1.9%) e um paciente colonizado por *Cupriavidus* sp. e *Pandoraea* sp., com um isolamento de cada gênero (0.9%). Apesar da existência de parentesco entre alguns pacientes com FC neste hospital, nenhum BNG-NF foi isolado entre eles.

A prevalência de *P. aeruginosa* neste estudo esteve relativamente mais elevada quando comparada aos dados do Registro de pacientes com FC do Reino Unido (37.5%), mas o resultado foi semelhante aos dados obtidos pelo Registro de pacientes com FC dos EUA (50.6%) e aos dados obtidos pelo Registro Brasileiro de FC (47.5%) (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009; UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY, 2010). No Centro de FC da Universidade de Nápoles, na Itália, de janeiro de 2004 a dezembro de 2008, a prevalência de *P. aeruginosa* foi de 59%, também muito semelhante à quantidade isolada neste hospital (LAMBIASE et al., 2011). Um estudo realizado com crianças do departamento pediátrico do Hospital Necker-Enfants Malades (Paris, França) entre janeiro de 2006 a dezembro de 2006, de um total de 128 crianças, 78.9% apresentaram *P. aeruginosa*, um número significativamente mais elevado do que o resultado obtido neste estudo (DEGAND et al., 2008). Estes dados se contradizem aos descritos na literatura (LIPUMA et al., 2009) que relatam percentagem baixa de *P. aeruginosa* para crianças com FC.

De acordo com o Registro Brasileiro de FC, 12.1% dos pacientes apresentaram bactérias do CBc no ano de 2009 (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009). Esta percentagem está condizente com a quantidade de pacientes colonizados por este grupo de bactérias neste hospital (16%). Dentre os trabalhos com pacientes de FC no Brasil, um estudo realizado no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, entre fevereiro e dezembro de 2006, também relata percentagem semelhante de 10.6% (LEITE et al., 2011). Já em outros países a prevalência de pacientes colonizados por bactérias do CBc apresenta percentagem bem menor; dados recentes do Registro de FC dos EUA e do Registro de FC do Reino Unido revelam prevalência de 2.6% e 3.8%, respectivamente (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY, 2010).

Outro estudo também realizado nos EUA, no estado de Geórgia, a prevalência foi de 6% no ano de 2012, número um pouco mais elevado, mas ainda bem menor quando comparado a dados brasileiros (DESAI et al., 2012).

A prevalência de *S. maltophilia* obtida neste hospital foi de 9.3%, valor um pouco mais elevado quando comparado aos dados obtidos pelo Registro Brasileiro de FC, o qual revelou quantidade de 5.9%. Por outro lado, este valor está um pouco menor quando comparado a dados referentes ao Registro de FC dos EUA (14%). Também em um estudo realizado em três hospitais da Argentina, entre o ano de 2004 e 2006, houve uma prevalência mais elevada de 15.38% de pacientes com *S. maltophilia* (BOSH et al., 2008; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009).

A prevalência de *Ralstonia* sp. (1.9%) e *Pandoraea* sp. (0.9%), apesar de muito baixa, foi similar à prevalência em várias partes do mundo. Na Argentina, entre 2004 e 2006, a prevalência de *R. pickettii* foi de 0.59% (BOSH et al., 2008); nos EUA a prevalência em 2012 foi de 0.21% para *P. pnomenusa* e de 0.43% para *R. picketti* (DESAI et al., 2012); já na Espanha a prevalência foi um pouco maior, 3.2% para *Ralstonia* sp. e 3.8% para *Pandoraea* sp. (FERNÁNDEZ-OLMOS et al., 2012). Devido à escassez de trabalhos relacionados ao *Cupriavidus* não foi possível correlacionar seus dados.

A prevalência de *Achromobacter* sp. no Brasil de acordo com o Registro Brasileiro de FC foi de apenas 2.9%, um valor significativamente menor do que o obtido neste hospital (12%) (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009). Entretanto, um estudo realizado no Instituto Fernandes Figueira – Fundação Oswaldo Cruz (IFF–FIOCRUZ) e Hospital Universitário Pedro Ernesto - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ), entre janeiro de 2003 e janeiro de 2008 no Rio de Janeiro, relatou prevalência de *A. xylosoxidans* de 21.8%, um número muito maior quando comparado à prevalência de *A. xylosoxidans* neste hospital (7.7%), evidenciando divergência de dados entre regiões brasileiras (PEREIRA et al., 2011). Nos três hospitais da Argentina já relacionados anteriormente, entre 2004 e 2006, a prevalência de *A. xylosoxidans* foi de 11.24% (BOSH et al., 2008), no Registro de FC dos EUA consta prevalência de 6.2% e um estudo realizado no Centro de FC da Universidade de Nápoles, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2008, relatou prevalência de 6.9%. Portanto, a percentagem referente à *A. xylosoxidans* em outros países foi similar ao obtido neste estudo (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; LAMBIASE et al., 2011).

Declínio da função pulmonar pode ser causado devido a infecções por bactérias do CBc (LEITE et al., 2011). Geralmente pacientes colonizados por *Burkholderia* sp. apresentam uma redução na idade média de sobrevivência, mas o risco atribuído a infecções por diferentes genomovares não é muito conhecido (MANNO et al., 2004). Sabe-se que o genomovar mais prevalente nos pacientes com FC é *B. cenocepacia*, seguido de *B. multivorans*. Além disso, *B. cenocepacia* é considerado um dos mais graves patógenos, é a espécie mais relacionada com síndrome cepácia e também contém a maioria das linhagens epidêmicas descritas (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010).

O genomovar mais prevalente no presente estudo foi *B. cenocepacia* subgrupo IIIB com percentagem de 35.3%, dados de acordo com a literatura. Em seguida aparece *B. vietnamiensis* com percentagem de 29.4%, *B. pyrrocia* com 17.6%, *B. cepacia* com 11.8% e *B. multivorans* com 5.9%. Apesar de nenhum caso de síndrome cepácia no HCFMRP-USP ter ocorrido até os dias de hoje, é recomendado atenção devido à elevada percentagem de *B. cenocepacia* isolada no hospital. O Centro de FC regional da Universidade de Nápoles na Itália relatou entre o período de janeiro de 2001 a dezembro de 2005, 58.1% dos pacientes colonizados por *B. cenocepacia* IIIA, 32.3% colonizados por *B. cenocepacia* IIIB e 3.2% colonizados por *B. cepacia*, *B. stabilis* e *B. vietnamiensis* (LAMBIASE et al., 2011). Já na Espanha, 31 hospitais e laboratórios clínicos espalhados entre as 19 províncias, entre o ano de 1997 e 2010, encontraram 22.3% de *B. multivorans*, 14.8% de *B. cenocepacia* subgrupo IIIA, 9.5% de *B. cepacia* e *B. stabilis*, 6.7% de *B. vietnamiensis*, 6% de *B. cenocepacia* subgrupo IIIB, e finalmente 0.48% de *B. ambifaria* e *B. pyrrocinia* (MEDINA-PALCUAL, 2012). Dados Brasileiros referentes ao Hospital das Clínicas da cidade de Porto Alegre, de acordo com Leite e colaboradores (2011), revelam 75% dos pacientes colonizados por *B. cenocepacia* subgrupo IIIA, 37.5% colonizados por *B. cenocepacia* subgrupo IIIB, 15.4% colonizados por *B. multivorans*, 7.7% colonizados por *B. vietnamiensis* e *B. ambifaria*, e nenhum paciente colonizado por *B. cepacia*, *B. dolosa*, *B. anthina* e *B. pyrrocinia*. Apesar da maioria das referências citadas terem apresentado maior percentagem de bactérias do CBc pertencentes ao genomovar *B. cenocepacia*, a distribuição dos outros genomovares foi muito variável, além de nem sempre obedecer a elevada percentagem de *B. multivorans* descrita na literatura.

Ao relacionar a distribuição dos BGN-NF emergentes por faixa etária dos pacientes com FC, bactérias do CBc estiveram mais presente em crianças. Mais de 88% dos pacientes tinham idade até 17 anos, havendo alta percentagem de pacientes menores de um ano de

idade, e o maior número de pacientes encontrado foram adolescentes com idade entre 11 a 17 anos. Dados relacionados no Brasil de acordo com o Registro Brasileiro de FC foram bem semelhantes, 12.9% dos pacientes tinha idade abaixo de 5 anos, em seguida houve uma diminuição deste número para 10.21% de pacientes com idade entre 5 a 10 anos, e a maioria dos pacientes tinha idade entre 10 a 25 anos (43%), com número máximo de pacientes com idade entre 20 e 25 anos, número um pouco mais elevado quando comparado a este hospital (GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009). Em um estudo realizado na cidade de Santa Maria em Portugal, houve 33% dos pacientes colonizados por bactérias do CBc, sendo que 70% dos pacientes eram crianças, dados também similares a este estudo (COUTINHO et al., 2011). Entretanto, no Reino Unido e nos EUA, estes dados são bem diferentes. No Reino Unido, no ano de 2010, apenas 18.5% dos pacientes tinha idade abaixo de 16 anos e o número máximo de pacientes tinham idade entre 20 e 23 anos (UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY, 2010). Da mesma forma, nos EUA no ano de 2011, a grande maioria dos pacientes tinha idade acima de 18 anos de idade, sendo mínimo o número de crianças colonizadas por estas bactérias (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011). O número mais elevado de crianças colonizadas por bactérias do CBc neste hospital, inclusive recém-nascidos, pode ter acontecido devido a não segregação dos pacientes que apresentam estas bactérias.

S. maltophilia também esteve mais presente em crianças principalmente com idade entre 2 a 5 anos de idade. No Brasil, a percentagem de pacientes colonizados por *S. maltophilia* não variou muito entre as diferentes idades, mas o pico esteve maior em pacientes adultos com idade entre 30 a 35 anos, dados que divergem bastante do resultado obtido neste estudo. Também nos EUA, os resultados foram contrários aos obtidos por este estudo, o menor pico se refere a pacientes com idade entre 2 a 5 anos, e o número máximo se refere a pacientes com idade entre 11 a 17 anos (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011; GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA, 2009).

O maior número de pacientes colonizados por *Achromobacter* sp. encontra na faixa etária entre 6 a 10 anos de idade, acometendo portanto um maior número de crianças. Em estudo realizado no Brasil na cidade do Rio de Janeiro, mais de 79% dos pacientes colonizados por *Achromobacter* sp. também eram crianças (PEREIRA et al., 2011). Já nos EUA, *Achromobacter* sp. prevaleceu em pacientes com idade acima de 11 anos de idade, divergindo de dados obtidos no Brasil (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2011).

Na maioria das vezes, *S. aureus* está envolvido na infecção em pacientes jovens com FC e *P. aeruginosa* acomete mais pacientes adultos (LIPUMA et al., 2009). O número de pacientes colonizados por *S. aureus* e *P. aeruginosa* neste estudo foi evidentemente mais elevado do que outros microrganismos isolados. *S. aureus* prevaleceu em crianças principalmente com idade entre 6 a 10 anos, não sendo tão elevado o número de crianças

com idade menor que 5 anos, dados de acordo com a literatura. Porém, pacientes com *Pseudomonas* sp. apresentaram colonização precoce, mais de 79% dos pacientes foram crianças, principalmente com idade entre 6 a 14 anos. Existem evidências de que a aquisição da infecção por *Pseudomonas* sp. em idade precoce, como apresentado neste estudo, contribui para um mal prognóstico (EMERSON et al., 2002).

O tipo de mutação responsável pela transmissão da FC influencia nas manifestações clínicas e na gravidade da doença (PARANJAPE; ZEITLIN, 2008). Nenhum estudo foi realizado com relação ao tipo de mutação dos pacientes com FC no HCFMRP-USP. A manifestação clínica mais frequente neste hospital se refere a problemas pulmonares (90 a 95% dos casos), seguida de distúrbios nutricionais (60%), sendo que cerca de 4 a 5% dos quadros clínicos evoluem para transplantes (informação verbal)².

Como já foi citada, a infecção crônica do trato respiratório é responsável pela grande morbidade e mortalidade da FC (FLUME et al., 2010). No HCFMRP-USP, *Pseudomonas* aparece como uma das principais bactérias associadas à mortalidade/morbidade de pacientes com FC, especialmente linhagens mucóides. Recentemente, pacientes infectados por bactérias do CBc e *Achromobacter* também vêm apresentando piora no quadro clínico².

Portanto, a identificação correta desses patógenos é extremamente importante, de maneira que sejam adotadas medidas de controle mais efetivas e tratamentos mais adequados, com importante contribuição para melhoria na qualidade de vida dos pacientes de FC.

² Informação cedida por Dra. Lídia Torres - Serviço de Referência de Fibrose Cística do HCFMRP- USP, em Ribeirão Preto, 2012.

6. CONCLUSÕES

- O meio de cultura seletivo BCSA foi indispensável para isolamento principalmente de bactérias do CBc.
- O meio de cultura seletivo MC proporcionou isolamento de muitas bactérias que só foram isoladas neste meio.
- O meio de cultura seletivo PAB, apesar de específico para *Pseudomonas*, foi bastante útil no isolamento de BNG-NF emergentes.
- A ferramenta BLAST utilizada antes da padronização neste estudo é considerada etapa fundamental na seleção dos *primers*.
- Gradiente de temperatura de *annealing* foi essencial durante a etapa de padronização, para obtenção de especificidade e sensibilidade com os *primers* utilizados.
- Os *primers* BCR1/BCR2, AX-F1/AX-B1 e SM-1/SM4 usados na identificação de bactérias do CBc, *Achromobacter* sp. e *S. maltophilia*, obtiveram 100% de especificidade e sensibilidade quando testados com linhagens padrões.
- Os *primers* spuF/spuR, RalGS-F/RalGS-R e ral2f/ral2r, usados na identificação de *Pandoraea* sp., *Ralstonia* sp. e *Cupriavidus* sp., apresentaram baixa especificidade.
- Os *primers* BCRG3A1/BCRG3A2, BCRG3B1/BCRG3B2, BCRG41/BCRG42, G6N/BCR1 e BCRG81/BCRG82, usados na identificação de *B. cenocepacia* (IIIA), *B. cenocepacia* (III-B), *B. stabilis* (IV), *B. dolosa* (VI) e *B. anthina* (VIII) respectivamente, obtiveram 100% de especificidade. Porém, os *primers* para *B. cenocepacia* (III-B) e *B. anthina* (VIII) a sensibilidade foi mais baixa.
- Os *primers* BCRG11/BCRG12, BCRBM1/BCRBM2 e BCRBV1/BCRBV2, usados na identificação de *B. cepacia*, *B. multivorans* e *B. vietnamiensis*, não apresentaram boa especificidade.
- Os *primers* BCRGC1/BCRGC2 usados na identificação de *B. ambifaria* (VII) não gerou produtos de PCR amplificados.
- Após a triagem fenotípica para selecionar BGN-NF de pacientes com FC, deve ser realizada PCR com *primers* selecionados, nas condições descritas neste trabalho: primeiramente, devem ser utilizados os *primers* BCR1/BCR2, AX-F1/AX-F2 e SM1/SM2, para a identificação de bactérias do CBc, *Achromobacter* sp. e *S. maltophilia*, respectivamente.

- Provas bioquímicas convencionais devem ser realizadas com o objetivo de confirmar gêneros e identificar algumas espécies não detectadas por PCR e, para resultados discrepantes entre PCR e testes fenotípicos, API[®] – NE é recomendado.
- O método RFLP utilizado na identificação dos genovares do CBc foi mais preciso quando comparado ao PCR, o qual utilizou *primers* específicos para cada uma das espécies/genovares do complexo.
- O genovar mais prevalente foi *B. cenocepacia* subgrupo IIIB com percentagem de 35.3%.
- Houve grande variação na distribuição dos outros genovares encontrados do CBc.
- A percentagem de pacientes colonizados por *P. aeruginosa* neste estudo (59%) esteve relativamente mais elevada quando comparada aos dados do Registro de Pacientes com FC do Reino Unido, mas este resultado foi semelhante a dados Brasileiros, dados dos EUA e dados do Centro de FC da Universidade de Nápoles, na Itália.
- A percentagem de pacientes colonizados por bactérias do CBc neste estudo (16%) foi condizente quando comparado a dados de outros Centros de FC no Brasil, mas esta percentagem foi bem maior quando comparado a dados de outros países.
- A prevalência de *S. maltophilia* obtida neste hospital foi de 9.3%, valor um pouco mais elevado ao obtido pelo Registro Brasileiro de FC, mas um pouco menor quando comparado a dados internacionais.
- A percentagem de pacientes colonizados por *Achromobacter* sp. foi muito diversificada no Brasil. Entretanto, a percentagem de *A. xylosoxidans* neste estudo foi similar quando comparada com dados estrangeiros.
- A percentagem de pacientes colonizados por *Ralstonia* sp. (1.9%) e *Pandoraea* sp. (0.9%), apesar de muito baixa, foi similar à percentagem obtida em várias partes do mundo.
- Bactérias do CBC estiveram mais presentes em crianças e adolescentes, dados semelhantes aos obtidos em Portugal. *Achromobacter* sp. esteve mais presente em crianças com idade inferior a 11 anos de idade, resultado semelhante a dados de outros estudos Brasileiros. *S. maltophilia* esteve mais presente em crianças com idade até 5 anos, havendo apenas um paciente adulto colonizado por esta bactéria. Estes dados estão bem divergentes quando comparados a dados Brasileiros e dados dos EUA. *S. aureus* esteve mais presente em crianças, dados concordantes com a literatura. Já pacientes com *P. aeruginosa* apresentaram colonização precoce.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS³

³ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ALVAREZ, A. E.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J. D. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **Jornal da Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 371-379, 2004.

AMOUREUX, L.; BADOR, J.; SIEBOR, E.; TAILLEFUMIER, N.; FANTON, A.; NEUWIRTH, C. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. **Journal of Cystic Fibrosis**, França, v. 12, p. 170–176, 2013.

ANDERSON, P. Emerging therapies in cystic fibrosis. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, Little Rock, v. 4, n. 3, p. 177-185, 2010.

ANTUNES, E. T. Epidemiologia. In: NETO, L. **Fibrose Cística**: enfoque multidisciplinar. 2. ed. Florianópolis: 2009. cap. 1, p. 25-58.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 72, n. 2, p. 1198–1206, 2006.

BOSCH, A.; MINAN, A.; VESCINA, C.; DEGROSSI, J.; GATTI, L.; MONTANARO, P.; MESSINA, M.; FRANCO, M.; VAY, C.; SCHMITT, J.; NAUMANN, D.; YANTORNO, O. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, Argentina, v. 46, N. 8, p. 2535–2546, 2008.

CARVALHO, A. P. D.; VENTURA, G. M. C.; PEREIRA, C. B.; LEO, R. S.; FOLESCU, T. W.; HIGA, L.; TEIXEIRA, L. M.; PLOTKNOWSKI, M. C. M.; MERQUIOR, V. L. C.; ALBANO, R. M.; MARQUES, E. A. *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Rio de Janeiro, v. 115, n. 4, p. 311-318, 2007.

CIAMPO, I. R. L.; TORRES, L. A. G. M. M.; AUGUSTIN, A.; SAWAMURA, R.; FERNANDES, M. I. M.. Fibrose cística: características ao diagnóstico em um centro de referência. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 36, 2010.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVEENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ghent, v. 51, p. 1481–1490, 2001a.

COENYE, T.; LIU, L.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Identification of *Pandoraea* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. **Journal of clinical microbiology**, Ann Arbor, v. 39, n. 12, p. 4452-4455, 2001b.

COENYE, T.; SPILKER, T.; REIK, R.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Ann Arbor, v. 43, n. 7, p. 3463-3466, 2005.

COENYE, T.; ACKER, H. V.; PEETERS, E.; SASS, A.; BURONI, S.; RICCARDI, G.; MAHENTHIRALINGAM, E. Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Itália, v. 55, n. 5, p. 1912–1919, 2011.

COUTINHO, C.; SANTOS, S. C.; MADEIRA, A.; MIRA, N. P.; MOREIRA, A. S.; CORREIA, I. S. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lisbon, v. 1, n. 12, 2011.

CROSSMAN, L. C.; GOULD, V. C.; DOW, J. M.; VERNIKOS, G. S.; OKAZAKI, A.; SEBAIHIA, M.; SAUNDERS, D.; ARROWSMITH, C.; CARVER, T; PETERS, N.; ADLEM, E.; KERHORNOU, A.; LORD, A.; MURPHY, L.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; RUTTER, S.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; THOMSON, N. R.; AVISON, M. B. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. **Genome Biology**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 74-87, 2008.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION PATIENT REGISTRY. Annual Data Report, 2011. Disponível em: <<http://www.cff.org/>>. Acesso em: 08 Nov. 2012.

DAMAS, C.; AMORIM, A.; GOMES, I. Cystic fibrosis: Review. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Lisboa, v. 14, n. 1, p. 89-112, 2008.

DAVIES, J. C.; D. BILTON. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. **Respiratory Care**, London, v. 54, n. 5, p. 628-40, 2009.

DEGAND, N.; CARBONNELLE, E.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J.; BOURGEOIS, M. L.; SERMET-GAUDELUS, I.; SEGONDS, C.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Paris, v. 46; n. 10; p. 3361–3367, 2008.

DESAI, A. P.; STANLEY, T.; ATUAN, M.; MCKEY, J.; LIPUMA, J. J.; ROGERS, B.; JERRIS, R. Use of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in a pediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, p. 835–838, 2012.

DOI, Y.; POIREL, L.; PATERSON, D. L.; NORDMANN, P. Characterization of a naturally occurring class D β -Lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Paris, v. 52, n. 6, p. 1952-1956, 2008.

DREVINEK, P.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 821 – 830, 2010.

EMERSON, J.; ROSENFELD, M.; MCNAMARA, S.; RAMSEY, B.; GIBSON, R. L. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, Washington, v. 34, p. 91–100, 2002.

FERNÁNDEZ-OLMOS, A.; GARCÍA-CASTILLOA, A.; MOROSINIA, M.; LAMAS, A.; MÁIZC, L.; CANTÓN, R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, Madrid, v. 11, p. 59-62, 2012.

FLUME, P. A.; MOGAYZEL, P. J.; ROBINSON, K. A.; ROSENBLATT, R. L.; QUITTEL, L.; MARSHALL, B. C. Cystic fibrosis pulmonary guidelines pulmonary complications:

Hemoptysis and pneumothorax. **American journal of respiratory and critical care medicine**, Charleston, v.182, n. 3, p. 298-306, 2010.

GAMBARI, R.; BORGATTI, M.; BEZZERRI, V.; NICOLIS, E.; LAMPRONTI, I.; DECHECCHI, M. C.; MANCINI, I.; TAMANINI, A.; CABRINI, G. Decoy oligodeoxyribonucleotides and peptide nucleic acids–DNA chimeras targeting nuclear factor kappa-B: Inhibition of IL-8 gene expression in cystic fibrosis cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical Pharmacology**, Ferrara, v. 80, n. 12, p. 1-8, 2010.

GENE GATEWAY – exploring genes and genetic disorders. A web companion to the human genome landmarks poster. Disponível em: <www.ornl.gov>. Acesso em: 28 Jan. 2013.

GOETZINGER, K. R.; CAHILL, A. G. An update on cystic fibrosis screening. **Clinics in laboratory medicine**, South Euclid, v. 30, n. 3, p. 533-543, 2010.

GOUDIE, A. D.; LYNCH, K. H.; SEED, K. D.; STOTHARD, P.; SHRIVASTAVA, S.; WISHART, D. S.; DENNIS, J. J. Genomic sequence and activity of KS10, a transposable phage of the *Burkholderia cepacia* complex. **Biomed Central Genomics**, Edmonton, v. 9, p. 615-629, 2008.

GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiological Reviews**, Scotland, v. 60, n. 3, p. 539-574, 1996.

GRAINDORGE, A.; MENARD, A.; NETO, M.; BOUVET, C.; MIOLLAN, R.; GAILLARD, A.; MONTCLOS, H.; LAURENT, F.; COURNOYER, B. Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Lyon, v. 66, n. 1, p. 29-40, 2010.

GRUPO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA. Registro Brasileiro de Fibrose Cística. Primeiro relatório anual, ano 2009. Disponível em: <http://www.gbefc.org.br>. Acesso em: 08 Nov. 2012.

HANSEN, C. R. *Stenotrophomonas maltophilia*: to be or not to be a cystic fibrosis pathogen. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, Dinamarca, v. 20, n. 6, p. 628-631, 2012.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H. **Modern Genetic Analysis**. New York: W. H. Freeman, 1999. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. Acesso em: 28 Jan. 2013.

KONIG, C. H. W.; RIFFELMANN, M.; COENYE, T. *Bordetella* and related genera. In: VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 2 ed. Washington DC: 2011. cap. 43, p. 739-750.

LAMBIASE, A.; CATANIA, M. R.; PEZZO, M. D.; ROSSANO, F.; TERLIZZI, V.; SEPE, A.; RAI, V. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious**, Nápoles, v. 30, p. 973-980, 2011.

LEITE, F. C.; MOMBACH, A. B.; MACHADO, P.; LUTZ, L.; VIEIRA, M.; BARTH, A. L. Molecular identification of *Burkholderia cepacia* complex and species distribution among cystic fibrosis patients seen at the reference center in southern Brazil. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 138-144, 2011.

LIPUMA, J. J.; RATHINAVELU, S.; FOSTER, B. K.; KEOLEIAN, J. C.; MAKIDON, P. M.; KALIKIN, L. M.; BAKER, J. R. In vitro activities of a novel nanoemulsion against *Burkholderia* and other multidrug-resistant cystic fibrosis-associated bacterial species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Ann Arbor, v. 53, n.1, p. 249-55, 2009.

LIPUMA, J. J. et al. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In: VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington DC: 2011. cap. 43, p. 692-713.

LIU, L.; COENYE, T.; BURNS, J. L.; WHITBY, P. W.; STULL, T. L.; LIPUMA, J. J. Ribosomal DNA-Directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, Ann Arbor, v. 40, n. 4, p. 1210-1213, 2002.

LUCA, G. R. D.; MENEZES, M. E.; OCAMPOS, M. Genética e diagnóstico molecular. In: NETO, L. **Fibrose Cística**: enfoque multidisciplinar. 2. ed. Florianópolis: 2009. cap. 4, p. 77-92.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BISCHOF, J.; BYRNE, S. K.; RADOMSKI, C.; DAVIES, J. E.; AV-GAY, Y.; VANDAMME, P. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, Edmonton, v. 38, n. 9, p. 3165-3173, 2000.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, Cardiff, v. 14, n. 6, p. 1539–1551, 2008.

MANNO, G.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VANDAMME, P.; LORINI, R.; MINICUCCI, L.; ROMANO, L.; GIANNATTASIO, A.; CHIARINI, L.; BEVIVINO, A. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. **Journal of Clinical Microbiology**, Itália, v. 42, n. 4, p. 1491–1497, 2004.

MCKEON, S., MCCLEAN, S., CALLAGHAN, M. Macrophage responses to CF pathogens: JNK MAP kinase signaling by *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharide. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, Dublin, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2010.

MEDINA-PALCUAL, M. J.; VALDEZATE, S.; VILLALÓN, P.; GARRIDO, N.; RUBIO, V.; SAÉZ-NIETO, J. A. Identification, molecular characterization and antimicrobial susceptibility of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Madrid, v. 31, n. 12, p. 3385-3396, 2012.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2010. p. 77-125.

PANZNER, M. J.; HINDI, K. M.; WRIGHT, B. D.; TAYLOR, J. B.; HAN, D. S.; YOUNGS, W. J.; CANNON, C. L. A theobromine derived silver N-heterocyclic carbene: synthesis,

characterization, and antimicrobial efficacy studies on cystic fibrosis relevant pathogens. **The Royal Society of Chemistry**, Akron, v. 35, p. 7308-7313, 2009.

PARANJAPE, S. M.; ZEITLIN, P. L. Atypical cystic fibrosis and CFTR-Related diseases. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, Baltimore, v. 35, n. 3, p. 116-123, 2008.

PEREIRA, R. H. V.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; ALBANO, R. M.; FOLESCU, T. W.; JONES, M. C. M. F.; LEÃO, R. S.; MARQUES, E. M. *Achromobacter xylosoxidans*: strain characterization in Brazilian cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Rio de Janeiro, 2011.

PHENNICIE, R. T.; SULLIVAN, M. J.; SINGER, J. T.; YODER, J. A.; KIM, C. H. Specific resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection in Zebrafish is mediated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Infection and Immunity**, Orono, v. 78, n. 11, 2010.

PETTIT, R. S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator– modifying medications: The future of cystic fibrosis treatment. **The Annals of Pharmacotherapy**, Indianápolis, v. 46, n. 7-8, p. 1065-1075, 2012.

POMPILO, A.; CROCETTA, V.; CONFALONE, P.; NICOLETTI, M.; PETRUCCA, A.; GUARNIERI, S.; FISCARELLI, E.; SAVINI, V.; PICCOLOMINI, R.; BONAVENTURA, G. D. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. **Biomed Central Microbiology**, Abruzzo, v. 10, p. 102-117, 2010.

POMPILO, A.; CROCETTA, V.; SCOCCHI, M.; POMPONIO, S.; VINCENZO, V. D.; MARDIROSSIAN, M.; GHERARDI, G.; FISCARELLI, E.; DICUONZO, G.; GENNARO, R.; BONAVENTURA, G. D. Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed α -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*. **BMC Microbiology**, Itália, v. 145, n. 12, 2012.

PROESMANS, M.; VERMEULEN, F.; BOECK, K. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. **European Journal of Pediatrics**, Belgium, v. 167, n. 8, p. 839-849, 2008.

- QIN, X.; EMERSON, J.; STAPP, J.; STAPP, L.; ABE, P.; BURNS, J. Use of Real-Time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4312-4317, 2003.
- RAMALHO, R.; CUNHA, J.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Modified *Pseudomonas* agar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. **Journal of Microbiological Methods**, Portugal, v. 49, p. 69–74, 2002.
- RIDDERBERG, W.; WANG, M.; NØRSKOV-LAURITSEN, N. Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Dinamarca, v. 50, n. 8, p. 2688-2694, 2012.
- ROSENSTEIN, B. J.; CUTTING, G. R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statements. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. **Journal of pediatrics**, Maryland, v.132, n. 4, p. 589-595, 1998.
- ROSSOLINI, G. M.; MUSCAS, P.; CHIESURIN, A.; SATTA, G. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Salmonella typhi* gene cluster coding for type 1 fimbrial. **The biology of Salmonella**, p. 408-412, 1993.
- SEGONDS, C.; PAUTE, S.; CHABANON, G. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Ralstonia* and *Pandoraea* species: interest in determination of the respiratory bacterial flora in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Toulouse Cedex 9, v. 41, n. 7, p. 3415-3418, 2003.
- TURRIENTES, M. C.; BAQUERO, M. R.; SANCHEZ, M. B.; VALDEZATE, S.; ESCUDERO, E.; BERG, G.; CANTON, R.; BAQUERO, F.; GALAN, J. C.; MARTINEZ, J. L. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. **Applied and environmental microbiology**, Madri, v. 76, n. 6, p. 1746-1758, 2010.
- UK CYSTIC FIBROSIS REGISTRY. Cystic Fibrosis Trust Annual data report, 2010. Disponível em: <<http://www.cftrust.org.uk>>. Acesso em 17 Jan. 2013.

VALENZA, G.; RADIKE, K.; SCHOEN, C.; HORN, S.; OESTERLEIN, A.; FROSCH, M.; ABELE-HORN, M.; HEBESTREIT, H. Resistance to tobramycin and colistin in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronically colonized patients with cystic fibrosis under antimicrobial treatment. **Institute of Hygiene and Microbiology**, Würzburg, v. 42, n. 11-12, p. 885-889, 2010.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J.; SPEERT, D. P.; GOVAN, J. R. W.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **Immunology and Medical Microbiology**, Ghent, v. 33, p. 143-149, 2002.

VERMIS, K.; COENYE, T.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ghent, v. 54, p. 689-691, 2004.

VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10 ed. Washington DC: 2011. cap. 43, p. 692-713.

ZLOSNIK, J. E. A.; SPEERT, D. P. The role of mucoidy in virulence of bacteria from the *Burkholderia cepacia* complex: a systematic proteomic and transcriptomic analysis. **The Journal of Infectious Diseases**, Vancouver, v. 202, n. 5, p. 770-781, 2010.

ZOCCOLI, C. M.; SILVEIRA, E. R.; MARQUES, E. A.; PEREIRA, S. V. Microbiologia. In: NETO, L. **Fibrose Cística: enfoque multidisciplinar**. 2. ed. Florianópolis: 2009. cap. 6, p. 115-152.

WHITBY, P. W.; CARTER, K. B.; BURNS, J. L.; ROYALL, J. A.; LIPUMA, J. J.; STULL, T. Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-Directed PCR. **Journal of clinical microbiology**, Oklahoma, v. 38, n. 12, p. 4305-4309, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Condições das PCRs utilizadas no estudo.

Complexo *Burkholderia cepacia*

(30 ciclos)

Desnaturação inicial: 96°C – 5 min

Desnaturação: 94°C – 30s

Hibridização: 55 e 56°C – 45s

Extensão: 72°C – 1 min

Extensão final: 72°C – 10 min

***Ralstonia* sp.** (30 ciclos)

Desnaturação inicial: 95°C – 30s

Desnaturação: 94°C – 20s

Hibridização: 58°C – 20s

Extensão: 72°C – 40s

Extensão final: 72°C – 1 min

***Pandoraea* sp.** (20 ciclos)

Desnaturação inicial: 94°C – 2 min

Desnaturação: 94°C – 1 min

Hibridização: 63°C – 45s

Extensão: 72°C – 1 min

Extensão final: 72°C – 10 min

***Cupriavidus* sp.** (32 ciclos)

Desnaturação inicial: 94°C – 3 min

Desnaturação: 94°C – 20s

Hibridização: 62°C – 10s

Extensão: 72°C – 40s

Extensão final: 72°C – 3 min

***Achromobacter* sp.** (30 ciclos)

Desnaturação inicial: 95°C – 3 min

Desnaturação: 94°C – 1 min

Hibridização: 56°C – 1 min

Extensão: 72°C – 1:30 min

Extensão final: 72°C – 10 min

S. maltophilia (30 ciclos)

Desnaturação inicial: 95°C – 5 min

Desnaturação: 95°C – 10s

Hibridização: 58°C – 10s

Extensão: 72°C – 1 min

Extensão final: 72°C – 10 min

Amplificação do gene *Cbl* (30 ciclos)

Desnaturação inicial: 95°C – 5 min

Desnaturação: 94°C – 1 min

Hibridização: 55°C – 1 min

Extensão: 72°C – 1 min

Extensão final: 72°C – 10 min

Amplificação do gene *BCEMS*

(30 ciclos)

Desnaturação inicial: 95°C – 5 min

Desnaturação: 94°C – 1 min

Hibridização: 63°C – 1 min

Extensão: 72°C – 2 min

Extensão final: 72°C – 10 min

Ciclo comum a todos os genomovares do CBc (30 ciclos)

Desnaturação inicial: 94°C – 2 min

Desnaturação: 94°C – 30s

Hibridização: variável de acordo com a espécie (apresentadas ao lado)

Extensão: 72°C – 1 min

Extensão final: 72°C – 10 min

Temperaturas de *annealing* utilizadas na etapa de hibridização de bactérias do CBc

***B.cepacia* (genomovar I): 58°C**

***B. multivorans* (genomovar II): 58°C**

***B. cenocepacia* (genomovar IIIA): 59°C**

***B. cenocepacia* (genomovar IIIB): 58°C**

***B. stabilis* (genomovar IV): 64°C**

***B. vietnamiensis* (genomovar V): 64°C**

***B. dolosa* (genomovar VI): 67°C**

***B. anthina* (genomovar VIII): 59°C**

ANEXOS

ANEXO 1

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

ANEXO 2

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

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

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:

Dr^a 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

Dados de identificação fenotípica e molecular de BGN-NF emergentes isolados de todos pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP

Pacientes	Data	Triagem fenotípica		Primers positivos	PCR	Provas bioquímicas								API	Gênero/especie
		Oxidase	O/F gli			Xil	Mal	Lac	Sac	DNase	Lisina	PYR	Nit		
FC-5a Pab1	3/8/2011	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-5a MC1	3/8/2011	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-5b BC1	29/02/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-5c AS	02/07/12	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-6a AS2	17/08/11	Pos	O	SM	Steno					pos	neg	pos		<i>Elizabethkingia</i>	<i>Elizabethkingia</i>
FC-6a MC1	17/08/11	Pos	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. cepacia</i>
FC-6a MC2	17/08/11	Pos	O	RalGS, spu, ral2	<i>Ralstonia</i>	pos	Pos	pos	neg				neg		<i>R. mannitolytica</i>
FC-6a BC1	17/08/11	Pos	O	RalGS, spu, ral2	<i>Ralstonia</i>	pos	Neg	neg	neg				pos		<i>R. pickettii</i>
FC-7aBC1	27/07/11	pos f	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC7e BC1	16/05/12	pos f	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-9 MC1	13/07/11	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-9 MC2	13/07/11	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-12 BC1	13/07/11	Pos	O	BCR	CBc					neg	neg	neg			<i>B. pyrrocinia</i>
FC-12a BC	27/06/12	pos f	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. pyrrocinia</i>
FC-13 BC1	13/07/11	pos f	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-13b BC1	14/12/11	Pos	ASS	BCR	CBc					neg	pos	neg		CBc	<i>B. vietnamiensis</i>
FC-13c BC1	07/03/12	pos f	O	BCR	CBc					neg	posf	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-13d BC1	28/03/12	Pos	O	BCR	CBc					neg	posf	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-19 BC1	13/07/11	Neg	O	spu e ral2	<i>Pandora</i>	neg	Neg	neg	neg						<i>Pandora</i> sp
FC-23 MC1	20/07/11	pos f	O	SM	Steno					pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>

(Continua)

Dados de identificação fenotípica e molecular de BGN-NF emergentes isolados de todos pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP (continuação)

Pacientes	Data	Triagem fenotípica		Primers positivos	PCR	Provas bioquímicas								API	Gênero/espécie
		Oxidase	O/F gli			Xil	Mal	Lac	Sac	DNase	Lisina	PYR	Nit		
FC-24 AS4	20/07/11	Neg	O	SM	Steno					Neg	pos	neg		<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
FC-26b MC2	18/04/12	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-26b Pab2	18/04/12	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-28e AS	11/06/12	Neg	ASS	SM	Steno					Pos	neg	neg		<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
FC-33 BC1	27/07/11	Pos	O	BCR	CBc					Neg	pos f	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-36b BC1	17/08/11	Neg	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg		Inconclusivo	<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-36b Pab1	17/08/11	Pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-36c MC2	14/12/11	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-37 Pab1 [#]	03/08/11	Pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				Neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-37a AS2 [#]	14/12/11	Pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				Neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC37b AS	5/set/12	Pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-38b AS2	29/02/12	Pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. multivorans</i>
FC-38b MC1	29/02/12	Pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. multivorans</i>
FC-38b BC1	29/02/12	Pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. multivorans</i>
FC-38c BC1	14/03/12	pos f	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. multivorans</i>
FC-38d AS2 [#]	16/05/12	Pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				Neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-38d BC1	16/05/12	pos f	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. multivorans</i>
FC-38d MC1	16/05/12	Pos	O	RalGS, spu, ral2	<i>Ralstonia</i>	pos	Neg	neg	neg				pos		<i>R. pickettii</i>
FC-38e AS [#]	05/set/12	pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				Neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-48a MC1	16/05/12	neg	ASS	SM	Steno					Pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>

(Continua)

Dados de identificação fenotípica e molecular de BGN-NF emergentes isolados de todos pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP (continuação)

Pacientes	Data	Triagem fenotípica		Primers positivos	PCR	Provas bioquímicas								API	Gênero/especie
		Oxidase	O/F gli			Xil	Mal	Lac	Sac	DNase	Lisina	PYR	Nit		
FC-48a Pab1	16/05/12	neg	ASS	SM	Steno					pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-50 MC1	03/08/11	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-50a Pab	14/12/11	pos f	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-50c MC1	28/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-50c Pab1	28/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-51b AS2	14/12/11	neg	ASS	SM	Steno					pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-52d Pab	18/04/12	neg	ASS	SM	Steno					pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-67a MC1	14/03/12	neg	ASS	BCR	CBc					neg	pos	pos		CBc	CBC?
FC-69a BC	04/07/12	pos f	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-70 Pab1	17/08/11	pos	O	AX e ral2	Achormo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-71 BC1	17/08/11	neg	O	SM	Steno					neg	pos	neg		Inconclusivo	<i>S. maltophilia</i>
FC-71 Pab1	17/08/11	pos	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-71a BC1	28/03/12	pos	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-78 BC1	24/08/11	pos	O	BCR	CBc					neg	neg	neg			<i>B. cepacia</i>
FC-78 Pab [#]	24/08/11	pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-78a Pab1	18/04/12	pos f	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-78a MC3	18/04/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-78b MC	04/07/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-82c BC1	21/03/12	pos	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-84 BC1	07/12/11	pos	O	BCR	CBc					neg	neg	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-85 MC1	14/12/11	neg	O	SM	Steno					pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>

(Continua)

Dados de identificação fenotípica e molecular de BGN-NF emergentes isolados de todos pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP (continuação)

Pacientes	Data	Triagem fenotípica		Primers positivos	PCR	Provas bioquímicas								API	Gênero/especie
		Oxidase	O/F gli			Xil	Mal	Lac	Sac	DNase	Lisina	PYR	Nit		
FC-86a MC1 [#]	29/02/12	pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-86aMC2 [#]	29/02/12	pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				neg		neg	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-88 BC1	14/12/11	pos	ASS	BCR	CBc					neg	pos	neg		CBc	<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-88a BC1	07/03/12	pos f	O	BCR	CBc					neg	pos	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-88a Pab1	07/03/12	pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. cenocepacia</i> (IIIB)
FC-94 As3	29/02/12	pos	O	SM	Steno					Pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-94 AS2	29/02/12	pos	O	SM	Steno					Posf	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-94 MC1	29/02/12	pos	O	SM	Steno					Pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-94 Pab1	29/02/12	pos	O	SM	Steno					Pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-95a BC1	28/03/12	pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. pyrrocinia</i>
FC-95a Pab	28/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-95b BC	27/06/12	pos f	ASS	BCR	CBc					Neg	pos	pos		CBc	<i>B. pyrrocinia</i>
FC-96 MC2	07/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-96Pab1	07/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-96a Pab2	21/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-96b Pab1	28/03/12	pos	O	AX e ral2	Achromo	pos				Neg		pos			<i>A. xylosoxidans</i>
FC-99a MC1*	21/03/12	pos	ASS	RalGS e ral2	<i>Cupriavidus</i>										<i>C. respiraculis</i> ou <i>gillardii</i>
FC-102 AS1 [#]	14/03/12	pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				Neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>
FC-102 Pab	14/03/12	neg	ASS	SM	Steno					Pos	pos	neg			<i>S. maltophilia</i>
FC-102a MC3 [#]	16/05/12	pos	ASS	AX e ral2	Achromo	neg				Neg		pos	pos		<i>A. denitrificans</i>

(Continua)

Dados de identificação fenotípica e molecular de BGN-NF emergentes isolados de todos pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP (continuação)

Pacientes	Data	Triagem fenotípica		Primers positivos	PCR	Provas bioquímicas								API	Gênero/especie
		Oxidase	O/F gli			Xil	Mal	Lac	Sac	DNase	Lisina	PYR	Nit		
FC-103 BC	21/03/12	pos f	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-103 Pab2	21/03/12	pos f	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. vietnamiensis</i>
FC-112 BC1	18/04/12	pos	O	BCR	CBc					Neg	pos	neg			<i>B. pyrrocinia</i>

* urease negativa; # citrato positivo; PCR reação em cadeia da polimerase; BC *Burkholderia cepacia* Selective Agar (BCSA); MC macConkey; PAB *Pseudomonas* Agar Base; AS ágar Sangue; O/F gli oxidação/fermentação da glicose; O oxidativo; ASS assacarolítico; Xil xilose; Mal maltose; Lac lactose; Sac sacarose; Nit nitrato; pos positivo; neg negativo; f fraco; Steno *S. maltophilia*; Achromo *Achromobacter*; CBc complexo *B. cepacia*.
(Conclusão)