UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com
fibrose cística envolvendo *Achromobacter* e bactérias do
complexo *Burkholderia cepacia***

Carolina Paulino da Costa Capizzani

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose
cística envolvendo *Achromobacter* e bactérias do complexo
*Burkholderia cepacia***

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: *Carolina Paulino da Costa Capizzani*

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

Ribeirão Preto

2017

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 *Achromobacter* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*
Ribeirão Preto, 2017.

89 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa.

1. Fibrose cística. 2. Epidemiologia. 3. *Burkholderia*. 4. *Achromobacter*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Carolina Paulino da Costa Capizzani

Título de trabalho: Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose cística envolvendo *Achromobacter* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: 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:

Prof. Dr. (a)

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr. (a)

Instituição:

Assinatura:

Dedico este trabalho à minha mãe, que não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, e ao Rodrigo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

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 Dr^a Lídia Alice Gomes Monteiro Marin Torres, pneumologista pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por toda a sua dedicação, disponibilidade e incentivo. Suas críticas construtivas, discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso.

À Lucélia Aparecida Pereira, bióloga 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 colegas do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular pelo carinho, acolhimento e auxílios científicos.

Aos meus queridos e verdadeiros amigos, que fizeram meus dias mais especiais e alegres, e que mesmo em momentos difíceis estiveram presentes, me dando força e carinho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/14494-8, 2013/13455-6 e 2015/04615-5) 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.

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.

***“A consciência é meu guia, a paz é meu abrigo,
a experiência é minha escola, e o obstáculo é minha lição.”***

(Chico Xavier)

RESUMO

CAPIZZANI, C. P. C. **Epidemiologia das infecções bacterianas em pacientes com fibrose cística envolvendo *Achromobacter* e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*. 2017.** 89 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Achromobacter sp. e *Burkholderia* sp. são considerados patógenos problemáticos em pacientes com fibrose cística (FC), principalmente por apresentarem linhagens que podem ser transmissíveis e multidroga resistentes. Este trabalho teve como objetivo analisar isolados de *Achromobacter* e do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) de pacientes com FC atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas de Campinas (HCFCM-UNICAMP): identificar gênero/espécies; avaliar a sensibilidade a antimicrobianos; investigar relações genéticas entre os isolados por *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE); elucidar a taxonomia e epidemiologia molecular dos isolados por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e correlacionar os resultados com dados clínicos. Entre julho/2011 a setembro/2014, nos dois hospitais, as espécies mais prevalentes de *Achromobacter* e CBc foram *A. xylosoxidans* e *B. vietnamiensis*, respectivamente. Os antibióticos mais efetivos contra isolados de *Achromobacter* sp. de pacientes do HCFMRP-USP foram imipenem e meropenem e do HCFCM-UNICAMP foram meropenem e ceftazidima. Os antibióticos mais efetivos contra CBc de pacientes do HCFMRP-USP foram sulfametoxazol-trimetoprim e meropenem e do HCFCM-UNICAMP foram ceftazidima e meropenem. Houve suspeita de contaminação cruzada entre alguns pacientes que apresentaram isolados com o mesmo perfil de PFGE. No HCFMRP-USP, isolados de *B. vietnamiensis* de pacientes diferentes tiveram o mesmo perfil de PFGE e apenas 2 pacientes tinham infecção crônica. No HCFCM-UNICAMP, isolados de *B. cenocepacia* IIIB de 4 pacientes apresentaram o mesmo pulsotipo, porém nenhum dos pacientes tinha infecção crônica. Isolados de *B. vietnamiensis* e *B. multivorans* de pacientes diferentes no HCFCM-UNICAMP também apresentaram o mesmo pulsotipo, e apenas um paciente colonizado por *B. multivorans* tinha infecção crônica. No HCFCM-UNICAMP, isolados de *Achromobacter* apresentaram perfis únicos de PFGE, enquanto que no HCFMRP-USP houve suspeita de contaminação cruzada somente entre pacientes colonizados por *A. xylosoxidans*, sendo que 3 destes pacientes estavam com infecção crônica. Nos dois hospitais, 17 STs foram identificados em isolados do CBc, 14 deles pela primeira vez e 3 STs (ST17, ST369 e ST911) apresentaram distribuição intercontinental. Em isolados de pacientes dos dois hospitais foram identificados alguns STs em comum (STs 1056, 1057, 369 e 911), o que pode sugerir ancestral comum. No total, 6 STs diferentes foram identificados em isolados de *A. xylosoxidans* de pacientes do HCFMRP-USP, dos quais 3 STs apareceram pela primeira vez e os outros 3 STs apresentaram distribuição intercontinental. Nenhuma das espécies apresentou linhagens epidêmicas descritas. Os pacientes colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans* apresentaram valores de escore de Shwachman, índice de massa corporal (IMC) e função pulmonar menos preservados e exacerbações ligeiramente mais frequentes do que pacientes colonizados por bactérias do CBc. Este estudo possibilitou a correta identificação dos patógenos proporcionando a adoção de medidas de controle mais efetivas e tratamentos mais adequados, além de atualização do banco de dados epidemiológicos, o que facilita a análise colaborativa multicêntrica e auxilia no controle de infecção global destes patógenos.

Palavras-chave: Fibrose cística, Epidemiologia, *Burkholderia*, *Achromobacter*.

ABSTRACT

CAPIZZANI, C. P. C. **Epidemiology of bacterial infections in patients with cystic fibrosis involving *Achromobacter* and *Burkholderia cepacia* complex.** 2017. 89 f. Thesis (Doctorate). Ribeirão Preto School of Pharmacological Sciences – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Achromobacter sp. and *Burkholderia* sp. are troublesome pathogens in cystic fibrosis (CF) patients, mainly because they may have transmissible and multidrug resistant strains. The aim of this study was to analyze the *Achromobacter* and *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) isolates from CF patients treated at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) and Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas de Campinas (HCFCM-UNICAMP); to identify genus/species; to evaluate antimicrobial susceptibility; to investigate clonal relatedness among isolates by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE); to elucidate taxonomy and molecular epidemiology of the isolates by Multilocus Sequence Typing (MLST), and to relate the results to clinical data. Between July/2011 and September/2014, in both hospitals, the most prevalent species of *Achromobacter* and Bcc were *A. xylosoxidans* and *B. vietnamiensis*, respectively. The most effective antibiotics against *Achromobacter* sp. isolates of patients from HCFMRP-USP were imipenem and meropenem, and from HCFCM-UNICAMP were meropenem and ceftazidime. The most effective antibiotics against Bcc isolates of patients from HCFMRP-USP were sulfamethoxazole-trimethoprim and meropenem, and from HCFCM-UNICAMP were ceftazidime and meropenem. Cross-contamination was suspected among some patients who presented isolates with the same PFGE profile. In HCFMRP-USP, isolates of *B. vietnamiensis* from different patients showed the same PFGE profile, and only 2 patients had chronic infection. In HCFCM-UNICAMP, isolates of *B. cenocepacia* IIIB of 4 patients showed the same pulsetype, but none of the patients had chronic infection. Isolates of *B. vietnamiensis* and *B. multivorans* from different patients from HCFCM-UNICAMP also showed the same pulsetype, and only one patient colonized by *B. multivorans* had chronic infection. In HCFCM-UNICAMP, *Achromobacter* isolates showed unique profiles of PFGE, whereas in HCFMRP-USP cross-contamination was only suspected among patients colonized by *A. xylosoxidans*, and 3 of these patients had chronic infection. In both hospitals, 17 STs were identified in Bcc isolates, 14 of them for the first time and 3 STs (ST17, ST369 and ST911) presented intercontinental distribution. In both hospitals, some common STs (STs 1056, 1057, 369 and 911) were identified, which may suggest a common ancestor. In total, 6 different STs were identified in *A. xylosoxidans* isolates of patients from HCFMRP-USP, of which 3 STs were identified for the first time, and the other 3 STs presented intercontinental distribution. None of the species presented described epidemic strains. Patients chronically colonized by *A. xylosoxidans* showed less preserved Shwachman score, body mass index (BMI) and lung function, and slightly more frequent exacerbations than patients colonized by Bcc bacteria. This study provided the correct identification of the pathogens, allowing the adoption of more effective control measures and adequate treatments, besides updating the epidemiological database, which

facilitates the multicentric collaborative analysis and assists in the control of global infection of these pathogens.

Key words: Cystic fibrosis, Epidemiology, *Burkholderia*, *Achromobacter*.

RESUMEN

CAPIZZANI, C. P. C. **Epidemiología de las infecciones bacterianas en pacientes con fibrosis quística involucrando *Achromobacter* y las bacterias del complejo *Burkholderia cepacia*. 2017.** 89 f. Tesis (Doctorado). Facultad de Farmacia de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Achromobacter sp. y *Burkholderia* sp. son patógenos problemáticos en pacientes con fibrosis quística (FQ), principalmente por presentar cepas que pueden ser transmisibles y multidroga resistentes. El objetivo del estudio fue analizar *Achromobacter* y complejo *Burkholderia cepacia* (CBc) de los pacientes con FQ atendidos en Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) y en Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas de Campinas (HCFCM-UNICAMP): identificar género/especies; evaluar la sensibilidad antimicrobiana; investigar las relaciones genéticas entre los aislados por *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE); aclaración de la taxonomía y epidemiología molecular de los aislados por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) y correlacionar los resultados con los datos clínicos. Entre julio/2011 y septiembre/2014, en los dos hospitales, las especies más frecuentes de *Achromobacter* y CBc fueron *A. xylosoxidans* y *B. vietnamiensis*, respectivamente. Los antibióticos más eficientes contra los aislados de *Achromobacter* sp. de pacientes del HCFMRP-USP fueron imipenem y meropenem, y del HCFCM-UNICAMP fueron meropenem y ceftazidima. Los antibióticos más eficientes contra CBc de pacientes del HCFMRP-USP fueron sulfamethoxazole-trimethoprim y meropenem, y del HCFCM-UNICAMP fueron ceftazidima y meropenem. Hubo sospecha de contaminación cruzada entre pacientes que presentaron aislados con el mismo perfil PFGE. En HCFMRP-USP, aislados de *B. vietnamiensis* de pacientes diferentes tuvieron el mismo perfil PFGE y sólo 2 pacientes tenían infección crónica. En HCFCM-UNICAMP, aislados de *B. cenocepacia* IIIB de 4 pacientes presentaron el mismo pulsotipo, pero ninguno de los pacientes tenían infección crónica. Aislados de *B. vietnamiensis* y *B. multivorans* de diferentes pacientes en HCFCM-UNICAMP también presentaron el mismo pulsotipo, y solamente un paciente colonizado por *B. multivorans* tenía infección crónica. En HCFCM-UNICAMP, aislados de *Achromobacter* presentaron perfiles únicos de PFGE, mientras que en HCFMRP-USP hubo sospecha de contaminación cruzada solamente entre pacientes colonizados por *A. xylosoxidans*, y 3 de esos pacientes tenían infección crónica. En los dos hospitales, 17 STs fueron identificados en aislamiento del CBc, 14 de ellos por primera vez y 3 STs (ST17, ST369 y ST911) presentaron distribución intercontinental. En aislados de pacientes de ambos hospitales fueron identificados algunos STs en común (STs 1056, 1057, 369 y 911), que puede sugerir el antepasado común. En total, se identificaron 6 STs diferentes en aislados de *A. xylosoxidans* de pacientes del HCFMRP-USP, de los cuales 3 STs aparecieron por primera vez y los otros 3 STs presentaron distribución intercontinental. Ninguna de las especies presentó cepas epidémicas descritas. Los pacientes colonizados crónicamente por *A. xylosoxidans* presentaron valores de score de Shwachman, índice de masa corporal (IMC) y función pulmonar menos preservada y exacerbaciones ligeramente más frecuentes que los pacientes colonizados por las bacterias de CBc. Este estudio permitió la correcta identificación de los patógenos proporcionando la adopción

de medidas de control más efectivas y tratamientos más adecuados, además de la actualización de la base de datos de epidemiología, que facilita el análisis colaborativo multicéntrico y auxilia en el control de la infección global de estos patógenos.

Palabras-clave: Fibrosis quística, epidemiología, *Burkholderia*, *Achromobacter*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Linhagens controle utilizadas nos experimentos.....	11
Quadro 2. Sequências iniciadoras utilizadas na realização da PCR.....	12
Quadro 3. Intervalos das concentrações usadas de cada antibiótico para <i>Burkholderia</i> sp. e interpretação dos resultados.....	14
Quadro 4. Intervalos das concentrações usadas de cada antibiótico para <i>Achromobacter</i> sp. e interpretação dos resultados.....	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados do CBc de pacientes do HCFMRP-USP.....	22
Figura 2. Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Achromobacter</i> de pacientes do HCFMRP-USP.....	23
Figura 3. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados do CBc de pacientes do HCFCM-UNICAMP.....	29
Figura 4. Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Achromobacter</i> de pacientes do HCFCM-UNICAMP.....	30
Figura 5. Estrutura populacional do CBc por MLST e diagrama do CC31.....	35
Figura 6. Estrutura populacional do CBc por MLST e diagrama do CC319.....	36
Figura 7. Estrutura populacional do <i>Achromobacter</i> por MLST.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes cronicamente colonizados por CBc e características microbiológicas de seus isolados.....	26
Tabela 2. Características clínicas dos pacientes cronicamente colonizados por <i>A. xylosoxidans</i> e características microbiológicas de seus isolados.....	27
Tabela 3. Características microbiológicas dos isolados do CBc e <i>Achromobacter</i> de pacientes crônicos.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS	Ágar sangue
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</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>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosine
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CC	Complexo clonal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CHL	Cloranfenicol
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CMHCA	Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado
CVF	Capacidade vital forçada
CZ1	<i>Czech</i> clone 1
d	Degradado
DES	<i>Danish epidemic strain</i>
DLV	<i>Double-locus variant</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo tri-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ET12	<i>Electrophoretic type 12</i>
F	Feminino

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
HCFCM-Unicamp	Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
ids	Números de Identificação
IMC	Índice de massa corporal
IMP	Imipenem
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
LEV	Levofloxacina
LGM	<i>Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms</i>
M	Masculino
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>
MC	Ágar MacConkey
MER	Meropenem
MIN	Minociclina
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
n	Número
O/F	Oxidação/fermentação
p	Probalidade
pb	Pares de bases
PB	Polimixina B
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed - Field Gel Electrophoresis</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PTZ	Piperacilina – tazobactam
PYR	L-pirrolidonil-B-naftilamida

q.s.p	Quantidade suficiente para
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SLV	<i>Single-locus variant</i>
ST	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIC	Ticarcilina – ácido clavulânico
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
V	Versão
VEF1	Volume expiratório forçado em um segundo

LISTA DE SÍMBOLOS

Kda	Kilodalton (s)
Cl⁻	Íons cloro
Na⁺	Íons sódio
®	Marca registrada
°C	Graus centígrados
g	Aceleração gravitacional
μL	Microlitro (s)
%	Porcentagem
HCl	Ácido clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
mL	Mililitro (s)
μg	Micrograma (s)
λ	Comprimento de onda
nm	Nanômetro (s)
ng	Nano grama (s)
X	Vezes
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
U	Unidade
pmol	Picomol
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
M	Molar
mg	Miligramma (s)
V	Volts
<	Menor

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iv
Lista de Quadros	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Símbolos	xii
1.Introdução	01
1.1. Bactérias do complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	03
1.2. <i>Achromobacter</i> sp.....	05
2. Objetivos	07
3. Materiais e métodos	09
3.1. Isolados bacterianos.....	10
3.2. Confirmação dos gêneros bacterianos.....	11
3.3. Identificação das espécies do CBc e de <i>Achromobacter</i>	13
3.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	14
3.5. Tipagem molecular.....	15
3.5.1. Eletroforese em campos pulsados.....	15
3.5.2. Tipagem por Multilocus.....	16
3.6. Avaliação clínica dos pacientes.....	17
4. Resultados.....	19
5. Discussões.....	38
6. Conclusões.....	46
Referências bibliográficas.....	49
Apêndices.....	58
Anexo.....	67

1.INTRODUÇÃO

Fibrose cística (FC) é uma das doenças autossômicas recessivas fatais mais comum no mundo ocidental. 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, e codifica uma proteína de 1480 aminoácidos com massa molecular de 168.138 KDa (proteína CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*). Essa proteína se encontra localizada na membrana apical das células epiteliais de alguns órgãos como intestino, vias biliares, aparelho reprodutor, glândulas sudoríparas, pâncreas, túbulos renais e aparelho respiratório, e tem como função a participação na regulação do transporte de íons através do canal de cloreto regulado por cAMP. A regulação deste canal iônico de cloro interfere no balanço iônico e hídrico do epitélio celular (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008; LUCA; MENEZES; OCAMPO, 2009).

Desde a descoberta do gene da FC em 1989, já foram descritas mais de 2000 mutações responsáveis pela transmissão da doença (FELÍCIO et al., 2016). Mutação neste gene pode levar à redução no número de proteínas CFTR ou sua eliminação (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; DE BOECK, 2008). Esta mutação faz com que haja interrupção da transferência normal dos íons de cloro (Cl^-) e sódio (Na^+) através das membranas celulares levando à desidratação e ao aumento da viscosidade das secreções celulares, o que pode ocasionar falência do *clearance* mucociliar normal (PANZNER et al., 2009; PROESMANS; VERMEULEN; DE BOECK, 2008). Essas alterações podem provocar doença pulmonar obstrutiva crônica progressiva, insuficiência pancreática exócrina e desnutrição, além de concentração elevada de íons de cloro no suor (ROSENSTEIN; CUTTING, 1998). Os pacientes também podem apresentar diabetes, desordens biliares e infertilidade (DAMAS; AMORIM; GOMES, 2008).

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 broncoalveolar coletados de lactentes com FC. Nova aquisição ou expansão clonal de infecções bacterianas crônicas ou intermitentes contribui significativamente para exacerbações, o que pode levar à perda irreversível da função pulmonar em 25% dos pacientes, mesmo após o tratamento (ZEMANICK et al., 2013).

Os quadros normalmente evoluem para bronquiectasias que podem culminar em destruição pulmonar, levando à insuficiência respiratória crônica e morte (ROSENSTEIN; CUTTING, 1998).

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 em infecção de pacientes jovens com FC, enquanto que, em indivíduos mais velhos, *Pseudomonas aeruginosa* é o principal agente responsável. Várias outras espécies como, *Achromobacter* spp., *Burkholderia* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia*, bem como vários outros gêneros e espécies também são isolados de pacientes com FC como *Ralstonia*, *Pandoraea*, *Cupriavidus* (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 pelo uso excessivo de antimicrobianos contra *P. aeruginosa* (POMPILIO et al., 2012).

1.1. Bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*

Bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) compreendem 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 (GOUDIE et al., 2008).

Inicialmente acreditava-se que *Burkholderia cepacia* era uma única espécie, porém, atualmente é conhecido que o CBc é um complexo de espécies filogeneticamente relacionadas. Em 1997 cinco espécies foram identificadas por PCR (16S rDNA) e polimorfismo do gene *recA*, sendo elas: *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia stabilis* e *Burkholderia vietnamiensis* (VANDAMME et al., 1997). Posteriormente, as espécies *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina* e *Burkholderia pyrrocinia* foram

distinguidas por meio de testes baseados no gene *recA* (COENYE et al., 2001; VERMIS et al., 2004). Em 2008, seis novas espécies foram identificadas: *Burkholderia latens*, *Burkholderia diffusa*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia metallica* e *Burkholderia ubonensis* (VANLAERA et al., 2008). Por *Multilocus Sequence Type* (MLST) duas novas espécies foram detectadas, *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia lata* (BALDWIN et al., 2005; VANLAERE et al., 2009). Mais recentemente, as novas espécies *Burkholderia pseudomultivorans*, *Burkholderia stagnalis* e *Burkholderia territorii* foram identificadas por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) (PEETERS et al., 2013; SMET et al., 2015).

A importância de identificar corretamente as espécies do CBc está relacionada com a gravidade da infecção, uma vez que dependendo da espécie isolada, esta pode causar desde a diminuição lenta da função pulmonar até uma septicemia grave frequentemente fatal conhecida como síndrome cepácia (ZLOSNIK; SPEERT, 2010). Essa síndrome é caracterizada por pneumonia necrotizante com febre, bacteremia, elevação da média de sedimentação de eritrócitos e leucocitose, que culmina em rápida e fatal deterioração clínica (GOVAN; DERETIC, 1996; ZLOSNIK; SPEERT, 2010). *B. cenocepacia* é a espécie mais relacionada com a síndrome cepácia (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010).

O CBc inclui linhagens que podem ser altamente resistentes aos antibióticos, o que dificulta o tratamento dos pacientes (LUPO et al., 2015; SMET et al., 2015). Muitas espécies do CBc são altamente transmissíveis e virulentas, e surtos podem resultar da exposição a uma fonte de contaminação ou da disseminação entre pacientes (CABALLERO et al., 2014; SCHAFFER, 2015). A existência de linhagens epidêmicas como *B. cenocepacia* ET12 (ST28) e CZ1 (ST32), e *B. multivorans* ST16 é também documentada (LUPO et al., 2015; VASILJEVIC et al., 2016).

A identificação fenotípica de bactérias do CBc é difícil, e erros de identificação são frequentemente relatados à medida que essas espécies são facilmente confundidas com outros bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF), o que desencadeia problemas em relação à epidemiologia e tratamento de pacientes com FC. Devido à complexidade taxonômica e à semelhança entre as espécies do CBc, métodos fenotípicos tornaram-se desafio para identificação destas bactérias. A análise de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*) do gene *recA* é descrita como método confiável para identificação dos

genomovares do CBc, porém, estudos recentes afirmam que comparações de sequências do gene *recA* utilizando as ferramentas BLAST, *RecA*-RFLP e PCR espécie-específica podem em algum momento não ser suficientes para definir claramente o status taxonômico. Portanto, outras estratégias têm sido utilizadas para este fim (CESARINI et al., 2009).

MLST tem demonstrado ser uma ferramenta precisa, reprodutível e que permite facilidade de transferência de dados entre laboratórios, além de fornecer conhecimentos importantes em relação à diversidade e dinâmica populacional neste grupo de patógenos oportunistas (SPILKER et al., 2009). Pela análise de fragmentos de sete genes *housekeeping*, o MLST permite tanto a identificação de espécies, como discriminação de alta resolução entre as linhagens (PEETERS et al., 2013; SMET et al., 2015). A existência de um banco de dados on-line de MLST para o CBc (<http://pubmlst.org/bcc/>) facilita a análise colaborativa multicêntrica e auxilia no controle de infecção global destes patógenos (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2013).

1.2. *Achromobacter* sp

Achromobacter é BGN-NF aeróbio, produtor de oxidase e catalase; é amplamente distribuído no ambiente natural e está sendo, cada vez mais, reconhecido como patógeno nosocomial clinicamente significativo (AMOUREUX et al., 2013). Inicialmente, *Achromobacter xylosoxidans* era considerado como uma espécie solitária. Posteriormente, *Achromobacter ruhlandii* e *Achromobacter piechaudii* foram realocados do gênero *Alcaligenes* para este gênero, e, em seguida, *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* foi reclassificado como *Achromobacter denitrificans*. Em 2012, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter insolitus*, e *Achromobacter marplatensis* foram descritas como novas espécies do gênero (RIDDERBERG; WANG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2012; SPILKER; VANDAMME; LIPUMA, 2012).

Como a estrutura populacional e taxonômica dessas espécies não estão bem definidas, MLST tem sido útil para melhorar o entendimento da taxonomia, epidemiologia, ecologia e do impacto clínico de *Achromobacter* na FC (SPILKER; VANDAMME; LIPUMA, 2012). Este método baseia-se no sequenciamento de fragmentos de sete genes *housekeeping*: *nusA*, *eno*, *rpoB*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* e *nrdA*, e pelo MLST foi possível descrever 14 novos genogrupos, cada um deles geneticamente

distintos o suficiente para representar novas espécies. Oito delas foram denominadas como *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter animicus*, *Achromobacter spiritinus*, *Achromobacter pulmonis*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter aegrifaciens*, *Achromobacter anxifer* e *Achromobacter dolens* (VANDAMME et al., 2013a, 2013b). Recentemente 4 novas espécies foram sugeridas: *Achromobacter agilis*, *Achromobacter pestifer*, *Achromobacter kerstersii* e *Achromobacter deleyi* (VANDAMME et al., 2016).

Achromobacter é frequentemente confundido com espécies do CBc. Na maioria das vezes, isolados clínicos de *Achromobacter* são identificados erroneamente como *A. xylosoxidans*. Erros na identificação de *A. xylosoxidans* e de espécies não fermentadores comprometem seriamente as medidas de controle de infecção em pacientes com FC (DOI et al., 2008; LIU et al., 2002). Além disso, análises de isolados bacterianos têm identificado variedade de linhagens como "*Achromobacter-like*", que não se enquadram nas espécies conhecidas, o que sugere a existência de vários táxons adicionais distintos (SPILKER; VANDAMME; LIPUMA, 2012).

Um número relativamente limitado de estudos avalia o significado clínico da infecção por espécies de *Achromobacter* em pacientes com FC, e alguns deles sugerem que a infecção crônica por *A. xylosoxidans*, considerada a espécie mais comum, resulta em declínio na função pulmonar (COWARD et al., 2015; NIELSEN; NØRSKOV-LAURITSEN, N BJARNSHOLT; MEYER, 2016). *A. xylosoxidans* é naturalmente resistente à cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, aztreonam e aos aminoglicosídeos, e resistência adquirida à carbapenênicos tem sido documentada (AMOUREUX et al., 2013; COWARD et al., 2015). Também é frequentemente relatada transmissão de *A. xylosoxidans* de paciente para paciente, o que torna ainda mais preocupante a infecção por este microrganismo (SCHAFFER, 2015).

2.OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar características fenotípicas e moleculares de linhagens de *Achromobacter* e bactérias do CBc isoladas de pacientes com FC atendidos em dois hospitais universitários do Estado de São Paulo, no período de julho de 2011 a setembro de 2014.

Objetivos específicos

- Identificar as espécies do CBc por sequenciamento do gene *recA*, e de *Achromobacter* por sequenciamento do gene *nrdA*; e determinar a frequência de ocorrência dos mesmos nos dois hospitais;
- Avaliar a concentração inibitória mínima dos isolados de *Achromobacter* e *Burkholderia* a antimicrobianos;
- Avaliar a epidemiologia molecular de espécies de *Burkholderia* e *Achromobacter* sp. por eletroforese em campos pulsados (PFGE), e inferir na cronicidade dos pacientes;
- Avaliar a taxonomia e epidemiologia de espécies de *Burkholderia* e *Achromobacter* por MLST;
- Avaliar a gravidade da doença em pacientes com infecção crônica por *Achromobacter* e *Burkholderia* correlacionando dados clínicos disponíveis no hospital de Ribeirão Preto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Foram estudados todos BGN-NF identificados como *Achromobacter* e *Burkholderia* isolados de escarros de pacientes com FC atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e a maioria dos BGN-NF destes gêneros isolados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas (HCFCM-Unicamp), no período de julho de 2011 a setembro de 2014.

Inicialmente, as bactérias foram isoladas e identificadas pelo sistema Vitek® II versão 5.04 (bioMérieux) nos Laboratórios de Microbiologia dos dois hospitais.

Todas as bactérias foram então enviadas ao Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), onde foram cultivadas para confirmação da pureza e posterior isolamento, em placas contendo meio de cultura não seletivo ágar Müller-Hinton (Oxoid) acrescido de 5% de sangue de carneiro (ágar sangue - AS) e meios de cultura seletivos ágar MacConkey (MC - Oxoid) e *Burkholderia cepacia* Selective ágar (BCSA - Oxoid), e em seguida estocadas à temperatura de -80°C.

As linhagens-padrão utilizadas neste trabalho estão listadas no Quadro 1.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP sob o nº 210/2011 com concordância do CEP do HCFMRP-USP e do CEP do HCFCM-Unicamp, e termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) obtido de todos os pacientes.

Quadro 1 - Linhagens controle utilizadas nos experimentos

Gêneros/espécies	Referência ¹
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	LMG 1863
<i>Achromobacter piechaudii</i>	LMG 1873
<i>Achromobacter denitrificans</i>	LMG 1231
<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>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
<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); BC Bactérias cedidas pelo Laboratório de Bactérias Gram-Negativas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); ATCC American Type Culture Collection. Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.Confirmação dos gêneros bacterianos

No LEBEM, com o objetivo de confirmar a identificação de gêneros de isolados de *Achromobacter* e bactérias do CBc, foi realizada PCR usando *primers* específicos de interesse descritos no Quadro 2. Testes bioquímicos convencionais como: produção das enzimas oxidase, DNase, teste da oxidação e fermentação da glicose (O/F glicose) e xilose, descarboxilação da lisina, hidrólise da L-pirrolidonil-B-Naftilamida (PYR) e sensibilidade à polimixina B, foram realizados para complementar os resultados obtidos por PCR (LIPUMA, 2011).

Quadro 2 - Sequências iniciadoras utilizadas na realização da PCR

Alvo identificado	Par de Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto da PCR (pb)	Temperatura de annealing (°C)	Referências Bibliográficas
Complexo <i>B. cepacia</i>	BCR1 BCR2	TGACCGGCGAGAAGAGCAA CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	1043	55 e 56	MAHENTHIR ALINGAM et al., 2000
Gênero <i>Achromobacter</i>	AX-F1 AX-B1	GCAGGAAAGAAACGTCGCGGGT ATTTCACATCTTTCTTTCCG	163	56	LIU et al., 2002

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o método de Gianni-Rossolini (ROSSOLINI, 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 foram adicionados 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 foram adicionados 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 foram adicionados 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 armazenado a -20°C.

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* (Quadro 2) para amplificação dos genes, 60ng de DNA e água ultrapura (q.s.p. 25, sigma). Foi utilizado o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%. Depois da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (1µg/mL) e observado sob luz ultravioleta, sendo então fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager (Alpha Innotech, EUA).

3.3. Identificação das espécies do CBc e de *Achromobacter*

Todas as bactérias identificadas por PCR e provas bioquímicas como pertencentes ao CBc tiveram as espécies identificadas pelo sequenciamento do gene *recA*, o qual foi inicialmente amplificado por PCR usando *primers forward* F-AGGACGATTCATGGAAGAWAGC e *reverse* R-GACGCACYGAYGMRTAGAACTT (SPILKER et al., 2009).

O gene *nrdA* foi sequenciado para identificação das espécies de *Achromobacter*, e durante a etapa de amplificação por PCR foram utilizados os *primers forward* F-GAACTGGATTCCCGACCTGTTC e *reverse* R-TTCGATTTGACGTACAAGTTCTGG, de acordo com o website <http://pubmlst.org/achromobacter/>.

Após purificação dos produtos das PCRs foi realizado sequenciamento utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready* e os mesmos *primers* usados na amplificação dos genes. O sequenciamento foi realizado nos sequenciadores automáticos ABI 3730 DNA Genetic Analyser¹ e 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)² e as análises do sequenciamento foram feitas utilizando BioNumerics v 7.5 (Applied Maths).

¹ Centro de Estudos do Genoma Humano – USP, Setor de Sequenciamento de DNA, situado na cidade universitária de São Paulo – USP.

² Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Gent, Bélgica.

3.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos para os primeiros e últimos isolados de CBc e de *Achromobacter* sp. de cada paciente e para isolados do mesmo paciente com perfil de PFGE (*Pulsed - Field Gel Electrophoresis*) diferentes, utilizando o método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado - CMHCA (BD Diagnostic Systems), de acordo com critérios estabelecidos pelo (CLSI, 2016).

Os antibióticos testados contra bactérias do CBc foram: meropenem, ceftazidima, levofloxacina, minociclina, ticarcilina-ácido clavulânico, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol (Quadro 3). Os antibióticos testados contra *Achromobacter* sp. foram: imipenem, meropenem, ceftazidima, ciprofloxacina, levofloxacina, piperacilina-tazobactam, polimixina B, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol (Quadro 4). Os resultados foram interpretados usando *breakpoints* para *Burkholderia cepacia* e outros não *Enterobacteriaceae*, respectivamente. *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada para controle de qualidade do teste.

A partir da solução estoque, foram realizadas 6 ou mais diluições de acordo com os pontos de corte específicos de cada antimicrobiano, utilizando o CMHCA como diluente (Quadros 3 e 4). A CIM foi determinada de acordo com a visualização do crescimento microbiano pela comparação visual com o controle negativo do teste. A determinação da CIM foi realizada em duplicata.

Quadro 3 - Intervalos das concentrações usadas de cada antibiótico para *Burkholderia* sp. e interpretação dos resultados

Antimicrobianos	Intervalo das diluições realizadas	Concentração (µg/mL)		
		CIM		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Ticarcilina- Ac Clavulânico	4/2 – 128/2	≤ 16/2	32/2-64/2	≥128/2
Ceftazidima	0.06 - 64.0	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	0.03 - 32.0	≤ 4	8	≥ 16
Minociclina	0.03 - 32.0	≤ 4	8	≥ 16
Levofloxacina	0.15 - 16.0	≤ 2	4	≥ 8
Sulfametoxazol-Trimetoprim	0.015/0,3–16/304	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Cloranfenicol	2.0 - 64.0	≤ 8	16	≥ 32

Fonte: (CLSI, 2016)

Quadro 4 - Intervalos das concentrações usadas de cada antibiótico para *Achromobacter* sp. e interpretação dos resultados

Antimicrobianos	Intervalo das diluições realizadas	Concentração (µg/mL)		
		CIM		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Piperacilina-tazobactam	4/4 – 128/4	≤ 16/4	32/4 - 64/4	≥ 128/4
Ceftazidima	0.06 - 64.0	≤ 8	16	≥ 32
Imipenem	0.03 - 32.0	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	0.03 - 32.0	≤ 4	8	≥ 16
Polimixina B	0.5 - 16.0	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacina	0.007 - 8.0	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacina	0.15 - 16.0	≤ 2	4	≥ 8
Sulfametoxazol-Trimetoprim	0.015/0,3–16/304	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Cloranfenicol	2.0 - 64.0	≤ 8	16	≥ 32

Fonte: (CLSI, 2016)

3.5. Tipagem molecular

3.5.1. Eletroforese em campos pulsados

Foi analisado o perfil de macrorrestrição do crDNA por eletroforese em campos pulsados de todos os isolados do CBc e de *Achromobacter* sp. com a finalidade de verificar o perfil clonal destas bactérias.

A PFGE foi realizada segundo Gautom (1997) usando o aparelho CHEF-DRIII (BioRad). Uma colônia de cada isolado foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubada a 37° C durante 24 horas. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um tubo *ependorf* e centrifugada por 2 minutos a 15.000 g. As células bacterianas foram lavadas com 500 µL da solução PIV (10mM Tris, pH 8,0, 1,0M NaCl), centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 200 µL de solução de suspensão, sendo 150 µL transferido para um novo tubo e colocado em banho de água a 48°C, durante 5 a 10 minutos. Em seguida foram adicionados 150 µL de agarose (2% Agarose Ultra Pure, Gbco BRL) para a confecção dos blocos de agarose.

Os blocos de agarose foram colocados em tubos contendo 1 mL de solução de lise EC (6 mM Tris, pH 8,0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8,0; 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5%, 0,5% N-laurylsarcosine), acrescentando-se lisozima e RNase à concentração final de 1 mg/mL e 20 µg/mL, respectivamente. Os blocos foram incubados durante 4 a 5 horas

a 37°C. Em seguida a solução de lise foi retirada e foi adicionado 1 mL de solução tamponante ES (EDTA, pH9,0; sarcosil 1%) acrescida de 1 mg/mL de proteinase K e os tubos foram incubados a 50°C durante 18 a 24 horas. Os blocos foram lavados 5 vezes com 13mL da solução tamponante TE 1X (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH8,0) com intervalo de 30 minutos para cada lavagem. Os blocos foram mantidos em solução tamponante TE, a 4° C, até o momento do uso.

O DNA bacteriano total, fixado em bloco de agarose, foi digerido pela enzima de restrição. As enzimas de restrição utilizadas foram: *SpeI* (Thermo Scientific) para bactérias do CBc e *XbaI* (Thermo Scientific) para *Achromobacter* sp. (AMOUREUX et al., 2013; KUTTY, 2007). Para a fragmentação do DNA, cada bloco foi colocado em 100 µL de solução tamponante 1X concentrada da cada enzima de restrição e mantida a 37°C por 30 minutos. Essa solução foi desprezada e uma nova solução foi adicionada, preparada no momento do uso, acrescida de 27 U de suas respectivas enzimas de restrição. A reação foi incubada em banho de água a 37° C por 18 a 20 horas.

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

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

O perfil eletroforético de macrorrestrição do crDNA foi analisado utilizando o programa BioNumerics, versão 5.10 (Applied Maths). A similaridade genética dos isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice (tolerance, 2%; optimization, 2%) e dendrogramas foram constituídos segundo o método UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Isolados com similaridade genética superior a 90% foram considerados do mesmo tipo clonal.

3.5.2. Tipagem por multilocus

Tipagem molecular por MLST foi realizada para os primeiros e últimos isolados de *Burkholderia* e *Achromobacter* de cada paciente e para isolados do mesmo paciente com

perfil de PFGE diferente a fim de proporcionar análise epidemiológica em contexto global.

Amplificações de sete genes *housekeeping* (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e *trpB*) foram realizadas para os isolados de *Burkholderia* utilizando protocolos padronizados (BARRADO et al., 2013a; PEETERS et al., 2013). Amplificações de sete genes *housekeeping* (*eno*, *gltB*, *lepA*, *nrdA*, *nuoL*, *nusA* e *rpoB*) foram realizadas para os isolados de *Achromobacter* utilizando *primers* selecionados segundo indicação do *website*: <http://pubmlst.org/achromobacter/>, e as condições da PCR foram realizadas segundo Spilker, Vandamme e Lipuma (2012).

Após purificação dos produtos das PCRs foi realizado sequenciamento utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready e os mesmos *primers* usados na amplificação dos genes *housekeeping*. O sequenciamento foi realizado nos sequenciadores automáticos ABI 3730 *DNA Genetic Analyser* e 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e as análises do sequenciamento foram feitas utilizando BioNumerics v 7.5 (Applied Maths).

Para cada alelo único referente aos setes genes *housekeeping* foi assinalado um número, e posteriormente, usando a ferramenta <http://pubmlst.org/database/>, foi gerado um tipo de sequência (ST) pela combinação dos sete números obtidos.

3.6. Avaliação clínica dos pacientes

Foi feita avaliação clínica em todos os pacientes do HCFMRP-USP ao longo do estudo, porém, foram considerados e descritos somente os resultados obtidos dos pacientes cronicamente colonizados devido a sua maior significância clínica. O critério de cronicidade para pacientes com *A. xylosoxidans* e bactérias do CBc foi definido de acordo com Barrado et al. (2013a) com modificações. Pacientes foram considerados cronicamente colonizados se duas ou mais culturas positivas foram obtidas no intervalo de pelo menos um ano e todos os isolados obtiveram o mesmo pulstipo por PFGE. Os pacientes FC-16, FC-88 e FC-112 foram considerados crônicos baseado em resultados clínicos obtidos anteriormente ao período de estudo (dados não mostrados).

O score de Shwachman e o índice de massa corporal (IMC) foram obtidos e analisados a cada visita, mas somente os valores obtidos após três meses de isolamento bacteriano foram incluídos no estudo.

Exacerbações foram consideradas quando o paciente teve pelo menos um dos seguintes sintomas: aumento da tosse, produção de escarro ou modificação de suas características, febre sem relação com outros fatores clínicos, perda de peso não associadas com má absorção, sons respiratórios anormais ou declínio acentuado da função pulmonar (BILTON et al., 2011).

A função pulmonar foi medida por espirometria em crianças com idade acima de seis anos, pelo menos uma vez no ano, de acordo com *International Standards of American Thoracic Society* (ATS) (MILLER et al., 2005). Medidas da capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório forçado em um segundo (VEF1) em percentagem do valor previsto foram consideradas para este estudo e analisadas de acordo com equações de referência de Sherrill e colaboradores (SHERRILL et al., 1992). A interpretação do score de shwachman, IMC e função pulmonar foi realizada baseada no Anexo A.

Análises estatísticas descritivas foram realizadas. O teste não-paramétricos de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos em relação as variáveis CVF, VEF1, escore de shwachman e IMC. O teste t independente foi utilizado para analisar a significância estatística entre dois grupos em relação às exacerbações. O nível de significância foi estabelecido na probabilidade (p) menor que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Referentes aos pacientes do HCFMRP-USP

Foram 98 pacientes atendidos no HCFMRP-USP no período de estudo. Destes, 25 pacientes apresentaram isolados que foram identificados como bactérias do CBc (46 isolados) e 16 pacientes apresentaram isolados que foram identificados como *Achromobacter* (43 isolados).

4.1.1. Identificação das espécies do CBc

O sequenciamento do gene *recA* para identificação dos isolados de *Burkholderia* demonstrou a ocorrência da seguinte diversidade de espécies: *B. vietnamiensis* (12 pacientes), *B. cenocepacia* IIIA (6 pacientes), *B. multivorans* (2 pacientes), *B. cepacia* (1 paciente), *B. cenocepacia* IIIB (1 paciente) e *B. contaminans* (1 paciente). Outros dois pacientes estavam colonizados por mais de uma espécie diferente, *B. cenocepacia* IIIB e *B. vietnamiensis*, e *B. diffusa* e *B. vietnamiensis* (Apêndice A). Nove pacientes apresentaram infecção crônica por *Burkholderia* (10.2%). A idade dos pacientes variou de 6 meses a 20 anos, a maioria deles do sexo masculino (n = 7; 77,7%), e seis desses pacientes tinham idade inferior a 12 anos. Dentre os pacientes crônicos, a espécie mais isolada foi *B. cenocepacia* IIIA (4 pacientes), seguida de *B. vietnaminensis* (3 pacientes) e *B. multivorans* e *B. contaminans* (1 paciente cada) (Tabela 1).

4.1.2. Identificação das espécies de *Achromobacter*

O sequenciamento do gene *nrdA* dos isolados de *Achromobacter* provenientes dos 16 pacientes demonstrou o seguinte resultado: 11 pacientes colonizados com *A. xylosoxidans*, 2 com *A. dolens*, 1 com *A. ruhlandii*, 1 com *A. mucicolens* e 1 paciente com *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii* (Apêndice B). Seis pacientes apresentaram infecção crônica por *Achromobacter*, sendo todos os isolados pertencentes à espécie *A. xylosoxidans*. A idade dos pacientes variou de 9 a 31 anos, a maioria deles do sexo feminino (n = 5; 83,3%), e dois desses pacientes tinham idade inferior a 12 anos (Tabela 2).

4.1.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Dada a grande dificuldade dos laboratórios em identificar corretamente as espécies do CBc, a Figura 1 foi dividida em A e B. A Figura 1A facilita a visualização da eficácia dos antibióticos para o gênero e a Figura 1B facilita a visualização da eficácia dos antibióticos para cada espécie isoladamente.

Como ilustrado na Figura 1A, 90.9% dos isolados do CBc apresentaram sensibilidade à sulfametoxazol-trimetoprim, 81.2% ao meropenem, 73.3% à ceftazidima, 69% à minociclina, 30.2% ao cloranfenicol, 26.3% à levofloxacina e 5.2% à ticarcilina-ácido clavulânico. De acordo com a Figura 1B as espécies *B. cenocepacia* IIIB e *B. vietnamiensis* foram as que apresentaram maior percentagem de sensibilidade aos antibióticos e as espécies *B. multivorans* e *B. contaminans* as que apresentaram mais resistência. Todos os antibióticos, com exceção da ticarcilina-ácido clavulânico, foram 100% efetivos *in vitro* contra *B. cenocepacia* IIIB. Ceftazidima e meropenem foram os antibióticos mais efetivos contra *B. vietnamiensis*. Ceftazidima, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim foram os mais efetivos contra *B. cenocepacia* IIIA. Ceftazidima, meropenem, sulfametoxazol-trimetoprim e minociclina foram os mais efetivos contra *B. difusa* e *B. cepacia*. Sulfametoxazol-trimetoprim foi o antibiótico mais efetivo contra *B. multivorans* e *B. contaminans*.

Figura 1 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados do CBc de pacientes do HCFMRP-USP

A Figura 2 também foi dividida em A e B (mesmo intuito da anterior), sendo que a Figura 2A ilustra o perfil de sensibilidade para o gênero *Achromobacter* e a Figura 2B ilustra o perfil de sensibilidade por espécie. Houve 100% de sensibilidade ao imipenem, 96.8% ao meropenem, 86.9% à piperacilina-tazobactam, 77.5% à polimixina B, 75.5% à ceftazidima, 54.1% à levofloxacina, 51.5% à ciprofloxacina, 49.4% à sulfametoxazol-trimetoprim e 7.8% ao cloranfenicol.

De acordo com a Figura 2B, os isolados de *A. mucicolens* apresentaram maior percentagem de sensibilidade enquanto que os isolados de *A. xylosoxidans* tiveram a maior percentagem de resistência. Todos os antibióticos, com exceção de cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, foram 100% efetivos *in vitro* contra *A. mucicolens*.

Piperacilina-tazobactam, imipenem, meropenem, polimixina B e sulfametoxazol-trimetoprim foram 100% sensíveis contra *A. dolens*. Ceftazidima, imipenem e meropenem foram os antibióticos mais efetivos contra *A. ruhlandii*. Imipenem e meropenem foram os mais efetivos contra *A. xylosoxidans*, e nenhum dos antibióticos foi 100% sensíveis.

Figura 2 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *Achromobacter* de pacientes do HCFMRP-USP

A. apresentação dos resultados por antibiótico; B. apresentação dos resultados por espécie. IMP, Imipenem; MER, Meropenem; PTZ, piperacilina-tazobactam; PB, Polimixina B; CAZ, ceftazidima; LEV, Levofloxacina; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CIP, ciprofloxacina; CHL: Cloranfenicol. Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.4. Eletroforese em campos pulsados

Baseado no perfil de macrorestrição obtido entre os pacientes colonizados por *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. contaminans* e *B. diffusa* não houve suspeita de contaminação cruzada. De acordo com o dendrograma

construído a partir do perfil de macrorestrição dos isolados de *B. vietnamiensis* (dados não mostrados), foram visualizados 5 perfis clonais nomeados de A a E. Seis pacientes apresentaram isolados com o mesmo perfil clonal V-A (FC-7, FC-13, FC-33, FC-39, FC-82 e FC-103), entre os quais havia dois pacientes com colonização crônica (FC-13 e FC-103). Outros cinco pacientes (FC-7, FC-81, FC-84, FC-86 e FC-107) apresentaram isolados com o mesmo perfil clonal D, e nenhum deles foi definido como crônico pelos critérios adotados (Apêndice A).

De acordo com o dendrograma construído a partir do perfil de macrorestrição dos isolados de *A. xylosoxidans*, foram visualizados 8 perfis clonais nomeados de A a H (dados não mostrados). Isolados de *A. xylosoxidans* com o mesmo perfil clonal foram observados entre pacientes crônicos e não crônicos, e nenhuma suspeita de contaminação cruzada foi observada entre pacientes cronicamente colonizados por *A. xylosoxidans*. No perfil clonal A ficaram agrupados isolados de três pacientes, o paciente FC-50 o qual foi definido como paciente crônico, e outros dois pacientes, FC-36 e FC-95, que apresentaram somente isolados não persistentes. Os isolados pertencentes aos pacientes FC-4 e FC-5 apresentaram o mesmo perfil de macrorestrição (C), e apenas o paciente FC-5 foi considerado cronicamente colonizado. Os pacientes FC-9 e FC-70 apresentaram o mesmo perfil clonal E, e apenas o paciente FC-70 foi definido como crônico. Em nenhum dos pacientes colonizados pelas espécies *A. ruhlanddi*, *A. dolens* e *A. mucicolens* houve suspeita de contaminação cruzada (Apêndice B).

4.1.5. Avaliação clínica dos pacientes

Foi realizada avaliação clínica comparativa entre pacientes com infecção crônica por *B. cenocepacia* IIIA e as outras espécies. Os valores de escore de Shwachman se enquadraram na classificação entre bom e excelente, e mostraram-se mais elevados para o grupo de *B. cenocepacia* IIIA, entretanto não houve diferença significativa estatisticamente (p -value: 0.6072). Não houve diferença significativa entre os valores de IMC (p -value: 0.1913), apesar dos mesmos apresentarem menores para *B. cenocepacia* IIIA. Todos os pacientes do grupo de *B. cenocepacia* IIIA estavam abaixo do peso, porém com valores próximos dos normais. O número de exacerbações foi não significativamente (p -value: 0.3570) menor para *B. cenocepacia* IIIA (média: 1) do que para as outras espécies (média: 2), e um paciente colonizado por *B. multivorans*, que evoluiu para óbito, apresentou 4 exacerbações. No entanto, este paciente também apresentou infecção por

linhagem mucóide de *P. aeruginosa* e *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA), que também podem causar exacerbações graves. Os valores de função pulmonar foram obtidos de apenas 5 dos 9 pacientes com infecção crônica porque três pacientes tinham menos de 6 anos de idade, e 1 não foi capaz de realizar a espirometria. Por isso, não foi possível realizar análise estatística destes valores. A média da CVF para o grupo de *B. cenocepacia* IIIA foi de 64% do valor previsto, menor do que para as outras espécies (média: 92.3% do valor previsto), porém todos os pacientes apresentaram distúrbios restritivos leves. A média do FEV1 foi de 51.5% para *B. cenocepacia* IIIA, e todos os pacientes apresentaram distúrbio obstrutivo moderado. Já os pacientes colonizados por outras espécies apresentaram média de FEV1 de 83%, todos com distúrbio leve (Tabela 1).

Foi realizada avaliação clínica comparativa entre pacientes com infecção crônica por *B. vietnamiensis* e as outras espécies. Não houve diferença significativa para os valores de score de shwachman entre os dois grupos (p -value: 0.8923), e os mesmos apresentaram-se ligeiramente mais elevados para as outras espécies. Os valores de IMC foram mais elevados sem diferença significativa para *B. vietnamiensis* (p -value: 0.5714). A média do número de exacerbações para *B. vietnamiensis* (1.6) foi ligeiramente maior do que a média para o outro grupo (1.5), sem diferença significativa (p -value: 0.8878). A média da CVF para *B. vietnamiensis* foi de 94% do valor previsto, maior do que para as outras espécies (média: 72.3% do valor previsto). A média do FEV1 foi de 86% para *B. vietnamiensis* e de 60% para das outras espécies (Tabela 1).

Comparou-se os resultados da avaliação clínica entre pacientes com infecção crônica por CBc e por *A. xylosoxidans*. Os valores do escore de Shwachman apresentaram-se ligeiramente maiores para o grupo do CBc, sem diferença significativa (p -value: 0.2792). O mesmo ocorreu com os valores de IMC (p -value: 1). Em média, 2.8 exacerbações foram detectadas para o grupo de *A. xylosoxidans* e 1.5 exacerbações para o grupo do CBc, sem diferença significativa (p -value: 0.0791). A média da CVF foi de 57.8% do valor previsto para o grupo de *A. xylosoxidans* e 81% para o outro grupo, também sem diferença significativa (p -value: 0.0547). Os valores de FEV1 foram significativamente maiores (p -value: 0.0345) para CBc (média: 70.4%) do que para *A. xylosoxidans* (média: 43.3%) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes cronicamente colonizados por CBc e características microbiológicas de seus isolados

Paciente ^a	Idade (primeiro isolamento)	Gênero ^b	Data de isolamento	Identificação (MLST) ^c	PFGE ^d	Dados clínicos ^e				
						Exacerbação	CVF	VEF1	Score de Shwachman	IMC
FC-12	13	M	13/07/2011	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-D	0	65	50	75	17
FC-12a			27/06/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-D					
FC-12b			03/09/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-D					
FC-16b	10	F	19/03/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-B	1	-	-	85	18
FC-95a	0.6	M	28/03/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A	3	-	-	90	13.2
FC-95b			27/06/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A					
FC-95d			14/08/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A					
FC-95e			24/09/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A					
FC-112	10	M	18/04/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-C	0	63	53	85	18
FC-13	8	M	13/07/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1	2	104	101	54.5	22
FC-13b			14/12/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1					
FC-13c			07/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1					
FC-13d			28/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1					
FC-13e			10/02/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-B					
FC-71	5	M	17/08/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-C1	3	-	-	85	16
FC-71a			28/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-C1					
FC-71c			17/09/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-C1					
FC-103	14	M	21/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A	0	84	71	90	25
FC-103c			14/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A					
FC-103d			26/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A					
FC-103e			10/02/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A					
FC-38b	6	F	29/02/2012	<i>B. multivorans</i>	II-A	4	-	-	50	-
FC-38c			14/03/2012	<i>B. multivorans</i>	II-A					
FC-38d			16/05/2012	<i>B. multivorans</i>	II-A					
FC-38f			03/06/2013	<i>B. multivorans</i>	II-A					
FC-88	20	M	14/12/2011	<i>B. contaminans</i>	d	1	89	77	85	23.6
FC-88a			07/03/2012	<i>B. contaminans</i>	d					

^a FC- números significam pacientes e letras significam isolados;^b M: masculino, F: feminino;^c MLST: *multilocus sequence typing*;^d PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*; d: DNA degradado;^e CVF: capacidade vital forçada em % do previsto; VEF1: volume expiratório forçado em 1 segundo em % do previsto; IMC: índice de massa corporal; -: não realizado. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes cronicamente colonizados por *A. xylosoxidans* e características microbiológicas de seus isolados

Pacientes ^a	Idade (primeiro isolamento)	Gênero ^b	Data de isolamento	PFGE ^c	Dados clínicos ^d				
					Exacerbação	CVF	VEF1	Score de Shwachman	IMC
FC-5a	17	F	08/03/2011	X-C1	2	67	50	80	19
FC-5b			29/02/2012	X-C					
FC-5c			02/07/2012	X-C					
FC-5d			14/05/2013	X-C					
FC-37	9	M	03/08/2011	X-B	4	48	45	80	19
FC-37a			14/12/2011	X-B					
FC-37b			05/09/2012	X-B					
FC-37c			30/04/2013	X-B					
FC-37d			07/08/2013	X-B					
FC-37e			15/08/2013	X-B					
FC-37f			26/08/2013	X-B					
FC-37g			10/09/2013	X-B1					
FC-50	20	F	03/08/2011	X-A	3	49	24	60	20.3
FC-50a			14/12/2011	X-A					
FC-50b			13/03/2012	X-A					
FC-50c			28/03/2012	X-A					
FC-50d			11/07/2013	X-A					
FC-50g			14/04/2014	X-A					
FC-70	10	F	17/08/2011	X-E	3	74	71	85	20.3
FC-70a			17/04/2013	X-E					
FC-78	17	F	24/08/2011	X-H	3	49	35	75	17
FC-78a			18/04/2012	X-H					
FC-78b			04/08/2012	X-H					
FC-96	31	F	07/03/2012	X-D	2	60	35	70	16.1
FC-96a			21/03/2012	X-D					
FC-96b			28/03/2012	X-D					
FC-96c			26/09/2013	X-D					

^a FC- números significam pacientes e letras significam isolados;

^b M: masculino, F: feminino;

^c PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*;

^d CVF: capacidade vital forçada em % do previsto; VEF1: volume expiratório forçado em 1 segundo em % do previsto; IMC: índice de massa corporal. Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.Referentes aos pacientes do HCFCM-Unicamp

No HCFCM-Unicamp, 192 pacientes com FC foram atendidos no período de estudo. Foram enviadas para o estudo, 74 bactérias de 43 pacientes: 24 pacientes que apresentaram isolados identificados como bactérias do CBc (40 isolados) e 19 pacientes que apresentaram isolados de *Achromobacter* sp. (34 isolados).

4.2.1. Identificação das espécies do CBc

O sequenciamento do gene *recA* dos isolados de *Burkholderia* propiciou a ocorrência da seguinte diversidade de espécies: *B. vietnamiensis* (16 pacientes), *B. cenocepacia* IIB (5 pacientes), *B. multivorans* (2 pacientes) e *B. contaminans* (1 paciente) (Apêndice C). Pelos critérios estabelecidos e dados disponíveis, apenas dois pacientes foram considerados cronicamente colonizados por *Burkholderia*, um paciente colonizado por *B. multivorans* (31 anos) e outro por *B. contaminans* (15 anos) (Tabela 3).

4.2.2. Identificação das espécies de *Achromobacter*

Dos 19 pacientes colonizados por *Achromobacter*, 11 pacientes estavam colonizados por *A. xylosoxidans*, 5 por *A. ruhlandii*, 1 por *A. insuavis*, 1 por *A. piechaudii* e 1 paciente por uma espécie nova de *Achromobacter* (Apêndice D). Quatro pacientes foram considerados cronicamente colonizados por *Achromobacter*, dois pacientes colonizados por *A. ruhlandii* (28 e 18 anos de idade) e dois pacientes com *A. xylosoxidans* (22 e 12 anos de idade) (Tabela 3).

4.2.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A Figura 3A ilustra a eficácia dos antibióticos para o gênero *Burkholderia*. Houve 64.5% de sensibilidade à ceftazidima, 56.2% ao meropenem, 54.3% à minociclina, 42.5% à sulfametoxazol-trimetoprim, 31.2% à levofloxacina, 13.7% ao cloranfenicol e 3.7% à ticarcilina-ácido clavulânico. A Figura 3B ilustra a eficácia dos antibióticos para cada espécie isoladamente. As espécies *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* IIB foram as que apresentaram maior percentagem de sensibilidade aos antibióticos e as espécies *B.*

contaminans e *B. multivorans* as que apresentaram mais resistência. Os antibióticos mais efetivos *in vitro* contra *B. vietnamiensis* foram ceftazidima e meropenem. Os antibióticos mais efetivos contra *B. cenocepacia* IIB foram ceftazidima, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim. Os mais efetivos e únicos contra *B. contaminans* foram ceftazidima, meropenem e minociclina. Os mais efetivos contra *B. multivorans*, apesar de pouca sensibilidade, foram ceftazidima e minociclina.

Figura 3 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados do CBc de pacientes do HCFCM-Unicamp

A. apresentação dos resultados por antibiótico; **B.** apresentação dos resultados por espécie do CBc. CAZ, ceftazidima; MER, Meropenem; LEV, Levofloxacina; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CHL, Cloranfenicol; TIC, ticarcilina-ácido clavulânico; MIN, Minociclina. Fonte: elaborada pelo autor.

Com relação ao gênero *Achromobacter*, houve 88.1% de sensibilidade ao meropenem, 86.3% à ceftazidima, 85.7% à piperacilina-tazobactam, 84.5% ao imipenem, 52.9% à levofloxacina, 32.9% à sulfametoxazol-trimetoprim, 27.5% ao cloranfenicol, 21.8% à polimixina B e nenhuma sensibilidade à ciprofloxacina (Figura 4A).

Os isolados de *A. piechaudii* apresentaram maior percentagem de sensibilidade enquanto que os isolados de *A. ruhlandii* tiveram a maior percentagem de resistência. Houve 100% de sensibilidade contra *B. piechaudii* para todos os antibióticos, com exceção de ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim. Todos os antibióticos foram efetivos contra a espécie nova de *Achromobacter*, com exceção de polimixina B, ciprofloxacina e cloranfenicol. Os antibióticos mais efetivos contra *A. insuavis* foram piperacilina-tazobactam, ceftazidima, imipenem e meropenem. Os mais efetivos contra *A. xylosoxidans* foram piperacilina-tazobactam e meropenem. Os mais efetivos contra *A. ruhlandii* foram ceftazidima, imipenem e meropenem (Figura 4B).

Figura 4 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *Achromobacter* de pacientes do HCFCM-Unicamp

A. apresentação dos resultados por antibiótico; **B.** apresentação dos resultados por espécie MER, Meropenem; CAZ, ceftazidima; PTZ, piperacilina-tazobactam; IMP, Imipenem; LEV, Levofloxacina; SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CHL, Cloranfenicol; PB, Polimixina B; CIP, ciprofloxacina. Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.4. Eletroforese em campos pulsados

Todos os pacientes colonizados tanto por *B. contaminans* quanto por *Achromobacter* sp. apresentaram isolados com perfis de restrição únicos.

Os pacientes C-1 e C-45 colonizados por *B. multivorans* apresentaram isolados com o mesmo perfil clonal II-B, e apenas o paciente C-1 apresentou colonização crônica. Quatro pacientes (C-32, C-37, C-44 e C-51) colonizados por *B. cenocepacia* IIIB apresentaram isolados com o mesmo perfil clonal IIIB-C, sendo que nenhum deles foi considerado com colonização crônica. Dentre os pacientes colonizados por *B. vietnamiensis*, os pacientes C-8, C-9, C-10, C-16, C-24, C-36 e C-42 apresentaram isolados com o mesmo perfil V-F, nenhum deles com colonização crônica. Os pacientes C-3 e C-24 apresentaram isolados com o mesmo perfil V-G, nenhum deles com colonização crônica. Outros seis pacientes também apresentaram isolados com o mesmo perfil clonal V-H (C-2, C-17, C-50, C-52, C-56 e C-65), nenhum deles com colonização crônica. Dois pacientes sem infecção crônica também apresentaram isolados com o mesmo perfil V-I (Apêndice C).

Tabela 3. Características microbiológicas dos isolados do CBc e *Achromobacter* de pacientes crônicos

Pacientes ^a	Idade (primeiro isolamento)	Sexo	Data de isolamento	Identificação (MLST)	PFGE
C1	31	M	28/06/2011	<i>B. multivorans</i>	II-B
C1a			06/03/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B
C1c			08/05/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B
C1d			26/06/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B
C1e			25/06/2013	<i>B. multivorans</i>	II-B
C5	15	F	30/08/2011	<i>B. contaminans</i>	C-A
C5a			07/02/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A
C5b			03/06/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A
C5e			25/07/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A
C5f			25/09/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A
C10a	28	F	27/03/2012	<i>A. ruhland</i>	R-C
C10b			27/04/2012	<i>A. ruhland</i>	R-C
C10c			14/08/2012	<i>A. ruhland</i>	R-C
C10d			09/03/2013	<i>A. ruhland</i>	R-C1
C26	22	F	24/02/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-I
C26a			07/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-I
C26b			26/11/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-I
C27	12	F	03/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K
C27a			10/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K
C27b			19/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K
C27c			25/09/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K
C27d			25/06/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K
C41	18	F	21/01/2012	<i>A. ruhland</i>	R-E
C41a			04/12/2012	<i>A. ruhland</i>	R-E
C41b			25/05/2013	<i>A. ruhland</i>	R-E
C41f			18/04/2014	<i>A. ruhland</i>	R-E

^a: C- Campinas, números significam pacientes e letras significam isolados; M: masculino, F: feminino; MLST: *multilocus sequence typing*; PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*.
Fonte: elaborada pelo autor.

4.3. MLST

No total, 17 STs diferentes foram identificados entre os isolados de CBc de pacientes com FC em ambos os hospitais (Apêndices A e C), e 14 deles foram descritos pela primeira vez por este estudo (*B. cepacia*: ST1049, *B. multivorans*: ST1051, *B. cenocepacia* IIIA: ST1052, ST1053, ST1054, ST1055 e ST1058, *B. vietnamiensis*: ST1046, ST1050, ST1056 e ST1057, *B. diffusa*: ST1047, e *B. contaminans*: ST1045 e ST1048). Os três outros STs (ST911, ST17 e ST369) apresentaram distribuição intercontinental (<http://pubmlst.org/bcc/>). Na maioria dos casos, o primeiro e último isolados de cada paciente pertenciam ao mesmo ST. Apenas dois pacientes colonizados por *B. vietnamiensis* apresentaram isolados com diferentes STs ao longo do tempo. O paciente FC-7 do HCFMRP-USP apresentou pela primeira vez o novo ST1056 e um ano após o ST369, sendo que os dois STs diferiam em quatro genes *housekeeping*. O paciente C-24 do HCFCM-Unicamp apresentou o ST1056 em 2011 e dois anos depois o ST1057, sendo que os dois STs diferiam em cinco genes *housekeeping*. Em isolados de pacientes dos dois hospitais foram identificados alguns STs em comum (STs 1056, 1057, 369 e 911). *B. vietnamiensis* foi a espécie mais predominante entre estes pacientes: doze pacientes de ambos hospitais exibiram isolados com o ST1056; três paciente exibiram isolados com o ST1057, quatorze pacientes exibiram isolados com o ST369. Isolados de *B. cenocepacia* IIIB pertencentes a 7 pacientes de ambos os hospitais pertenceram ao ST911. O maior grupo de ST formado por este estudo incluiu 4 STs (1052, 1053, 1054 e 1055), os quais pertencem a *B. cenocepacia* e tem como fundador o ST331, que foi identificado no ano de 1970. Estes 4 STs pertencem ao complexo clonal (CC) 31 e estão intimamente relacionados com os STs 28 e 32, considerados epidêmicos (Figura 5). O segundo grupo inclui ST1046, ST1050, ST1056 e ST1057, os quais pertencem a *B. vietnamiensis* e fazem parte do CC319, que tem como fundador o ST65, que foi identificado no ano de 1990 (Figura 6). Todos os outros STs pertencem a pequenos grupos de dois STs ou foram considerados *singletons*.

A análise de MLST foi realizada somente para isolados de *A. xylosoxidans* de pacientes com infecção crônica do HCFMRP-USP (Apêndice B). No total, 6 STs diferentes foram identificados, dos quais 3 STs apareceram pela primeira vez (ST340, ST341 e ST342). Os STs 2, 201 e 205 foram descritos também em outros estudos. Em todos os casos o primeiro e último isolados de cada paciente pertenciam ao mesmo ST.

Não houve STs comuns entre os pacientes deste hospital. Cinco dos STs fazem parte de um mesmo grupo (2, 201, 205, 341 e 342), o qual tem como fundador o ST20, que foi identificado no ano de 1953 (Figura 7). O ST340 foi considerado *singletons*.

Figura 5 - Estrutura populacional do CBc por MLST e diagrama do CC31

A. Todos os 1113 STs presentes no banco de dados do PubMLST. Cada ponto representa um único ST. O círculo azul representa o CC31. **B.** Diagrama do CC31, STs em vermelho pertencem a este estudo. Fontes: <http://www.phyloviz.net/goeburst/>; <https://pubmlst.org/bcc/>.

Figura 7 - Estrutura populacional do *Achromobacter* por MLST

A. Diagrama no qual STs em vermelho pertencem a este estudo. B. Todos os 343 STs presentes no banco de dados do PubMLST. Cada ponto representa um único ST. O círculo azul representa o diagrama ilustrado na figura 7A. Fontes: <http://www.phylovis.net/goeburst/>; <https://pubmlst.org/achromobacter/>.

5. DISCUSSÃO

Espécies do CBc são consideradas patógenos particularmente problemáticos associados não somente ao aumento da morbidade, mas também aumento da mortalidade (LAMBIASE et al., 2013). A maior preocupação no que diz respeito às infecções por CBc é a dificuldade de identificar suas espécies e a capacidade de propagação apresentada por algumas delas. A correta identificação destes microrganismos é frequentemente limitada devido a erros de identificação fenotípica (ABDULWAHAB et al., 2015). Além disso, isolados de pacientes crônicos frequentemente perdem suas características fenotípicas em condições de crescimento em meios de cultura, tornando ainda mais árdua a correta identificação destas espécies, inclusive do gênero (FERNÁNDEZ-OLMOS et al., 2012). *Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) está cada vez mais sendo utilizada em laboratórios de microbiologia clínica para a identificação de patógenos implicados em pacientes com FC. No entanto, algumas espécies do CBc podem ser identificadas erroneamente pelo MALDI-TOF MS, provavelmente devido a limitações no banco de dados ou à similaridade fenotípica entre as espécies (ABDULWAHAB et al., 2015). Portanto, o uso de métodos moleculares pode ser muito útil para identificação, especialmente em casos nos quais características fenotípicas são confusas e inconclusivas. MLST é capaz de fornecer identificação precisa das espécies do CBc, além de permitir estudos epidemiológicos em grande escala por meio do acesso gratuito ao *website* <http://pubmlst.org/bcc> (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008), o que justifica a escolha desta ferramenta para este estudo.

Infecções por bactérias do CBc podem causar declínio da função pulmonar (LEITE, 2011). De acordo com *Cystic Fibrosis Consensus*, o genômico mais frequente nos pacientes com FC é *B. cenocepacia*, seguido de *B. multivorans* (LUPO et al., 2015). Além disso, *B. cenocepacia* é considerado um dos patógenos mais graves e a espécie mais relacionada com síndrome cepácia, além de conter a maioria das linhagens epidêmicas descritas, o que justifica a importância em identificar corretamente qual espécie do CBc está sendo isolada (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010). A ocorrência tanto de *B. cenocepacia* quanto de *B. multivorans* foi baixa neste estudo. A espécie de *Burkholderia* mais prevalente nos dois hospitais foi *B. vietnamiensis*, o que não é usual. Esta espécie não tem sido considerada como patogênica e normalmente não está associada com manifestações graves da doença (BOUSSAUD et al., 2008). No HCFMRP-USP, de modo geral os pacientes com infecção crônica por *B. vietnamiensis* apresentaram quadro clínico ligeiramente melhor do que as outras espécies, porém não houve diferença

significativa. *B. cenocepacia* IIIA foi a espécie mais prevalente entre os pacientes com infecção crônica por CBc, os quais tiveram valores de função pulmonar e IMC levemente inferiores, porém sem diferença significativa. Entretanto, apresentaram valores de escore de Shwachman mais elevados e número de exacerbações menos frequentes do que as outras espécies (sem diferença significativa), além de exibir bom estado nutricional, o que pode facilitar tanto a resposta à infecção quanto a manutenção da função pulmonar (COBURN et al., 2015). A maioria dos pacientes (92.3%) colonizados por CBc teve isolamento concomitante de outras bactérias. *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram os patógenos mais comumente isolados (42.3% e 65.3% dos pacientes, respectivamente), seguido de outros BGN-NF como *Achromobacter* sp. (11.5%), *Ralstonia* sp. (7,7%), *S. maltophilia* (11.5%) e *Elizabethkingia* sp. (3.8%) (dados não mostrados). Este resultado pode também ser responsável pelo bom desempenho observado no grupo do CBc no HCFMRP-USP, já que vários autores mostraram que a infecção polimicrobiana tem sido associada a melhor prognóstico (COBURN et al., 2015).

O contato próximo e prolongado entre pacientes com FC e compartilhamento de nebulizadores facilita a aquisição e transmissão de CBc. Há relatos que a aquisição do CBc está associada à hospitalização e infecção cruzada por contato social entre pacientes com FC (CORREA-RUIZ et al., 2013). Entretanto, na maioria das vezes, isolados envolvidos em colonização primária, sem persistência, correspondem a eventos de aquisição não relacionados (FERNÁNDEZ-OLMOS et al., 2013), e desaparecem facilmente. Nos dois hospitais houveram casos em que isolados com o mesmo perfil clonal foram observados em pacientes diferentes sem infecção crônica, portanto sem importância clínica. Dentre os pacientes com suspeita de contaminação cruzada no HCFMRP-USP, apenas dois pacientes estavam cronicamente colonizados, os quais não apresentam parentesco e possuem idades diferentes. Os dois pacientes apresentaram-se colonizados por *B. vietnamiensis* com o mesmo perfil clonal, o que não ocorre com frequência já que *B. cenocepacia* parece ser mais provável do que outras espécies de se disseminar entre os pacientes (LAMBIASE et al., 2013). No HCFCM-Unicamp, dentre os pacientes com mesmo perfil clonal, apenas um paciente que estava colonizado por *B. multivorans* tinha infecção crônica. De acordo com a orientação mais recente publicada pela Fundação de Fibrose Cística dos Estados Unidos, todos os pacientes independentemente da sua condição microbiológica, são aconselhados a ser segregados para evitar contaminação cruzada (SCHAFFER, 2015), mesmo que a falta de socialização com outros pacientes possa levar a um impacto emocional negativo e sentimento de

alienação (WAINE; WHITEHOUSE; HONEYBOURNE, 2007). Nos dois hospitais, todos os pacientes com o mesmo perfil de PFGE também apresentaram o mesmo ST, o que pode significar que as estirpes podem ter sido originadas de uma fonte comum de contaminação, conforme descrito anteriormente por alguns estudos (DEDECKOVA et al., 2012; NANNINI et al., 2015; WIENER-WELL et al., 2014), ou podem ter sido adquiridos do ambiente, uma vez que este complexo de bactérias tem distribuição generalizada na natureza como solo, água, plantas, animais e seres humanos (SHOMMU; VOGEL; STOREY, 2015). Portanto, estudos adicionais seriam necessários para pesquisar a provável fonte de contaminação.

De acordo com alguns estudos, sulfametoxazol-trimetoprim é considerada a primeira opção terapêutica para as infecções por CBc, enquanto que ceftazidima e meropenem, isoladamente ou em combinação com aminoglicosídeos ou minociclina, são consideradas opções terapêuticas alternativas (FEHLBERG et al., 2016). Entretanto, não existe consenso sobre a terapia de manutenção crônica e o tratamento de erradicação precoce (RAIDT et al., 2015; RHODES; SCHWEIZER, 2016). No HCFMRP-USP, sulfametoxazol-trimetoprim foi o antibiótico mais efetivo *in vitro* em relação às espécies do CBc, seguido de meropenem e ceftazidima. No HCFCM-Unicamp, ceftazidima foi o antibiótico mais efetivo *in vitro*, seguido de meropenem e minociclina. Outro estudo realizado no Brasil mostrou sulfametoxazol-trimetoprim como o antibiótico mais potente (FEHLBERG et al., 2016). Em Madrid, a grande maioria dos isolados foram sensíveis ao meropenem, enquanto que apenas metade dos isolados foram sensíveis à ceftazidima (CORREA-RUIZ et al., 2013). Em outra unidade da mesma cidade, ceftazidima foi o antibiótico mais efetivo, seguido pela minociclina e sulfametoxazol-trimetoprim, e o meropenem foi apenas 68% ativo contra os isolados (BARRADO et al., 2013b). Raidt et al. relataram em um estudo na Alemanha que o antibiótico mais efetivo também foi ceftazidima, enquanto que as taxas de resistência ao meropenem e à sulfametoxazol-trimetoprim foram bastante altas (RAIDT et al., 2015). Em estudo realizado na Suíça, observaram elevadas taxas de sensibilidade à sulfametoxazol-trimetoprim, ceftazidima, levofloxacina e meropenem (LUPO et al., 2015). Estes estudos revelam que ainda existem diferenças na eficácia dos antibióticos testados em diferentes locais. Portanto, estudos adicionais são necessários para estabelecer terapia empírica padrão. No entanto, as técnicas *in vitro* para prever a sensibilidade não estão bem padronizadas para o CBc e muitos estudos avaliam um pequeno número de pacientes (FEHLBERG et al., 2016). Portanto, por enquanto, a recomendação aos clínicos é que continuem a avaliar cada

paciente individualmente, levando em conta os dados de sensibilidade *in vitro* para antibióticos, respostas clínicas prévias e sua própria experiência. *B. multivorans* e *B. contaminans* foram as espécies com maior porcentagem de resistência aos antibióticos, entretanto, o pequeno número de isolados de *Burkholderia* entre as diferentes espécies neste estudo não possibilitou análise estatística diferencial da resistência. No geral, as outras espécies obtiveram taxas elevadas de sensibilidade.

O gênero *Achromobacter* é composto por várias espécies e diferentes métodos já foram propostos para sua identificação. Análises fenotípicas demonstraram ser inadequadas para a identificação confiável de suas espécies, sendo estas na maioria das vezes identificadas erroneamente como *A. xylosoxidans* (AMOUREUX et al., 2016; BARRADO et al., 2013a). Genes considerados biomarcadores como *bla_{OXA-114}*, *bla_{OXA-258}*, *bla_{OXA-364}* e *bla_{OXA-243}* são utilizados apenas para identificação espécie-específica de *A. xylosoxidans*, *A. ruhlandii*, *A. dolens*, e *A. insuavis*, respectivamente (RODRIGUES et al., 2015). O sequenciamento do gene 16S rRNA, devido à natureza conservada do gene, não assegura a correta identificação de espécies estreitamente relacionadas, e todas as espécies de *Achromobacter* conhecidas apresentam sequências deste gene com diferença inferior a 1% entre elas (GOMILA et al., 2014; RIDDERBERG; WANG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2012). MALDI-TOF MS, apesar de estar sendo muito utilizado, não é capaz de identificar todas as espécies até então descritas de *Achromobacter*, muitas vezes identificando outras espécies como *A. xylosoxidans* (GOMILA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015). Portanto, neste estudo foi utilizado sequenciamento do gene *nrda*, o qual tem provado ser ferramenta altamente discriminatória para a identificação das espécies de *Achromobacter*, e que juntamente com o MLST é capaz de elucidar a epidemiologia dos mesmos (SPILKER; VANDAMME; LIPUMA, 2012, 2013).

A. xylosoxidans foi a espécie mais isolada em ambos hospitais, o que também foi observado em outros estudos (BARRADO et al., 2013a; SPILKER; VANDAMME; LIPUMA, 2013). O impacto de *A. xylosoxidans* na doença pulmonar é obscuro, porém a prevalência deste patógeno está crescendo rapidamente e alguns autores sugerem que este microrganismo pode causar inflamação em pacientes com FC infectados cronicamente tão grave quanto as ocasionadas por *Pseudomonas* ou bactérias do CBc, com perda da função pulmonar maior do que a causada por estes dois microrganismos (COWARD et al., 2015). No HCFMRP-USP houve apenas pacientes cronicamente colonizados por *A. xylosoxidans*, os quais apresentaram valores de escore de Shwachman, IMC e CVF não significativamente inferior e exacerbações ligeiramente mais frequentes do que pacientes

colonizados por bactérias do CBc, o que também foi observado por Hansen et al. (HANSEN et al., 2010). Além disso, os valores de FEV1 foram significativamente menores para *A. xylosoxidans* do que para o CBc. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de que estas alterações podem ser devido à presença de outras bactérias tais como *P. aeruginosa* e MRSA, que foram isoladas simultaneamente.

Devido ao potencial de espécies de *Achromobacter* em causar surtos nosocomiais e infecções envolvendo multirresistência, sua importância clínica tem aumentado muito nos últimos anos (YAMAMOTO et al., 2012). A maioria dos pacientes colonizados por *Achromobacter* sp. abriga sua própria estirpe, mas contaminação cruzada tem sido descrita em alguns centros clínicos (AMOUREUX et al., 2013). Houve suspeita de contaminação cruzada somente no HCFMRP-USP, e apenas entre pacientes colonizados por *A. xylosoxidans*, espécie frequentemente considerada mais transmissível de acordo com outros estudos (PEREIRA et al., 2011). Dentre os pacientes com suspeita de contaminação cruzada, três pacientes estavam cronicamente colonizados por *A. xylosoxidans*, com idade variando entre 10 a 20 anos, e sem relação de parentesco entre eles. Porém um dos pacientes com infecção crônica apresentou o mesmo perfil clonal que seu irmão, o qual teve seu primeiro isolamento em 2011 e aparentemente não mais apresentou esta linhagem bacteriana. Diversos fatores podem explicar as diferenças obtidas entre esses irmãos, como características intrínsecas dos isolados bacterianos, diferenças genéticas entre os pacientes e fatores ambientais. Possíveis contaminações cruzadas entre familiares já foram descritas em outros estudos, inclusive casos com evoluções clínicas muito diferentes, porém ainda não foi possível correlacionar as diferenças, tanto microbiológicas quanto clínicas, entre os pacientes devido à grande quantidade de variáveis e a dificuldade em controlá-las (AMOUREUX et al., 2013; FIRMIDA et al., 2017; PEREIRA et al., 2011). No entanto, este resultado destaca a possibilidade de transmissão entre os pacientes, apesar da separação mantida entre eles.

Antibioticoterapia adequada tem sido fundamental para o aumento da expectativa de vida dos pacientes com FC nos últimos anos. No entanto, com o aumento da resistência aos antimicrobianos, o futuro da terapia antimicrobiana continua sendo um desafio (MCCAUGHEY et al., 2013). No geral, com exceção de *A. ruhlandii* isolados de pacientes do HCFCM-Unicamp, as espécies de *Achromobacter* obtiveram taxas elevadas de sensibilidade, possibilitando aos pacientes mais de uma opção terapêutica. *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii* foram as espécies com maior porcentagem de resistência neste estudo, porém, o pequeno número de isolados dificulta comparações significativas entre

as diferentes espécies. Alguns estudos mostram *A. ruhlandii* como a segunda espécie mais comumente isolada de pacientes com FC, além de ser um patógeno potencial em infecções relacionadas com FC (RIDDERBERG; WANG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2012; SPILKER; VANDAMME; LIPUMA, 2012, 2013). Valores elevados de resistência aos antimicrobianos contra *A. ruhlandii* também já foram descritos por outros autores. HANSEN et al. (2006) e RIDDERBERG et al. (2011), por exemplo, isolaram um clone de *Achromobacter* PAN- resistente, designado *danish epidemic strain* (DES), o qual estava causando infecção em pacientes com FC de Copenhague e Aarhus (Dinamarca), respectivamente. Da mesma maneira que foi observado nos dois hospitais deste estudo, a maioria dos estudos relacionados a pacientes com FC colonizados por *A. xylosoxidans* relatam aumento da sensibilidade, especialmente para as drogas meropenem, imipenem e piperacilina-tazobactam, e alguma variabilidade em relação aos outros antimicrobianos. Na Dinamarca, 100% dos isolados foram sensíveis à piperacilina-tazobactam, 94% ao meropenem, 92% ao imipenem, e 62 à ceftazidima, e em Madri, houve 93.7% de sensibilidade à piperacilina-tazobactam e 62.5% ao meropenem; sendo que nos dois hospitais, o antibiótico menos efetivo foi ciprofloxacina (OTERO et al., 2016; WANG et al., 2013). Embora estes resultados estejam de acordo com as recomendações para o tratamento da infecção por *A. xylosoxidans*, com o uso de combinações de antibióticos intravenosos incluindo imipenem ou meropenem, cuidado extra deve ser tomado devido a relatos de produção de carbapenemase (AMOUREUX et al., 2013), que não foram encontradas nos isolados deste estudo (dados não mostrados).

Até agora, dados de MLST de apenas seis isolados (ids 344, 775, 776, 777, 795, 798) tinham sido relatados em pacientes com FC no Brasil, que foram isolados em 1997 e 1998 de acordo com *Burkholderia cepacia complex* MLST Databases (<http://pubmlst.org/bcc/>). Nenhum dos STs que haviam sido notificados no Brasil foi encontrado neste estudo. Embora não tenha sido identificada nenhuma nova espécie do CBc, obteve-se grande diversidade de linhagens. Todos os resultados de MLST deste estudo foram registrados no banco de dados PubMLST sob os números (id) 1947 a 1981, que contribui para atualizá-lo (<http://pubmlst.org/bcc/>). Os STs 1052, 1053, 1054 e 1055 pertencem ao CC13, considerado o maior CC reportado com mais de 100 isolados distribuídos globalmente em locais distintos (<http://pubmlst.org/bcc/>) (GAUTAM et al., 2016). Embora neste estudo nenhuma das espécies apresentou linhagens epidêmicas conhecidas (LUPO et al., 2015; VASILJEVIC et al., 2016), o ST1054 foi considerado *double-locus variant* (DLV) de ST28 (polimorfismos em *gyrB* e *trpB*) e ST1053 e

ST1055 foram consideradas *single-locus variant* (SLV) de ST32 (polimorfismos em *gyrB*). ST28 e ST32 são cepas epidêmicas de *B. cenocepacia* distribuídas no todo o mundo (GAUTAM et al., 2016), porém ainda não foram descritas na América do Sul. Dos 17 ST identificados neste estudo, três (ST911, ST17 e ST369) apresentaram distribuição intercontinental. Seis cepas de *B. cenocepacia* IIIB pertencentes ao ST911 foram isoladas, uma da Bélgica e agora cinco estirpes do Brasil, todas elas de pacientes com FC em 2015. Um isolado de *B. multivorans* classificado como ST17 foi detectado pela primeira vez em um paciente com FC nos Estados Unidos em 1995. Depois disso, *B. multivorans* ST17 foi detectado em dois isolados da Nova Zelândia (2003), um da Austrália (2009), um da Espanha (2010), e agora dois do Brasil (2013), todos eles isolados de pacientes com FC (<http://pubmlst.org/bcc/>). Este é o primeiro relato de ST369 em pacientes com FC; o mesmo foi mencionado somente uma vez em amostra ambiental isolada da Bélgica (2002).

Dados de MLST de onze isolados (ids 526 a 536) foram relatados em pacientes com FC no Brasil no estado de Rio de Janeiro entre 2003 e 2009 de acordo com *Achromobacter PubMLST Database* (<https://pubmlst.org/achromobacter/>). Dois STs (ST201 e ST205) que haviam sido identificados no Rio de Janeiro foram encontrados neste estudo. Todos os resultados de MLST foram enviados para o banco de dados PubMLST, mas ainda não foram registrados (<https://pubmlst.org/achromobacter/>). Os STs 2, 201, 205, 341 e 342 fazem parte de um grupo grande com mais de cem STs, porém ainda não foi nomeado nenhum CC no banco de dados de *Achromobacter* (<https://pubmlst.org/achromobacter/>). Nenhum estudo evidenciou cepas epidêmicas intercontinentais, apenas surtos locais (<https://pubmlst.org/achromobacter/>)(COOLS et al., 2016; PEREIRA et al., 2011; RIDDERBERG; WANG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2012). Três STs (ST2, ST201 e ST205) apresentaram distribuição intercontinental. Duas cepas de *A. xylosoxidans* pertencentes ao ST2 foram isoladas em pacientes com FC, um nos Estados Unidos em 2012 e um na França em 2014. Dois isolados de *A. xylosoxidans*, um pertencendo ao ST201 e outro ao ST205 foram identificados em paciente com FC no Brasil em 2007 e 2009, respectivamente.

Como demonstrado por este estudo, a compreensão da epidemiologia, ecologia e impacto clínico de infecções por espécies de *Achromobacter* e CBc na espécie humana ainda é um grande desafio, principalmente por causa da variabilidade dos dados encontrados em diferentes centros, o que pode ser associado com a variabilidade genética das bactérias e variabilidade no gene *CFTR* dos pacientes.

6. CONCLUSÕES

- A espécie de *Burkholderia* mais prevalente nos dois hospitais foi *B. vietnamiensis*, o que não é usual. A ocorrência tanto de *B. cenocepacia* quanto de *B. multivorans*, que normalmente são as mais prevalentes, foi baixa neste estudo.
- *A. xylosoxidans* foi à espécie mais isolada em ambos os hospitais, o que também é observado na maioria dos estudos.
- Diferenças foram observadas na eficácia dos antibióticos testados para o CBc nos dois hospitais e também em outros países. Como ainda não existe consenso sobre a terapia de manutenção crônica e o tratamento de erradicação precoce do CBc, por enquanto, os clínicos devem continuar a avaliar cada paciente individualmente, levando em conta os dados de sensibilidade *in vitro* para antibióticos, respostas clínicas prévias e sua própria experiência.
- Valores elevados de resistência aos antimicrobianos contra *A. ruhlandii* foram obtidos, o que também já foi descrito por outros autores. Os resultados do teste de sensibilidade para *A. xylosoxidans* estiveram de acordo com as recomendações para o seu tratamento em pacientes com FC, e que por incluir combinações com os antibióticos imipenem ou meropenem, cuidado extra deve ser tomado em relação à produção de carbapenemases.
- Nos dois hospitais houve alguns casos em que isolados com o mesmo perfil clonal foram observados entre pacientes sem infecção crônica por CBc, portanto sem importância clínica já que estes isolados costumam desaparecer com facilidade no pulmão destes pacientes.
- No HCFMRP-USP houve suspeita de contaminação cruzada somente entre pacientes colonizados por *B. vietnamiensis*, e apenas dois pacientes estavam cronicamente colonizados. No HCFCM-Unicamp, dentre os pacientes com mesmo perfil clonal, apenas um paciente que estava colonizado por *B. multivorans* tinha infecção crônica.
- Houve suspeita de contaminação cruzada por *Achromobacter* somente entre pacientes do HCFMRP-USP, e apenas entre pacientes colonizados por *A. xylosoxidans*, espécie frequentemente considerada mais transmissível de acordo com alguns estudos. Dentre os pacientes com suspeita de contaminação cruzada, apenas três deles estavam cronicamente colonizados.
- Nenhuma nova espécie foi identificada por MLST e nenhuma das espécies apresentou linhagens epidêmicas conhecidas. Grande diversidade de STs foi observada, sendo a maioria deles identificados pela primeira vez neste estudo, e os mesmos foram depositados no banco de dados para que possam servir de base para futuros estudos.

- Nos dois hospitais, alguns isolados de pacientes diferentes colonizados por CBc obtiveram o mesmo ST, o que pode sugerir que as estirpes podem ter sido originadas de uma fonte comum de contaminação ou podem ter sido adquiridos do ambiente.
- No geral, os pacientes colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans* apresentaram valores de escore de Shwachman, IMC e função pulmonar menos preservados e exacerbações ligeiramente mais frequentes do que pacientes colonizados por bactérias do CBc. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de que estas alterações podem ser devido à presença de outras bactérias tais como *P. aeruginosa* e MRSA, que foram isoladas simultaneamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS³

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

- ABDULWAHAB, A. et al. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. **Infection and drug resistance**, v. 8, p. 83–8, 2015.
- AMOUREUX, L. et al. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, n. 2, p. 170–176, 2013.
- AMOUREUX, L. et al. *Achromobacter xylosoxidans* is the predominant *Achromobacter* species isolated from diverse non-respiratory samples. **Epidemiol Infect**, 2016.
- ANDERSON, P. Emerging therapies in cystic fibrosis. **Therapeutic advances in respiratory disease**, v. 4, n. 3, p. 177–85, 2010.
- BALDWIN, A. et al. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4665–73, 2005.
- BARRADO, L. et al. Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1927–1930, 2013a.
- BARRADO, L. et al. Clonal diversity among *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic fibrosis patients in a reference unit. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 10, p. 665–668, 2013b.
- BILTON, D. et al. Pulmonary exacerbation: Towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. S79–S81, 2011.
- BOUSSAUD, V. et al. Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonised with *Burkholderia cepacia* complex: results from two French centres. **Thorax**, v. 63, n. 8, p. 732–737, 2008.
- CABALLERO, J. DE D. et al. Microbiological diagnostic procedures for respiratory cystic fibrosis samples in Spain: towards standard of care practices. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 335, 2014.
- CESARINI, S. et al. RecA gene sequence and Multilocus Sequence Typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 580–588, 2009.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100S**. 26th. ed. Wayne, PA: [s.n.]. v. 36

- COBURN, B. et al. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. **Scientific reports**, v. 5, p. 10241, 2015.
- COENYE, T. et al. *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**, v. 51, n. 4, p. 1481–1490, 2001.
- COOLS, P. et al. Epidemic *Achromobacter xylosoxidans* strain among Belgian cystic fibrosis patients and review of literature. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 122, 2016.
- CORREA-RUIZ, A. et al. *Burkholderia cepacia* complex infection in an Adult Cystic Fibrosis unit in Madrid. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31, n. 10, p. 649–654, 2013.
- COWARD, A. et al. Use of *nrdA* gene sequence clustering to estimate the prevalence of different *Achromobacter* species among Cystic Fibrosis patients in the UK. **Journal of Cystic Fibrosis**, 2015.
- DAMAS, C.; AMORIM, A.; GOMES, I. Fibrose quística: Revisão. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 14, n. 1, p. 89–112, 2008.
- DAVIES, J. C.; BILTON, D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. **Respiratory care**, v. 54, n. 5, p. 628–40, 2009.
- DEDECKOVA, K. et al. PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 11, n. 5, p. 440–445, 2012.
- DOI, Y. et al. Characterization of a naturally occurring class D β -lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 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*, 2010.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P. et al. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. **Current microbiology**, v. 67, n. 1, p. 51–60, 2013.
- FEHLBERG, L. C. C. et al. In vitro Susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex Isolates: Comparison of Disk Diffusion, Etest®, Agar Dilution, and Broth Microdilution Methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 2016.
- FELÍCIO, V. et al. mRNA-based Detection of Rare CFTR Mutations Improves Genetic Diagnosis of Cystic Fibrosis in Populations with High Genetic Heterogeneity. **Clinical Genetics**, 2016.
- FERNÁNDEZ-OLMOS, A. et al. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-

fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 11, n. 1, p. 59–62, 2012.

FERNÁNDEZ-OLMOS, A. et al. Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2761–5, 2013.

FIRMIDA, M. C. et al. *Achromobacter xylosoxidans* infection in cystic fibrosis siblings with different outcomes: Case reports. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 20, p. 98–103, 2017.

FLUME, P. A. et al. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines: Pulmonary Complications: Hemoptysis and Pneumothorax. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 3, p. 298–306, 2010.

GAUTAM, V. et al. Multilocus sequence analysis reveals high genetic diversity in clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex from India. **Scientific reports**, 2016.

GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2977–2980, 1997.

GOMILA, M. et al. Genotypic and Phenotypic Applications for the Differentiation and Species-Level Identification of *Achromobacter* for Clinical Diagnoses. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114356, 2014.

GOUDIE, A. D. et al. Genomic sequence and activity of KS10, a transposable phage of the *Burkholderia cepacia* complex. **BMC genomics**, v. 9, p. 615, 2008.

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

HANSEN, C. R. et al. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 1, p. 51–58, 2010.

KUTTY, P. K. Multistate outbreak of *Burkholderia cenocepacia* colonization and infection associated with the use of intrinsically contaminated alcohol-free mouthwash. **CHEST Journal**, v. 132, n. 6, p. 1825–31, 2007.

LAMBIASE, A. et al. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, n. 2, p. 145–149, 2013.

LEITE, F. C. ET AL. Molecular identification of *Burkholderia cepacia* complex and species distribution among cystic fibrosis patients seen at the reference center in southern Brazil. **Revista HCPA**, v. 21, n. 2, p. 138–144, 2011.

LIPUMA, J. J. et al. In vitro activities of a novel nanoemulsion against *Burkholderia* and other

multidrug-resistant cystic fibrosis-associated bacterial species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 249–255, 2009.

LIPUMA, J. J. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, and Acidovorax. In: **Manual of Clinical Microbiology**. [s.l: s.n.]. p. 692–713.

LIU, L. et al. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1210–3, 2002.

LUCA, G. R. D.; MENEZES, M. E.; OCAMPO, M. Genética e diagnóstico molecular. In: NETO L (Ed.). . **Fibrose Cística: enfoque multidisciplinar**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 77–92.

LUPU, A. et al. Clonality and Antimicrobial Susceptibility of Burkholderia cepacia complex Isolates Collected from Cystic Fibrosis Patients during 1998-2013 in Bern, Switzerland. **The new microbiologica**, v. 38, n. 2, p. 281–288, 2015.

MAHENTHIRALINGAM, E. et al. 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**, v. 38, n. 9, p. 3165–73, 2000.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. **Burkholderia cepacia complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology** **Journal of Applied Microbiology**, 2008.

MCCAUGHEY, G. et al. The future of antimicrobial therapy in the era of antibiotic resistance in cystic fibrosis pulmonary infection. **Expert review of respiratory medicine**, v. 7, p. 385–96, 2013.

MILLER, M. R. et al. Standardisation of spirometry. **European Respiratory Journal**, v. 26, n. 2, p. 319–338, 2005.

NANNINI, E. C. et al. Polyclonal outbreak of bacteremia caused by Burkholderia cepacia complex and the presumptive role of ultrasound gel. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 543–545, 2015.

NIELSEN, S.; NØRSKOV-LAURITSEN, N BJARNSHOLT, T.; MEYER, R. Achromobacter species isolated from cystic fibrosis patients reveal distinctly different biofilm morphotypes. **Microorganisms**, v. 4, n. 3, 2016.

OTERO, L. L. et al. Achromobacter xylosoxidans infection in an adult cystic fibrosis unit in Madrid. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 34, n. 3, p. 184–187, 2016.

PANZNER, M. J. et al. A theobromine derived silver N-heterocyclic carbene: synthesis,

characterization, and antimicrobial efficacy studies on cystic fibrosis relevant pathogens.

Dalton transactions, n. 35, p. 7308–13, 2009.

PEETERS, C. et al. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 483–489, 2013.

PEREIRA, R. H. V et al. *Achromobacter xylosoxidans*: Characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3649–3651, 2011.

PETTIT, R. S. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Modifying Medications: The Future of Cystic Fibrosis Treatment. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 7-8, p. 1065–1075, 2012.

POMPILIO, A. et al. Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed α -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 145, 2012.

PROESMANS, M.; VERMEULEN, F.; DE BOECK, K. **What's new in cystic fibrosis? from treating symptoms to correction of the basic defect** **European Journal of Pediatrics**, 2008.

RAIDT, L. et al. Increased Prevalence and Resistance of Important Pathogens Recovered from Respiratory Specimens of Cystic Fibrosis Patients During a Decade. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 7, p. 700–705, 2015.

RHODES, K. A.; SCHWEIZER, H. P. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 82–90, 2016.

RIDDERBERG W, BENDSTRUP KE, OLESEN HV, JENSEN-FANGEL S, N.-L. N. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. **Journal of Cystic Fibrosis Cyst Fibros**, v. 10, n. 6, p. 466–469, 2011.

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**, v. 50, n. 8, p. 2688–2694, 2012.

RODRIGUES, E. R. A. et al. Characterization of *Achromobacter* Species in Cystic Fibrosis Patients: Comparison of blaOXA-114 PCR Amplification, Multilocus Sequence Typing, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 12, p. 3894–3896, 2015.

RØNNE HANSEN, C. et al. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study. **Journal of cystic fibrosis : official journal**

of the **European Cystic Fibrosis Society**, v. 5, n. 4, p. 245–51, 2006.

ROSENSTEIN, B. J.; CUTTING, G. R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. **The Journal of pediatrics**, v. 132, n. 4, p. 589–95, 1998.

ROSSOLINI, G. M. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Salmonella typhi* gene cluster coding for type 1 fimbrial. **The biology of Salmonella**, p. 409–413, 1993.

SCHAFFER, K. Epidemiology of infection and current guidelines for infection prevention in cystic fibrosis patients. **The Journal of hospital infection**, v. 89, n. 4, p. 309–13, 2015.

SHERILL, D. L. et al. Continuous longitudinal regression equations for pulmonary function measures. **The European respiratory journal**, v. 5, n. 4, p. 452–62, 1992.

SHOMMU, N. S.; VOGEL, H. J.; STOREY, D. G. Potential of metabolomics to reveal *Burkholderia cepacia* complex pathogenesis and antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. July, p. 1–6, 2015.

SHWACHMAN, H.; KULCZYCKI, L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. **AMA J Dis Child**, v. 96, n. 1, p. 6–15, 1958.

SMET, B. et al. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2265–2271, 2015.

SPIKER, T. et al. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607–10, 2009.

SPIKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. A Multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 3010–3015, 2012.

SPIKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, n. 3, p. 298–301, 2013.

TRINDADE, A. M.; SOUSA, T. L. F. DE; ALBUQUERQUE, A. L. P. The interpretation of spirometry on pulmonary care: until where can we go with the use of its parameters. **Pulmão RJ**, v. 24, n. 1, p. 3–7, 2015.

VANDAMME, P. et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, n. 4, p. 1188–1200, 1997.

VANDAMME, P. et al. *Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicolens* sp. nov.,

Achromobacter pulmonis sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–10, 2013a.

VANDAMME, P. et al. Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 7, p. 474–82, 2013b.

VANDAMME, P. et al. Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 3708–3717, 2016.

VANLAERA, E. et al. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov., and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1580–1590, 2008.

VANLAERE, E. et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 102–111, 2009.

VASILJEVIC, Z. V. et al. *Burkholderia cepacia* complex in Serbian patients with cystic fibrosis: prevalence and molecular epidemiology. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 35, n. 8, p. 1277–1284, 2016.

VERMIS, K. et al. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 3, p. 689–91, 2004.

WAINE, D. J.; WHITEHOUSE, J.; HONEYBOURNE, D. Cross-infection in cystic fibrosis: The knowledge and behaviour of adult patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 6, n. 4, p. 262–266, 2007.

WANG, M. et al. Early treatment with inhaled antibiotics postpones next occurrence of *Achromobacter* in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, n. 6, p. 638–643, 2013.

WIENER-WELL, Y. et al. Successful outbreak investigation of *Burkholderia cepacia* complex bacteremia in intensive care patients. **American Journal of Infection Control**, v. 42, n. 5, p. 580–581, 2014.

YAMAMOTO, M. et al. Molecular characterization of imp-type metallo B-lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**,

v. 67, n. 9, p. 2110–2113, 2012.

ZEMANICK, E. T. et al. Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62917, 2013.

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**, v. 202, n. 5, p. 770–781, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Características fenotípicas e moleculares de espécies do CBc isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP

Pacientes ^a	Data de coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c								Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e							
				ST	atpD	gltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB		CAZ	MER	LEV	SXT	CHL	TIC	MN	
FC-6a	17/08/2011	<i>B. cepacia</i>	I-A	1049	6	448	685	321	41	313	446	LEV (I), CHL (I), TIC	8	4	4	2	16	>128	4	
FC-7 ^a	27/07/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A	1056	376	19	62	111	35	11	17	CHL (I)	<1	<0.25	2	2	16	8	2	
FC7e	16/05/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-D2	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC	<1	0.5	1	2	8	>128	1	
FC-12	13/07/2011	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-D	1053	16	11	686	14	11	6	79	LEV, CHL (I), MN (I), TIC, SXT	2	4	8	8	16	>128	8	
FC-12a	27/06/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-D																	
FC-12b	03/09/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-D	1053	16	11	686	14	11	6	79	CAZ (I), MER (I), LEV, TIC	16	8	8	2	8	>128	2	
FC-13	13/07/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1	1056	376	19	62	111	35	11	17	LEV, CHL, MN (I), TIC	2	1	16	2	32	>128	8	
FC-13b	14/12/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1																	
FC-13c	07/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1																	
FC-13d	28/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1	1056	376	19	62	111	35	11	17	LEV, SXT, CHL, MN (I), TIC	4	1	>16	8	>32	>128	8	
FC-13e	10/02/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-B	1056	376	19	62	111	35	11	17	S	4	1	0.25	0.5	4	8	0.25	
FC-16b	19/03/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-B	1054	15	11	186	14	11	6	79	TIC, LEV (I)	2	4	4	2	8	>128	2	
FC-27e	14/08/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	"d"	1058	377	449	687	403	457	340	448	TIC, LEV (I)	4	1	4	2	8	>128	1	
FC-33	27/07/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A	1056	376	19	62	111	35	11	17	LEV (I), CHL (I)	<1	<0.25	4	2	16	16	2	
FC-36b	17/08/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-E	1046	312	19	16	23	12	187	17	S	4	<0.25	<0.5	2	4	2	<0.25	
FC-38b	29/02/2012	<i>B. multivorans</i>	II-A	17	97	50	4	79	37	63	55	TIC	2	4	2	2	8	128	0.5	
FC-38c	14/03/2012	<i>B. multivorans</i>	II-A																	
FC-38d	16/05/2012	<i>B. multivorans</i>	II-A																	
FC-38f	03/06/2013	<i>B. multivorans</i>	II-A	17	97	50	4	79	37	63	55	TIC, CAZ, MER, LEV, SXT, CHL, MN (I)	>32	16	>16	8	>32	>128	8	
FC-39b	09/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC, LEV, CHL, MN (I)	4	1	>16	2	32	>128	8	
FC-40d	21/08/2013	<i>B. multivorans</i>	"d"	17	97	50	4	79	37	63	55	TIC, CAZ, MER, LEV, CHL, MN (I)	>32	16	>16	2	32	>128	8	
FC-69a	04/07/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-A	911	23	136	352	15	69	8	14	TIC	2	2	2	1	8	>128	1	
FC-71	17/08/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-C1	1057	27	231	202	23	49	56	17	TIC, LEV, CHL	4	1	16	1	32	>128	4	
FC-71a	28/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-C1																	
FC-71c	17/09/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-C1	1057	27	231	202	23	49	56	17	TIC, LEV, CHL	4	1	16	1	32	>128	4	
FC-81c	14/04/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-D	369	191	19	62	22	12	132	17	S	2	1	0.25	0.25	4	16	0.25	
FC-82c	21/03/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-B	911	23	136	352	15	69	8	14	TIC	4	2	2	1	8	>128	1	
FC-82d	15/05/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A1	1056	376	19	62	111	35	11	17	LEV, CHL (I)	<1	0.5	8	2	16	16	4	
FC-83c	26/09/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	"d"	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, LEV (I), CHL (I)	2	1	4	1	16	>128	4	
FC-84	07/12/2011	<i>B. difusa</i>	"d"	1047	375	447	684	402	455	339	445	TIC, LEV, CHL (I)	8	2	16	2	16	>128	4	
FC-84 ^a	26/09/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-D1	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, LEV (I), CHL (I)	2	1	4	1	16	>128	4	
FC-86d	14/02/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-D	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, CHL (I)	2	0.5	2	1	16	>128	4	
FC-88	14/12/2011	<i>B. contaminans</i>	"d"	1048	27	80	546	217	122	288	214	TIC, CAZ (I), LEV, CHL (I), MN (I)	16	2	>16	2	16	>128	8	

(Continua)

Características fenotípicas e moleculares de espécies do CBc isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP (Continuação)

Pacientes ^a	Data de coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c								Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e						
				ST	atpD	gltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB		CAZ	MER	LEV	SXT	CHL	TIC	MN
FC-88a	07/03/2012	<i>B. contaminans</i>	"d"	1048	27	80	546	217	122	288	214	TIC, LEV, CHL, MN, CAZ (I), MER (I)	<u>16</u>	8	>16	2	>32	>128	>16
FC-95a	28/03/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A	1055	16	11	474	14	11	6	79	TIC	2	2	2	<i>1</i>	8	>128	<i>0.5</i>
FC-95b	27/06/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A																
FC-95d	14/08/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A																
FC-95e	24/09/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-A	1055	16	11	474	14	11	6	79	TIC, LEV, CHL	2	<i>4</i>	>16	2	32	>128	<i>4</i>
FC-103	21/03/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC, LEV, SXT, CHL	8	2	8	4	32	>128	<i>4</i>
FC-103c	14/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A																
FC-103d	26/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A																
FC-103e	10/02/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-A	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC, LEV, SXT, CHL, MN (I), CAZ (I)	<u>16</u>	<i>4</i>	8	4	32	>128	8
FC-107c	10/02/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-D	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, CHL (I)	2	<i>0.5</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<u>16</u>	>128	2
FC-112	18/04/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	IIIA-C	1052	15	11	487	14	456	6	447	TIC, LEV, CHL, MN	<i>4</i>	<i>4</i>	>16	1	>32	>128	>16
FC-116 ^a	03/10/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FC-120	12/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	"d"	1050	27	231	202	22	12	56	17	LEV, CHL (I)	2	<i>0.5</i>	>16	<i>1</i>	<u>16</u>	<i>4</i>	2

^a FC, fibrose cística; números significam pacientes e letras significam isolados;

^b PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; d: DNA degradado;

^c MLST: multilocus sequence typing; ST, sequencing type; negrito, novos STs e novos alelos;

^d CAZ, ceftazidima; MER, meropenem; LEV, levofloxacina, SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CHL, cloranfenicol; TIC, Ticarcilina-ácido-clavulânico; (I), intermediário;

^e CIM: concentração inibitória mínima; negrito, resistente; sublinhado, intermediário; itálico, sensível;

-: não realizado.

(Conclusão)

APÊNDICE B - Características fenotípicas e moleculares de espécies de *Achromobacter* isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP

Pacientes ^a	Data de coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c									Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e								
				ST	nusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA	nrdA_765		PTZ	CAZ	IMP	MER	PB	CIP	LEV	SXT	CHL
FC-4b	27/08/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-C	201	91	26	2	2	62	8	2	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FC-4c	18/07/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-C	201	91	26	2	2	62	8	2	36	PB, CIP, LEV	<1	8	2	2	>16	>8	8	<0.5	8
FC-5a	08/03/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-C1	201	91	26	2	2	62	8	2	36	PTZ, CAZ, MER, PB, CIP, LEV, SXT	64	64	2	16	>16	8	8	>16	8
FC-5b	29/02/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-C																			
FC-5c	02/07/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-C																			
FC-5d	14/05/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-C	201	91	26	2	2	62	8	2	36	PTZ, CAZ, PB, CIP, LEV	64	64	2	1	>16	8	8	1	8
FC-9	13/07/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-G	-	-	-	-	-	-	-	-	36	CIP, LEV, SXT, CHL	<1	8	0.6	0.12	2	8	8	8	32
FC-9b	07/04/2014	<i>A. xylosoxidans</i>	X-E	-	-	-	-	-	-	-	-	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FC-19 ^a	06/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-F	-	-	-	-	-	-	-	-	36	CIP, LEV(I), SXT, CHL	<1	4	2	2	2	4	4	4	32
FC-26b	18/04/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	36	PB, CIP	2	4	2	0	8	4	2	2	8
FC-36	01/08/2011	<i>A. ruhlandii</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	20	SXT, CHL	<1	2	4	0.125	2	1	1	4	32
FC-36c	14/12/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A	-	-	-	-	-	-	-	-	36	PB (I), CIP, LEV (I), CHL	2	4	2	0	4	8	4	2	32
FC-37	03/08/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B	340	77	93	100	88	120	95	7	232	CIP, LEV (I), SXT, CHL (I)	4	8	0.6	1	2	8	4	16	16
FC-37a	14/12/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B1																			
FC37b	05/09/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B																			
FC-37c	30/04/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B																			
FC-37d	07/08/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B																			
FC-37e	15/08/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B																			
FC-37f	26/08/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B																			
FC-37g	10/09/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-B	340	77	93	100	88	120	95	7	232	CIP (I), SXT, CHL (I)	4	4	2	1	2	2	2	16	16
FC-38c	13/03/2012	<i>A. ruhlandii</i>	R-A	-	-	-	-	-	-	-	-	23	CIP, LEV (I), CHL (I)	4	4	2	0.5	2	4	4	<0.5	16
FC-38d	16/05/2012	<i>A. ruhlandii</i>	R-B									23										
FC-38e	05/09/2012	<i>A. ruhlandii</i>	R-B	-	-	-	-	-	-	-	-	23	PTZ, PB (I), CIP, LEV (I), CHL (I)	64	8	2	4	4	4	4	<0.5	16
FC-50	03/08/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A	205	1	26	83	4	59	8	2	36	CIP, LEV (I), SXT, CHL	2	4	2	0.24	2	4	4	4	32

(Continua)

Características fenotípicas e moleculares de espécies de *Achromobacter* isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFMRP – USP (Continuação)

Pacientes ^a	Data de coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c									Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e									
				ST	nusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA	nrdA_765		PTZ	CAZ	IMP	MER	PB	CIP	LEV	SXT	CHL	
FC-50a	14/12/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A																				
FC-50b	13/03/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A																				
FC-50c	28/03/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A																				
FC-50d	11/07/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A																				
FC-50g	14/04/2014	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A	205	1	26	83	4	59	8	2	36	CIP, LEV, SXT, CHL	2	8	2	0.48	2	8	8	4	32	
FC-52e	17/04/2012	<i>A. mucicolens</i>	Mu-A	-	-	-	-	-	-	-	-	57	SXT, CHL	<1	1	2	0.062	2	1	2	>16	32	
FC-70	17/08/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-E	341	6	105	8	5	59	8	4	42	CAZ, CIP, LEV, SXT, CHL	2	64	2	4	2	>8	8	>16	32	
FC-70a	17/04/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-E	341	6	105	8	5	59	8	4	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FC-78	24/08/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	X-H	2	1	26	2	4	59	2	5	41	PTZ, CAZ, PB, CHL	128	64	2	0.5	>16	0.5	0.5	2	64	
FC-78a	18/04/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-H																				
FC-78b	04/08/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-H	2	1	26	2	4	59	2	5	41	CAZ, MER (I), PB, CIP, LEV (I), SXT	<1	32	2	<u>8</u>	>16	4	<u>4</u>	8	4	
FC-86a	29/02/2012	<i>A. dolens</i>	D-A	-	-	-	-	-	-	-	-	91	CAZ (I), CHL	<1	<u>16</u>	2	0.12	2	1	1	2	32	
FC-95a	28/03/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-A	-	-	-	-	-	-	-	-	36	PB, CIP, LEV, SXT, CHL	<1	8	2	0.48	8	8	8	8	32	
FC-96	07/03/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-D	342	6	26	2	2	59	8	2	36	PB (I), CIP, LEV (I), SXT, CHL	4	8	2	1	<u>4</u>	4	<u>4</u>	16	64	
FC-96a	21/03/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-D																				
FC-96b	28/03/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-D																				
FC-96c	26/09/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-D	342	6	26	2	2	59	8	2	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FC-102	14/03/2012	<i>A. dolens</i>	D-B	-	-	-	-	-	-	-	-	90	CAZ, CIP (I), LEV (I), CHL	<1	32	0.6	0.48	2	<u>2</u>	<u>4</u>	<0.5	64	
FC-102a	16/05/2012	<i>A. dolens</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	90	CHL	<1	4	2	0.48	2	0.5	1	<0.5	32	

^a FC, fibrose cística; números significam pacientes e letras significam isolados;

^b PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; d: DNA degradado;

^c MLST: multilocus sequence typing; ST, sequencing type; negrito, novos STs e novos alelos;

^d PTZ, piperacilina, tazobactam; CAZ, ceftazidima; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina, SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CHL, cloranfenicol; (I), intermediário;

^e CIM: concentração inibitória mínima; negrito, resistente; sublinhado, intermediário; itálico, sensível;

-: não realizado.

(Conclusão)

APÊNDICE C - Características fenotípicas e moleculares de espécies do CBc isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFCM-Unicamp

Pacientes ^a	Data de Coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c								Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e							
				ST	AtpD	gltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB		CAZ	MER	TIC	LEV	SXT	CHL	MN	
C1	28/06/2011	<i>B. multivorans</i>	II-B	1051	125	154	98	140	144	14	136	CAZ(I), MER(I), TIC, LEV, SXT, CHL, MN(I)	16	8	>128	16	4	>32	8	
C1a	06/03/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B																	
C1c	08/05/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B																-	
C1d	26/06/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B																-	
C1e	25/06/2013	<i>B. multivorans</i>	II-B	1051	125	154	98	140	144	14	136	MER(I), TIC, LEV, SXT, CHL, MN(I)	4	8	>128	16	8	>32	8	
C2a	26/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H1	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, CHL(I)	4	1	>128	0.5	1	16	1	
C3	12/07/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-G	1057	27	231	202	23	49	56	17	TIC, LEV, SXT, CHL, MN	4	1	>128	16	16	>32	16	
C5	30/08/2011	<i>B. contaminans</i>	C-A	1045	64	80	683	217	454	338	444	TIC, LEV, SXT, CHL	4	0.25	>128	>16	16	>32	4	
C5a	07/02/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A																	
C5b	03/06/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A																	
C5e	25/07/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A																	
C5f	25/09/2012	<i>B. contaminans</i>	C-A	1045	64	80	683	217	454	338	444	CAZ, MER, TIC, LEV, SXT, CHL, MN	32	16	>128	>16	16	>32	>16	
C8	22/09/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F1	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC(I), LEV(I), CHL(I)	2	1	64	4	2	16	4	
C9	27/09/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	"d"	1056	376	19	62	111	35	11	17	S	1	<0.25	4	0.5	1	8	<0,25	
C9a	25/10/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC, LEV(I), CHL(I)	4	1	>128	4	1	16	4	
C10	27/09/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F1	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC, LEV(I), CHL(I), MN(I)	4	1	>128	4	2	16	8	
C16	10/04/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC(I), CHL(I)	4	0.5	32	2	1	16	4	
C16a	13/01/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F																	
C16b	23/02/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F	1056	376	19	62	111	35	11	17	CHL(I), MN(I)	4	2	8	2	1	16	8	
C17	11/10/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H2	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC	4	0.5	>128	1	1	8	2	
C24	25/10/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F1	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC(I), CHL	4	1	64	2	2	32	2	
C24a	26/11/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-G1	1057	27	231	202	23	49	56	17	TIC, LEV(I), CHL	4	1	>128	4	1	32	4	
C32	04/02/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C	911	23	136	352	15	69	8	14	TIC, LEV(I), CHL, MN	8	4	>128	4	1	32	16	
C32a	24/04/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C																	

(Continua)

Características fenotípicas e moleculares de espécies do CBc isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFCM-Unicamp (Continuação)

Pacientes ^a	Data de Coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c								Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e						
				ST	atpD	gltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB		CAZ	MER	TIC	LEV	SXT	CHL	MN
C32b	03/07/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C2																
C32c	06/09/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C2	911	23	136	352	15	69	8	14	CAZ, MER, TIC, LEV, SXT, CHL, MN	32	16	>128	16	8	32	>16
C36	08/11/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F	1056	376	19	62	111	35	11	17	TIC(I), CHL	4	0.5	<u>32</u>	2	1	32	4
C37	29/11/2011	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C1	911	23	136	352	15	69	8	14	-	-	-	-	-	-	-	-
C39	29/11/2011	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	"d"	911	23	136	352	15	69	8	14	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	08/11/2011	<i>B. vietnamiensis</i>	V-F	1056	376	19	62	111	35	11	17	CHL(I)	4	0.5	16	1	1	<u>16</u>	2
C43	29/05/2012	<i>B. vietnamiensis</i>	V-I	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC	4	1	>128	1	1	8	2
C44	12/06/2012	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C	911	23	136	352	15	69	8	14	TIC, CHL(I)	4	4	>128	2	1	<u>16</u>	2
C45	12/06/2012	<i>B. multivorans</i>	II-B	1051	125	154	98	140	144	14	136	CAZ, MER, TIC, LEV, SXT, CHL	>32	16	>128	16	8	>32	4
C50	25/06/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H1	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC	4	1	>128	1	1	8	1
C50a	26/11/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, CHL(I)	4	1	>128	1	1	<u>16</u>	1
C51	21/06/2013	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	IIIB-C1	911	23	136	352	15	69	8	14	TIC	8	2	>128	1	1	8	2
C52	24/09/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, CHL	4	1	>128	2	1	32	2
C56	27/08/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H3	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC, CHL(I)	4	1	>128	2	1	<u>16</u>	2
C63b	29/11/2013	<i>B. vietnamiensis</i>	V-I	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC	2	1	>128	1	1	8	1
C65	13/12/2014	<i>B. vietnamiensis</i>	V-H	369	191	19	62	22	12	132	17	TIC	2	1	>128	1	1	8	1

^a C, Campinas; números significam pacientes e letras significam isolados;

^b PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; d: DNA degradado;

^c MLST: multilocus sequence typing; ST, sequencing type; negrito, novos STs e novos alelos;

^d CAZ, ceftazidima; MER, meropenem; LEV, levofloxacina, SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CHL, cloranfenicol; TIC, Ticarcilina-ácido-clavulânico; (I), intermediário;

^e CIM: concentração inibitória mínima; negrito, resistente; sublinhado, intermediário; itálico, sensível;

-: não realizado.

(Conclusão)

APÊNDICE D - Características fenotípicas e moleculares de espécies de *Achromobacter* isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFCM-Unicamp

Pacientes ^a	Data de Coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c									Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e								
				ST	nusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA	nrdA_765		CAZ	MER	LEV	SXT	CHL	CIP	IMP	PB	PTZ
C10a	27/03/2012	<i>A. ruhland</i>	R-C	-	-	-	-	-	-	-	-	23	MER,LEV(I),SXT,CIP,IMP(I),PB,PTZ(I)	8	>16	<u>4</u>	>16	8	8	<u>8</u>	8	<u>32</u>
C10b	27/04/2012	<i>A. ruhland</i>	R-C																			
C10c	14/08/2012	<i>A. ruhland</i>	R-C																			
C10d	09/03/2013	<i>A. ruhland</i>	R-C1	-	-	-	-	-	-	-	-	23	CAZ,MER,LEV,SXT,CHL(I),CIP,PB(I),PTZ(I)	32	>16	16	>16	<u>16</u>	>8	4	<u>4</u>	<u>32</u>
C11	29/09/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C21	18/10/2011	<i>A. ruhland</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	23	CIP(I), PB(I0, PTZ(I)	8	2	1	0.5	8	<u>2</u>	4	<u>4</u>	<u>32</u>
C23	29/10/2011	<i>A. xylosoxidans</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	39	LEV, SXT, CHL, CIP, PB(I)	4	0.5	16	4	32	>8	1	<u>4</u>	2
C26	24/02/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-I	-	-	-	-	-	-	-	-	36	LEV(I), CHL(I), CIP, PB	4	0.25	<u>4</u>	2	<u>16</u>	4	2	8	2
C26a	07/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-I																			
C26b	26/11/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-I	-	-	-	-	-	-	-	-	36	LEV, CHL, CIP, PB	4	0.25	8	2	64	8	2	8	2
C27	03/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K	-	-	-	-	-	-	-	-	36	LEV (I), SXT, CHL(I), CIP, IMP(I), PB(I)	4	0.25	<u>4</u>	8	<u>16</u>	4	<u>8</u>	<u>4</u>	2
C27a	10/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K																			
C27b	19/06/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K																			
C27c	25/09/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K																			
C27d	25/06/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-K	-	-	-	-	-	-	-	-	36	CAZ,MER,LEV,SXT,CHL,CIP,IMP,PB(I),PTZ	>64	16	16	8	32	>8	16	<u>4</u>	>128
C28	03/07/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-N	-	-	-	-	-	-	-	-	111	LEV(I), SXT, CHL, CIP, PB	8	0.25	<u>4</u>	4	32	4	2	8	2
C29	04/12/2012	<i>A. specie Y (new)</i>	Y-A	-	-	-	-	-	-	-	-	99	CHL(I), CIP(I), PB(I)	8	0.25	2	1	<u>16</u>	<u>2</u>	1	<u>4</u>	2
C38	08/11/2011	<i>A. piechaudii</i>	P-A	-	-	-	-	-	-	-	-	234	SXT, CIP(I)	8	0.25	2	>16	8	<u>2</u>	1	2	2
C40	18/09/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-J	-	-	-	-	-	-	-	-	36	SXT, CHL(I), CIP(I), PB	8	1	2	4	<u>16</u>	<u>2</u>	4	16	2
C41	21/01/2012	<i>A. ruhland</i>	R-E	-	-	-	-	-	-	-	-	23	MER, LEV(I), SXT, CIP, PB(I), PTZ(I)	2	16	<u>4</u>	4	8	4	4	<u>4</u>	<u>32</u>
C41a	04/12/2012	<i>A. ruhland</i>	R-E																			
C41b	22/05/2013	<i>A. ruhland</i>	R-E																			
C41f	18/04/2014	<i>A. ruhland</i>	R-E	-	-	-	-	-	-	-	-	23	CAZ,MER,LEV(I),SXT,CHL,CIP,IMP,PB(I),PTZ(I)	32	16	<u>4</u>	8	32	8	16	<u>4</u>	<u>64</u>
C46	16/02/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-P	-	-	-	-	-	-	-	-	36	LEV (I), CHL, CIP, IMP, PB	8	1	<u>4</u>	2	32	8	16	8	2
C46a	08/07/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-Q																			

(Continua)

Características fenotípicas e moleculares de espécies de *Achromobacter* isoladas de pacientes com FC atendidos no HCFCM-Unicamp (Continuação)

Pacientes ^a	Data de Coleta	Gênero/espécie (UGent)	PFGE ^b	MLST ^c									Perfil de resistência ^d	CIM (µg/mL) ^e								
				ST	nusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA	nrdA_765		CAZ	MER	LEV	SXT	CHL	CIP	IMP	PB	PTZ
C46b	18/08/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-Q	-	-	-	-	-	-	-	-	41	SXT, CHL, CIP(I), PB(I)	8	0.5	2	4	32	<u>2</u>	4	<u>4</u>	2
C47	16/05/2012	<i>A. xylosoxidans</i>	X-O	-	-	-	-	-	-	-	-	36	LEV, SXT, CHL, CIP, PB(I)	8	1	8	16	>64	>8	4	<u>4</u>	2
C49	30/05/2013	<i>A. insuavis</i>	I-A	-	-	-	-	-	-	-	-	233	LEV, SXT, CHL, CIP, PB(I)	4	0.5	8	16	>64	8	4	<u>4</u>	2
C53	09/03/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-M	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C54	27/08/2013	<i>A. ruhland</i>	R-F	-	-	-	-	-	-	-	-	23	CAZ, CHL(I), CIP(I), IMP(I), PB(I)	>64	1	1	2	<u>16</u>	<u>2</u>	<u>8</u>	<u>4</u>	8
C54a	11/05/2013	<i>A. ruhland</i>	R-F	-	-	-	-	-	-	-	-	23	CAZ, CHL(I), CIP(I), IMP(I), PB(I)	>64	0.5	2	1	<u>16</u>	<u>2</u>	<u>8</u>	<u>4</u>	8
C55	27/08/2013	<i>A. ruhland</i>	R-D	-	-	-	-	-	-	-	-	130	LEV, SXT, CHL, CIP, PB (I)	8	2	8	8	64	8	4	<u>4</u>	2
C58	29/10/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	X-L	-	-	-	-	-	-	-	-	36	CAZ (I), SXT, CHL, CIP, PB	<u>16</u>	0.5	2	4	32	4	4	8	2
C59a	11/05/2013	<i>A. xylosoxidans</i>	"d"	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a C, Campinas; números significam pacientes e letras significam isolados;

^b PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; d: DNA degradado;

^c MLST: multilocus sequence typing; ST, sequencing type; negrito, novos STs e novos alelos;

^d PTZ, piperacilina, tazobactam; CAZ, ceftazidima; IMP, imipenem; MER, meropenem; PB, polimixina B; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina, SXT, Sulfametoxazol-trimetoprim; CHL, cloranfenicol; (I), intermediário;

^e CIM: concentração inibitória mínima; negrito, resistente; sublinhado, intermediário; itálico, sensível;

-: não realizado.

(Conclusão)

ANEXO

ANEXO A – Valores para interpretação da avaliação clínica

Valores de Score de Shwachman e suas características

Graduação	Pontos	Atividade geral	Exame físico	Nutrição	Achados radiológicos
Excelente (86-100)	25	Atividade íntegra. Brinca, joga bola, vai à escola regularmente	Normal. Não tosse. FC e FR normais. Pulmões livres. Boa postura.	Mantém peso e estatura acima do percentil 25. Fezes bem formadas. Boa musculatura e tônus.	Campos pulmonares limpos.
Bom (71-85)	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência na escola.	FC e FR normais em repouso. Tosse rara. Pulmões livres. Pouco enfisema.	Peso e altura entre percentis 15 e 20. Fezes discretamente alteradas.	Pequena acentuação da trama vasobrônquica. Enfisema discreto.
Médio (56-70)	15	Necessita repousar durante o dia. Cansaço fácil após exercícios. Diminui a frequência à escola.	Tosse ocasional, às vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baqueteamento de dedos.	Peso e altura acima do 3º percentil. Fezes anormais, pouco formadas. Distensão abdominal. Hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade. Aumento da trama vasobrônquica.
Moderado (41-55)	10	Dispneia após pequenas caminhadas. Repouso em grande parte.	Tosse frequente produtiva. Retração torácica. Enfisema moderado. Pode haver deformidade do tórax. Baqueteamento 2/3+.	Peso e altura abaixo do 3º percentil. Fezes anormais. Volumosa diminuição da massa muscular.	Moderado enfisema. Áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta. Bronquiectasia.
Grave (40 ou menos)	5	Ortopneia. Confinado ao leito.	Tosse intensa. Períodos de taquipneia e taquicardia e extensas alterações pulmonares. Pode mostrar sinais de falência cardíaca direita. Baqueteamento 3/4+.	Desnutrição intensa. Distensão abdominal. Prolapso retal.	Extensas alterações. Fenômenos obstrutivos. Infecção, atelectasia, bronquiectasia.

Fonte: SHWACHMAN; KULCZYCKI (1958)

Classificação do peso pelo IMC

Classificação	IMC(kg/m ²)	Risco de Comorbidades
Baixo peso		Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Sobrepeso	≥25	—
Pré-obeso	25-29,9	Aumentado
Obeso I	30,0-34,9	Moderado
Obeso II	35,0-39,9	Grave
Obeso III	≥40	Muito grave

Fonte: <http://bvsmis.saude.gov.br/>

Classificação da gravidade da doença

GRAVIDADE (% CVF DO PREVISTO)					GRAVIDADE (%VEF ₁ DO PREVISTO)				
LEVE	MODERADO	MODERADO A GRAVE	ACENTUADO	MUITO ACENTUADO	LEVE	MODERADO	MODERADO A GRAVE	ACENTUADO	MUITO ACENTUADO
≥ 60%	51 - 59%	X	≤ 50%	X	≥ 60%	41 - 59%	X	≤ 40%	X

CVF: capacidade vital forçada; VEF₁: volume expiratório forçado em um segundo. Fonte: TRINDADE; SOUSA; ALBUQUERQUE (2015)