Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Rosana Helena Vicente Pereira

Achromobacter spp na Fibrose Cística: Identificação das espécies, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos de virulência

Rio de Janeiro
2013

Rosana Helena Vicente Pereira

Achromobacter spp na Fibrose Cística: Identificação das espécies, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos de virulência

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.ª Dra Elizabeth de Andrade Marques

Coorientadora: Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P436 Pereira, Rosana Helena Vicente.
Achromobacter spp na Fibrose Cística: Identificação das espécies, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos de virulência / Rosana Helena Vicente Pereira. – 2013.
124 f.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques.
Coorientadora: Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Fibrose cística - Teses. 2. Fibrose Cística - Fisiopatologia. 3. Achromobacter - Classificação. 4. Achromobacter denitrificans - Patogenicidade. 5. Achromobacter denitrificans - Virologia. 6. Resistência beta-Lactâmica - Efeito de drogas. 7. Pneumopatias - Etiologia. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Assef, Ana Paula D'Alincourt Carvalho. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.24-003.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Rosana Helena Vicente Pereira

Achromobacter spp na Fibrose Cística: Identificação das espécies, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos de virulência

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 17 de dezembro de 2013.

Orientadora: Prof.ª Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

_____
Prof.ª Dra. Mara Lúcia Penna Queiroz
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof. Dr. Robson de Souza Leão
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves
Universidade Federal Fluminense

_____
Prof.ª Dra. Karyne Rangel Carvalho
Fundação Oswaldo Cruz.

Rio de Janeiro
2013

DEDICATÓRIA

À minha mãe, exemplo de vida e dedicação aos filhos, que sempre soube na sua simplicidade me fazer acreditar que meus sonhos eram possíveis e por apoiar incondicionalmente minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por, mais uma vez, Ter estado ao meu lado, guiando meus passos e me amparando nos momentos difíceis...

A minha amada mãe, Eudinete, pelo incentivo e exemplo de caráter, a qual devo e dedico, como sempre, mais uma conquista.

Aos meus irmãos, Renata e Marcus Vinícius pela simples existência e incentivos constantes.

Ao meu namorado, Rodrigo, pelo seu amor, amizade, compreensão e paciência nas ausências, carinho e companheirismo constantes.

A Professora Elizabeth Marques, minha orientadora, exemplo de competência e superação, pela paciência, disponibilidade, compromisso e amizade.

A Dra. Ana Paula D. Carvalho-Assef pela co-orientação, atenção e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Professor Robson de Souza Leão, pela amizade, parceria em muitos momentos e revisão desta tese.

Ao Professor Rodolpho Matos Albano pela amizade, atenção, parceria, ajuda e ensinamentos que sempre me ofertou.

A todos os Professores membros da Banca por aceitarem meu convite.

A Márcia Jones, minha grande amiga, professora e parceira, idealizadora do trabalho com *Achromobacter*.

A Luciene Silva, minha querida amiga, parceira de estudos durante o Mestrado, parceira de vida durante o Doutorado.

A Maíra Citrangulo, querida amiga do dia-a-dia, grande incentivadora, pelo auxílio em parte desse trabalho.

A Emanuella Araújo, querida amiga e companheira da Microbiologia UERJ.

Aos queridos companheiros do laboratório 2: Géssica Araújo, Elenice Rosa, Alex Ferreira, Rachel Ribeiro, Luiz Gonzaga Júnior, Daniele Lima, Daniele Pacheco e Beathiz Godoy, por tornarem os momentos de trabalho sempre muito divertidos e agradáveis.

A Denise do Laboratório de Genoma/UERJ, pela amizade, parceria e suporte imprescindíveis a realização deste e de muitos outros trabalhos.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM)/UERJ) do Laboratório de Bacteriologia do HUPE, que contribuíram de inúmeras formas para que eu chegasse até aqui.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro para a execução desse projeto.

Você é do tamanho dos seus sonhos.

César Souza

RESUMO

PEREIRA, Rosana Helena Vicente. ***Achromobacter spp* na Fibrose Cística:** identificação das espécies, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos de virulência. 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O gênero *Achromobacter,* sobretudo, *A. xylosoxidans*, tem se destacado como um importante patógeno pulmonar relacionado à Fibrose Cística (FC). A identificação das espécies é dificultada pela similaridade fenotípica e genotípica entre elas, o que pode subestimar a real frequência e o significado das diferentes espécies. Fatores relacionados à virulência e resistência a antimicrobianos são pouco conhecidos. O objetivo deste estudo foi comparar diferentes metodologias para a identificação de espécies de *Achromobacter* spp*;* analisar os perfis de resistência a antimicrobianos; e estudar atributos de virulência (biofilme e tipos de motilidades) em amostras isoladas de pacientes com FC, atendidos em dois centros de referência do Rio de Janeiro. Foram analisadas 129 amostras de *Achromobacter* spp obtidas de 38 pacientes. As amostras foram identificadas por testes fenotípicos, por sequenciamento anterior do gene *rrs* e por PCR para detecção do gene $bla_{\text{OXA-114-}like}$, intrínseco de *A. xylosoxidans*. A relação clonal foi avaliada por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE). Os testes fenotípicos e o sequenciamento identificaram 93,8% (n=122) das amostras como *A. xylosoxidans,* uma como *A. denitrificans*. e sete foram identificadas apenas em gênero. As 122 amostras foram positivas para o gene $bla_{\text{OXA-114-}like}$. O PFGE mostrou 22 grupos clonais. Foram selecionadas 63 amostras, representativas de cada grupo clonal por paciente, para a identificação por Analise de Restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA). Todas as amostras foram identificadas: 56 (88,9%) *A. xylosoxidans*, uma (1,5%) *A. denitrificans,* três *A. insolitus (*4,8%) e três (4,8%) como *A. piechaudii*. A maioria (n=101) das 122 amostras de *A. xylosoxidans* foi forte produtora de biofilme (BF) e apresentou motilidade do tipo *swimming* (n=118; 96,7%) e *swarming* (n=99; 81%). Todas as amostras positivas para *swarming* também foram positivas para *swimming*. Houve significância entre produção de BF e os tipos de motilidades, sugerindo que estes possam favorecer a produção de BF. As amostras de *A.* não *xylosoxidans*, em sua maioria, foram BF, com concomitância dos tipos de motilidades. Das 122 amostras de *A. xylosoxidans* submetidas à CIM por E-test®, a maioria foi sensível a ceftazidima, imipenem, ciprofloxacin (CIP) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT), Entretanto, 46% das amostras foram não sensíveis a CIP. As sete amostras de *A*. não *xylosoxidans* foram sensíveis aos antimicrobianos testados. As 129 amostras de *Achromobacter* spp foram negativas para os genes bla_{SPM1}, $bla_{\text{VIM 2}}$ e bla_{KPC2}. A distribuição de marcadores de resistência entre os grupos clonais de *A. xylosoxidans* isolados de pacientes com colonização crônica, mostrou que a resistência a CIP e SUT foram os marcadores de maior ocorrência dentre os grupos clonais. Independente da técnica molecular empregada *A xylosoxidans* foi a espécie predominante, entretanto não é excludente o envolvimento de espécies emergentes nesse cenário, uma vez que todas mostraram perfil de virulência semelhante a espécie predominante.

Palavras chave: Fibrose cística; Identificação; Resistência; Virulência.

ABSTRACT

PEREIRA, Rosana Helena Vicente. ***Achromobacter spp* in Cystic Fibrosis:** Species identification, antibiotic susceptibility and virulence attributes. 2013. 124f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The genus *Achromobacter*, especially *A. xylosoxidans*, has emerged as an important lung pathogen related to Cystic Fibrosis (CF). Species identification is hampered by phenotypic and genotypic similarity between them, which may underestimate the actual frequency and significance of different species. Factors related to virulence and antimicrobial resistance are poorly understood. The aims of this study were to compare different methodologies for identifying species of *Achromobacter* spp; analyze the antimicrobial resistance profiles, and study virulence attributes (types of motility and biofilm formation) in isolates from CF patients treated at two centers of reference of Rio de Janeiro. A total of 129 *Achromobacter* spp isolates obtained from 38 patients were analyzed. The isolates were identified by phenotypic testing, by sequencing the gene *rrs* and PCR for gene $bla_{OXA-114}$-like intrinsic to *A. xylosoxidans*. The clonal relatedness was assessed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Phenotypic tests and sequencing identified 93.8 % (n=122) of the isolates as *A. xylosoxidans*, one as *A. denitrificans*. and seven were identified only at genus. The 122 isolates were positive for $bla_{OXA\ -114}$-like gene. The PFGE showed 22 clonal groups. 63 isolates representative of each clonal group per patient were selected for identification by restriction analysis of amplified ribosomal DNA (ARDRA). All samples were identified: 56 (88.9 %) *A. xylosoxidans*, one (1.5%) *A.denitrificans* three *A. insolitus* (4.8%) and three (4.8%) *A. piechaudii*. The majority (n = 101) of 122 isolates of *A. xylosoxidans* was strong biofilm (BF) producers and showed motility of swimming type (n=118, 96.7%) and swarming (n=99, 81%). All positive isolates for swarming were also positive for swimming. There was significance between the production of BF and the types of motility, suggesting that they may favor the production of BF. Non xylosoxidans *Achromobacter* were mostly BF producers, with concurrence of the types of motility. Of the 122 samples of *A. xylosoxidans* submitted to MIC by E-test®, most were sensitive to ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin (CIP) and trimethoprim/sulfamethoxazole (SUT), however, 46 % of the samples were not sensitive to CIP. The seven non xylosoxidans *Achromobacter* isolates were not susceptible to the antibiotics tested. The 129 *Achromobacter* spp isolates were negative for bla_{SPM-1}, bla_{VIM-2} and bla_{KPC-2} genes. The distribution of resistance markers between the clonal groups of *A. xylosoxidans* isolated from patients with chronic colonization, showed that resistance to CIP and SUT were most frequent markers among clonal groups. Regardless of the molecular technique employed *A. xylosoxidans* was the predominant species. However, the role of emerging species cannot be excluded from this scenario, since all showed similar virulence profile of the predominant species.

Key words: Cystic Fibrosis; Identification; Resistance, Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para ceftazidima em 122 amostras de *A. xylosoxidans*..... 67

Figura 2 Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para Ciprofloxacina em 122 *A. xylosoxidans*..... 68

Figura 3 Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para imipenem em 122 amostras de *A. xylosoxidans*..... 69

Figura 4 Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para sulfametoxazol/trimetoprim em 122 amostras de *A. xylosoxidans* 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de acesso no GenBank das sequências do gene *rrs* utilizadas na obtenção do perfis de fragmentação a partir das enzimas de restrição das cepas padrão de seis espécies do gênero *Achromobacter* 45

Tabela 2 Critério para classificação das amostras quanto à formação de biofilme (Stepanovic *et al*., 2000) 46

Tabela 3 Padrões de interpretação dos resultados das leituras das CIMs de acordo com os critérios estabelecidos e descritos no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011) 49

Tabela 4 Sequência dos iniciadores para detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamases (MBLs) e Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC): bla_{IMP-1}, bla_{SPM-1}, bla_{VIM-2} e bla_{KPC-2} 51

Tabela 5 Perfil fenotípico das 121 amostras de *Achromobacter xylosoxidans* 54

Tabela 6 Perfil fenotípico de oito amostras de *Achromobacter* spp..... 55

Tabela 7 Distribuição dos grupos clonais entre as 122* amostras de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas dos 38 pacientes com FC..... 57

Tabela 8 Distribuição dos grupos clonais das amostras de sete espécies de *Achromobacter não xylosoxidans* 58

Tabela 9 Distribuição das espécies de *Achromobacter* spp. identificadas por técnicas fenotípicas e moleculares 59

Tabela 10 Distribuição das amostras de *Achromobacter* selecionadas para a identificação pelo método da ARDRA 60

Tabela 11 Comparação entre métodos moleculares utilizados na identificação de *Achromobacter* spp 62

Tabela 12 Comparação da capacidade de formação de biofilme entre as 122 amostras de *A. xylosoxidans* 63

Tabela 13 Comparação da produção de formação de biofilme em sete amostras de *Achromobacter não xylosoxidans* 64
Tabela 14 Correlação entre produção de biofilme e os tipos de motilidade *swarming* e *swimming* nas 122 amostras de *A. xylosoxidans* 65
Tabela 15 Correlação entre produção de biofilme e os tipos de mobilidade *swarming* e *swimming* em sete amostras de *Achromobacter não xylosoxidans* 66
Tabela 16 Percentual de não sensibilidade aos antimicrobianos em 122 amostras de *A. xylosoxidans* 70
Tabela 17 Concentração Inibitória Mínima para os antimicrobianos testados em sete amostras de *Achromobacter não xylosoxidans* 71
Tabela 18 Distribuição de amostras não sensíveis entre os grupos clonais de amostras de *Achromobacter xylosoxidans* 73
Tabela 19 Comparação entre atributos de virulência, CIM e relação clonal das amostras de pacientes cronicamente colonizados por *A. xylosoxidans* 79
Tabela 20 Características de virulência e resistência em amostras de pacientes colonizados cronicamente por *Achromobacter xylosoxidans* 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARDRA	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado
BGN-NF	Bastonete Gram Negativo não Fermentador
BHI	Brain Heart Infusion
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo *Burkhoderia cepacia*
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CIP	Ciprofloxacina
ERT	Ertapenem
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
FC	Fibrose Cística
IMP	Imipenem
KPC	*Klebisiela pneumoniae* carbapenemase
M	Mucoide
MBL	Metalo-β-lactamase
MER	Meropenem
MHA	Müeller Hinton Agar
MHB	Müeller Hinton Broth
MLST	Tipagem de sequência multilocus
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NM	Não Mucoide
OXA	Oxacilinase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SUT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TOB	Tobramicina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	**OBJETIVOS**	40
1.1	**Objetivo geral**	40
1.2	**Objetivos específicos**	40
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	41
2.1	**Pacientes, espécimes clínicos e amostras bacterianas**	41
2.2	**Detecção genotípica de oxacilinase- β-lactamase (OXA-114)**	42
2.2.1	Extração do DNA bacteriano por lise térmica	42
2.2.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	42
2.3	**Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)** ..	43
2.3.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
2.3.2	Restrição com endonucleases	44
2.4	**Formação de Biofilme**	45
2.5	**Teste de Mobilidade**	47
2.5.1	*Swimming*	47
2.4.2	*Swarming*	47
2.6	**Determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas**	48
2.7	**Detecção fenotípica da produção de carbapenemase**	49
2.8	**Detecção genotípica de metalo-β-lactamase (MBL) e *carbapenemase***	50
2.9	**Análise estatística**	52
2.10	**Aspectos éticos**	52
3	**RESULTADOS**	53
3.1	**Características da amostragem**	53
3.2	**Identificação preliminar**	53
3.3	**Tipificação Molecular preliminar**	56
3.4	**Detecção genotípica de oxacilinase- β-lactamase (OXA-114)**	58
3.5	**Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)** ..	59
3.6	**Formação de biofilme**	62
3.6.1	Formação de biofilme em amostras de *A. xylosoxidans*	62

3.6.2 Formação de biofilme em amostras de *Achromobacter.não xylosoxidans* 63
3.7 **Motilidades**. 64
3.7.1 Determinação da motilidade do tipo *swimming* e *swarming* em amostras de *A. xylosoxidans* 64
3.7.2 Determinação da motilidade do tipo *swimming* e *swarming* em amostras de *Achromobacter não xylosoxidans* 66
3.8 **Determinação da Concentração Inibitória Mínima** 67
3.8.1 Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos para *A. xylosoxidans* 67
3.8.2 Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos em sete amostras de *Achromobacter não xylosoxidans* 71
3.8.3 Distribuição de marcadores de resistência entre os grupos clonais de *Achromobacter* spp 71
3.9 **Detecção fenotípica da produção de carbapenemases** 74
3.10 **Detecção de genes associados à resistência aos beta-lactâmicos**. 74
3.10.1 Detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamase 74
3.10.2 Detecção de genotipica de carbapenemases 74
3.11 **Relação entre fatores de virulência, resistência e grupos clonais** . 74
3.11.1 Análise da relação entre fatores de virulência, CIMs e grupos clonais em pacientes com colonização ocasional por *A. xylosoxidans* 74
3.11.2 Análise da relação entre fatores de virulência, CIMs e grupos clonais em pacientes colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans* 75
4 **DISCUSSÃO** 82
4.1 **Identificação** 82
4.2 **Fatores de virulência** 87
4.3 **Resistência** 91
4.4 **Relação entre clonalidade, fatores de virulência e mecanismos de resistência** 98
CONCLUSÕES 100
REFERÊNCIAS 102
APENDICE A - Fluxograma das etapas realizadas no estudo 121

ANEXO A - Pereira RH, *et al*. *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 2011.49:3649–3651 ……. 122

INTRODUÇÃO

Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é a doença genética autossômica recessiva letal mais comumente associada a mortalidade na população caucasiana. A doença tem incidência variável em diferentes países e entre grupos étnicos de um mesmo país, ocorrendo entre cada 1:2000 a 1:5000 caucasianos nascidos vivos na Europa, nos Estados Unidos e Canadá (VOYNOW, FISCHER & ZHENG, 2008).

No Brasil, sua incidência ainda não é bem conhecida, devido à existência de poucos estudos epidemiológicos ou de triagem neonatal, abrangentes, que permitam estimar a incidência nas diversas regiões do país, que apresenta extensões continentais e grande variedade populacional em cada região. Estima-se que apenas 10% do total de pessoas afetadas são diagnosticadas, o que confere uma impressão equivocada de baixa incidência da FC na população brasileira (TAGLE, 1988; SANTOS, DOMINGOS & WITTING, 2005; RASKIN *et al*., 2008).

Esta doença é causada pela perda da expressão ou função da glicoproteína reguladora de condutância transmembranar (CFTR), consequente a mutações em um único gene (*Cystic Fibrosis Transmembrane Condutance Regulator* - CFTR) situado no cromossomo 7, que a codifica. Tal proteína atua como um canal de cloro e regula outros canais de íons, incluindo sódio e potássio. Está presente em células epiteliais de diversos tecidos, atuando na homeostase de íons e fluidos. Como consequências das mutações neste gene ocorrem alterações na maturação intracelular e distribuição anormal da proteína CFTR nas células epiteliais, levando ao aumento da absorção de Na^+ e perda ou redução da secreção de Cl^-. Já foram descritas mais de 1800 mutações, desde sua descoberta em 1989, relacionadas com diferentes graus de gravidade e manifestações da doença (SIMMONDS, 2010; *Cystic Fibrosis Consortium*, 2011).

A mutação mais frequente encontrada na FC, presente em cerca de 70% dos genes mutantes, é a designada Delta F508, que ocorre pela deleção de três pares de bases, resultando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. No Brasil, alguns estudos mostram uma frequência menor desta

mutação (variando em media de 30% a 66%, dependendo da região ou estado avaliado) em comparações aos estudos europeus e norte-americanos, provavelmente devido à grande miscigenação no país (STRAIT *et al*., 2003; RASKIN *et al*., 2008).

A FC é uma doença multissistêmica, que se manifesta por anormalidades na função de glândulas exócrinas resultando em alterações na composição de íons e aumento da viscosidade de secreções epiteliais. Isso leva a um distúrbio generalizado no processo secretor de todas as glândulas exócrinas, afetando principalmente as glândulas produtoras de muco e os sistemas digestório e respiratório (LYCZAK, CANNOM & PÍER, 2002; VOYNOW & SCANLIN, 2005).

O pulmão é o órgão mais gravemente afetado e, em decorrência disto, infecções pulmonares crônicas causam 95% dos óbitos nos pacientes com FC (VOYNOW & SCANLIN, 2005). Nas vias aéreas, como efeito da disfunção da proteína CFTR, as secreções respiratórias dos pacientes com FC tornam-se desidratadas, hiperosmolares e tem suas propriedades bastante alteradas, acarretando uma grave disfunção no transporte mucociliar, o que favorece a colonização e posterior infecção das vias aéreas dos pacientes por um grupo restrito de microrganismos. Associada à colonização/infecção bacteriana, as mucosas respiratórias dos pacientes apresentam, caracteristicamente, um processo inflamatório crônico responsável pela destruição irreversível do parênquima pulmonar e insuficiência respiratória progressiva (DAMAS, AMORIM & GOMES, 2008). É importante ressaltar que existem diferentes apresentações clínicas na FC e, estas, são determinadas pelo tipo de mutação genética básica e consequente efeito funcional na CFTR (FOWERAKER *et al*., 2005).

Com isso, a doença pulmonar é resultado da falência de funções do sistema imune inato deste tecido: ação mucociliar defeituosa, perda da atividade antimicrobiana e falência de mecanismos de opsonização e destruição bacteriana, associados à liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, principalmente proteases e elastases de neutrófilos, que contribuem significativamente para o declínio da função pulmonar. Assim, a obstrução pulmonar crônica, infecção e inflamação levam a bronquiectasias e falência pulmonar. O prognóstico dos pacientes é influenciado pelo número de exacerbações das infecções pulmonares anuais e a carga microbiana nas secreções respiratórias (VOYNOW, FISCHER & ZHENG, 2008).

Desde a primeira descrição da doença, 1938, quando em torno de 80% dos recém-natos afetados por esta doença não chegavam ao primeiro ano de vida e todos iam a óbito até os 10 anos de idade (RENDERS *et al*., 2001; MANNO *et al*., 2005), muito se tem avançado no conhecimento desta doença. Isso se reflete no aumento da expectativa de vida dos pacientes. Hoje, cerca de um terço dos pacientes com FC atinge a idade adulta, com uma expectativa de vida superior a 30 anos nos países desenvolvidos. O aumento da sobrevida média destes pacientes está relacionado a esse avanço do conhecimento, favorecendo a adoção de medidas multidisciplinares padronizadas no tratamento dos pacientes portadores de FC (RATJEN & DORING, 2003; BARBATO *et al.*, 2009; LAMBIASE *et al*., 2011).

Aspectos Microbiológicos na Fibrose Cística

A perda progressiva da função pulmonar, resultante de ciclos de inflamação e infecção, é responsável pela morbidade e mortalidade na FC (ZHANG *et al*., 2005). Geralmente essas infecções são polimicrobianas, com predomínio das bacterianas, sendo os principais patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e espécies do grupo dos bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGN-NF), caracterizando-se por quadros progressivamente crônicos com episódios de exacerbação (GOVAN & NELSON, 1992; SAIMAN & SIEGEL, 2004). O controle da progressão da colonização e da deterioração da função pulmonar se torna difícil com o estabelecimento de microrganismos multirresistentes, que vem se tornando problemático em função do aumento da expectativa de vida e o uso prolongado de antimicrobianos, que atua selecionando tais microrganismos (FOWERAKER *et al*., 2005; LEE *et al*., 2005a).

De acordo com a idade do paciente e grau de comprometimento pulmonar, a prevalência dos patógenos nos pulmões dos pacientes com FC é variável. *S. aureus* e *H. influenzae* são os patógenos geralmente encontrados colonizando inicialmente o pulmão destes pacientes. Microrganismos da microbiota transitória, como, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp., também podem ser isolados em culturas de secreções de pacientes com FC nessa fase, embora com uma

frequência mais baixa (THOMASSEN *et al*., 1986; BERINGER & APPLEMAN, 2000; RENDERS *et al*., 2001; MARQUES, 2011).

Na adolescência, outros microrganismos são encontrados nessas secreções, a maioria deles pertence ao grupo dos BGN-NF, microrganismos predominantemente ambientais, dentre quais se destaca a *Pseudomonas aeruginosa* como o patógeno de maior relevância. Estudos com crianças entre seis e 10 anos, revelam índices de colonização de 60% para *S. aureus*, 40% para *P. aeruginosa* e 25% para *H. influenzae*. A maioria dos adultos (80%) é cronicamente colonizada por *P. aeruginosa* (*CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION PATIENT REGISTRY*, 2010).

S. aureus, patógeno mais frequente nos primeiros anos de vida é encontrado em 30% de fluidos de lavado broncoalveolar de crianças acometidas por esta doença com média de idade de três meses, persistindo mesmo com o estabelecimento da terapia antimicrobiana (ARMSTRONG, GRIMWOOD & CARZINO, 1995; KAHL *et al*., 2003; FOWERAKER, 2009). Supõe-se que a infecção por estes microrganismos preceda a infecção do parênquima pulmonar pelos BGN-NF (GOVAN & NELSON, 1992; HUTCHISON & GOVAN, 1999; BURNS *et al*., 2001). Embora o uso de antibioticoterapia anti-estafilocócica, de forma rotineira ou intermitente, com a finalidade de evitar a progressão da infecção seja clinicamente efetivo, seu papel como profilático em longo prazo é incerto (SMYTH & WALTERS, 2003).

O aumento no isolamento de *S. aureus* resistentes a Meticilina (MRSA) é causa de preocupação, pois nestes casos, as opções de tratamento são limitadas. O mecanismo que confere resistência a meticilina é o mesmo para todos os beta-lactâmicos. Muitas cepas de MRSA também têm adquirido resistência a antimicrobianos não relacionados, como as quinolonas e os aminoglicosídeos (FOWERAKER, 2009). A prevalência de MRSA nos pacientes com FC, embora pequena, vem aumentando gradualmente (COIA *et al*., 2006; MACFARLANCE *et al*., 2007; VERGISON *et al*., 2007; LIMA *et al*., 2013).

H. influenzae encapsulado do sorotipo b, biotipo 1 é o mais frequentemente encontrado em infecções de pacientes com menos de cinco anos de idade (RENDERS *et al*., 2001; JEFFREY *et al*., 2002; LYCZAK, CANNOM & PÍER, 2002). Estudos mostram um aumento na resistência a antimicrobianos usados no tratamento de infecções por este microrganismo, com 37% dos pacientes infectados

com cepas resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos, incluindo resistência a ciprofloxacina, que é raramente observado em pacientes sem FC (ROMAN *et* al., 2004; WATSON, BURNS & SMITH, 2004). Estima-se que, após 11 meses de colonização, este microrganismo gradualmente torna-se resistente aos antimicrobianos usados no tratamento (STARNER *et al*., 2008).

P. aeruginosa é o principal patógeno, responsável pela maioria dos óbitos na FC. Caracteriza-se por dois morfotipos: não mucoide (NM) e mucoide (M). O morfotipo não mucóide (NM) é o responsável pela colonização inicial das vias aéreas dos pacientes fibrocísticos e pelo início da patogênese, devido ao arsenal de fatores de virulência que expressa, como lipopolissacarídeo, pili, sistema de secreção do tipo III, exotoxina A, elastases e proteases, fatores estes que, associados à resposta inflamatória, causam o dano tecidual no pulmão, podendo persistir neste local por vários anos (MARTIN *et al*., 1993; O'TOOLE & KOLTER, 1998; TERADA *et al*., 1999; HENTZER *et al*., 2001; FINNAM *et al*., 2004; BJARNSHOLT *et al*., 2009)

A caracterização do estágio de infecção crônica normalmente se dá pelo aumento das exacerbações e pela conversão do morfotipo NM para o mucóide (M) (LYCZAK, CANNOM & PÍER, 2002). Este fenótipo é resultado da hiperprodução de alginato, um polímero acetilado de ácidos manurônico e glicurônico, que atua como um importante fator de proteção contra a ação das imunidades inata e adquirida, protegendo o microrganismo contra a fagocitose, o estresse oxidativo e o sistema complemento. Também pode agir como uma barreira à ação de antimicrobianos, garantindo, assim, a persistência da *P. aeruginosa* no pulmão dos pacientes com FC. (LYCZAK, CANNOM & PÍER, 2002; RYDER, BYRD & WOZNIAK, 2007). A conversão para o morfotipo M está associada a mutações no gene regulador *mucA* (MAHENTHIRALINGAM *et al*., 1994; DRENKARD & AUSUBEL, 2002). O aparecimento do morfotipo M está associado a um pior prognóstico para os pacientes, com aumento da deterioração pulmonar (LI PUMMA, 2010; HAUSER *et al*., 2011).

Até pouco tempo, acreditava-se que a transmissão cruzada *de P. aeruginosa* entre os pacientes era rara e que estes eram infectados com cepas únicas, presumivelmente adquiridas do ambiente. Entretanto, recentemente, alguns estudos mostraram a disseminação de clones epidêmicos e muitos deles caracteristicamente multirresistentes. Esses achados levaram a uma mudança na política de controle

das infecções, sendo instituída a segregação dos pacientes em centros onde são detectados tais fenótipos (SCOTT & PITT, 2004, FOWERAKER, 2009; POLLINI *et al*., 2011; DE VRANKRIJER *et al*., 2011).

Este é o principal patógeno encontrado no pulmão dos pacientes com FC, tanto em importância quanto em prevalência. Geralmente, crianças com infecção por esse microrganismo apresentam uma redução da expectativa de vida de cerca de 10 anos, quando comparadas àquelas sem infecção pela bactéria (SAIMAN *et al*., 2003). Mais de 90% dos pacientes adultos são infectados por esses microrganismos (LI *et al*., 2005).

O aumento da sobrevida dos pacientes foi acompanhado do aumento na frequência de isolamento de outros BGN-NF, além de *P. aeruginosa*, como as bactérias do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans.* Destes, o CBc apresentou maior destaque a partir dos anos 1980, causando grande impacto na sobrevida dos fibrocísticos (GILLIGAN, 1991; GLADMAN *et al*., 1992; BURNS & SAIMAN, 1999, SIBLEY, RABIN & SURETTE, 2006).

O CBc consiste de espécies fenotipicamente muito similares, mas genotipicamente distintas, anteriormente nomeadas como genomovares (VANDAMME *et al*., 1997). Atualmente, o CBc é composto por 18 espécies: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina, B. pyrrocinia, B. ubonensis, B. latens, B. diffusa, B. arboris, B. seminalis, B. metallica, B. lata, B. contaminans* e *B. pseudomultivorans*. Exceto *B.ubonensis,* as demais já foram isoladas de secreções respiratórias de pacientes com FC, sendo as espécies *B. cenocepacia* e *B. multivorans,* as prevalentes (VANLAERE *et al*., 2008; VANLAERE *et al*., 2009; PEETERS *et al*., 2013).

A colonização das vias respiratórias pelo CBc em geral envolve apenas uma espécie de forma transitória ou crônica (CARVALHO *et al*, 2005). As espécies variam em frequência de isolamento, apresentação clínica, resistência a antimicrobianos e atributos de virulência (CARVALHO *et al.*, 2006). Além disso, algumas espécies possuem alta capacidade de transmissão entre os pacientes (LI PUMA *et al*., 1998; COENYE *et al.*, 2001; SAIMAN *et al*., 2003; GOVAN, BROWN & JONES, 2007).

O CBc tem grande impacto para os pacientes com FC, podendo causar desde colonização assintomática até um quadro fulminante com pneumonia necrosante

fatal que é geralmente associada a bacteremia, a “síndrome cepacia” (PEGUES, 1999; COENYE *et al.,* 2000; VINION-DUBIEL *et al*., 2004). Quando colonizados por estes microrganismos, esses pacientes apresentam maior mortalidade e um declínio mais rápido da função pulmonar após a colonização (LEWIN *et al*., 1990, BUTLER *et al*., 1995; LI PUMA, 1998; SAIMAN *et al*., 2003; VINION-DUBIEL *et al*., 2004). Devido a possibilidade de transmissão de cepas com características de maior virulência, a segregação dos pacientes colonizados pelo CBc faz parte das medidas de controle instituídas nos centros de assistência a esses pacientes (SAIMAN & SIEGEL, 2004).

Outro microrganismo emergente é *S. maltophilia,* conhecido por possuir resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos, podendo aumentar o risco de morbi-mortalidade quando encontrado nesses pacientes (BERINGER & APPLEMAN, 2000). Entretanto, alguns estudos mostram que seu significado na clínica pode ser limitado, não sendo associada com quadros de deterioração pulmonar (GOSS *et al*., 2004; FOWERAKER, 2009).

Nos últimos anos, *A. xylosoxidans* vem despertando grande interesse, com relatos de sua associação com exacerbações dos sintomas pulmonares em pacientes imunocomprometidos (DUNNE & MAISCH, 1995; SAIMAN *et al*., 2001). Nesse contexto, tem-se destacado também em termos de frequência de isolamento nas secreções respiratórias de pacientes com FC, embora sem que tenha sido documentado ainda o seu real impacto clínico na colonização/infecção crônica. Alguns trabalhos epidemiológicos com *A. xylosoxidans* já mostram a possibilidade de transmissão cruzada entre os pacientes (KANELLOPOULOU *et al*., 2004; MAGNI *et al*., 2010; PEREIRA *et al*., 2011).

A melhoria nos métodos de identificação laboratorial nos últimos anos, principalmente com a implementação de técnicas moleculares, associado ao interesse crescente no campo da microbiologia da FC, permitiu o reconhecimento, embora em menor frequência, de muitos outros BGN-NF não usuais nesses pacientes, incluindo espécies dos gêneros *Ralstonia, Chryseobacterium, Comamonas, Moraxella, Acinetobacter, Bordetella, Inquilinus, Burkholderia* spp. e *Pandoraea* spp. Adicionalmente, estes microrganismos são inerentemente resistentes a muitos antimicrobianos, o que pode complicar ainda mais a situação do paciente. Embora para alguns desses microrganismos ainda não esteja estabelecida a sua contribuição na doença pulmonar, para outros já se sabe que estão

associados a um curso clínico desfavorável da doença (COENYE *et al*., 2002; CHIRON *et al*, 2005; DAVIES & RUBIN, 2007; FOWERAKER, 2009).

Este é o caso, por exemplo, do gênero *Pandoraea,* que foi identificado em amostras de secreções respiratórias de pacientes com FC. Embora ainda com prevalência baixa, sua associação com infecções invasivas (sepse) e surtos sugere que estes microrganismos são clinicamente mais relevantes para os pacientes com FC que outros BGN-NF similares (ATKINSON *et al*, 2006). No Brasil, já foram descritos casos de isolamento deste microrganismo em Porto Alegre e Rio de Janeiro (VIEIRA *et al,* 2006). Entretanto, é precoce qualquer afirmativa sobre o seu real papel nas infecções pulmonares destes pacientes.

Outro microrganismo que preocupa é *Burkholderia pseudomallei*, também já descrito no Brasil, em paciente com FC (BARTH *et al*, 2007). Este BGN-NF, agente da melioidose, uma doença multissistêmica grave, teve seu primeiro relato, no Brasil em 2004 em um paciente sem FC (MIRALLIS *et al*, 2004). O isolamento desse microrganismo é raro em pacientes com FC fora de áreas endêmicas, como o caso descrito no Brasil.

Os estudos com estes microrganismos emergentes mostram a importância da atenção e identificação acurada destes potenciais patógenos, além de reforçar que o encontro de BGN-NF não usuais não deve ser subestimado na FC.

***Achromobacter* spp. na Fibrose Cística**

A posição taxonômica do gênero *Achromobacter* é incerta nas últimas décadas, devido a diversas alterações em sua nomenclatura levando a sucessivas modificações quanto a sua classificação como pertencentes aos gêneros *Achromobacter* ou *Alcaligenes* (YABUUCHI & YANO, 1981).

A espécie *Achromobacter xylosoxidans* foi primeiramente proposta em 1971 a partir de culturas isoladas de secreções do ouvido humano (YABUUCHI & OHYAMA, 1971), sendo feita a descrição da nova espécie e cepa tipo (ATCC 27061) em 1974, pelo mesmo grupo de pesquisadores (YABUUCHI *et al*., 1974). No mesmo ano, surgiu o questionamento de outro grupo de pesquisadores (HENDRIE, HOLDING & SHEWAN, 1974), que propôs a rejeição do nome do gênero *Achromobacter* e sua

substituição por *Alcaligenes* ao Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, que em Comissão Judicial aprovou a omissão do nome do gênero em questão na Lista de Nomes Bacterianos Aprovados (HOLT, 1979; SKERMAN, MCGOWAN & SNEATH, 1980). Deste modo, o nome genérico *Achromobacter* perdeu sua posição na nomenclatura científica, porém não foi incluído na lista de nomes genéricos rejeitados. Uma revisão do Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana restabeleceu o nome *Achromobacter xylosoxidans* para os mesmos microrganismos que foram originalmente descritos por Yabuuchi & Ohyama em 1971 e a cepa ATCC 27061 foi designada como a cepa tipo de *Achromobacter xylosoxidans* (YABUUCHI & YANO, 1981).

Em 1984, Kersters & De Ley no Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, transferiram *Achromobacter xylosoxidans* para o gênero *Alcaligenes* e propuseram duas novas espécies, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *denitrificans* e *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans*. (KERSTERS & DE LEY, 1984). Em 1986, Kiredjiam *et al*. alteraram os nomes destas espécies para *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* e *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (KIREDJIAN *et al*., 1986).

Em 1998, Yabuuchi *et al.* baseados em características fenotípicas, composição de bases do DNA, hibridação DNA-DNA e análise do sequenciamento do gene *rrs* que codifica o 16S rRNA, instituíram *Achromobacter* como gênero, descreveram as cepas tipo de *Achromobacter xylosoxidans* e propuseram três novas espécies: *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter piechaudii* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*.

Atualmente, o gênero *Achromobacter* é considerado membro da família Alcaligenaceae, pertencendo ao grupo beta Proteobacteria, composto por 15 espécies: *Achromobacter xylosoxidans,* considerada a espécie tipo do gênero, *Achromobacter denitrificans, Achromobacter ruhlandii, Achromobacter piechaudii, Achromobacter insolitus, Achromobacter spanius, Achromobacter marplatensis*, *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter animicus*, *Achromobacter spiritinus*, *Achromobacter pulmonis*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter aegrifaciens*, *Achromobacter anxifer* e *Achromobacter dolens* (STACKEBRANDT, MURRAY & TRUEPER, 1988; DE LEY *et al*., 1986; COENYE *et al*., 2003; RIDDERBERG, WANG & NØRSKOV-LAURITSEN, 2012; SPILKER, VANDAMME & LIPUMA, 2012; VANDAMME *et al*., 2013 a; VANDAMME *et al*., 2013 b). Todas as espécies são

ambientais, mas podem ser encontradas em diferentes amostras clínicas humanas (KIREDJIAN *et al*. 1986; COENYE *et al*., 2003). A introduçao recente da utilização do (*Multi Locus Sequence Typing* – MLST) revelou uma grande diversidade entre cepas de *Achromobacter* (RIDDERBERG, WANG & NØRSKOV-LAURITSEN, 2012; SPILKER, VANDAMME & LIPUMA, 2012).

A. xylosoxidans é a principal espécie do gênero apresentando a maior frequência de isolamento em espécimes clínicos humanos. Tem sido reconhecido como patógeno oportunista relacionado à bacteremias, meningites, pneumonias, peritonites, infectando pacientes imunocomprometidos com alto índice de mortalidade (FERRONI *et al.* 2002; KANELLOPOULOU *et al*., 2004; VAN DAELE *et al.* 2005; SHIE *et al.* 2005; VANDAMME *et al*., 2013b). É considerado o microrganismo emergente isolado em maior frequência nos espécimes respiratórios de pacientes com FC, porém informações sobre sua relevância clínica ainda são muito limitadas (LIU *et al*., 2002; SAIMAN & SIEGEL, 2004; DE BAETS *et al*., 2007)

A. xylosoxidans são BGN-NF, movéis com flagelos peritríquios, podendo apresentar de 1 a 20 por célula, aeróbios, sendo possível o crescimento anaeróbico utilizando nitrato como aceptor final de elétrons em algumas cepas. Apresentam metabolismo oxidativo ou assacarolítico para a glicose, produzem ácidos a partir de xilose, mas não utilizam outras fontes de açúcares, apresentam também reações de oxidase, catalase, citrato, pyrrolidonyl arylamidase (PYR) positivas. São capazes de reduzirem nitrato a nitrito e, algumas, com produção de gás. A maioria cresce a 42°C e algumas cepas, em concentrações de NaCl a 6,0% e NaCl a 0%. Não possuem atividade sobre os aminoácidos arginina, ornitina e lisina e não produzem urease, gelatinase ou DNase. Não se observam atividades hemolíticas, hidrólise de esculina ou produção de indol e H_2S (YABUUCHI *et al*., 1998; COENYE *et al*., 2003; BOMBICINO *et al*., 2007; LIPUMA, 2010).

As outras espécies do gênero apresentam características bioquímicas bem semelhantes às de *A. xylosoxidans*, sendo muito difícil a diferenciação destas espécies por métodos fenotípicos. Entretanto, um teste bastante característico que sugere a identificação de outra espécie do grupo, é a não produção de ácido a partir de xilose, apresentando, portanto, resultado negativo para este teste, a maioria das demais espécies.

Nos pacientes com FC, a frequência de isolamento de *A. xylosoxidans* tem aumentado mundialmente e pode ser representado pelos dados americanos da *US*

Cystic Foundation National Patient Registry. O percentual de pacientes portadores deste microrganismo foi de 0,5%, 1,9%, 2,7%, 3,8% e 5,2% em 1995, 1996, 1997, 1999 e 2002, respectivamente. No Brasil, de acordo com o Registro Brasileiro de FC, 2,7% de 1.440 pacientes apresentaram isolamento desse microrganismo até o ano de 2010 (GBEFC, 2010).

Estudos apontam *A. xylosoxidans* como o segundo BGN-NF mais frequente em centros de referência para atendimento desses pacientes (FERRONI *et al*., 2002; RASO *et al*., 2008). Sua emergência tem sido associada a uma pressão seletiva após repetidos e prolongados tratamentos para infecções por *P. aeruginosa* e a co-colonização com este microrganismo tem sido vista (KANELLOPOULOU *et al*., 2004; RASO *et al*., 2008). Entretanto, um estudo recente, mostra seu potencial de estabelecimento no pulmão de pacientes ainda não colonizados/infectados por *P. aeruginosa* (LAMBIASE *et al*., 2011).

Como já mencionado, o significado clínico de *A. xylosoxidans* nos pacientes com FC, bem como sua contribuição no declínio pulmonar não estão claros. Lambiase e colaboradores (2011) em um estudo envolvendo 276 amostras de *A. xylosoxidans* em 53 pacientes de um centro na Itália, concluíram que não houve indicativo de aumento da morbidade ligada a esta infecção/colonização por estes microrganismos. Além disso, neste estudo não foi observada diferença nos efeitos sobre o estado clínico da infecção crônica/intermitente/esporádicos por *A. xylosoxidans*.

Alguns estudos chamam a atenção para a sua associação com infecções crônicas e consequente influência negativa no curso clínico da doença (PELTROCHE-LLACSAHUANGA, HAASE & KENTRUP, 1998; HANSEN *et al*., 2006; FOWERAKER, 2009). Outros estudos mostram a infecção ou colonização por *A. xylosoxidans* mais frequentemente associada a sintomas de exacerbação pulmonar (MOISSENET *et al*., 1997; BURNS *et al*., 1998).

Estudos realizados por Hansen *et al*. (2006) reportaram que a característica de multirresistência de *A. xylosoxidans* dificulta bastante a sua eliminação pelos antimicrobianos. Apesar do tratamento rápido e agressivo, estes pacientes desenvolveram infecção crônica. Em alguns deles houve um aumento no nível de anticorpos específicos (que caracteriza a infecção crônica) mesmo após uma ou poucas culturas positivas para *A. xylosoxidans* e associados a um pior prognóstico. Os autores especularam que tal fato poderia ser decorrente de uma infecção mais

invasiva, por uma cepa virulenta. Também sugerem que as infecções crônicas por *A. xylosoxidans* possam ter impacto relevante na condição clínica dos pacientes, especialmente quando resultarem em pronunciada resposta de anticorpos específica e forem causadas por cepas transmissíveis.

Kanellopoulou *et al*. (2004) mostraram que alguns pacientes infectados com *A. xylosoxidans* apresentaram tosse, escarro purulento, febre e redução da função pulmonar, mas não demonstraram dor torácica, hipoxemia e infiltrado pleural. Em tais casos, *P.aeruginosa* esteve associada. O único paciente que foi colonizado persistentemente com *A. xylosoxidans* permaneceu em boas condições clínicas, corroborando com estudos prévios realizados por Tan *et al*. (2002).

Poucos são os dados também em relação a características de transmissibilidade desse microrganismo. Saiman *et al.* (2000) sugerem que pacientes com FC colonizados por *A. xylosoxidans* devam ser isolados de acordo com as recomendações do *Center of Disease Control and Prevention* (CDC-EUA) estabelecidas para patógenos multiressistentes. Entretanto, até o momento a transmissão paciente-paciente é controversa (DUNNE & MAISCH, 1995; VAN DAELE *et al*, 2005; HANSEN *et al*, 2006).

Os poucos relatos na literatura sobre a capacidade de *A. xylosoxidans* em causar infecções persistentes no trato respiratório de pacientes com FC, seu potencial de transmissibilidade, seu caráter multirresistente e o aumento da frequência de seu isolamento, que lhe tem atribuído o *status* de patógeno emergente na FC, chamam atenção para a necessidade de estudos epidemiológicos que possam esclarecer aspectos ainda divergentes (PELTROCHE-LLACSAHUANGA, HAASE & KENTRUP, 1998; OLIVE & BEAN, 1999; KRZEWINSKI *et al*., 2001; SADER *et* al., 2003; KANELLOPOULOU *et al*., 2004; VAN DAELE *et al*., 2005).

Métodos moleculares, tais como determinação do perfil plasmidial, análise dos perfis de proteínas celulares (SDS-PAGE), avaliação do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), amplificação de segmentos do DNA empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR), análise randômica do polimorfismo genético do DNA amplificado (*Random Amplified Polymorphic DNA analysis* – RAPD) e principalmente, a análise dos perfis de fragmentação do DNA, após digestão com enzimas de restrição, através de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), são recomendados para a tipificação de microrganismos com propósitos epidemiológicos. Recentemente, a tipificação de

sequencias multi "locus" (MLST), também tem sido apontada como um sistema preciso e altamente discriminatório de tipificação que pode ser usado para a maioria dos microrganismos. Estes métodos são menos sujeitos a variações e apresentam maior poder discriminatório, maior reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de bancos de dados para caracterização dos microrganismos (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997; OLIVE & BEAN, 1999; BELKUM *et al*., 2001; KRZEWINSKI *et al*., 2001; VAN DAELE *et al*., 2005, Spilker *et al*., 2013).

Dentre estas ferramentas epidemiológicas, o PFGE tem sido amplamente utilizado em amostras do gênero *Achromobacter*. Através desta técnica, é possível avaliar a diversidade genômica utilizando o genoma completo da amostra bacteriana de interesse, através de uma macrorrestrição com endonucleases de restrição que irão gerar fragmentos que serão separados e orientados de acordo com um campo elétrico que é periodicamente alterado (BARNINI, DODI & CAMPA, 2004). Esta técnica tem sido o método mais utilizado em investigações de surtos causados por *A. xylosoxidans*, apresentando percentuais altamente discriminatórios em estudos recentes. (WEITKAMP *et al*., 2000; KAUR *et al*., 2009). Dessa forma, sua utilização pode contribuir grandemente para esclarecer estas questões sobre o potencial de transmissibilidade destes microrganismos.

Identificação de *Achromobacter* spp.

Para o esclarecimento das questões epidemiológicas e do significado clínico desses microrganismos na FC, é pré-requisito básico sua correta identificação. A maioria dos BGN-NF apresenta similaridade fenotípica e, em geral, quando associados a infecções crônicas possuem características distintas dos que causam infecções agudas, incluindo fenótipos atípicos que dificultam a sua identificação (FOWERAKER, 2009). Dessa forma, a correta caracterização dos BGN-NF sempre foi um desafio para os laboratórios de rotina, considerando que a maioria deles não realiza este tipo de identificação, ou o faz de maneira elementar em virtude da sua pouca frequência em espécimes clínicos, assim como pela complexidade e elevado custo para implementação de esquemas completos de identificação (AUGUST *et al*.,

1990; FORBES & GRANATO, 1995; LAFFLNEUR , JANSSENS & CHARLIER, 2002; MURRAY *et al*., 2004; KERNEN, SAUTY & ROULET , 2005; WANG *et al*., 2013).

Várias metodologias têm sido utilizadas para a identificação fenotípica desse grupo, incluindo testes manuais comerciais ou preparados no laboratório e sistemas automatizados ou semi-automatizados. Em muitos casos é necessária a utilização de um amplo conjunto de testes fenotípicos convencionais. Além disso, em algumas situações a identificação destes microrganismos só pode ser concluída através da utilização de métodos moleculares, como o sequenciamento do gene *rrs,* que codifica o 16S rRNA, dentre outros (LIU *et al*., 2002; FERRONI *et al*. 2002; ZBINDEN *et al*., 2007).

A identificação errônea de espécies do gênero *Achromobacter* é comum, dificultando a avaliação do impacto clínico destes microrganismos. Por isso, o estabelecimento de métodos confiáveis e específicos para identificar com precisão *A. xylosoxidans*, principal espécie do grupo, torna-se necessário (TURTON *et al*., 2011).

A técnica de sequenciamento, que consiste inicialmente de uma amplificação por PCR, geralmente de genes ribossomais como do gene *rrs*, reação de sequenciamento e posterior análise em banco de dados genéticos, embora laboriosa e de elevado custo, tem se mostrado como a melhor ferramenta, entre as diversas técnicas de biologia molecular utilizadas na identificação de microrganismos, para a correta identificação do gênero *Achromobacter*. Outras abordagens mais simples para este gene, utilizando apenas PCR, com iniciadores espécie-específicos, esbarram no alto nível de similaridade na identidade genética entre as espécies do gênero *Achromobacter*, o que dificulta a construção desses iniciadores e inviabiliza a técnica (LIU *et al*., 2002).

Entretanto, recentemente, um estudo realizado por Turton *et al*. (2011) mostra a utilização de PCR específico para identificação de *A. xylosoxidans* pela detecção do $bla_{\text{OXA-114-like}}$, gene intrínseco desta espécie. Tal estudo representa um avanço na identificação deste microrganismo, contribuindo de forma significativa para facilitar esta questão.

Outra técnica molecular que vem sendo apontada como uma alternativa ao sequenciamento é a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (*amplified ribosomal DNA restriction analysis* - ARDRA), em que se amplifica o gene *rrs* e posteriormente é realizada a digestão com enzimas de restrição. Tem sido utilizada

na identificação de *Inquilinus* spp., *Pandoraea* spp., *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* e outros BGN-NF (VANEECHOUTTE *et al*., 1995; SEGONDS *et al*., 1999; RIBBECK-BUSCH *et al*., 2005; OLIVER *et al*., 2009).

Também se tem utilizado com sucesso a técnica de hibridização por fluorescência *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization* – FISH) para a identificação dos principais patógenos encontrados nos pacientes com FC, incluindo *A. xylosoxidans*. Esta técnica tem se mostrado como de fácil execução e baixo custo, permitindo a obtenção de resultados em poucas horas com muito boa especificidade (WELLINGHAUSEN, WIRTHS & POPPERT, 2006; OLIVER *et al*., 2009). Porém a possibilidade de utilização destas técnicas em laboratórios clínicos é ainda remota e se restringem a laboratórios de centros de referência em pesquisas.

Recentemente foi desenvolvida uma nova técnica para caracterização de cepas e espécies do gênero *Achromobacter*, que são cada vez mais recuperados de amostras de pacientes com FC. Trata-se de um esquema de análise de sequências multilocus (MLSA/MLST). Ridderberg, Wang & Nørskov-Lauritsen (2012) testaram esse tipo de análise, a partir de cinco genes conservados, em um conjunto diversificado de 77 cepas originárias da Europa, Ásia e América do Sul, e em cepas padrão de sete espécies *Achromobacter* spp, sendo seis estirpes ambientais, oito amostras clínicas não-FC e 56 amostras clínicas de FC. Eles observaram que o poder discriminatório de MLST, com base em 2.098 nucleotídeos (NT), era muito superior em comparação ao gene 16S rRNA com base em 1309 nt. MLST foi capaz de diferenciar todas as sete espécies de *Achromobacter* spp., descritas até aquele momento, e também demonstrou a presença de pelo menos quatro potenciais novas espécies dentro do gênero.

Para o diagnóstico correto da etiologia das infecções em pacientes com FC, devem ser utilizados protocolos específicos, associando-se procedimentos fenotípicos e o uso de técnicas moleculares. Como estas técnicas não são usuais em laboratórios de rotina, a prevalência de *Achromobacter* spp. e de outros possíveis “novos patógenos” nas secreções do trato respiratório dos pacientes com FC, pode estar sendo subestimada (WELLINGHAUSEN *et al*., 2005; HANSEN *et al*., 2006; RIDDERBERG, WANG & NØRSKOV-LAURITSEN, 2012).

Resistência aos antimicrobianos em *Achromobacter* spp.

O uso frequente de antimicrobianos para o tratamento de exacerbações pulmonares agudas na FC, devido principalmente à infecções por *P. aeruginosa*, pode contribuir para o aumento de resistência em outros BGN-NF, como por exemplo, *A. xylosoxidans.*

É sabido também que para a maioria dos BGN-NF os testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) não são validados pelos comitês internacionais de TSA como *Clinical and Laboratory Standarts Institute* - CLSI e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - EUCAST.

Um estudo recente realizado na Argentina analisou a susceptibilidade de isolados de *Achromobacter* spp. através da comparação dos métodos de disco difusão, de gradiente de difusão em ágar [E-test®] e microdiluição em ágar. Os autores propuseram pontos de corte para o método de difusão em ágar a para os antimicrobianos, como IMP, meropenem (MER), ertapenem (ERT), gentamicina (GEN), SXT, tetraciclina (TET) e doxiciclina (ALMUZARA *et al*., 2010).

Entretanto, nos documentos de normatização usados nos laboratórios clínicos (CLSI e EUCAST), não há padronização para nenhum desses métodos para *Achromobacter* spp. Segundo Lambiase *et al*., 2011, estudos de resistência para estes microrganismos devem utilizar ensaios de microdiluição com determinação da CIM como teste de escolha.

A resistência a diversas classes de antimicrobianos usados no tratamento de pacientes com FC, como os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, cefalosporinas e carbapenêmicos, tem sido frequentemente observada em amostras de *A. xylosoxidans* (KANELLOPOULOU *et al*., 2004; SOFIANOU *et al*., 2005).

Cerca de 20% das amostras de *A. xylosoxidans* de um estudo realizado por Lambiase *et. al*. (2011) mostraram-se multirresistentes, apresentando resistência ao aztreonam (ATM), cefalosporinas, incluindo cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), ao sulfametoxazol/trimetoprim (SUT), e aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. As mesmas amostras foram sensíveis à piperacilina com ou sem tazobactam, CAZ, carbapenêmicos, quinolonas e SUT, além de piperacilina e piperacilina-tazobactam (PTZ), foram ativas contra isolados não multirresistentes. *A. xylosoxidans* isolados de pacientes sem FC também foram

resistentes a CAZ, carbapenêmicos e levofloxacina, indicando amostras de *A. xylosoxidans* podem ser resistente a muitos agentes antimicrobianos, independentemente da população estudada.

Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos responsáveis pela multirresistência apresentada por esta bactéria. Embora pouco ainda se saiba a respeito, alguns mecanismos começam a ser melhor acompanhados, como a ocorrência natural de β-lactamases de Classe D, como a OXA-114, a presença de metalo-β-lactamases (MBL), por exemplo, VIM-1 e VIM-2, IMP-1 e IMP-10 e a presença de β-lactamases de espectro estendido (ESBL), como VEB-1 (IYOBE *et al*., 2002; SHIBATA *et al*., 2003; SHIN *et al*., 2005; SOFIANOU *et al*., 2005; NEUWIRTH *et al*., 2006; DOI *et al*., 2008).

As β-lactamases compreendem enzimas que catalisam a hidrólise dos antimicrobianos β-lactâmicos e são divididas em 4 classes moleculares A, B, C e D, segundo a classificação de Ambler (AMBLER *et al*. , 1980). Aquelas que pertencem às classes A, C e D são serina β-lactamases e possuem resíduo de serina no sítio ativo, enquanto que as β-lactamases que pertencem à classe B são as chamadas metalo-β-lactamases (MBLs) que requerem cátions divalentes, como o íon zinco, como co-fatores para sua atividade catalítica (BUSH & JACOBY, 2010). Essas enzimas podem ser inibidas por quelantes de metais, como o EDTA ou compostos tiólicos. As MBLs pertencem ao grupo 3 das β-lactamases de espectro estendido, fazendo parte de uma classe funcional comum de metalo-enzima classificada com base em sua habilidade de hidrolisar o imipenem (RASMUSSEN & BUSH, 1997; SANTOS F° *et al.*, 2003; SHIBATA *et al*., 2003).

Dentre as classes de β-lactamases, as enzimas da classe B (MBLs) e uma variedade de enzimas da classe D (oxacilinases) são classificadas como carbapenemases por serem capazes de hidrolizar os carbapenemas, levando resistência a este grupo de antimicrobianos. Os carbapenens, como o imipenem e meropenem, são drogas com amplo espectro de atividade bacteriana, resistentes a grande maioria das β-lactamases, incluindo as de espectro estendido (QI *et al.*, 2008).

Dentro da classe B das metalo-enzimas, existem muitas variantes identificadas em diferentes regiões e em outros BGN-NF, principalmente em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Atualmente já estão descritas mais de 44 variantes do tipo IMP e 12 do tipo VIM presentes em amostras de *P. aeruginosa*

(WALSH *et al*., 2005; PICÃO *et al*., 2008; CASTANHEIRA *et al*., 2009; TADA *et al*., 2013).

A propagação de amostras produtoras de MBLs, principalmente em cepas de *P. aeruginosa,* tem sido descrita em vários locais, como Grécia, Portugal, Inglaterra, França, Itália. No Brasil, foram isoladas as primeiras amostras no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, havendo registros, também, na região nordeste e em São Paulo (SANTOS F° *et al.*, 2003; TOLLEMAN *et al.*, 2002; WALSH *et al*., 2005). Em 2002, Tolleman *et al*., descreveram a caracterização bioquímica e molecular de uma MBL, presente em amostra proveniente de uma criança com quatro anos de idade de São Paulo. Essa MBL foi denominada SPM-1 e faz parte de uma subfamília com características próprias. Assim como as amostras do tipo IMP e VIM, a SPM-1 também não hidrolisa o ácido clavulânico nem o aztreonam. (MURPHY *et al.*, 2003; WALSH *et al*., 2005).

“German Imipenemase”- GIM-1 foi descrita como uma MBL única, localizada em uma estrutura distinta de integron e representa a quarta sub-classe de MBL. Foi descrita em 2002, em amostra clínica de *P. aeruginosa* isoladas na Alemanha. As amostras produtoras dessa enzima apresentam susceptibilidade apenas à polimixina (CASTANHEIRA *et al*., 2004; WALSH *et al*., 2005).

Lee *et al* (2005), na Coréia do Sul, descreveram uma nova classe de enzima, em integron de classe 1, denominada SIM, provenientes de amostras clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Na Austrália, foi descrita uma classe de enzima, denominada AIM (YONG, 2007). Outra enzima, denominada KHM-1foi encontrada em amostras de *Citrobacter freundii* resistente à maioria dos β-lactâmicos (SEKIGUCHI *et al*., 2008). Mais recentemente uma nova classe de MBL, denominada NDM-1, foi descrita em amostras de *Klebsiella pneumoniae* de um paciente sueco. Pelo menos 10 variantes dessa classe, em diversos microrganismos, já foram descritas (YONG *et al*., 2009; TADA *et al*., 2013b; LAHEY CLINIC, 2013).

Em *A. xylosoxidans*, a sub-classe IMP das MBLs tem sido relatada, sendo o gene $bla_{\text{IMP-1}}$, a variante mais comumente encontrada, já tendo sido detectada em várias amostras de espécimes clínicos no Japão (SENDA *et al*., 1996; SHIBATA *et al*., 2003). A variante $bla_{\text{IMP-10}}$, também foi detectada em uma amostra de *A. xylosoxidans* de urina de um paciente japonês (IYOBE *et al*., 2002). Entre a classe VIM, o gene $bla_{\text{VIM-1}}$ foi relatado em *A. xylosoxidans*, na Itália, identificado em um

integron de classe 1 que alberga também outros três diferentes determinantes de resistência para aminoglicosídeos (RICCIO *et al*., 2001). Em 2005, Shin e colaboradores, mostraram o primeiro relato de bla_{VIM-2} em cepas de *A. xylosoxidans* multirresistentes em pacientes hospitalizados na Coréia do Sul.

VIM-2 é a mais difundida variante de MBL do tipo VIM em todo o mundo e, provavelmente, a mais comum MBL adquirida na parte sul da Europa, bem como em países do Extremo Oriente, como a Coréia do Sul, sendo detectado em várias enterobactérias e espécies de *Pseudomonas* (POUMARAS *et al*., 2003; WALSH *et al*., 2005). Um estudo realizado na Grécia indica que VIM-2 está atualmente disseminada no país, inclusive em cepas de *A. xylosoxidans* resistentes a carbapenêmicos (SOFIANOU *et al*., 2005). O aumento gradual da incidência da VIM-2 em diferentes espécies bacterianas e a estrutura variável do gene bla_{VIM-2} pode ser um indicativo da alta natureza móvel do cassete bla_{VIM-2} nestes países e em outras regiões (YAN *et al*., 2001; POUMARAS *et al*., 2003).

Recentemente foi descrita uma nova MBL, TMB-1, a partir de uma amostra de *A. xylosoxidans* isolada em Trípoli, na Líbia. O bla_{TMB-1} estaria localizado em um integron de classe 1, de localização cromossômica (EL SALABI *et al*., 2012).

Estes estudos reforçam a necessidade de vigilância epidemiológica nas principais instituições de cuidados terciários. A restrição do uso de carbapenêmicos, e ajuste das medidas de controle de infecção devem ser considerados para monitorar a propagação de MBLs entre espécies de bactérias Gram Negativas.

As oxacilinases que possuem atividade de carbapenemase e β-lactamase são classificadas em vários subgrupos distintos e podem ser de ocorrência natural ou adquirida, plamidial ou cromossômica (BUSH & JACOBY, 2010).

A existência de uma β-lactamase da classe D, ou seja, uma oxacilinase foi recentemente caracterizada ocorrendo naturalmente em cepas de *A. xylosoxidans*, sendo denominada OXA-114. Esta enzima não apresentou atividade de penicilinase ou de cefalosporinase, como se acreditava anteriormente, mas é provável que sua contribuição como enzima para a resistência aos β-lactâmicos na maioria das cepas de *A. xylosoxidans* possa ser secundária, como já foi demonstrado para a ocorrência natural de oxacilinases em outras espécies de bactérias Gram Negativas aeróbias, como OXA-50 em *P. aeruginosa* ou OXA-51/69 de *A. baumannii*. No entanto, a presença de dessas enzimas pode servir como uma região para incorporação de elementos de inserção que carreiam outros genes relacionados à resistência, como

ocorre em ISAba1 em cepas de *A. baumannii*. Existe a hipótese de que eventos semelhantes também poderiam ser esperados para o gene $bla_{OXA-114}$, constituindo uma possível fonte de genes de resistência (DOI *et al*., 2008).

As ESBLs pertencem à classe A de Ambler e tem sido descritas em vários microrganismos como *A. baumannii* e muitos representantes da família Enterobacteriaceae, porém a estimativa verdadeira de sua prevalência tem sido prejudicada pelas dificuldades de detecção em laboratórios clínicos, especialmente devido a presença de AmpC (β-lactamase cromossômica de classe C).

Um estudo realizado na França mostra o primeiro relato da produção de ESBL do tipo VEB-1 em *A. xylosoxidans* resistente a CAZ isolada de um paciente com FC. Este achado contribui para o aumento da escassa informação sobre a produção de ESBL em BGN-NF isolados de pacientes com FC. Resistência a cefalosporinas de espectro estendido mediada por ESBLs nunca havia sido descrito em *A. xylosoxidans*. Em função da dificuldade na caracterização, acredita-se que a detecção deste mecanismo de resistência seja subestimada (NEUWIRTH *et al*., 2006).

Esse tipo de ESBL já foi descrito em amostras de *P. aeruginosa,* Enterobacteriaceae no Sudeste Asiático e *Acinetobacter baumannii,* na França, onde estiveram envolvidas em vários focos de infecção hospitalares em unidades de terapia intensiva (GIRLICH *et al*., 2001; POIREL *et al*., 2003; BUREAU-CHARLOT *et al*., 2004).

A localização do gene bla_{VEB-1} em plasmídeos, que facilmente são transferíveis pode representar uma ameaça clínica ao se espalhar entre outras espécies bacterianas amplamente encontradas entre os pacientes com FC, especialmente, *P. aeruginosa*. Essa transferência poderia criar sérios problemas na terapêutica desses pacientes. Portanto, recomenda-se para evitar a transmissão pessoa-pessoa, o acompanhamento ambulatorial em dias alternados, de acordo com a colonização microbiológica dos pacientes. Em caso de internação, recomendam-se as mesmas medidas de contenção adotadas para os pacientes com outros patógenos multirresistentes (SAIMAN & SIEGEL, 2003).

Atributos de Virulência

Para estabelecer e manter uma infecção bem sucedida, os patógenos microbianos têm evoluído com uma variedade de estratégias para invasão celular, evasão ou resistência à resposta imune inata, evitando assim, danos as suas células e possibilitando sua multiplicação em regiões, normalmente estéreis dos hospedeiros. Com base em sua capacidade para lidar com essas questões críticas, as bactérias podem apresentar inúmeros fatores de virulência (COSSART & SANSONETTI, 2004).

Formação de Biofilme

Biofilmes podem ser definidos simplesmente como comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície (O'TOOLE, KAPLAN & KOLTER, 2000a). As células bacterianas encontram-se embebidas em uma matriz composta por proteínas, polissacarídeos e ácido nucléico que é secretada pelos próprios componentes do biofilme (COSTERTOn *et al*., 1995; WHITCHURCh *et al*., 2002).

O crescimento em biofilme é considerado uma estratégia de sobrevivência da bactéria, ou seja, uma alternativa a vida planctônica (HÖIBY *et al*., 2001). Assim, trata-se de uma forma de desenvolvimento microbiano, pois estas bactérias sofrem alterações na forma e função que passam a ter um papel proeminente no ciclo de vida destes microrganismos (SHIMKETS & BRUN, 1999). O biofilme representa um sistema biológico com elevado nível de organização, onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (O'TOOLE, KAPLAN & KOLTER, 2000a).

Uma ou mais espécies microbianas compõem os biofilmes, podendo ser formados em uma gama de superfícies bióticas e abióticas. Enquanto que os biofilmes polimicrobianos predominam na maioria dos ambientes os biofilmes monomicrobianos existem em várias infecções e na superfície de dispositivos médicos (DICKINSON & BISNO, 1993; ADAL & FARR, 1996; ARCHIBALD & GAYNES; 1997).

A formação do biofilme pelas bactérias é um processo que pode ser dividido em quatro estágios: adesão a uma superfície, estabelecimento de uma monocamada de bactérias, formação de microcolônias e por último a maturação deste biofilme (HEAD & YU, 2004). Esta formação tem início quando a bactéria identifica condições ambientais, como alterações na temperatura, na osmolaridade, no pH e na disponibilidade de ferro e oxigênio, que sinalizam a transição para o crescimento em biofilme (PRATT & KOLTER, 1998; STOODLEY *et al*., 1999; WALTNICK & KOLTER, 1999; O'TOOLE *et* al., 2000b).

O crescimento em biofilme exige que a bactéria seja capaz de aderir e se mover em superfícies através da quantidade de moléculas sinalizadoras de comunicação intercelular e formar uma estrutura tridimensional de células embebidas por uma matriz (O'TOOLE, KAPLAN & KOLTER, 2000a). Desta forma a bactéria poderá formar uma comunidade e obter benefícios adicionais da versatilidade fenotípica das bactérias vizinhas (DAVEY & O'TOOLE, 2000). Os organismos podem viver de forma independente no ambiente, porém em muitos casos eles proliferam mais efetivamente interagindo e formando comunidades, por isso o crescimento em biofilme parece ser uma característica crítica para a persistência das bactérias (CALDWELL *et al*., 1997).

Assim, uma mesma população infectante poderá conter bactérias com diferentes padrões de susceptibilidade. O escarro expectorado contém fragmentos de diferentes partes do biofilme, assim como formas planctônicas, resultando que, no mesmo espécime clínico, bactérias com diferentes níveis de resistência poderão ser encontradas (HAUBLER, 2004).

A presença de biofilmes pode ser verificada em mais de 65% das infecções humanas de etiologia bacteriana. Esta é uma importante forma de persistência da bactéria e a principal causa de episódios recorrentes (MITTELMAN, 1997; COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999; POTERA, 1999). Por exemplo, nas infecções pulmonares crônicas em pacientes com FC, a persistência da *P. aeruginosa* tem sido associada à capacidade desta bactéria em formar biofilme, tendo um papel importante na patogênese (SINGH *et al*., 2000; WORLITZSCH *et al*., 2002; O'MAY *et al*., 2006).

O flagelo, responsável pela locomoção de células bacterianas até a proximidade da superfície, juntamente com o lipopolissacarídeo (LPS) e outras proteínas de membrana externa, tem sido apontado como mediador das interações

iniciais, promovendo a formação de uma monocamada de bactérias, em cepas de *P. aeruginosa* (ST. GEME & CUTTER, 1996; OTTEMANN & MILLER, 1997).

Após os estágios iniciais de interação da *P. aeruginosa* com a superfície e da formação de microcolônias, ocorrem alterações na expressão gênica que levam a diferenciação das bactérias e a formação da estrutura do biofilme, fatos estes que caracterizam a etapa de maturação do biofilme (DAVIES *et al*., 1998; DAVEY & O'TOOLE, 2000; SINGH *et al*., 2000). Estas são adaptações do microrganismo à vida em biofilme e consistem em respostas as condições físico-químicas na comunidade bacteriana (VAN LOOSDRECHT, PICIOREANU & HEINEN, 1997; WIMPENNY & COLASANTI, 1997).

Um dos principais aspectos do biofilme bacteriano é sua resistência aos agentes antimicrobianos, que no caso das infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa* na FC, seria um dos fatores relacionados com a recorrência dos sintomas, após o término da antibioticoterapia (DAVEY & O'TOOLE, 2000; DRENKARD, 2003).

Ressaltamos que *P. aeruginosa*, dentre os microrganismos que fazem parte do grupo dos BGN-NF, é o patógeno mais amplamente estudado por suas inúmeras características de resistência e virulência. A maioria do conhecimento discutido a respeito da formação de biofilme relaciona-se ao conhecimento do comportamento apresentado por este microrganismo. Até o presente momento desconhecemos estudos deste fator de virulência em espécies do gênero *Achromobacter*. Dessa forma, utilizamos os conhecimentos prévios com base na formação de biofilme em *P. aeruginosa* como modelo para desenvolver o presente estudo.

Motilidade

Vários estudos têm apontado a importância da motilidade bacteriana como meio para iniciar o contato em superfícies abióticas, formação e desenvolvimento do biofilme (O'TOOLE & KOLTER, 1998; PRATT & KOLTER, 1998; MATTICK, 2002). Utilizando novamente como modelo cepas de *P. aeruginosa*, são conhecidos três tipos de motilidade: *swimming*, *swarming* e *twitching*.

A motilidade por *swarming* é do tipo flagelo-dependente e é observada *in vitro* em superfície de meio semi-sólido (HARSHEY, 2003). No fenômeno de *swarming* observam-se alterações morfológicas das células bacterianas (*swarmer cells*), que se tornam alongadas e hiperflageladas (FRASER & HUGHES, 1999; HARSHEY, 2003). Em adição ao flagelo, neste tipo de motilidade há necessidade do aumento na produção de componentes extracelulares, que seriam capazes de reduzir o atrito da célula com a superfície (HARSHEY, 2003).

A motilidade do tipo *swarming* difere de *swimming*, que também é flagelo-dependente, por ser representada por movimentos celulares independentes, que podem ser observados em meios líquidos ou sólidos com baixa concentração de agar. *Swarming* é um movimento multicelular e diversos autores têm associado sua função, em diferentes espécies bacterianas, com fatores de virulência e resistência (FRASER & HUGHES, 1999; HARSHEY, 2003; KIM *et al*., 2003; Merino *et al*., 2006).

A motilidade do tipo *twitching* depende do pili tipo-IV, usado pela bactéria para se locomover através da superfície na qual ela está aderida, tem sido relacionada à formação das microcolônias, uma das etapas para a formação de biofilme (DAVIES *et al*., 1998). As bactérias aderidas têm a capacidade de retrair o pili em direção à célula hospedeira, aumentando assim o contato entre os dois tipos celulares (SPANGENBERG *et al*., 1995; COMER *et al*., 2002).Há indícios de que as bactérias utilizem este tipo de motilidade quando estão em contato com outras bactérias, sugerindo um comportamento comunitário (SEMMLER, WHITCHURCH & MATTICK, 1999).

Ainda não são descritos relatos sobre estes tipos de motilidades em *Achromobacter* spp. Este estudo é pioneiro no sentido de tentar contribuir para o esclarecimento de questões como a presença ou não de fatores de virulência relacionados à colonização/infecção por estes microrganismos em pacientes com FC

Relevância e Justificativa

Em estudos anteriores, verificamos um aumento da frequência de *A. xylosoxidans* em pacientes com FC, acompanhados em dois centros de referência

para diagnóstico e tratamento destes pacientes no Rio de Janeiro. Observamos que estes microrganismos foram capazes de estabelecer infecções persistentes e a transmissão cruzada entre pacientes foi vista, inclusive entre irmãos. Evidenciamos também o aparecimento de um grupo clonal único em um grande número de pacientes de ambas as instituições, o que nos levou a supor a ocorrência de um surto de *A. xylosoxidans* nestes pacientes. Até o momento, este foi o primeiro relato da ocorrência de um surto de *A. xylosoxidans* entre pacientes com FC (PEREIRA *et a*l., 2011).

Estes achados associados aos aspectos e características que têm sido atribuídos a estes microrganismos, como sua dificuldade de identificação, seu caráter multirresistente, seu potencial de transmissibilidade e sua capacidade em estabelecer infecções persistentes em pacientes com FC, corroboram para a necessidade da continuidade desses estudos. Dessa forma, nossa proposta foi comparar diferentes testes fenotípicos e moleculares para sua identificação; avaliar mecanismos de resistência a antimicrobianos, além de estudar alguns atributos de virulência que possam estar favorecendo o estabelecimento deste microrganismo emergente na FC. Estudos como este podem contribuir significativamente para um melhor conhecimento deste gênero, visando propiciar uma melhoria na qualidade e sobrevida destes pacientes.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Comparar diferentes metodologias para a identificação de espécies do gênero *Achromobacter* spp., analisar perfis fenotípicos e genotípicos de resistência e estudar alguns atributos de virulência em amostras com grupos clonais previamente determinadas, isoladas de pacientes com Fibrose Cística, atendidos em dois centros de referência do Rio de Janeiro.

1.2 Objetivos específicos:

- Comparar metodologias moleculares para identificação de espécies do gênero *Achromobacter* spp.;
- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas para Ceftazidima, Imipenem, Ciprofloxacina e Sulfametoxazol-Trimetoprim, em espécies do gênero *Achromobacter;*
- Realizar a detecção fenotípica de carbapenemase pelo teste de Hodge modificado;
- Verificar por técnica molecular a presença de genes de resistência aos antimicrobianos;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme em espécies do gênero *Achromobacter;*
- Verificar a presença de mobilidade do tipo *swarming* e *swimming* em espécies do gênero *Achromobacter*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes, Espécimes clínicos e Amostras bacterianas

Para este estudo foram selecionados 38 pacientes com FC, que apresentaram no período entre janeiro de 2003 e dezembro de 2008, pelo menos uma cultura de secreção respiratória inferior, positiva para *Achromobacter* spp.

Destes pacientes, 30 fazem acompanhamento clínico regular no Departamento de Pneumologia do Instituto Nacionall de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF – FIOCRUZ), e oito acompanhados no Departamento de Pneumologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), dois centros de referência, no Rio de Janeiro, responsáveis pelo atendimento a pacientes pediátricos e adultos, respectivamente. O acompanhamento microbiológico regular dos pacientes é realizado no Laboratório de Bacteriologia Clínica do HUPE-UERJ (LABAC), onde os espécimes respiratórios são processados e os patógenos identificados.

As amostras bacterianas caracterizadas, inicialmente por provas fenotípicas, como BGN-NF ou *Achromobacter* spp. foram encaminhados para o Laboratório 2 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UERJ e estocados em solução de leite desnatado a 10% (Skim Milk; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo glicerol a 10% e mantidas a -20°C até a realização dos testes.

Os pacientes foram considerados colonizados cronicamente por *Achromobacter* spp. quando apresentavam pelo menos três culturas positivas em um ano, com intervalo mínimo de um mês entre elas por pelo menos dois anos.

Todas as amostras bacterianas foram avaliadas quanto à pureza e tiveram sua identificação confirmada através dos testes fisiológicos convencionais e por técnica de sequenciamento do gene *rrs,* que codifica o 16S rRNA., e foram submetidas ao PFGE em uma etapa anterior deste estudo (PEREIRA *et al.*, 2011).

Foram incluídos no estudo 38 pacientes com FC que apresentaram pelo menos uma cultura de secreção respiratória positiva para o gênero Achromobacter, em um total de 897 analisadas, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2008.

2.2 **Detecção genotípica de oxacilinase- β-lactamase (OXA-114)**

2.2.1 Obtenção do DNA bacteriano por lise térmica

As amostras foram semeados em agar CLED (*cysteine lactose electrolyte deficient agar*; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA), e incubadas a 35±2°C por 18-24h. Ao término deste período, uma colônia isolada foi semeada em 3mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Merck, Alemanha). Após incubação a 35±2°C por 18-24h sob agitação, 200µL do crescimento bacteriano foram adicionados a 2mL de água destilada (1:10) para a leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro (B295 II Micronal, SP, Brasil) (λ= 580nm). A partir desta leitura foi determinado o volume da cultura necessário para se obter a D.O.$_{580nm}$ de 0,5.

As amostras foram distribuídas em microtubos nos volumes especificados pela D.O., e a seguir, centrifugadas por 2 min a 14.000 rpm (HERMLE, Z 233M-2). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado completamente e o sedimento foi ressuspendido em 600µL de água deionizada estéril. O DNA foi obtido após aquecimento destas suspensões à 100ºC por 10 min e subsequente centrifugação por 10s a 14.000 rpm. Uma vez obtido, o DNA permaneceu em banho de gelo durante a preparação da mistura de reação.

2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A detecção do gene *bla*$_{\text{-OXA-114-like}}$ foi realizada utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a realização da reação de PCR foi preparada uma mistura de reação, cujo volume total foi de 25 µL: contendo 2,5 mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 10 pmol de cada par de iniciadores; 1 X tampão de PCR (200 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500mM de KCl); 1,5 mM MgCl2; 1,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µL do extrato bacteriano fervido.

Os iniciadores utilizados para a amplificação foram: OXA-114F2 (5′-CGCATCCTGTTCCAGCA-3′) e OXA-114R2 (5′-GTGCCGGTCTTGCCATAC-3′). O fragmento amplificado apresentou aproximadamente 509 pb.

As condições da reação para amplificação do gene foram: 3 min a 95 °C, seguida por 32 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 60 °C e 45 s a 72°C, e extensão final de 10 min a 72 °C, em termociclador (PTC-100 MJ *Research*, Inc.) (TURTON *et al*., 2011).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese a 100V, durante aproximadamente 40 min em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 1,2%, com solução 1X de tampão TBE (Tris-Base, Ácido bórico, EDTA 0,5M, pH 8,0) e corante SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (*Cole Parmer* 96W *Instrument Co. Vernen Hills*, *Illinois,* EUA) e fotografado (*Kodak Digital Sciense, Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120).

2.3 **Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)**

Todas as amostras foram submetidas à obtenção do DNA bacteriano por lise térmica, nas mesmas condições já descritas no item 2.2.1.

2.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para a amplificação do gene *rrs*. Os iniciadores utilizados para a amplificação foram: 27, 5’-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3’ e 1492, 5’-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3’ (HIRASHI, 1992). O fragmento amplificado apresentou aproximadamente 1.500 pb.

Nesta etapa, 2µL do DNA bacteriano de cada amostra foram adicionados a microtubos contendo 48µL da mistura de reação, composta de: 20 pmol de cada iniciador que compõe o par corresponde ao gene *rrs*, 2,5 mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil) , 1 U de Taq polimerase Platinum (Invitrogen, São

Paulo, Brasil), tampão PCR 1X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500mM de KCl), 1,5 mM de $MgCl_2$.

As condições da reação para amplificação do gene *rrs* foram adaptadas a partir da descrição de Hirashi, 1992: desnaturação inicial a 94˚C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94˚C por 1 min e 30 s, 1 min e 30 s à temperatura de anelamento específica (52˚C), 2 min a 72˚C e extensão final a 72˚C por 15 min, em termociclador (PTC-100 MJ *Research*, Inc.).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese a 100V, durante aproximadamente 40 min em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 1,2%, com solução 1X de tampão TBE (Tris-Base, Ácido bórico, EDTA 0,5M, pH 8,0).

Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), por 10min e, em seguida, visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (*Cole Parmer* 96W *Instrument Co. Vernen Hills*, *Illinois,* EUA) e fotografado (*Kodak Digital Sciense, Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120).

2.3.2 Digestão com endonucleases de restrição

Cada amostra foi submetida à restrição por seis enzimas separadamente: *Hinf* I (GANTC), *Msp* I (CCGG), *HinP I* (GCGC), *Ncil* I (CCSGG), *Nla* III (CATG) (New England Biolabs, County Ipswich, Inglaterra) e *Dde* I (CTNAG) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Em cada reação foram utilizadas 5U de cada enzima de restrição, tampão da enzima 1X, água deionizada estéril e 5µL do DNA de cada amostra, em um volume final de 20µL. A reação foi incubada em banho-maria por 2 horas a 37°C.

Após o término da reação, os produtos da digestão de cada enzima foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, com solução 1X de tampão TBE (Tris-Base, Ácido bórico, EDTA 0,5M, pH 8,0) adicionado de corante SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil), a 100 v por 1 h. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (*Cole Parmer* 96W *Instrument Co. Vernen Hills*, *Illinois,* EUA) e fotografado (*Kodak Digital Sciense, Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120).

Posteriormente foi realizada a análise visual pela comparação dos padrões de fragmentação do gene *rrs* das amostras obtidos a partir da digestão com cada

enzima de restrição com os padrões de fragmentação de cada cepa padrão de cada espécie com digestão com as mesmas enzimas. As sequências do gene *rrs* de cada cepa padrão foram obtidas na base de dados do *GenBank*, presente na base de dados do NCBI[1] (Tabela 1) e o perfis de fragmenção foram obtidos através do programa Bioedit versão 7.1.3.0.

Tabela 1: Número de acesso no GenBank das sequências do gene *rrs* utilizadas na obtenção do perfis de fragmentação a partir das enzimas de restrição das cepas padrão de seis espécies do gênero *Achromobacter*.

Amostra	**Número de acesso no *GenBank***
A. xylosoxidans LMG 1863^T	D88005
A. denitrificans LMG 1231^T	M22509
A. ruhlandii LMG 1866^T	ABO10840
A. piechaudii ATCC 43552^T	ABO10841
A. insolitus LMG 6003^T	AY170847
A. spanius LMG 5911^T	AY170848

2.4 **Formação de Biofilme (TENDOLKAR *et al.*, 2004)**

As amostras estocadas previamente a -20^{0}C foram submetidas a dois subcultivos em agar CLED, duas a três colônias foram semeadas em meio Mueller Hinton Broth (MHB- Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) acrescido de 0,75 % de glicose (Sigma, St. Louis, Mo.) a 35±2°C por 18 a 24 horas sob agitação. Após o ajuste desta cultura para uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de McFarland em um novo tubo com MHB, 200μL foram transferidos para uma placa de microtitulação de fundo chato de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catálogo nº. 269787). Cada amostra foi testada em triplicata e poços contendo apenas MHB foram utilizados como controle negativo. A placa de microtitulação foi incubada a 35±2°C por 20h sob agitação a 150 ATM.

[1] Disponível no endereço eletrônico da NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Após a incubação, a microplaca foi lavada três vezes com água Mili-Q estéril para retirar as bactérias que não fazem parte do biofilme. Para corar este biofilme, foi adicionada a placa de microtitulação 200 µL de solução aquosa de cristal violeta a 0,1% por 15 min. A seguir foi lavada mais três vezes com água Mili-Q para retirar o excesso de cristal violeta e deixada em temperatura ambiente por duas horas para secar.

A fim de solubilizar o cristal violeta adsorvido, foi adicionado 200µL de etanol 95% por poço da placa por 15 min, em temperatura ambiente. Após este tempo, a placa foi submetida a leitura com espectofotômetro (Spectramax 190 Gemini ELISA, Molecular Devices Corp. Sunnyvale, Calif.) e a absorbância foi medida a 590nm.

Para quantificação da densidade do biofilme foi utilizada como controle para o teste a cepa de *P. aeruginosa* PAO1, que é sabidamente uma forte formadora de biofilme. Também foi incluída a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853, considerada uma fraca produtora de biofilme a fim de validar a execução do teste (HEAD & YU, 2004 e LEE *et al*., 2005).

As amostras foram classificadas quanto à capacidade de formar biofilme seguindo os critérios utilizados por Stepanovic *et al*. (2000).

Tabela 2: Critério para classificação das amostras quanto à formação de biofilme (STEPANOVIC *et al*., 2000)

Formação de Biofilme	$D.O.A_{590}$
Não formador	$D.O. \leq D.O._C$
Fraco	$D.O._C < D.O. \leq 2 \times D.O._C$
Moderado	$2 \times D.O._C < D.O. \leq 4 \times D.O._C$
Forte	$4 \times D.O._C < D.O.$

D.O.= densidade óptica; $D.O._C$= densidade óptica controle negativo

2.5 **Teste de motilidade (RASHID & KORNBERG, 2000)**

2.5.1 *Swimming*:

Uma colônia foi semeada em Caldo Nutriente (CN - Oxoid Basingstoke Hampshire England) e incubada a 35-37°C durante 18-24h. Após incubação o crescimento bacteriano foi homogeneizado e um volume de 3 µL foi aplicado no centro do meio semi-sólido Ágar Nutriente (AN - Oxoid Basingstoke Hampshire England), preparado a partir de 10 mL do meio CN acrescido de 0,3% de ágar distribuídos em placas de Pétri estéreis 90 X 15 mm, para formar uma camada de ágar de aproximadamente 1,6 mm. Após o período de 18-24h de incubação a 35-37°C, a mobilidade foi avaliada qualitativamente, medindo-se a zona de turbidez que se formou, devido à migração das células bacterianas, a partir do ponto de inoculação.

2.5.2 *Swarming*:

Uma colônia foi semeada em CN e incubada a 35-37°C por 18-24 h. Após incubação o crescimento bacteriano foi homogeneizado e um volume de 3 µL foi aplicado em *spot*, com o auxílio de pipeta automática, na superfície do meio composto por: 0,5% Bacto Agar (Oxoid Basingstoke Hampshire England), 8g de CN/litro, suplementados com 5 g de dextrose (Oxoid Basingstoke Hampshire England). Após o período de 18-24 h de incubação a 30±1°C a mobilidade foi avaliada qualitativamente medindo-se a zona de turbidez que se formou devido à migração das células bacterianas a partir do ponto de inoculação.

2.6 **Determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas**

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IMP) e sulfametoxazol-trimetoprim (SUT) para as amostras foram obtidas pelo método de gradiente de difusão em ágar (Etest® -AB BIODISK), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a execução do método, utilizamos culturas recentes, das quais selecionamos três a cinco colônias para o preparo de suspensão bacteriana padronizada, em solução salina fisiológica, com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. A suspensão bacteriana foi semeada em meio Mueller Hinton Agar (MHA - Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) para obtenção de crescimento homogêneo e confluente. As fitas do Etest® foram aplicadas após 10 a 15 min da semeadura para total absorção da umidade na superfície do meio.

Após aplicação das fitas, as placas foram imediatamente incubadas a 35±2° C por 16-20h em aerobiose. Ao término deste período, quando o crescimento bacteriano se tornou visível, uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita foi visualizada e realizada a leitura das CIMs. Os resultados foram interpretados conforme os critérios estabelecidos e descritos no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011) para Não Enterobacteriaceae, sendo as amostras agrupadas nas categorias: sensível, com resistência intermediária e resistente (Tabela 3). Como controle do teste, utilizamos a cepa padrão *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

Tabela 3: Padrões de interpretação dos resultados das leituras das CIMs de acordo com os critérios estabelecidos e descritos no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011).

Antimicrobianos	**Padrão de Interpretação (µg/mL)***		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ceftazidima	≤ 8	16	≥ 32
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Sulfametoxazol/trimetoprim	≤ 2/38	-	≥ 4/76

*Não Enterobacteriaceae

2.7 **Detecção fenotípica da produção de carbapenemase**

Todas as amostras foram submetidas ao Teste de Hogde modificado para a verificação da produção de carbapenemase de acordo com PASTERAN *et al*., 2011.

A partir de um crescimento recente da cepa *E. coli* ATCC 25922, duas ou três colônias foram utilizadas para preparar uma suspensão correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Foi feita uma diluição deste inóculo na proporção 1:10. Essa suspensão diluída foi aplicada em placas com o meio ágar Müeller-Hinton (MHA - Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA). Após 15 minutos foi colocado no centro da placa um disco de ertapenem de 10 µg.

Com auxílio de uma alça, foi feito estrias das amostras a partir do centro do disco de β-lactâmico até a periferia da placa de Petri, com o cuidado para não tocar o disco de β-lactâmico. A cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi utilizada como controle negativo e a cepa clínica de *K. pneumoniae* da coleção de bactérias do Instituto Oswaldo Cruz, gentilmente cedidas pela Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, foi utilizada como controle positivo do teste.

Após incubação à temperatura de 35±2ºC, por 16 a 18 h, foi realizada a leitura do teste. A observação de uma distorção no halo de inibição do crescimento da *E. coli* ATCC 25922 indica sua positividade.

2.8 **Detecção genotípica de metalo-β-lactamase (MBL) e carbapenemase**

A técnica da PCR foi utilizada para a detecção dos genes de algumas carbapenemases descritas na literatura, a saber: bla_{SPM-1}, bla_{IMP-1}, bla_{VIM-2} e bla_{KPC}. Todas as amostras foram submetidas à obtenção do DNA bacteriano por lise térmica, nas mesmas condições já descritas no item 2.2.1.

As reações da PCR foram realizadas em volume total de 50 µL: contendo 4 µL de dNTP; 25 pmol de cada par de iniciadores; 1 X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50mM KCl, 1 mg/mL gelatina); 2,5 mM $MgCl_2$; 2,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 5 µL de suspensão bacteriana fervida.

Como controles negativos foram utilizados a mistura de reação sem DNA bacteriano (45µL) e com a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, enquanto para controles positivos de bla_{SPM-1}, bla_{IMP-1} e bla_{VIM-2} foram utilizadas as cepas de *P.aeruginosa* produtoras de SPM-1 (48-1997A), IMP-1 (PSA 319) e VIM-2 (AG-2), respectivamente, cedidas pela Dra. Ana Cristina Gales da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

A tabela 4 descreve os diferentes pares de iniciadores empregados para a amplificação dos fragmentos gênicos.

Tabela 4: Sequência dos iniciadores para detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamases (MBLs) e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC): bla_{IMP-1}, bla_{SPM-1}, bla_{VIM-2} e bla_{KPC-2}

.

Gene	Seqüência	Tamanho do Produto (pb)	Condições de amplificação	Referência
bla_{IMP-1} forward (f)	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	593	95º C/2min; 33 ciclos de 94ºC/1 min; 60ºC/1min; 72°/1min; 72ºC/7 min.	SENDA *et al.*, 1996b
bla_{IMP-1} reverse (r)	5'-GAACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'			
bla_{SPM-1} forward (f)	5'-TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC-3'	648	95°C/5min; 30 ciclos de 95ºC/1 min; 54ºC/1min; 68ºC/1 min. 68ºC/7 min.	GALES *et al.*,2003
bla_{SPM-1} reverse (r)	5'-CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3'			
bla_{VIM-2} forward (f)	5'-ATGTTCAAACTT TTGAGTAAGT-3'	800	95°C/10min; 25 ciclos de 95ºC/30s; 53ºC/1min; 72ºC/45s; 72º/10 min.	GALES *et al.*,2003
bla_{VIM-2} reverse (r)	5'-CTACTCAACGACTGAGCG-3'			
bla_{KPC-2} forward (f)	5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3'	1011	94ºC/3 min; 35 ciclos de 94ºC/1min; 50ºC/1 min; 72º/1min; 72ºC/10 min.	PEIRANO *et al.*,2009
bla_{KPC-2} reverse (r)	5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'			

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese a 100V, durante aproximadamente 40 min em gel de agarose (Invitrogen, São Paulo, Brasil) a 1,2%, com solução 1X de tampão TBE (Tris-Base, Ácido bórico, EDTA 0,5M, pH 8,0) e corante SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Após a corrida eletroforética, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (*Cole Parmer* 96W *Instrument Co. Vernen Hills*, *Illinois,* EUA) e fotografado (*Kodak Digital Sciense, Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120).

2.9 **Análise estatística**

Para validar a análise comparativa entre a formação de biofilme e os diferentes tipos de motilidades foi utilizado o teste Exato de Fisher. Os dados foram avaliados no aplicativo Prisma (GraphPad, Inc., versão 4.0). Qualquer diferença foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$.

2.10 **Aspectos éticos**

As amostras bacterianas incluídas neste estudo foram obtidas a partir de um banco de amostras provenientes de espécimes clínicos encaminhados para culturas de rotina no Laboratório de Bacteriologia do HUPE e para o Laboratório 2 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas - UERJ. Assim, os exames bacteriológicos foram executados independentes deste estudo.

Em nenhum momento foi solicitado aos pacientes algum exame extra. Os dados foram divulgados através de códigos que não identificaram os indivíduos. Deste modo, não foram necessários o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o registro do Comitê de Ética da Instituição.

3 RESULTADOS

3.1 Características da amostragem

Foram incluídos no estudo 38 pacientes com FC que apresentaram pelo menos uma cultura de secreção respiratória positiva para o gênero *Achromobacter* spp, em um total de 897 analisadas, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2008. Dentre os pacientes estudados, 22 são do sexo feminino e 16 do sexo masculino.

A média de idade dos 30 pacientes atendidos no IFF foi de 10 anos, na faixa etária de 2 a 17 anos. Foram obtidas 103 culturas positivas para *Achromobacter* spp. e o número de amostras por paciente, variou de 1 a 20, com média de 3,5 culturas. Os oito pacientes atendidos no HUPE possuíam uma média de idade de 23,7 anos, na faixa etária de 17 a 37 anos. Obteve-se 26 de culturas positivas para *Achromobacter* spp. e o número de amostras por paciente, variou de 1 a 7, com média de 3,2 culturas.

3.2 Identificação preliminar:

Das 129 amostras de *Achromobacter* spp, 121 (93,8%), foram identificadas fenotipicamente em nível de espécie como *Achromobacter xylosoxidans*, quando avaliadas em um amplo conjunto de testes. O resultado dos testes para oito amostras nos permitiu a exclusão da espécie *A. xylosoxidans* (metabolismo assacarolítico associado ao teste de xilose negativo), porém não foram suficientes para a identificação de outra espécie do gênero (Pereira *et al*., 2011).

O perfil dos testes bioquímicos compatível com *A. xylosoxidans* pode ser consultado na Tabela 5.

Tabela 5: Perfil fenotípico das 121 amostras de *Achromobacter xylosoxidans*.

Testes fenotípicos	**Amostra referência % positividade***	**Amostras do presente trabalho % positividade**
Coloração de Gram	BGN	BGN
Produção de Pigmento	0	0
Mobilidade	100	100
Oxidase	100	100
Oxidação de:		
Glicose	78	12
Xilose	99	100
Manitol	0	0
Lactose	0	3
Sacarose	0	0
Maltose	0	0
Decarboxilação de:		
Lisina	0	0
Ornitina	0	0
Arginina Dehidrolase	13	1
Catalase	98	100
Hidrolise de:		
Gelatina	0	9
Esculina	0	2
DNA	0	1
Uréia	0	0
ONPG	0	3
PYR	100	100
Crescimento em:		
MacConkey	100	100
SS	98	95
Citrato	95	98
NaCl 0%	100	100
NaCl 6%	69	63
42°C	84	96
Redução Nitrato	100	84
Gás Nitrato	60	77
Indol	0	0
Produção de H_2S	0	0
Alcalinização Acetamida	33	41
King A	0	0
King B	0	0

*Adaptado de Murray *et al*., 2004
ONPG - o-nitrofenil-ß-D-galactopiranosídeo
PYR – L-pirrolidonil-β-naftilamida

O resultado dos testes fenotípicos para as oito amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans* são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6: Perfil fenotípico de oito amostras de *Achromobacter* spp.

Teste Fenotípico	**Amostras**							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Oxidação de:								
Glicose	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose 10%	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dehidrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
Decarboxilação:								
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise de;								
Gelatina	-	-	-	-	+	+	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	+	-
PYR	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em:								
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 0%	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6%	-	+	-	-	-	-	-	-
42%	+	+	+	+	+	+	+	+
Redução de Nitrato	-	+	+	+	+	-	+	+
Gás de Nitrato	+	-	-	+	+	+	+	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de H2S	-	-	-	-	-	+	+	+
Alcalinização de acetamida	+	+	+	+	+	+	-	-
King A	-	-	-	-	-	-	-	-
King B	-	-	-	-	-	-	-	-

ONPG - o-nitrofenil-ß-D-galactopiranosídeo; **PYR** – L-pirrolidonil-β-naftilamida

Todas as amostras foram submetidas à análise do sequenciamento do gene *rrs*, que codifica o 16S rRNA, permitindo-nos a identificação das mesmas 121 amostras (93,8%) como *A. xylosoxidans,* e uma amostra (0,8%) como *A. denitrificans*. Para sete amostras (5,4%) o sequenciamento não forneceu a identificação definitiva em nível de espécie, apresentando percentuais de similaridade idênticos (variando de 94 a 97%) para mais de uma espécie do gênero *Achromobacter* (*A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. insolitus* ou *A. piechaudii*).

3.3 **Tipificação Molecular preliminar**

A análise do polimorfismo genético de todas as amostras foi realizada em estudo anterior (Pereira et al., 2011), através da técnica de PFGE, que revelou a existência de 22 grupos clonais entre as amostras de *A. xylosoxidans* e três entre as demais espécies do gênero *Achromobacter*.

Nas tabelas 7 e 8 podemos observar a distribuição dos grupos clonais entre todas as amostras de *A. xylosoxidans* e demais espécies do gênero estudadas.

Tabela 7: Distribuição dos grupos clonais entre as 122* amostras de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas dos 38 pacientes com FC

Paciente	Número de amostras por grupo clonal																				
	A	Q	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	S	U	V	X	Z
1								1														
2							1															
3							1															
4																1						
5							1															
6			3																			
7														2								
8							1															
9					1																	
10	3																					
11															1							
12							1															
13						1	1		1								15					
14								3												1		
15				1																		
16							4										15					
17							1															
18							1															
19					1								1									
20			1																			
21							1								1							
22							3			2												
23					1	10	1										1	1				
25							1															
26							2															
27																			1			
28																	1					
29							1										1				1	1
30							1															
31							1															
32							1															
33		1					1					1										
34							1															
35											5											
36							1															
37							1															
38					7																	
39					7																	
Total	3	1	4	1	17	11	28	4	1	2	5	1	1	2	2	1	33	1	1	1	1	1

Pacientes crônicos
Clones de *A. xylosoxidans* presentes entre 2 pacientes
Clones de *A. xylosoxidans* presentes em mais de 2 pacientes

*121 amostras identificadas pelos testes fenotípicos e sequenciamento e uma não identificada por estas técnicas.

Tabela 8: Distribuição dos grupos clonais das amostras de sete espécies de *Achromobacter não xylosoxidans.*

Paciente	N amostra/grupo clonal		
	R	**T**	**Y**
5		1	1
9		1	
12	1		
13	1	1	
29	1		
Total	3	3	1

Parte desses dados foi publicado no *Jornal of Clinical Microbiology*, sob o título de *Achromobacter xylosoxidans*: Characterization of Strains in Brazilian Cystic Fibrosis Patients, em 2011, e serviram de base para a continuidade do presente estudo (Anexo A).

3.4 **Detecção genotípica de oxacilinase- β-lactamase (OXA-114)**

As 129 amostras de *Achromobacter* spp foram submetidas ao PCR para o gene *bla* $_{\text{OXA-114-like.}}$ O teste foi positivo para 122 amostras de *A. xylosoxidans* (121 identificadas pelos testes fenotípicos e sequenciamento e uma não identificada por estas técnicas).

As demais amostras identificadas como outras espécies do gênero apresentaram resultado negativo para este gene.

Considerando o resultado de todas as técnicas de identificação, fenotípicas e moleculares realizadas, a Tabela 9 mostra a distribuição das espécies de *Achromobacter* encontradas em cada técnica.

Tabela 9: Distribuição das espécies de *Achromobacter* spp. identificadas por técnicas fenotípicas e moleculares.

Técnicas de identificação (n)	**Amostras (n - %)**
Testes fenotípicos (129)	*A. xylosoxidans* - 121 (93,8) Não identificadas - 8 (6,2)
Sequenciamento 16S (129)	*A. xylosoxidans* - 121 (93,8) *A. denitrificans* - 1 (0,8) Não identificadas - 7 (5,4)
PCR OXA-114 (129)	*A. xylosoxidans* - 122 (94,6) Não *A. xylosoxidans* - 7 (5,4)

3.5 Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Para a realização da ARDRA foram selecionadas 63 amostras, representativas de cada grupo clonal por paciente (Tabela 9) que foram identificadas pelas técnicas fenotípicas, sequenciamento do gene *rrs* e PCR do gene $bla_{\text{OXA-114}}$ como: *A. xylosoxidans* (n=55), *A. denitrificans* (n=1) e sete do gênero *Achromobacter* spp. (não identificadas em nível de espécie por tais técnicas). Foi realizada a análise dos perfis de fragmentação obtidos por enzimas de restrição específicas e posterior comparação com os perfis de fragmentação obtidos de amostras padrão de seis espécies do gênero *Achromobacter* (Apêndice A).

Tabela 10: Distribuição das amostras de *Achromobacter* selecionadas para a identificação pelo método da ARDRA

Grupo Clonal /PFGE (n de amostras)	**Paciente**
A(1)	10
B(1)	33
C(2)	6, 20
D(1)	15
E(5)	9, 19, 23, 38,39
F(2)	13, 23
G(22)	2, 3, 5, 8, 11, 12, 13, 16, 17,18, 21, 22, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37
H(2)	1, 14
I(1)	13
J(1)	22
K(1)	35
L(1)	33
M(1)	19
N(1)	7
O(2)	11, 21
P(1)	4
Q(5)	13, 16, 23, 28, 29
R(3)	12, 13, 29
S(1)	23
T(3)	5, 10, 13
U(1)	27
V(1)	14
X(1)	29
Y(1)	5
Z(1)	29
W(1)	31

Após a análise, 56 (88,9%) amostras foram identificadas como *A. xylosoxidans*. Estes resultados confirmaram a identificação pelas técnicas utilizadas previamente e incluiu uma amostra não identificada anteriormente. Uma (1,5%) amostra foi identificada como *A. denitrificans*, confirmando também a identificação anterior. As amostras que não foram identificadas em nível de espécie anteriormente foram identificadas por esta técnica, três (4,8%) como *A. insolitus* e três (4,8%) como *A. piechaudii*.

A técnica de ARDRA foi a única que identificou todas as amostras. As sete amostras (5,4%) que não foram identificadas no sequenciamento mostraram percentuais de similaridade próximos (variando de 94 a 99%) para mais de uma espécie do gênero *Achromobacter* (*A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. insolitus* ou *A. piechaudii*), embora a espécie identificada no ARDRA estivesse dentre as opções observadas no sequenciamento (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação entre métodos moleculares utilizados na identificação de *Achromobacter* spp.

Técnicas de identificação		
Sequenciamento 16S (n=129)	**PCR *bla* OXA-114 (n=129)**	**ARDRA (n=63)**
A. xylosoxidans (121)	Positivo (121)	*A. xylosoxidans* (55)
A. denitrificans (1)	Negativo (1)	*A. denitrificans* (1)
Não identificadas (7) *A. xylosoxidans* (99%)* *A. denitrificans* (99%)* *A. insolitus* (98%)*	Positivo (1)	*A. xylosoxidans* (1)
A. xylosoxidans (94%)* *A. denitrificans* (94%)* *A. insolitus* (94%)*	Negativo (3)	*A. insolitus* (3)
A. xylosoxidans (97%)* *A. piechaudii* (94%)*	Negativo (3)	*A. piechaudii* (3)

*% - percentual de similaridade obtido na análise pelo *Blast*.

3.6 **Formação de Biofilme**

3.6.1 Formação de biofilme em amostras de *A. xylosoxidans*

As 122 amostras de *A. xylosoxidans* foram capazes de formar biofilme. A maioria (n=101; 82,8%) demonstrou uma capacidade forte de formação, com DO_{590}

variando de 4 X a >10X maiores que o valor mínimo para serem consideradas forte (DO_{590} acima de 0,509) e com intervalo de variação entre 0,587 e 2,466, com DO_{590} média de 0,985. Vinte amostras (16,4%) apresentaram-se com capacidade moderada (DO_{590} média de 0,452). Apenas uma amostra foi fracamente produtora de biofilme com DO_{590}de 0,156 (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação da produção de biofilme entre 122 amostras de *A. xylosoxidans*.

Produção de biofilme	**Amostras N (%)**	**DO média**	**Intervalo de variação da DO_{590}**
Fraca	**1 (1,2)**	**0,156**	**0,156**
Moderada	**20 (16,4)**	**0,452**	**0,277 – 0,586**
Forte	**101 (82,8)**	**0,985**	**0,587 – 2,466**

DO – Densidade ótica

3.6.2 Formação de biofilme em amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans*

As sete amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans* demonstraram forte capacidade de formação de biofilme, exceto uma amostra de *A. insolitus* que foi considerada fraca produtora. Os resultados do teste de formação de biofilme para essas amostras são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Comparação da produção de biofilme em sete amostras de *Achromobacter não xylosoxidans*.

Produção de biofilme	*A. denitrificans* (n=1/DO_{590})	*A. insolitus* (n=3/ DO_{590})	*A. piechaudii* (n=3/ DO_{590})
Fraca	**-**	**1 (0,233)**	**-**
Moderada	**-**	**-**	**1 (0,323)** **1 (0,507)**
Forte	**1 (2,386)**	**1 (1,465)** **1 (2,014)**	**1 (2,047)**

DO – Densidade ótica

3.7 **Motilidades**

3.7.1 Determinação da motilidade do tipo *swimming* e *swarming* em amostras de *A. xylosoxidans*

O teste da motilidade tipo *swimming* foi positivo para 118 (96,7%) amostras de *A. xylosoxidans*. O diâmetro dos halos de turbidez variou de 1,2 a 7,5 cm sendo que 19 (15,5%) amostras apresentaram exclusivamente este tipo de motilidade e quatro foram negativas.

No teste de motilidade tipo *swarming*, 99 (81%) amostras foram positivas, em tais amostras também se verificou a motilidade do tipo *swimming,* concomitantemente. A variação do diâmetro das zonas de turbidez, que se formaram a partir do ponto de inoculação, foi de 1,0 a 7,5 cm. Vinte e três (19%) amostras não apresentaram este tipo de mobilidade, entretanto, 19 apresentaram motilidade exclusivamente do tipo *swimming*. Somente quatro amostras foram negativas para ambos os testes.

Comparando esses resultados com a formação de biofilme, observou-se que a maioria das amostras (n=87) foi forte produtora de biofilme e apresentou ambos os

tipos de motilidade. Onze amostras demonstraram apenas motilidade do tipo *swimming* e três amostras não apresentaram nenhum tipo de motilidade, embora capazes de formar biofilme forte. A Tabela 14 mostra a correlação entre a capacidade de formação de biofilme e os diferentes tipos de motilidade.

Tabela 14: Correlação entre produção de biofilme e os tipos de motilidade *swarming* e *swimming* nas 122 amostras de *A. xylosoxidans.*

Produção de biofilme	***A. xylosoxidans* (n=122)**				
	***Swa* N+**	***Swa* N -**	***Swi* N+**	***Swi* N -**	**Swa+Swi N+**
Fraca (1)	**-**	**-**	**-**	**-**	**1**
Moderada (20)	**-**	**9**	**8**	**1**	**11**
Forte (101)	**-**	**14**	**11**	**3**	**87**

Swa= Swarming; Swi= Swimming;
Swa+Swi= Swarming + Swimming;
N= número de amostras
+ = resultado positivo
- = resultado negativo

Os resultados da correlação entre as amostras classificadas como fortes formadoras de biofilme e portadoras de motilidade do tipo *swarming* e *swimming* concomitantemente, foram estatisticamente significativos, com valor de P= 0.0045 utilizando teste Exato de Fisher.

Em relação aos resultados das amostras classificadas como moderadas produtoras de biofilme, quando comparadas à produção de ambos os tipos de motilidade e submetidas ao mesmo teste estatístico, não houve uma associação significativa.

3.7.2 Determinação da motilidade do tipo *swimming* e *swarming* em *Achromobacter* não *xylosoxidans*

A amostra de *A. denitrificans* foi positiva para ambos os testes de motilidade *swimming e swarming*, apresentando diâmetro dos halos e zonas de turbidez de 5,5 e 1,6 cm, respectivamente.

Nas três amostras de *A. insolitus,* o teste da motilidade tipo *swimming* foi positivo. O diâmetro dos halos de turbidez variou de 2,0 a 6,0 cm. Em duas amostras observamos concomitância com o tipo de motilidade *swarming* (com diâmetro das zonas de turbidez de 1,5 e 1,6 cm). Essas amostras demonstraram forte capacidade de formação de biofilme. Uma amostra apresentou exclusivamente motilidade do tipo *swimming*, tal amostra foi considerada fraca formadora de biofilme.

As três amostras de *A. piechaudii* também foram positivas para o teste de mobilidade tipo *swimming*, com o diâmetro dos halos de turbidez variando de 4,2 a 7,5 cm. Duas dessas amostras foram simultaneamente positivas no teste de mobilidade tipo *swarming*, com diâmetro das zonas de turbidez de 1,2 e 1,3 cm. Essas amostras apresentaram moderada capacidade de formação de biofilme. A única amostra que apresentou exclusivamente motilidade do tipo *swimming*, foi considerada forte formadora de biofilme (Tabela 15).

Tabela 15: Correlação entre produção de biofilme e os tipos de mobilidade *swarming* e *swimming* em sete amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans*

Produção de biofilme	***A. denitrificans* (n=1)**			***A. insolitus* (n=3)**			***A. piechaudii* (n=3)**		
	***Swa* N +**	***Swi* N +**	**Swa+Swi N+**	***Swa* N +**	***Swi* N +**	**Swa+Swi N+**	***Swa* N +**	***Swi* N +**	**Swa+Swi N+**
Fraca	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Moderada	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Forte	-	-	1	-	-	2	-	1	-

Swa= Swarming; Swi= Swimming;
Swa+Swi= Swarming + Swimming;
N= número de amostras
+ = resultado positivo
- = resultado negativo

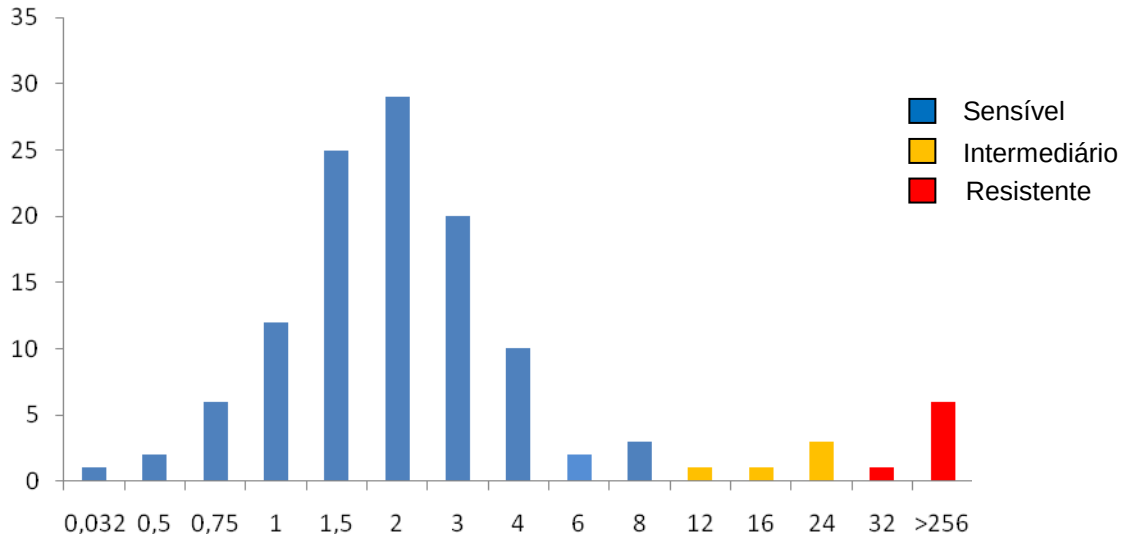
3.8 **Determinação da Concentração Inibitória Mínima**

3.8.1 Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos para *A. xylosoxidans*

A determinação da CIM das 122 amostras *A. xylosoxidans* em condições de crescimento planctônico foi feita pelo método de gradiente de difusão (Etest®) para os antimicrobianos: CAZ, CIP, IMP e SUT.

A maioria das amostras foi susceptível para CAZ (90,1%, n=110), com 60% (n=74) apresentando CIM entre 1,5 e 3,0 μg/mL. Cinco (4,2%) amostras apresentaram resistência intermediária (CIM de 12 a 24μg/mL) e sete (5,8%) revelaram resistência (CIM de 32 e >256μg/mL). A Figura 1 mostra a distribuição da CIM para CAZ nas amostras testadas.

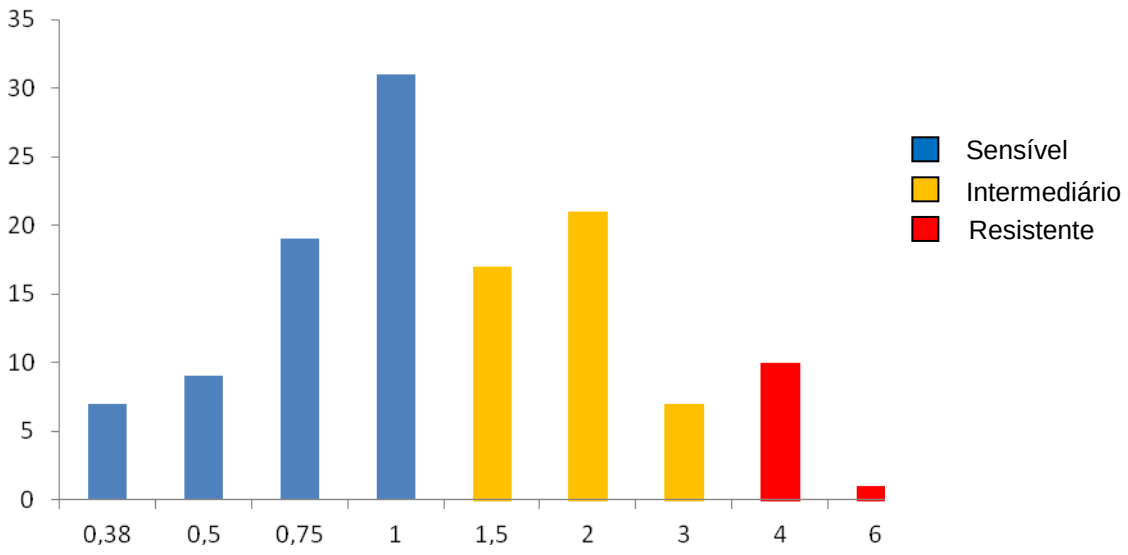
Figura 1: Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para ceftazidima em 122 amostras de *A. xylosoxidans*



Em relação à CIP, 66 (54%) amostras foram susceptíveis a este antimicrobiano, apresentando CIM entre 0,38 e 1μg/mL, 75,8% dessas amostras (n=50) com CIM de 0,75 e 1μg/mL. Resistência intermediária foi observada em 45

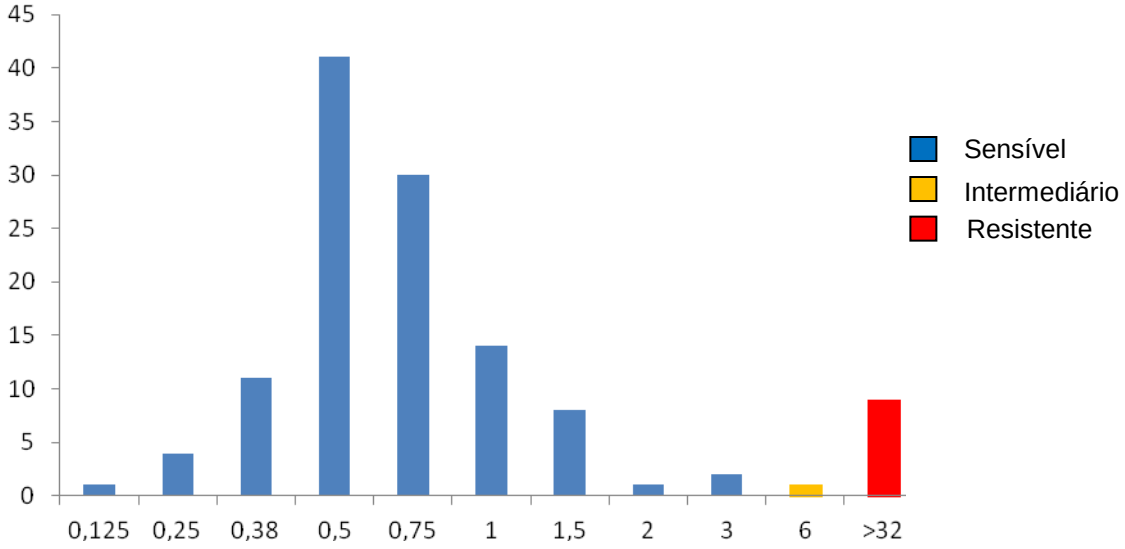
(37%) amostras, com CIM de 1,5 a 3μg/mL. Apenas 11 (9%) amostras foram resistentes a CIP, com CIM de 4 e 6μg/mL. A distribuição destas CIM para CIP são mostradas na Figura 2.

Figura 2: Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para Ciprofloxacina em 122 *A. xylosoxidans*



A maioria das amostras (n=112; 91,8%) foi suspcetível ao antimicrobiano IMP, com CIM de 0,125 a 3μg/mL, as CIM de 0,50 e 0,75μg/mL foram as mais frequentes, observadas em 41 (36,6%) e 30 (26,8%) amostras. Nove (7,4%) amostras foram resistentes a este antimicrobiano e todas apresentaram CIM >32μg/mL. Apenas uma (0,8%) amostra mostrou resistência intermediária ao IMP, pertencente ao grupo clonal C (Figura 3).

Figura 3: Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para imipenem em 122 amostras de *A. xylosoxidans*



A análise da CIM de SUT mostrou que 87,7% (n=107) foram sensíveis (CIM ≤ 2μg/mL), as CIM de 0,047 e 0,064μg/mL foram as mais frequentes, observadas em 17 e 22 destas amostras, respectivamente. O restante das amostras (12,3%, n=15) foi resistente, com CIM de 6 a >32μg/mL e a maioria delas (n=12) com CIM >32μg/mL. A distribuição das CIM para SUT são mostradas na Figura 4.

Os percentuais de amostras não sensiveis aos antimicrobianos estudados são mostrados na Tabela 16.

Figura 4: Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas para sulfametoxazol/trimetoprim em 122 amostras de *A. xylosoxidans*

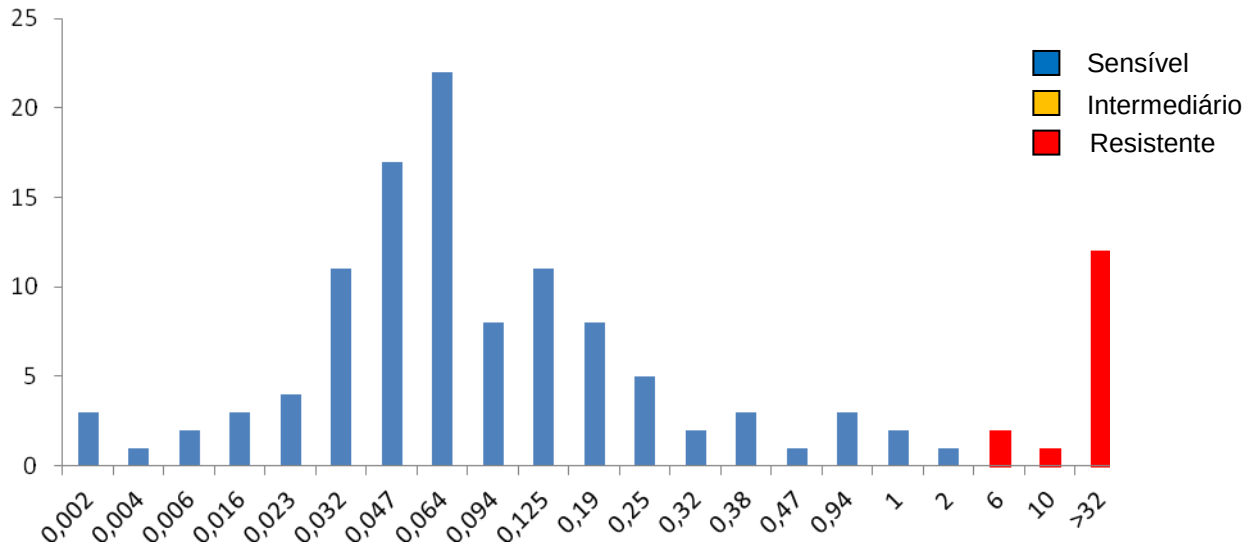


Tabela 16: Percentual de amostras não sensiveis aos antimicrobianos em 122 amostras de *A. xylosoxidans*

Antimicrobianos	Não Sensíveis (%)
Ciprofloxacina	**46**
Sulfametoxazol/Trimetoprim	**12,3**
Ceftazidima	**10**
Imipenem	**8,2**

3.8.2 Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos em sete amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans*

A amostra de *A. denitrificans,* as três amostras de *A. insolitus* e as três amostras de *A. piechaudii* foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. A Tabela 18 mostra a CIM de todos antimicrobianos testados nas diferentes espécies de *Achromobacter* spp.

Tabela 17: Concentração Inibitória Mínima para os antimicrobianos testados em sete amostras de *Achromobacter não xylosoxidans*

Antimicrobianos	***A. denitrificans*** **n=1**	***A. insolitus*** **n=3**	***A. piechaudii*** **n=3**
	CIM (μg/mL)	**CIM (μg/mL)**	**CIM (μg/mL)**
Ceftazidima	**0,25**	**0,19** **0,25** **0,38**	**0,125** **0,25(n=2)**
Ciprofloxacina	**0,38**	**0,19** **0,25(n=2)**	**0,19** **0,38** **0,50**
Imipenem	**0,38**	**0,19** **0,25** **0,38**	**0,25** **0,50** **0,75**
Sulfametoxazol/Trimetoprim	**0,25**	**0,125** **0,47** **0,64**	**0,016** **0,023** **0,25**

3.8.3 Distribuição de marcadores de resistência entre os grupos clonais de *Achromobacter* spp.

Doze dos 22 grupos clonais caracterizados apresentaram amostras de *A. xylosoxidans* não sensíveis a pelo menos uma das classes de antimicrobianos analisados (Tabela 18).

Amostras não sensíveis a CIP foram observadas em dez grupos clonais, sendo este o marcador de maior distribuição dentre os perfis clonais. Em oito desses grupos clonais o percentual foi maior que 48,5%, com destaque para os grupos E e

Q que estão relacionados a colonizaçâo crônica e a transmissibilidade cruzada entre irmãos, e ainda, para o grupo G, que foi responsável por um surto nesses pacientes.

O segundo marcador de maior ocorrência dentre os grupos clonais foi SUT presente em sete grupos. Entre esses também estavam os grupos E, Q e G. Os grupos H e J apresentaram todas as suas amostras resistentes a SUT. Tais clones foram responsáveis por colonização intermitente.

A resistência a IMP e CAZ foi observada em um número menor de grupos clonais, presentes em dois e três grupos, respectivamente, ambos do mesmo paciente. Dentre as amostras resistentes a IMP, oito (88,9%) pertencem ao mesmo clone, o clone F, que é relacionado a colonizaçao persistente em um paciente, e que também apresenta alta resistência a CAZ, 90% das amostras desse grupo clonal (Tabela 9).

O outro grupo clonal não sensível ao IMP foi o Q, também relacionado a cronicidade, mas em outros pacientes, que apresentou apenas uma amostra resistente.

De maneira geral, observamos um predomínio de amostras não sensíveis a uma determinada droga entre os grupos clonais relacionados a colonização crônica nos pacientes, como os grupos E e Q, que mostraram maior percentual de amostras não sensíveis à CIP. Entretanto, o grupo F apresentou percentuais elevados de amostras não sensívieis a dois antimicrobianos, IMP e CAZ.

O grupo clonal Q foi o que mostrou amostras não sensíveis aos quatro antimicrobianos, seguidos dos grupos E e F com amostras resistentes a três antimicrobianos.

Entre os grupos clonais de não *A. xylosoxidans*, todas as amostras foram susceptíveis aos antimicrobianos estudados.

Tabela 18: Distribuição de amostras não sensíveis entre os grupos clonais de amostras de *Achromobacter xylosoxidans*.

Grupo Clonal (n)	IMP (n)	CIP (n)	CAZ (n)	SUT (n)
A(3)				
B(1)				
C(4)				
D(1)				
E(17)		14	1	1
F(11)	8	1	10	
G(28)		15		1
H(4)		1		4
I(1)				
J(2)		2		2
K(5)		3		
L(1)		1		
M(1)				
N(2)		2		
O(2)				
P(1)				1
Q(33)	1	16	1	5
S(1)				
U(1)				
V(1)				1
X(1)				
Z(1)		1		

3.9 **Detecção fenotípica da produção de carbapenemases**

Todas as amostras foram submetidas ao Teste de Hogde modificado para a verificação da produção de carbapenemases e apresentaram resultados negativos.

3.10 **Detecção de genes associados à resistência aos beta-lactâmicos**

3.10.1 Detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamase

Utilizando a metodologia da PCR não foi detectada a presença dos genes bla_{SPM-1}e bla_{VIM-2} entre todas as amostras testadas e 11 amostras de *A. xylosoxidans* foram positivas para IMP-1 (9%). A maioria (n=9) foi resistente ao imipenem. Tais amostras pertenciam ao grupo clonal F e foram submetidas ao sequenciamento dos fragmentos obtidos na PCR, entretanto, esse resultado não foi confirmado.

3.10.2 Detecção de genotípica de carbapenemases

Todas as amostras do estudo foram submetidas à técnica de PCR para a detecção do gene bla_{KPC-2}. Não foi constatada a presença deste gene entre estas amostras.

3.11 **Relação entre fatores de virulência, resistência e grupos clonais**

3.11.1 Análise da relação entre fatores de virulência, CIMs e grupos clonais em pacientes com colonização ocasional por *A. xylosoxidans*

A maioria dos pacientes (33 dos 38 pacientes) foi colonizada por *A. xylosoxidans* de forma intermitente ou em isolamento único, sendo caracterizados 15

grupos clonais exclusivos por paciente e sete encontrados entre pacientes distintos, três ocorrendo também entre pacientes cronicamente colonizados.

Foi observado um alto nível de sensibilidade entre essas amostras às drogas estudadas, a exceção do grupo clonal G, que apresentou 53,5% de suas amostras não sensíveis à CIP.

Este clone foi responsável por um surto constatado em um período isolado do estudo, sem nova observação posteriormente (Pereira *et al*., 2011), sendo encontrado em 57,9% dos pacientes (22 dos 38 pacientes). Foram analisadas 28 amostras desse grupo clonal, e sua maioria apresentou forte capacidade de formação de biofilme e os dois tipos de motilidades, *swarmming* e *swimming*, concomitantemente.

Os demais grupos clonais apresentaram de maneira geral alto percentual de susceptibilidade a todos ou quase todos os antimicrobianos (Tabela 18), forte capacidade de formação de biofilme associado à expressão de ambos os tipos de motilidade, simultaneamente.

3.11.2 Análise da relação entre fatores de virulência, CIMs e grupos clonais em pacientes colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans*

Cinco pacientes com FC foram caracterizados como colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans.* De um modo geral, apresentaram clones esporádicos antes do estabelecimento da cronicidade que se caracterizava pelo encontro de um único grupo clonal (PEREIRA *et al*., 2011).

Os resultados dos testes de motilidade, biofilme e CIM das amostras de *A. xylosoxidans* encontradas nos pacientes cronicamente colonizados são mostrados na Tabela 20.

No paciente 13, foram analisadas 18 culturas, durante quatro anos. Observou-se a presença de quatro grupos clonais, com predomínio do grupo clonal Q (n=15; 83%).

Dentre essas amostras, a maioria (n=10) apresentou concomitância dos tipos de mobilidade *Swarmming* e *Swimming*. Em relação à capacidade de formação de biofilme, 13 amostras mostraram-se como fortes formadoras dessa estrutura, sendo

10 destas positivas para ambos os tipos de mobilidade. Duas amostras foram capazes de formar biofilme moderadamente, as mesmas também apresentaram ambos os tipos de mobilidades simultaneamente.

Em relação à CIM, quatro amostras se mostraram resistentes ao antimicrobiano SUT, três dessas amostras apresentaram resistência à altos níveis dessa droga (>32µg/mL), Todas foram fortes formadoras de biofilme e apresentaram ambos os tipos de mobilidades, concomitantemente.

Resistência intermediária foi observada em cinco amostras para o antimicrobiano CIP. Uma amostra era moderada formadora de biofilme e expressando ambos os tipos de motilidades. Quatro amostras apresentaram forte capacidade de formação de biofilme, três dessas demonstraram simultaneamente os dois tipos de motilidades. As amostras intermitentes dos grupos clonais I, F e G foram moderadas ou fortes produtoras de biofilme e portadoras dos dois tipos de mobilidades. Todas as amostras foram consideradas sensíveis aos antimicrobianos testados.

No paciente 16, foram analisadas 19 culturas que mostraram dois grupos clonais distintos durante o período do estudo, em 15 culturas observou-se unicamente o clone Q, sendo então estabelecido como colonizador crônico nesse paciente. Todas as amostras desse clone apresentaram os dois tipos de motilidades de forma concomitante, sendo 13 formadoras de biofilme forte e duas moderado.

A CIM para CIP mostrou que a maioria das amostras (n=10) apresentou resistência intermediária, oito delas demonstraram forte capacidade de formação de biofilme, apenas duas demonstraram moderada capacidade de formação dessa estrutura. O restante das amostras foi sensível a esta droga (n=5), mas também eram fortes produtoras de biofilme. Todas essas amostras expressavam ambos os tipos de motilidades. Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos IMP, SUT e CAZ.

O grupo clonal G foi observado em quatro culturas, antes do estabelecimento da cronicidade pelo grupo clonal Q. Todas as quatro amostras foram fortes formadoras de biofilme, expressando mobilidades dos tipos s*warmming* e s*wimming*, concomitantemente. Essas amostras foram ainda sensíveis, à IMP, SUT e CAZ. Duas amostras apresentaram sensibilidade intermediária à CIP, ambas fortes formadoras de biofilme e com os dois tipos de mobilidades.

Das 14 culturas analisadas do paciente 23, foi observada a presença de cinco grupos clonais distintos durante o período analisado, sendo em 10 culturas observados unicamente o clone F, responsável então pela cronicidade neste paciente. Destas, nove amostras apresentaram simultaneamente os dois tipos de mobilidade, e foram também fortes formadoras de biofilme.

Amostras deste grupo clonal foram às únicas com resistência a IMP (n=8) e (n=10) foram não sensíveis a CAZ. Dentre tais amostras, nove foram forte produtoras de biofilme. Essas amostras não apresentaram resistência aos demais antimicrobianos testados (SUT e CIP).

Os grupos clonais S, G, E e Q foram encontrados em 4 culturas e trataram-se de episódios isolados que ocorreram antes da caracterização da cronicidade, estabelecida pelo clone F.

A amostra pertencente ao clone S apresentou os dois tipos de mobilidades testadas no estudo e mostrou moderada capacidade de formação de biofilme. As amostras foram sensíveis aos antimicrobianos testados.

As amostras caracterizadas como pertencentes aos grupos clonais G, E e Q também apresentaram ambos os tipos de mobilidades estudadas e forte produção de biofilme. Quanto aos resultados da CIM, a amostra do clone G apresentou sensibilidade intermediária à CIP. A amostra do clone E, demonstrou resistência intermediária à CIP. A amostra do clone Q apresentou resistência à IMP e CAZ. Tais amostras foram sensíveis aos demais antimicrobianos testados.

Nos pacientes 38 e 39 foi observado exclusivamente o clone E nas sete culturas realizadas de cada paciente. O primeiro isolamento foi no paciente 39 e posteriormente isolado em ambos os pacientes quando se estabeleceu a colonização crônica. Cabe salientar que estes pacientes são irmãos.

Das sete amostras do paciente 38, quatro apresentaram apenas mobilidade do tipo *swimming*. As demais foram negativas nos testes de mobilidade. As sete amostras foram capazes de formar biofilme, cinco foram fortes formadoras e duas moderadas. Dentre as amostras classificadas como fortes produtoras dessa estrutura, duas não expressaram nenhum dos tipos de mobilidades e três expressaram apenas a mobilidade do tipo *swimming*. Nas amostras com capacidade moderada de formação de biofilme apenas uma apresentou a mobilidade do tipo *swimming*. Todas as amostras foram sensivei a IMP, SUT e CAZ. Entretanto, sete amostras foram não sensíveis à CIP.

Das sete amostras estudadas do paciente 39, quatro apresentaram concomitância dos dois tipos de mobilidades analisadas e três apresentam isoladamente a mobilidade do tipo *swimming*. A maioria das amostras foi classificada como forte produtora de biofilme (n=6). Dentre as amostras consideradas fortes, quatro apresentaram os dois tipos de mobilidades simultaneamente e duas apenas o tipo *swimming*.

Quatro amostras foram resistentes à CIP fortes produtoras de biofilme. Três apresentavam concomitância de ambos os tipos de mobilidades. Duas amostras mostraram sensibilidade intermediaria a essa droga, às quais eram fortes formadoras de biofilme, entretanto, apresentaram apenas a mobilidade do tipo *swimming*. Todas as amostras foram sensíveis à IMP e SUT, e apenas uma amostra apresentou sensibilidade intermediária à CAZ.

Tabela 19: Comparação entre atributos de virulência, CIM e relação clonal das amostras de pacientes cronicamente colonizados por *A. xylosoxidans*

Paciente	Amostras (n)	Clone	Mobilidades			Biofilme			CIM			
			Swa N+	*Swi* N+	Swa+Swi N+	Fraco	Moderado	Forte	IMP	SUT	CIP	CAZ
13	18	F(1)	-	-	1	-	-	1	0.50	0.032	1.5	3
		G(1)	-	-	1	-	-	1	0.75	0.064	0.75	2
		I (1)	-	-	1	-	1	-	0.75	0.064	0.75	2
		Q(15)	-	4	10	-	2	13	0.38(2)	0.047(2)	0.50(1)	0.50(1)
									0.50(5)	0.064(1)	0.75(2)	0.75(3)
									0.75(3)	0.125(1)	1(7)	1.5(2)
									1(4)	0.19(2)	2(4)	2(7)
									1.5(1)	0.25(3)	3(1)	3(3)
										0.47(1)		
										2(1)		
										6(1)		
										>32(3)		
16	19	G(4)	-	-	4	-	-	4	0.50(1)	0.032(1)	0.75(1)	1(1)
									0.75(1)	0.047(1)	1(1)	1.5(1)
										0.094(2)	1.5(1)	2(1)
											3(1)	3(1)
		Q(15)	-	-	15	-	2	13	0.38(1)	0.016(1)	0.38(1)	0.50(1)
									0.50(3)	0.047(2)	0.75(1)	1.5(4)
									0.75(2)	0.064(6)	1(3)	2(8)
									1(4)	0.094(3)	1.5(4)	3(1)
									1.5(5)	0.125(2)	2(4)	6(1)
										0.25(1)	3(2)	
23	14	S(1)	-	-	1	-	1	-	1	0.047	0.38	1.5
		G(1)	-	-	1	-	-	1	0.75	0.047	1.5	1.5
		E(1)	-	-	1	-	-	1	0.50	0.032	2	4
		Q(1)	-	-	1	-	-	1	>32	0.004	1	>256
		F(10)	-	1	9	1	-	9	0.25(1)	0.002(3)	0.38(1)	16(1)
									0.38(1)	0.006(2)	0.50(5)	24(3)
									>32(8)	0.016(1)	0.75(3)	32(1)
										0.032(2)	1(1)	>256(5)
										0.094(2)		
38	7	E	-	4	-		2	5	0.38 (1)	0.032(3)	3(2)	3(4)
									0.50 (5)	0.047(1)	4(4)	4(2)
									0.75 (1)	0.064(2)	6(1)	8(1)
										0.094(1)		
39	7	E	-	3	4	-	1	6	0.38(2)	0.032(1)	1(1)	2(1)
									0.50(4)	0.047(4)	2(2)	3(2)
									0.75(1)	0.064(1)	4(4)	4(3)
										0.125(1)		12(1)

Resistente Intermediário

A distribuição dos grupos clonais e caracteristicas de virulência e resistência em todas as amostras estudadas dos pacientes colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans*, são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20: Características de virulência e resistência em amostras de pacientes colonizados cronicamente por *Achromobacter xylosoxidans*.

Paciente	Origem	Data	Clone	Motilidade	Biofilme		Perfil de susceptibilidade			
				Swa + Swi	Moderado	Forte	IMP	CIP	CAZ	SUT
13	IFF	22/7/2004	Q			+	S	S	S	S
		28/10/2004	Q			+	S	S	S	S
		27/1/2005	I		+		S	S	S	S
		21/7/2005	G	+		+	S	S	S	S
		4/10/2005	Q	+		+	S	S	S	S
		3/11/2005	Q			+	S	I	S	S
		3/2/2006	Q	+		+	S	S	S	S
		7/2/2006	Q	+		+	S	S	S	S
		15/2/2007	Q			+	S	S	S	S
		29/3/2007	Q	+		+	S	S	S	S
		19/7/2007	Q	+	+		S	S	S	S
		23/8/2007	Q	+	+		S	I	S	S
		20/9/2007	F	+		+	S	I	S	S
		18/10/2007	Q	+		+	S	S	S	S
		22/11/2007	Q	+		+	S	S	S	R
		6/3/2008	Q	+		+	S	I	S	R
		5/6/2008	Q	+		+	S	I	S	R
		11/9/2008	Q	+		+	S	I	S	R
16	IFF	30/10/2003	Q	+		+	S	S	S	S
		1/7/2004	Q	+	+		S	I	S	S
		31/3/2005	G	+		+	S	I	S	S
		19/8/2005	G	+		+	S	S	S	S
		18/8/2005	G	+		+	S	S	S	S
		4/10/2005	G	+		+	S	I	S	S
		27/10/2005	Q	+	+		S	I	S	S
		3/1/2006	Q	+		+	S	I	S	S
		15/2/2007	Q	+		+	S	I	S	S
		29/3/2007	Q	+		+	S	S	S	S
		28/6/2007	Q	+		+	S	I	S	S
		19/7/2007	Q	+		+	S	I	S	S
		23/8/2007	Q	+		+	S	I	S	S
		20/9/2007	Q	+		+	S	S	S	S
		11/10/2007	Q	+		+	S	S	S	S
		17/1/2008	Q	+		+	S	I	S	S
		17/4/2008	Q	+		+	S	I	S	S
		21/7/2008	Q	+		+	S	I	S	S
		27/11/2008	Q	+		+	S	S	S	S
23	IFF	1/3/2007	F	+	+		S	S	S	S
		3/4/2007	F	+		+	S	I	S	S
		24/2/2005	S	+		+	R	S	I	S
		9/5/2005	G	+		+	R	S	I	S
		11/7/2007	F	+		Fraco	R	S	I	S
		23/8/2007	E	+		+	S	I	S	S
		26/9/2007	Q	+		+	R	S	R	S
		28/11/2007	F	+		+	R	S	I	S
		30/1/2008	F	+		+	R	S	R	S
		9/4/2008	F	+		+	R	S	R	S
		28/5/2008	F	+		+	R	S	R	S
		25/6/2008	F			+	R	S	R	S
		30/7/2008	F	+		+	S	S	R	S
		16/10/2008	F			+	S	S	R	S
38	HUPE	14/2/2007	E			+	S	I	S	S
		22/6/2007	E		+		S	R	S	S
		24/8/2007	E			+	S	R	S	S
		19/12/2007	E			+	S	R	S	S
		25/3/2008	E		+		S	R	S	S
		9/9/2008	E			+	S	I	S	S
		30/10/2008	E			+	S	R	S	S
39	Externo	25/11/2004	E	+		+	S	R	S	S
		14/2/2007	E	+		+	S	S	S	S
		24/8/2007	E			+	S	I	I	S
		7/1/2008	E	+		+	S	R	S	S
		28/2/2008	E	+		+	S	R	S	S
		9/9/2008	E			+	S	I	S	S
		30/10/2008	E		+		S	R	S	S

4 DISCUSSÃO

A epidemiologia das infecções pulmonares em pacientes com FC vêm se tornando mais complexa nas últimas duas décadas, pois além dos patógenos tradicionais como *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus* e CBc, muitos outros têm sido observado nas secreções respiratórias destes pacientes e alguns destes já apontados como “novos patógenos”. A maioria dessas bactérias é do grupo dos BGN-NF, sugerindo que o pulmão desses pacientes seja particularmente susceptível a colonização por esses microrganismos ambientais (FOWERAKER, 2009).

A baixa incidência dessas bactérias em outras infecções humanas, associada à grande similaridade fenotípica entre elas, traz inúmeros problemas para a sua correta identificação e, consequentemente, para o conhecimento real da epidemiologia das infecções na FC (SAIMAN *et al*., 2001).

Nas últimas décadas, o gênero *Achromobacter*, sobretudo *A. xylosoxidans*, tem se destacado como um importante patógeno relacionado à FC. Nestes pacientes, infecções crônicas pulmonares causadas por *A. xylosoxidans* são consideradas um problema crescente (HANSEN *et al*., 2013).

4.1 **Identificação**

Atualmente, o gênero compreende 15 espécies, nove destas descritas muito recentemente. Devido a propriedades fenotípicas semelhantes entre algumas destas espécies, há a necessidade de utilização de uma ampla variedade de testes fenotípicos e/ou genotípicos para a correta caracterização desses microrganismos, dificultando a identificação em nível de espécie em laboratórios de microbiologia clínica (RIDDERBERG, WANG & NØRSKOV-LAURITSEN, 2012; SPILKER, VANDAMME & LIPUMA, 2012; VANDAMME *et al*., 2013a; VANDAMME *et al*., 2013b).

A utilização de metodologias moleculares é imprescindível para a correta identificação das espécies do gênero *Achromobacter*, entretanto, também apresentam dificuldades em função da alta similaridade genética entre estas

espécies. O sequenciamento do gene *rrs* é uma técnica amplamente utilizada como ferramenta na diferenciação de microrganismos reconhecidos como de difícil identificação (COENYE *et al*., 2003).

Um dos pontos críticos do sequenciamento do gene *rrs* é a sua análise. Quando feita por comparações com sequências genéticas depositadas livremente no *GenBank*, não se pode garantir a correta identificação da sequência depositada, pois não há nenhum tipo de controle da qualidade da informação depositada neste banco de dados público. Além disso, em função das muitas alterações taxonômicas no gênero, ao longo do tempo, sequências depositadas como sendo de uma determinada espécie podem ficar desatualizadas.

As amostras utilizadas em nosso estudo foram previamente identificadas por um amplo conjunto de testes fenotípicos e por sequenciamento do gene rrs como *A. xylosoxidans* (93,8%), uma como *A. denitrificans* e sete amostras apenas como pertencentes ao gênero *Achromobacter*.

A técnica de sequenciamento nos forneceu resultados bastante satisfatórios, identificando quase todas as amostras do estudo. No período analisado em nossa amostragem (2003-2008), havia predomínio absoluto de *A. xylosoxidans*, sendo muitas das outras espécies do gênero ainda desconhecidas. Resultados semelhantes a estudos conduzidos com amostras do mesmo período também mostraram a maior prevalência de *A.xylosoxidans* (KRZEWINSKI *et al*., 2001; KANELLOPOULOU *et al*., 2004; ZBIDEN *et al*., 2007; RASO *et al*., 2008).

Esses estudos, à época em que foram realizados, apontavam a técnica de sequenciamento do gene *rrs* como a melhor ferramenta, entre as diversas técnicas de biologia molecular na identificação dos microrganismos descritos até então (LIU *et al*., 2002). Recentemente observamos um avanço expressivo tanto na descrição de novas espécies dentro do grupo, quanto no desenvolvimento de novas técnicas moleculares, capazes de distinguir melhor ou acelerar a identificação as espécies com alta similaridade genética.

Dentre ele-las a utilização de genes descritos como intrínsecos para algumas espécies, que podem ser usados como alvos para detecção por PCR, contribuindo para facilitar a identificação desses microrganismos.

O gene de β-lactamase $bla_{oxa\text{-}114,}$ apontado como intrínseco de *A. xylosoxidans,* tem sido relatado como uma possibilidade para identificação dessa espécie (DOI *et al*., 2008). Turton *et al*. (2011) realizaram a PCR para esse gene e

em seguida o sequenciamento dos produtos de amplificação obtidos de dez amostras clínicas e amostras referência de todas as espécies do gênero *Achromobacter*, descritas até aquele momento, e também de amostras de diversos outros gêneros de BGNNF relacionados. A análise desses resultados indicou que a detecção desse gene foi encontrada apenas nas amostras de *A. xylosoxidans*.

Também submetemos todas as amostras à detecção do gene $bla_{oxa\text{-}114}$ pela PCR e observamos que a maioria se tratava de *A. xylosoxidans*, corroborando com os resultados obtidos a partir das demais técnicas de identificação utilizadas previamente (PEREIRA *et al*., 2011) e com os resultados obtidos por Turton *et al*. (2011).

Já foram descritas pelo menos 12 variantes desse gene (DOI *et al*., 2008; TURTON *et al*., 2011; AMOUREUX *et al*., 2012). Traglia *et al*. (2013) analisaram produtos de amplificação desse gene e suas variantes, obtendo a identificação de 19 amostras de *A. xylosoxidans*. Também analisaram amostras de *A. denitrificans* (n=1) e *A. piechaudii* (n=1), não obtendo produtos de amplificação para esse gene, demonstrando que as diferentes variantes do gene $bla_{oxa\text{-}114}$ não influenciam na identificação de *A. xylosoxidans* e que este gene não está presente em outras espécies do grupo. Dessa maneira, tais resultados estão em concordância com os nossos achados e também com os de Turton *et al*. (2011), entretanto, analisamos sete amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans*, um número maior de amostras que as analisadas por esses autores.

Em discordância a esses dados, outro estudo recente realizado na Espanha, que analisou amostras de pacientes com e sem FC, obtidas de um período de 10 anos, relata que todas as 15 amostras de *A. xylosoxidans* e espécies/genogrupos recentemente descritos (2a, 12, 14, 17) exibiram positividade para o gene $bla_{oxa\text{-}114}$ a partir da PCR. Tal resultado foi confirmado por sequenciamento dos produtos da PCR de três amostras de *A. xylosoxidans* e de cinco amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans.* Com base nesses resultados eles sugerem que a detecção desse gene pode não ser específico para *A. xylosoxidans* (BARRADO *et al*., 2013).

O gene $bla_{OXA\text{-}258,}$ foi recentemente descrito como um marcador específico da espécie *A. ruhlandii*, em amostras obtidas de 25 pacientes com FC. Nesse estudo sugere-se que, embora, OXA-258 se diferencie de OXA-114 e de variantes desse gene, dependendo da região amplificada do gene OXA, pode se amplificar ambos os genes, gerando erros na identificação, resultados de algumas amostras de *A.*

ruhlandii podem ser confundidos com *A. xyloxosidans*. Entretanto, isso pode ser resolvido por sequenciamento desse fragmento ou MLST (PAPALIA *et al*., 2013).

Em função das recentes descrições de novas espécies do gênero *Achromobacter,* estudos devem ser realizados visando a validação da utilização de genes intrínsecos, como $bla_{oxa\text{-}114}$ e $bla_{OXA\text{-}258.}$ A aplicação de PCR para esses genes poderia representar uma grande alternativa de ferramenta na difícil tarefa de identificar esses microrganismos, por sua simplicidade na execução e custos não tão elevados quanto os de outras técnicas moleculares.

Diante das dificuldades expressas é necessário o desenvolvimento de alternativas úteis à identificação mais precisa desses microrganismos. Diversos estudos têm apontado que a técnica ARDRA pode ser usada para identificar espécies de diferentes gêneros microbianos de difícil identificação (DENG *et al*., 1992; GÜTLER, WILSON & MAYALL, 1991; JAYARAO, DORE´ & OLIVER, 1992; VANEECHOUTTE *et al*., 1992; VANEECHOUTTE *et al*., 1993).

A fim de elucidar a identificação principalmente das sete amostras não identificadas em nível de espécie, procedemos à ARDRA. A partir de sua analise tais amostras foram identificadas. Três amostras foram compatíveis com a espécie *A. insolitus,* três com a espécie *A. piechaudii* e uma amostra com *A. xylosoxidans*. As demais amostras testadas apresentaram resultados compatíveis com os obtidos pelas outras técnicas de identificação.

Um estudo realizado por Vaneechoutte *et al.* (1995), submeteram espécies de *Acinetobacter* spp., outro representante do grupo BGNNF, reconhecidamente como de difícil identificação à ARDRA. Foram analisadas 53 amostras, incluindo amostras clínicas e cepas de referência. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram a identificação da maioria das amostras testadas. Os autores sugerem que esta técnica, por sua fácil execução e por utilizar iniciadores universal do gene do 16S rRNA, poderia ser aplicada para a identificação da maioria das espécies bacterianas.

Ribbeck-Busch *et al*., (2005) estudaram a diferenciação de 58 amostras do gênero *Stenotrophomonas* utilizando ARDRA. Os resultados obtidos possibilitaram a diferenciação entre *S. maltophilia* e *S. rhizophila,* os mesmos resultados obtidos pelo sequenciamento do gene 16S, com a vantagem dos resultados obtidos com a utilização da ARDRA serem consideravelmente mais rápidos e com menos custos.

Assim como observado nesses trabalhos, nossos resultados a partir da ARDRA permitiram a identificação de outras espécies *Achromobacter* não

xylosoxidans e a confirmação da identificação das amostras de *A. xylosoxidans*, já realizada por outras técnicas de identificação utilizadas no estudo.

Mais recentemente, pesquisas têm desenvolvido esquemas de identificação baseados na tipiicação de sequências multilocus (MLST) sugerindo que o uso desta técnica aumenta a precisão da identificação das espécies do gênero *Achromobacter.* O uso desta técnica permitiu o conhecimento de uma grande diversidade dentro desse grupo (RIDDERBERG, WANG & NØRSKOV-LAURITSEN, 2012).

Um estudo realizado na Dinamarca analisou 77 amostras de *Achromobacter* spp, incluindo sete amostras de cepas referência, oito amostras clínicas de pacientes sem FC e 56 amostras clínicas de pacientes com FC. As amostras clínicas haviam sido coletadas da Europa, Ásia e América do Sul, a fim de alcançar um conjunto geograficamente diversificado de cepas. Todas as amostras clínicas foram identificadas pelos laboratórios de origem como *A. xylosoxidans*. Após análise pela técnica MLST, observaram que as amostras provenientes de pacientes com FC eram predominantemente *A. xylosoxidans* (64%), espécies de *Achromobacter* spp. ainda não descritas à época do estudo (18%) e *A. ruhlandii* (7 %) (RIDDERBERG, WANG & NØRSKOV-LAURITSEN, 2012).

Spilker, Vandamme & LiPuma (2013) relataram em um estudo da distribuição das novas espécies de *Achromobacter* entre pacientes com FC, que incluiu 341 amostras de 86 centros de referência nos EUA a partir da técnica MLST, que *A. xylosoxidans* estava presente em 42% casos. Surpreendentemente, *A. ruhlandii* foi identificado em 23,5%. *A. dolens*, *A. insuavis* e *A*. *aegrifaciens* foram encontrados em 17%, 4,4% e 3,8%, respectivamente.

Barrado *et al*. (2013) realizaram um estudo retrospectivo com 62 pacientes com FC que estavam colonizados/infectados com *Achromobacter* spp. e que eram tratados no centro de referência Hospital Universitário 12 de Outubro (Madri, Espanha), no período entre 2002 e 2012. A caracterização molecular baseada em MLST identificou além de *A. xylosoxidans*, cinco genogrupos distintos entre 15 amostras de *Achromobacter* spp. obtidas a partir de 14 pacientes colonizados cronicamente: 10 (71,4 %) de *A. xylosoxidans* e um de cada genogrupos (7,1 %): *A*. genogrupo 2a, *A*. genogrupo 2b, *A*. genogrupo 7, *A*. genogrupo 14 e *A*. genogrupo 17.

Em conjunto os dados mostram que, independente da técnica molecular empregada, o predomínio de *A. xylosoxidans* e a emergência de outras espécies

deste grupo que também podem estar relacionadas a infecções em pacientes com FC. O melhoramento e avanço no desenvolvimento de técnicas de identificação têm colaborado significativamente para um maior conhecimento da epidemiologia desses microrganismos, justificando a necessidade de novos estudos direcionados também às espécies menos frequentes.

4.2 **Fatores de virulência**

Os biofilmes são comunidades bacterianas aderidas a uma superfície e embebidas por uma matriz extracelular polimérica secretada por seus componentes. Podem causar problemas em diversas áreas, como, na indústria, nos sistemas de distribuição de água e no processamento de alimentos. Na saúde acredita-se que essas estruturas estejam envolvidas em 65 a 80% das infecções bacterianas (DONLAN & COSTERTON, 2002; FLEMMING, 2002; FUX *et al*., 2005; WAGNER & IGLEWSKI, 2008).

A formação de biofilme tem sido apontada como importante mecanismo na persistência das bactérias em infecções pulmonares crônicas na FC. Nos pulmões desses pacientes cronicamente infectados, a formação de biofilme, torna as estratégias de tratamento muito difícil, senão impossível (JAKOBSEN *et al*., 2013). Desde que a definição formal de biofilme foi apresentada pela primeira vez (COSTERTON *et al*., 1999), o interesse por esta forma particular de crescimento bacteriano tem aumentado imensamente, tornando-se evidente que os biofilmes são o modo predominante de crescimento em várias infecções bacterianas crônicas (COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999; COSTERTON, 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002).

Muitos estudos têm demonstrado a formação de biofilme em membros do grupo dos BGN-NF, tais como, *P. aeruginosa*, patógeno reconhecidamente encontrado infectando cronicamente os pulmões dos pacientes com FC (LEE *et al*., 2005; MOSKOWITZ *et al.,* 2005; MOREAU-MARQUIS, STANTON & O'TOOLE, 2007).

Estudos de formação de biofilme *in vitro* por *P. aeruginosa* demonstram que praticamente 100% das amostras são capazes de formar biofilme, embora tenham

sido evidenciadas variações na eficiência de formação (HEAD & YU, 2004). Lee *et al*. (2005) ao estudarem a formação de biofilme em 20 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de oito pacientes com FC, encontram diferentes níveis de formação de biofilme não só entre amostras de pacientes distintos, bem como nas amostras de um mesmo paciente. Em um estudo do nosso grupo foi também revelada diversidade na produção de biofilme entre as amostras de *P.aeruginosa* obtidas de um mesmo paciente, o que provavelmente reflete um comportamento adaptado a diferentes momentos da infecção crônica (FERREIRA *et al*., 2010).

Estudos relacionados à formação de biofilme em espécies do gênero *Achromobacter* são ainda escassos. Um estudo realizado por Hansen e colaboradores (2010) com pacientes com FC, na Dinamarca, detectou a presença de biofilmes diretamente do escarro de pacientes infectados com *A. xylosoxidans, P. aeruginosa* e CBc. Sete de oito pacientes com infecção crônica por *A. xylosoxidans* e todos os pacientes com C*B*c, tiveram formas de biofilme detectáveis com estruturas semelhantes. As amostras *P. aeruginosa* mucóide também apresentaram produção de biofilme, mas com estrutura distinta. O biofilme de *A. xylosoxidans* e CBc parecia mais escuro e condensado, talvez devido à presença de DNA extracelular na matriz do biofilme, e isto poderia explicar, em parte a redução da incidência de tais bactérias na expectoração de pacientes com FC submetidos a nebulizações com DNase, demostrada em outro estudo do grupo (FREDERICKSEN *et al*., 2006).

Observamos que as 122 amostras de *A. xylosoxidans* analisadas foram capazes de formar biofilme. A maioria das amostras (n= 101; 82,8%) foi classificada como forte formadora de biofilme. Da mesma forma, Jakobsen *et al*. (2013) demonstraram ao analisarem 11 amostras obtidas de um paciente com FC entre 1996 e 2011 que *A. xylosoxidans* é capaz de formação de biofilme *in vitro.* Esta capacidade foi investigada utilizando placas de microtitulação de 96 poços de poliestireno, assim como realizado em nosso trabalho. A formação de biofilme por este método depende fortemente da capacidade da bactéria aderir à superfície polimérica das placas. Os resultados obtidos nesse estudo deixaram claro que *A. xylosoxidans* era capaz de aderir á superfície da placa, quando comparados aos resultados com PAO1. Um aumento em células aderentes foi observado após 48-96 horas de crescimento, demonstrando forte adesão, semelhante à PAO1.

Os autores também realizam o sequenciamento do genoma completo deste microrganismo, o que permitiu o esclarecimento de que *A. xylosoxidans* contém o operon *pga*ABCD , que codifica o polissacarídeo β-1,6-GlcNAc que está envolvido em ambos os tipos de adesão: adesão célula-célula e adesão à superfície celular (WANG, PRESTON & ROMEO, 2004). Baseado nessas informações foi sugerido à possibilidade de que o locus funcional de *pga*ABCD esteja relacionado à adesão célula-célula observado no padrão de formação de biofilme.

A presença de biofilmes em pacientes com FC infectados com *A. xylosoxidans* poderia explicar a dificuldade na erradicação de infecções crônicas pela antibioticoterapia. Além disso, semelhante à infecção por *P. aeruginosa*, em que a presença de biofilmes pode piorar a infecção crônica, pela provável formação de complexos imunes, inflamação e danos no tecido nestes doentes (BJARNSHOLT *et al*., 2009).

Até o momento, *A. xylosoxidans* é a espécie, dentro do gênero, mais frequentemente encontrada associada a infecções em pacientes imunocomprometidos e com FC, dominando praticamente todos os estudos relacionados ao grupo. Em nosso estudo, as amostras de A*. denitrificans, A. piechaudii e A. insolitus* também foram capazes de produzir biofilme, sendo a maioria, formadoras de biofilme forte. Até o momento, não existem relatos publicados mostrando a formação de biofilme nessas espécies.

Muitos estudos têm relacionado os diferentes tipos de motilidades bacterianas como uma exigência tanto para a formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas, como para a patogênese bacteriana (HARSHEY, 2003; OVERHAGE e*t al*., 2008). *P. aeruginosa* têm sido alvo de muitos estudos sobre motilidade, que afirmam que este microrganismo é capaz de exibir os três tipos de motilidade: *swarmming, swimming e twitching* (RASHID & KORNBERG, 2000; INOUE, SHINGAKI & FUKUI, 2007).

Um estudo recente analisou a expressão dos diferentes tipos de motilidades em amostras de *P. aeruginosa* obtidas de infecções da corrente sanguínea de pacientes sem FC, classificadas em quatro categorias de acordo com seus perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos: XDR (extensiva resistência), MDR (resistência a três classes antimicrobianas), ModR (resistência a uma ou duas classes antimicrobianas) e MultiS (susceptibilidade a todas os antimicrobianos), oriundas de um estudo multicêntrico de dez hospitais na Espanha entre 2008 e 2009. Não foram

observadas diferenças estatisticamente significativas para qualquer um dos três tipos de motilidade entre as amostras das categorias MultS e ModR, por outro lado, em contraste com as expectativas iniciais, as amostras MDR e XDR (clones de alto risco) foram associadas significativamente com defeitos na expressão dos três tipos de motilidades. Eles sugerem que essa forte associação de clones de alto risco com motilidade deficiente pode ser conduzido pela ativação de vias regulatórias específicas nessas linhagens; seleção negativa dos sistemas de motilidade metabolicamente custosos ou seleção positiva de mecanismos para evasão do sistema imune do hospedeiro, mas estas questões ainda precisam ser exploradas (MULET *et al*., 2013).

Ainda são escassos os estudos sobre a expressão de motilidade em *A. xylosoxidans*, principalmente na FC, entretanto a motilidade do tipo *swimming*, mediada por flagelos peritríquios já foi documentada em pacientes sem FC (IGRA-SIEGMAN, CHMEL & COBBS, 1980), mas nada foi descrito para os tipos de mobilidades *swarmming* ou *twitching*.

No estudo de Jakobsen e colaboradores (2013), realizado com 11 amostras de um paciente com FC, foi observado também somente o tipo de motilidade *swimming* e ainda relatada a ocorrência de 57 genes diferentes no genoma de *A. xylosoxidans*, envolvidos na motilidade do tipo flagelar.

Em nosso estudo observamos que 118 (96,7%) amostras de *A. xylosoxidans* apresentaram motilidade tipo *swimming*. Em 99 dessas amostras também observamos a mobilidade do tipo *swarmming*, concomitantemente. Apenas quatro amostras não apresentaram nenhum tipo de motilidade. A ocorrência de ambos os tipos de mobilidade estava significativamente relacionada à formação de biofilme forte nessas amostras.

Seis das sete amostras de *Achromobacter* não *xylosoxidans* também apresentaram ambos os tipos de motilidade, simultaneamente, e produção de biofilme, em sua maioria forte, o que ressalta a possibilidade de associação entre estes fatores. Entretanto, é necessário o desenvolvimento de novos estudos para melhor determinar o real valor da expressão destas estruturas por estes microrganismos emergentes.

4. 3 **Resistência**

A. xylosoxidans é intrinsecamente resistente a múltiplas drogas, ou seja, é um microrganismo "naturalmente" MDR (SAIMAN *et al*., 2001; RASO *et al*., 2008). Esta espécie é naturalmente resistente à cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, aztreonam e aos aminoglicosídeos em geral (BADOR *et al*., 2010; DUEZ *et al*., 2010). Sensibilidade aos carbapenêmicos, piperacilina, com ou sem tazobactam, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprim tem sido relatada (IGRA-SIEGMAN, CHMEL & COBBS, 1980; GLUPCZYNSKI *et al*., 1988; SAIMAN *et al*., 2001; KANELLOPOULOU *et al*., 2004; RASO *et al*., 2008). Algumas combinações de antibióticos têm mostrado aumentar a atividade antimicrobiana contra *A. xylosoxidans* incluindo cloranfenicol-minociclina, ciprofloxacina-imipenem, e ciprofloxacina-meropenem (SAIMAN *et al*., 2001).

Um estudo recente analisou a CIM por E-test ® em onze amostras de um mesmo paciente com FC, coletadas em diferentes anos (1996 a 2011), para: tobramicina, meropenem, ceftazidima, aztreonam, piperacilina, piperacilina+tazobactam, colistina, ciprofloxacina, sulfametoxazol+trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol. Foi observada resistência à maioria dos β-lactâmicos e aumento na resistência para ciprofloxacina e meropenen. Ainda apontam três genes que codificam para classe C e D de β-lactamases presentes no genoma de *A. xylosoxidans*, e a presença de β-lactamase funcional em todas as amostras (JAKOBSEN *et al*., 2013).

A determinação da CIM para as 122 amostras de *A. xylosoxidans* analisadas em nosso estudo revelaram que a maioria das amostras é susceptível: CAZ (86%, n=105), IMP (91,8%, n=112), SUT (87,7%, n=107) e CIP, (54%, n=66).

O maior percentual de amostras não sensíveis em nossa amostragem foi observado para CIP. Onze (9%) amostras foram resistentes a CIP, com CIM de 4 e 6μg/mL e em 45 (37%) amostras, resistência intermediária foi observada com CIM de 1,5 a 3μg/mL. Nossos resultados estão de acordo vários estudos que relatam o aumento crescente da resistência a CIP em pacientes com FC. (SAIMAN *et al*., 2001; RASO *et al*., 2008; JAKOBSEN *et al*., 2013).

Em relação as amostras de outras espécies do gênero *Achromobacter*, todas foram susceptíveis aos antimicrobianos testados. Apesar do reconhecimento recente

de diversas espécies nesse gênero, os estudos relacionados ao assunto resumem-se a taxonomia, portanto, ainda são inexistentes dados sobre os perfis de susceptibilidade à antimicrobianos.

A. xylosoxidans têm demonstrado resistência contra as principais classes de antimicrobianos amplamente utilizados em tentativas para eliminar microrganismos do ambiente pulmonar dos pacientes com FC, constantemente acometidos por infecções bacterianas. Tal capacidade de desenvolver resistência enfatiza a necessidade de investigação deste microrganismo, tanto para tentar encontrar meios de controlar a propagação do aumento do número de infecções nosocomiais, quanto para combater infecções crônicas atribuídas a este patógeno (JAKOBSEN *et al*., 2013).

Destacamos que embora a amostragem analisada em nosso estudo tenha apresentado altos índices de sensibilidade às drogas estudadas em algumas foram observadas amostras não sensiveis simultaneamente a duas classes de antimicrobianos. A maioria desses casos envolvendo resistência aos carbapenêmicos, quinolonas e sulfonamidas. À exceção da última classe, as demais também têm sido associadas à resistência em *A. xylosoxidans* em outros estudos (VAY *et al*., 2005; TRAGLIA *et al*., 2012).

A pequena taxa de amostras multirresistentes em nosso trabalho difere do que tem sido relatado na literatura internacional (JAKOBSEN *et al*., 2013). Essas diferenças podem ser atribuídas ao número e tipos de classes antimicrobianas escolhidas para o estudo, inclusive classes na qual para *A. xylosoxidans* já foram determinadas seu caráter intrínseco, e por essa razão foram excluídos do nosso trabalho. Além disso, não são esclarecidos os critérios utilizados para classificação de multirresistência.

Embora tenha se atribuído um padrão de multirresistência para *A. xylosoxidans* aos agentes antimicrobianos em estudos anteriores (SAIMAN *et al*., 2001), comitês internacionais de padronização de testes de susceptibiliade à antimicrobianos ainda não estabeleceram pontos de corte para os métodos de difusão em agar e mesmo para determinação da CIM. Como não existem critérios estabelecidos, nos documentos normativos para esse gênero, tem-se utilizado aqueles definidos para "não enterobactérias". Dessa forma a classificação do perfil de susceptibilidade para *Achromobacter* não são específicos, como deveriam ser, o

que pode levar a diferenças na análise e padronização de critérios utilizados nos trabalhos científicos.

Um estudo realizado na Argentina analisou susceptibilidade antimicrobiana de 92 amostras de *Achromobacter* spp. à 18 agentes antimicrobianos, comparando diferentes técnicas, como difusão em agar , E-test® e diluição em ágar, para tentar determinar os pontos de corte para o método de difusão em agar (este mais acessível a laboratórios clínicos). Nesse estudo foram sugeridos pontos de corte apenas para carbapênemicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas. Mas, não foram sugeridos pontos de corte para todos os antimicrobianos testados no estudo (ALMUZARA *et al*., 2010). Outros estudos devem ser desenvolvidos para que sejam estabelecidos tais pontos de corte, colaborando para uma interpretação mais específica da susceptilidade aos antimicrobianos neste grupo

O elevado percentual de amostras multissensíveis encontrado em nossa amostragem para *Achromobacter* spp também tem sido observado em trabalhos desenvolvidos em nosso grupo para amostras de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes com FC, contrariamente ao descrito na literatura internacional sugerindo um perfil epidemiológico distinto (FERREIRA *et al*., 2010; ROCHA *et al*., 2013).

Ressaltamos que, embora um microrganismo apresente alto nível de sensibilidade a antimicrobianos, não se pode excluir seu potencial em expressar fatores de virulência. Amostras de *S. aureus* são exemplos dessas caracteristica. Amostras de *S. aureus* meticilina resistente - CA-MRSA (obtidas da comunidade) são em geral, mais sensíveis e mais virulentas que amostras de HA-MRSA (amostras de origem hospitalar), que são, geralmente, mais resistentes e menos virulentas, característica observada também com amostras de MRSA isoladas de pacientes com FC atendidos nos mesmos centros incluídos no presente estudo (LIMA *et al*., 2013).

Apesar de alguns estudos considerarem *A. xylosoxidans* multirresistente, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de aquisição dessa resistência e sua importância para o prognóstico dos pacientes colonizados cronicamente por este microrganismo. Traglia *et al*., (2012) contribuíram na elucidação dessa problemática ao analisarem 24 amostras com perfil de multirresistência, incluindo resistência a cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Todas as amostras foram tambem sensíveis a tazobactam e carbapenêmicos. Foi observada

em 10 amostras (42%) a presença do plasmídeo *Inc*P, um importante plasmídeo transmissível na disseminação de genes de resistência em todo o mundo em dez amostras (nove nosocomiais e uma de paciente com FC).

Além disso, também encontraram as sequências de inserção (IS), IS26 (n=2) e IS440 (n=7), duas ISs frequentemente associadas à genes resistência antimicrobiana, além de integrons de classes 1 e 2. No cassete gênico do integron de classe 1 foram identificados genes de resistência à aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib* e *addA1*), à trimetoprim (dfrA1 e dfrA16) e para β-lactamases (bla_{OXA-2}). No integron de classe 2, também foi encontrado o gene *aadA1* sendo carreado. Este seria o primeiro trabalho a descrever esse tipo de integron em *Achromobacter*. Encontraram também em todas as amostras estudadas o gene bla_{ampC}, previamente descrito (SHIN *et al*., 2005) confirmando sua natureza intrínseca.

Jakobsen *et al*. (2013) também contribuíram nesta questão ao apontarem três genes que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos estão presentes no genoma de *A. xylosoxidans*: aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH-VI), a qual medeia a resistência à canamicina e vários outros aminoglicosídeos relacionados (MARTIN, JULLIEN & COURVALIN, 1988), aminoglicosídeo fosfotransferase e aminoglicosídeo N3-acetiltransferase, que têm sido demonstradas modificando uma série de aminoglicosídeos, incluindo tobramicina e gentamicina (POOLE, 2005).

Estudos como esses sugerem que *A. xylosoxidans* tem capacidade de transportar sequências de inserção, plasmídeos e integrons, elementos associados à transferência horizontal de genes, normalmente também observados em amostras clínicas de outros microrganismos Gram Negativos. Dessa forma, *A. xylosoxidans* poderia ser considerado um reservatório de elementos transferíveis, contribuindo para disseminação e aquisição de mecanismos de resistência dentro do ambiente hospitalar e entre pacientes com FC.

Tais pacientes são constantemente acometidos por infecções pulmonares, frequentemente polimicrobianas e *A. xylosoxidans* poderia contribuir na evolução de um pior prognóstico, por sua capacidade de transmissão horizontal de genes de resistência para outros patógenos, geralmente, encontrados nesse ambiente. Também é provável que sua resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos assegure sua seleção e sobrevivência em fluidos e no ambiente (VAY *et al*., 2005).

A administração repetida de antibióticos para o tratamento das infecções por patógenos comuns, especialmente *P. aeruginosa*, têm sido sugerida como provável causa para explicar a seleção *A. xylosoxidans* resistentes. A multirresistência neste microrganismo tem se tornado uma preocupação constante, principalmente com o aumento da detecção de pacientes com FC colonizados cronicamente por este patógeno em todo o mundo (AMOUREUX *et al*., 2012).

Embora a resistência a IMP em nossa amostragem tenha sido baixa, apenas nove (7,4%) amostras, destacamos que a maioria dessas amostras pertencia a um mesmo paciente cronicamente colonizado por *A. xylosoxidans*. Tais amostras apresentaram concomitantemente resistência intermediária a CAZ.

O aumento da resistência aos carbapenêmicos tem se tornado alvo de grande preocupação. Muitos estudiosos têm direcionado seus esforços na tentativa de conter o avanço dessa resistência, já que em alguns casos os carbapênemicos são a opção para tratamento dos pacientes.

O surgimento e desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos através da aquisição de genes para metalo-β-lactamases (MBLs), durante as últimas décadas, tem atraído grande interesse, especialmente nas bactérias Gram-negativas (NORDMANN & POIREL, 2002). A ocorrência desses genes em pacientes sem FC têm sido demonstradas em vários trabalhos. Dos genes de bla_{IMP} carbapenemase adquiridas, o mais comum é bla_{IMP-1}, que já foi detectado em várias amostras clínicas de *A. xylosoxidans* no Japão (SENDA *et al*., 1996; SHIBATA *et al*., 2003). A variante bla_{IMP-10}, também já foi detectada em *A. xylosoxidans*, de uma paciente japonesa, isolada a partir de uma amostra de urina (IYOBE *et al*., 2002). Entre os genes bla_{VIM} carbapenemase, bla_{VIM-1} foi identificado em uma amostra de *A. xylosoxidans* isolada na Itália, em um integron de classe 1, juntamente com três diferentes determinantes de resistência à aminoglicosídeos (RICCIO *et al*., 2001). A ocorrência de bla_{VIM-2} em *A. xylosoxidans* recuperado a partir de amostras clínicas de um paciente grego, também foi descrita (SOFIANOU *et al*., 2005).

As recomendações para o tratamento de infecções por *A. xylosoxidans* em pacientes com FC apontam para uso intravenoso e combinação de diferentes antibióticos com um carbapenêmico, incluindo imipenem ou meropenem (GIBSON, BURNS & RAMSEY, 2003). Entretanto, casos de resistência nesses pacientes já têm sido relatados.

Um estudo retrospectivo com 447 amostras de *A. xylosoxidans* de 120 pacientes com FC na França, relatou a evolução da resistência nesses pacientes desde a primeira amostra analisada no centro, no período de 1995 até dezembro de 2010. Foi encontrado que a evolução da resistência, principalmente, aos carbapenêmicos foi importante, principalmente entre as amostras obtidas de pacientes colonizados cronicamente: em 2010, seis dos oito pacientes abrigavam cepas com sensibilidade diminuída ao meropenem e uma ao imipenem. No início do estudo, essa resistência era praticamente nula (AMOUREUX *et al*., 2012).

Um estudo analisou quatro amostras de *A. xylosoxidans* MDR, produtoras de metalo-β-lactamases, de pacientes com FC, atendidos em um hospital no Japão durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2010. As amostras eram resistentes a carbapenêmicos e fluoroquinolonas. Três amostras abrigavam o gene $bla_{\text{IMP-1}}$ e uma o gene $bla_{\text{IMP-19}}$. Estes genes estavam presentes em quatro diferentes cassetes gênicos em integrons de classe 1, incluindo: *orf1-*$bla_{\text{IMP-1}}$*-aacA4*, $bla_{\text{IMP-1}}$-$bla_{\text{IMP-1}}$*-nit1/nit2-catB3-*$bla_{\text{IMP-1}}$-$bla_{\text{IMP-1}}$, *aacA4-*$bla_{\text{IMP-1}}$ e $bla_{\text{IMP-19}}$. Foi sugerido que esses achados fornecem evidências de que a presença de genes do tipo IMP de MBLs podem ser associados à transferência horizontal e poderia contribuir para a resistência à carbapenêmicos em *A. xylosoxidans*. Assim, estes microrganismos poderiam representar uma ameaça clínica, tanto como agente patogênico, quanto como reservatório de genes de resistência (YAMAMOTO *et al*., 2012).

A partir do sequenciamento total do genoma de *A. xylosoxidans*, foram detectados três genes pertencentes à família das metalo-β-lactamases. Esses autores sugeriram que é possível prever um alto potencial para este microrganismo em termos de transferência de resistência no ambiente (JAKOBSEN *et al*., 2013).

Todas as amostras do presente estudo, foram submetidas à técnica de PCR para pesquisa dos genes $bla_{\text{SPM-1}}$, e $bla_{\text{VIM-2}}$. Entretanto, não foi detectada a existência desses genes. O teste para detecção do gene $bla_{\text{IMP-1}}$ foi positivo em 11 amostras (9%) de *A. xylosoxidans.* A maioria (n=9) resistente ao imipenem, pertence a um paciente cronicamente colonizado por este microrganismo. Tais amostras foram submetidas ao sequenciamento dos fragmentos obtidos na PCR. Esses resultados não foram confirmados por esta técnica. É possível que o iniciador utilizado nesse estudo não tenha apresentado especificidade para amostras de *A. xylosoxidans*, já que foi previamente desenhado para *P. aeruginosa*. Estudos com

iniciadores específicos para esse microrganismo devem ser realizados posteriormente para esclarecer essa questão.

O aparecimento e a propagação de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos representa um grande desafio à saúde pública. Um dos motivos para essa preocupação é a disseminação nos últimos anos de organismos que produzem Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC), um tipo de β-lactamase. A ocorrência de resistência a carbapenêmicos mediada pela produção KPC é cada vez maior e se difunde em várias regiões do mundo (CAI *et al*., 2008; NORDMANN, CUZON & NAAS, 2009), incluindo Brasil (MONTEIRO *et al*., 2009; PAVEZ, MAMIZUKA & LINCOPAN, 2009; PEIRANO *et al*., 2009; LEÃO *et al*., 2010; LEÃO *et al*., 2011).

Recentemente detectamos a presença dessa enzima em amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de dois pacientes adultos com FC (LEÃO *et al*., 2011), atendidos no centro referência do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE – UERJ). Submetemos também nossas amostras à verificação fenotípica da produção de KPC e a detecção genotípica do gene bla_{KPC}. Todos os testes foram negativos.

A identificação correta destas espécies tem contribuído muito para elucidação e melhor compreensão de algumas características das infecções causadas por *Achromobacter* spp., entretanto muitas outras questões continuam sem o conhecimento necessário e ainda há controvérsia sobre alguns fatores como o prognóstico e relevância clínica dessas infecções. De Baets *et al*. (2007) estudaram os impactos clínicos da infecção por *A. xylosoxidans* e reportaram que não houve excessiva lesão pulmonar ou aumento do declínio da função pulmonar, quando comparado com o estado clínico desses pacientes antes de contraírem a infecção por este microrganismo. No entanto, estudos recentes sugerem que a colonização crônica por *A. xylosoxidans* teve um impacto negativo mensurável no estado clínico e no prognóstico dos pacientes com FC (HANSEN *et al*., 2006; HANSEN *et al*., 2010).

4.4 Relação entre clonalidade, fatores de virulência e mecanismos de resistência

A análise dos perfis de fragmentação do DNA, após digestão com endonucleases de restrição, por PFGE, tem sido amplamente recomendada para a tipificação de microrganismos com propósitos epidemiológicos. (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997; OLIVE & BEAN, 1999; BELKUM *et al*., 2001; VAN DAELE *et al*., 2005; KAUR *et al*., 2009). Detectamos, a partir da técnica de PFGE, grande diversidade genética com 22 clones entre os 122 isolados de *A. xylosoxidans.* De forma geral, não foi observada a existência de clones prevalentes entre os isolados originários dos centros de referência analisados (IFF e HUPE), exceto pelo clone G, que foi encontrado em 22 dos 39 pacientes no ano de 2005, não reaparecendo nos anos subsequentes. Na maioria dos casos, tratou-se de clones únicos por paciente (PEREIRA *et al*., 2011).

A partir desses resultados obtidos em estudo prévio, analisamos possíveis relações entre fatores de virulência, resistência e os grupos clonais em pacientes colonizados cronicamente ou não por *A. xylosoxidans*.

Em todos os pacientes, crônicos ou não, a maioria das amostras de grupos clonais estabelecidos apresentou concomitantemente os dois tipos de motilidades *swarmming* e *swimming* e forte capacidade de formação de biofilme. A maior parte dos grupos clonais mostrou sensibilidade às drogas estudadas, entretanto, 12 dos 22 grupos clonais apresentaram amostras não sensíveis a pelo menos um antimicrobiano estudado. Para CIP foi observado o maior percentual de grupos clonais não sensíveis. Além disso, algumas amostras de pacientes crônicos apresentaram resistência intermediária a duas das classes de antimicrobianos analisadas.

Alguns estudos têm mostrado a relação entre colonização crônica e a transmissão cruzada em amostras de *A. xylosoxidans* de pacientes com FC. Nossos resultados em relação à tipificação molecular são similares aos achados de Krezwinski *et al.* (2001), que estudaram a relação genética de amostras de *A. xylosoxidans* provenientes de 92 pacientes com FC atendidos em 46 centros de referência no EUA. Os autores relataram que não houve genótipos compartilhados entre os centros estudados. Observaram também que, a maioria dos pacientes

colonizados persistentemente teve um genótipo único identificado e, dentre estes, dois pacientes, tiveram o aparecimento ocasional de um único clone que foi substituído pelo clone original em culturas subsequentes. Entretanto, nesse estudo não foram analisados fatores de virulência e resistência das amostras estudadas.

Kanellopoullou *et al*. (2004) observaram um aumento na frequência de isolamentos de *A. xylosoxidans* entre pacientes com FC acompanhados em um centro de referência na Grécia. Estudaram 34 amostras de nove pacientes adultos, persistentemente colonizados por esta bactéria, encontrando um único clone entre cinco destes pacientes. A maioria dessas amostras apresentava também resistência a muitas classes de antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos e fluoroquinolonas, classes em que também foram observadas amostras resistentes entre os pacientes cronicamente colonizados em nosso trabalho.

Raso *et al*. (2008), em um estudo com pacientes adultos de um centro de referência em Turim, na Itália, descreveram a colonização de 22 pacientes com pelo menos uma cultura positiva de *A. xylosoxidans*, e observaram a presença de dois clones entre pacientes distintos. Um destes clones foi identificado em sete e o outro em dois pacientes. A maioria dessas amostras mostrou perfil de multirresistência, incluindo resistência a ciprofloxacina. Imipenem e piperacilina foram as drogas mais ativas. Em geral, as amostras do mesmo grupo clonal apresentaram perfis de resistência semelhantes, assim como observado em nosso estudo.

Em todos esses estudos há apenas a relação entre transmissibilidade, estabelecimento de cronicidade e perfil de susceptibilidade. Estudos que associem essas relações a fatores de virulência e mecanismos de resistência em amostras de *Achromobacter* spp., isoladas de pacientes com FC, ainda são, até o momento, desconhecidos.

Apesar do aumento no número de estudos nos últimos anos e do maior reconhecimento de *A. xylosoxidans* como um patógeno de relevância na FC, a descrição de novas espécies no gênero *Achromobacter* suscita muitas questões que precisam ainda ser respondidas e oferece uma oportunidade para estudos que possam esclarecer e determinar que espécies podem se associar a um pior prognóstico.

5 CONCLUSÕES

- A frequência de isolamento de *Achromobacter xylosoxidans* (94,5%) nos pacientes com Fibrose Cística, no período analisado, confirma esta espécie como a prevalente entre as diferentes espécies do gênero *Achromobacter*;

- Dentre as técnicas moleculares analisadas para identificação das amostras: sequenciamento do gene 16S, PCR do gene $bla_{OXA-114}$ e ARDRA, esta permitiu a identificação de todas as espécies do gênero *Achromobacter* obtidas neste estudo, sendo de grande contribuição para o conhecimento da correta identificação das amostras de *A. piechaudii* e *A. insolitus,* não identificadas pelo sequenciamento;

- A identificação correta das espécies do gênero *Achromobacter*, em muitos casos, requer a utilização de uma ou mais técnicas moleculares, devido à alta similaridade genética encontrada no grupo. A utilização do PCR para detecção da OXA-114 pode ser útil e uma opção pouco custosa como triagem para identificar essas amostras, já que pode identificar as amostras de *A. xylosoxidans*, espécie mais frequente do grupo;

- Todas as amostras de *A. xylosoxidans* e em todos os pacientes colonizados cronicamente ou esporadicamente por esse microrganismo e todas as sete amostras de *A. piechaudii, A. insolitus e A. denitrificans* foram capazes de produção de biofilme, a maioria com forte produção. Além disso, a maioria também apresentou motilidade do tipo *swimming* e motilidade tipo *swarming*. Observamos uma significativa correlação entre produção de biofilme forte e expressão de ambos os tipos de motilidade, concomitantemente, demonstrando que a expressão de diferentes tipos de motilidades pode favorecer a produção de biofilme forte entre nossas amostras;

- A determinação da CIM a antimicrobianos mostrou que a maioria das amostras de *A. xylosoxidans*, na maioria dos grupos clonais foi sensível a ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim. Entretanto, 46% das amostras foram não sensíveis a ciprofloxacina;

- Embora não tenha sido possível caracterizar amostras multirresistentes, foram observadas amostras não sensíveis a duas das classes antimicrobianas estudadas, principalmente naquelas obtidas de pacientes cronicamente colonizados;

- CIP e SUT foram considerados os marcadores de maior distribuição de amostras não sensíveis dentre os perfis clonais, incluindo grupos clonais relacionados à colonizaçâo crônica, a transmissibilidade cruzada entre irmãos e entre pacientes não relacionados, como os grupos E, Q e G;

- Entre os grupos clonais relacionados à colonização crônica nos pacientes estudados, podemos destacar o grupo clonal F, que apresentou 90% de amostras não sensíveis a CAZ, além disso, a maioria dessas amostras também apresentou resistência ao IMP;

- A detecção dos genes codificadores de metalo-β-lactamases e carbapenemases não foi obtida em nossas amotras, sugerindo que outros mecanismos de resistência possam estar presentes nas amostras resistentes observadas no estudo;

REFERÊNCIAS

ADAL, K.A.; FARR, B.M. *Central venous catheter-related infections*: a review. Nutrition. 1996. v. 12, p.208–13.

ALMUZARA, M. et al. *In vitro susceptibility of Achromobacter spp. isolates*: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. Int. J. Antimicrob. Agents. 2010. v. 35, p.68-71.

AMBLER, R.P. et al. *A standard numbering scheme for the class A β-lactamases.* Biochem J. 1991. v.276, p.269-272.

AMOUREUX, L. et al. *Epidemiology and resistance of Achromobacter xylosoxidans from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy:* First French data*.* J Cyst Fibrosis. 2012.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. *Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 30 conserved sequence region among Salmonella isolates.* Antimicrob Agents Chemother.2007. v.51, p.1545–1548.

ARCHIBALD, L.K.; GAYNES, R.P. *Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons.* Nosocom. Infect. 1997. v.11, p.245–55.

ARMSTRONG, D.S. et al. *Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis.* BMJ 1995. v.310, p.1571-2.

ATKINSON, R.M. et al. *Chronic Colonization with Pandoraea apista in Cystic Fibrosis Patients Determined by Repetitive-Element-Sequence PCR.* J Clin Microbial. 2006. v.3, p.833-836.

AUBERT, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. *IS1999 increases expression of the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in Pseudomonas aeruginosa.* J Bacteriol. 2003. v.185, p.5314–5319.

AUGUST, M.J. et al. *Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology.* Coord. Ed. A.S. Wessfeld. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1990.

BADOR, J. et al. *First description of an RND-type multidrug efflux pump in Achromobacter xylosoxidans, AxyABM.* Antimicrob Agents Chemother. 2010. v.55, p.4912-4.

BARBATO, A. et al. *Paediarics in berlin*. Eur Respir J. 2009. v.34, p.436-43.

BARNINI, S.; DODI, C.; CAMPA, M. *Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of Pseudomonas aeruginosa.* Letters in Apllied. Microbiol. 2004. v.39, p.274-7.

BARRADO, L. et al. *Molecular Characterization of Achromobacter Isolates from Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients in Madrid, Spain.* J. Clin Microb. 2013. v.51, p.1927–1930.

BARTH, A.L. et al. *Cystic fibrosis patient with Burkholderia pseudomallei infection acquired in Brazil.* J Clin Microbiol. 2007. v.45, p.4077-80.

BERINGER, P.M.; APPLEMAN, M.D. *Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features.* Curr Opin Pulm Med. 2000. v.6, p.545-50.

BELKUM, A. el al. *Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology.* Clin Microbiol Rev. 2001. v.14, p.547-60.

BIEBER, D. et al. Sience. 1998. v.280, p.2114-18.

BJARNSHOLT, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients.* Pediatr Pulmonol. 2009. v.44, p.547-558.

BOMBICINO, K.A. et al. *Evaluation of pyrrolidonyl arylamidase for the identification of nonfermenting Gram-negative rods.* Diag Microbiol Infec Dis. 2007. v.57, p.101-3.

BUREAU-CHALOT, F. et al. *Blood pressure cuffs as potential reservoirs of extendedspectrum β-lactamase VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii.* J Hosp Infect. 2004. v.58, p.91–2.

BURNS, J.L. et al. *Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States.* Clin Infect Dis. 1998. v.27, p.158-63.

BURNS, J.L.; SAIMAN, L. *Burkholderia cepacia infections in cystic fibrosis.* Pediatr Infect Dis J. 1999. v.18, p.155-6.

BURNS, J.L. et al. *Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis.* J Infect Dis. 2001. v.183, p.444–52.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. *Update functional classification of beta-lactamases.* Antimicrob. Agents Chemother. 2010. v.59, p.969-76.

CASTANHEIRA, M. et al. *Carbapenem resistance among Pseudomonas aeruginosa strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18).* Agentes Antimicrob Chemother. 2009. v.53, p.1225-7.

CALDWELL, D.E. et al. *Do bacterial communities transcend darwinism?* Adv. Microb. Ecol. 1997. v.15, p.105–191.

CAI, J. et al. *Emergence of Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital.* Antimicrob Agents Chemother. 2008. v.52, p.2014–8.

CARVALHO, G.M. et al. *Transient isolation of Burkholderia multivorans and Burkholderia cenocepacia from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with Burkholderia vietnamiensis.* J Cyst Fibros. 2005. v.4, p.267-70.

CARVALHO, A.P.D. et al. *Characterization of an epidemic carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil.* Microbiol Drug Resist Mechan Epidemiol Dis. 2006. v.2, p.103-8.

CERI, H. et al. *The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.* J. Clin. Microbiol. 1999. v.37, p. 1771–1776.

CHIRON, R. et al. *Clinical and microbiological features of Inquilinus sp. Isolates from five patients with cystic fibrosis.* J Clin Microbiol. 2005. v.43, p.3938-43.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing.* 2011.

CYSTIC FIBROSIS CONSORTIUM. *Cystic Fibrosis Mutations Database.* Disponível em http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html. Acessado em 21 de maio de 2011.

COMER, J.E. et al. *Identification of the Pseudomonas aeruginosa 1244 pilin glycosylation site.* Infect Immun. 2002. v.70, p.2837-45.

COENYE, T., GILLIS, M. VANDAMME, P. *Pseudomonas antimicrobica Attafuah and Bradbury 1990 is a junior synonym of Burkholderia gladioli (Severini 1913) Yabuuchi.* 1993. Int J Syst Evol Microbiol. 2000. v.6, p.2135-2139.

COENYE, T. et al. *Taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex.* J Clin Microbiol. 2001. v.39, p.3427-36.

_____, et al. *Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of Inquilinus limosus gen. nov., sp. nov.* J Clin Microbiol. 2002. v.40, p.2062-69.

_____, et al. *Achromobacter insolitus sp. nov. and Achromobacter spanius sp. nov., from human clinical samples. I*nt J Syst Evol Microbiol. 2003. v.53, p.1819-24.

COIA, J.E. et al. *Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in healthcare facilities.* J Hosp Infect*.* 2006. v.63 (Suppl. 1):S1-S44.

COSSART, P.; SANSONETTI, P.J. *Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens.* Science. 2004. v.304, p.242-48.

COSTERTON, J.W. et al. *Microbial biofilms.* Annu. Rev. Microbiol 1995. v.49, p.711-745.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.* Science 1999. v.284, p.1318–1322.

COSTERTON, J.W. *Cystic fibrosis pathogenesis and role of biofilms in persistent* infection. Trends Microbiol. 2001. v.9, p.50-52.

DAMAS, C.; AMORIM, A.; GOMES, I. *Cystic Fibrosis*: Review. Rev Port Pneumol. 2009. p.89-112.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. *Microbial biofilms*: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. v.64, p.847-867.

DAVIES, D.G. et al. The involvement of cell-tocell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 1998. v.280, p.295– 98.

DAVIES, J.C., RUBIN, B.K. *Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis.* Semin Respir Care Med. 2007. v.28, p.312-21.

DE BAETS, F. et al. *Achromobacter xylosoxidans in cystic fibrosis: Prevalence and clinical relevance.* J Cyst Fibrosis. 2007. v.6, p.75-8.

DE LEY, J. et al. *Intra- and intergeneric similarities of the Bordetella ribosomal ribonucleic acid cistrons:* proposal fir a bew family, *Alcaligenaceae*. Int J Syst Bacteriol. 1986. v.36, p.405-14.

DEMKO, C.A.; BYARD, P.J.; DAVIS, P.B. *Gender differences in cystic fibrosis: Pseudomonas aeruginosa infection*. J Clin. Epidemiol. 1995. v.48, p.1041–49.

DENG, S. et al. *Detection by PCR and differentiation by restriction fragment length polymorphism of Acholeplasma, Spiroplasma, Mycoplasma, and Ureaplasma, based upon 16S rRNA genes.* PCR Methods Applications. 1992. v.1, p.202–204.

DE VRANKRIJKER, A.M. et al. *Clinical impact of a highly prevalent Pseudomonas aeruginosa clone in Dutch cystic fibrosis patients.* Clin Microbiol Infect. 2011. v.17, p. 382-5.

DICKINSON, M.; BISNO, A.L. *Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations.* Int. J. Artif. Organs 1993. v.16, p.749–54.

DOI, Y. et al. *Chracterization of a naturally occurring class D β-lactamase from Achromobacter xylosoxidans.* Antimicrobial Agents Chemoth. 2008. v.52, p.1952-6.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.* Clin Microbiol Rev. 2002. v.15, p.167–193.

DRENKARD, E. *Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilm.* Microbes Infection. 2003. v.5, p. 1213-1219.

DUEZ, J.M. et al. *In vitro synergistic activity of combined piperacillin and tobramycin against clinical strains of Achromobacter xylosoxidans.* J Chemother. 2010. v.22, p.139-41.

DUNNE, W.M.; MAISCH, S.H. *Epidemiology investigation of infections due to Alcaligenes species in children and patients with cystic fibrosis.* Clin infect Dis. 1995. v.20, p.836-41.

EL SALABI, A. et al. *Genetic and Biochemical Characterization from an Achromobacter xylosoxidans of a Novel Metallo-beta-Lactamase, TMB-1 Strain Isolated in Tripoli, Libya.* Antimicrob. Agents Chemother. 2012. v.56, p.2241.

FERREIRA, A.G. et al. *Influence of biofilm formation in the susceptibility of Pseudomonas aeruginosa from Brazilian patients with cystic fibrosis.* APMIS. 2010. v.118, p.606–612.

FERRONI ,A. et al. *Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center.* J Clin Microbiol. 2002. v.40, p.3793-7.

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

FLEMMING, H.C. *Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. v.59, p.629-640.

FORBES, B.A.; GRANATO, P.A. *Processing specimens for bacteria. In:* Murray PR; Baron EJ; Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds) Manual of Microbiology 6th, ed. Washinton DC. ASM, Press, 1995. p.509-19.

FOWERAKER, J.E. et al. Phenotypic variability of Pseudomonas aeruginosa in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. J. Antimicrobiol. Chemotherapy. 2005. v.55, p.921-927.

FOWERAKER, J. *Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis.* Br Med Bull. 2009. v.89, p.93-110.

FRASER, S.L.; JORGENSEN, J.H. *Reavaliação das susceptibilidades antimicrobianas de Chryseobacterium e Flavobacterium espécies e métodos para testes de suscetibilidade confiável.* Agentes Antimicrob Chemother. 1997. v.41, p. 2738-2741.

FRASER, G.M.; HUGHES, C. *Swarming motility*. Curr Opin Microbiol. 1999. v.2, p.630-5.

FREDERIKSEN, B. et al. *Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis.* Acta Paediatr. 2006. v.95, p.1070–4.

FUX, C.A. et al. *Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge.* Expert Rev Anti Infect Ther 2005. v.1, p.667–83.

GALES, A.C. et al. *Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing SPM metallo-β-lactamase.* J Antimicrob Chemother. 2003. v.52, p.699-702.

GBEFC*. Registro Brasileiro de Fibrose Cística*. Disponível em: < http://www.gbefc.org.br/gbefc/estudo_gbefc_2010.pdf>. Acesso em 20 nov. 2013.

GIBSON, R.L.; BURNS, J.L.; RAMSEY, B.W. *Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med. 2003. v.168, p.918-51.

GILLIGAN, P.H. *Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev. 1991. v.4, p.35-51.

GIRLICH, D. et al. *Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand.* J Clin Microbiol. 2001. v.39, p.175–82.

GLADMAN, G.P. et al. *Controlled study of Pseudomonas cepacia and Pseudomonas maltophilia in cystic fibrosis.* Arch Dis Child. 1992. v.67, p.192–5.

GLUPCZYNSKI, Y. et al. *In vitro susceptibility of Alcaligenes denitrificans subsp. xylosoxidans to 24 antimicrobial agents.* Antimicrob Agents Chemother. 1988. v.32, p.276-278.

GURTLER, V., WILSON, V. A., MAYALL, B. C. *Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCRamplified 16S rDNA.* J. Gen. Microbiol. 1991. v.137, p.2673–2679.

GOSS, C.H. et al. *Association between Stenotrophomonas maltophilia and lung function in cystic fibrosis*. Thorax. 2004. v.59, p.955-9.

GOVAN, J.R.W.; NELSON, J. W. *Microbiology of lung infection in cystic fibrosis.* Br Med Bull. 1992. v.48, p.912–30.

_____; BROWN, A.R.; JONES, A.M. *Evolving epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection.* Future Microbiol. 2007. v.2, p.153-64.

HANSEN, C.R. et al. *Chronic infection with Achromobacter xylosoxidans in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study.* J Cyst Fibrosis. 2006. v.5, p.245-51.

_____, et al. *Inflammation in Achromobacter xylosoxidans infected cystic fibrosis patients.* J Cyst Fibros. 2010. v.9, p.51–8.

_____; et al. *Achromobacter species in cystic fibrosis: Cross-infection caused by indirect patient-to-patient contact.* J Cyst Fibros. 2013 (aceito para publicação).

HARSHEY, R. M. *Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal.* Annu. Rev. Microbiol. 2003. v.57, p.249-273.

HAUBER, S. *Biofilm formation by the small colony variant phenotipe of Pseudomonas aeruginosa.* Env Microbiol. 2004. v.6, p.546-51.

HEAD, N.E.; YU, H. *Cross sectional analysis of clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa:* Biofilm formation, virulence and genome diversity. Infection Immunity. 2004. v.72, p.133-44.

HENDRIE, M.S.; HOLDING, A.J.; SHEWAN, J.M. *Emended descriptions of the genus Alcaligenes and of Alcaligenes faecalis and proposal that the generic name Achromobacter be rejected: status of the named species of Alcaligenes and Achromobacter. Request for an Opinion.* Int J Syst Bacteriol. 1974. v.24, p.534-50.

HENTZER, M. et al. *Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function.* J Bacteriol. 2001. v.183, p.5395-401.

HIRASHI, A. *Direct automated sequencing of 16s rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification.* Letters in Applied Microbiology***.*** 1992. v.15, p.210-13.

HOIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth.* Microbes Infect. 2001. v.3, p.23-35.

HOLT, J.G. *International Committee on Systematic Bacteriology, Judicial Commission, Minutes of the Meeting 3 September 1978, Minute 24, Rejection of the genus name Achromobacter.* Int J Syst Bacteriol. 1979. v.29, p.267-9.

HUTCHISON, M.L.; GOVAN, J.R.W. *Phatogenicity of microbes associated with cystic fibrosis.* Microbes and Infection. 1999. v.1, p.1005-14.

IGRA-SIEGMAN, Y.; CHMEL, H.; COBBS, C. *Clinical and laboratory characteristics of Achromobacter xylosoxidans infection.* J Clin Microbiol. 1980. v.11, p.141-145.

INOUE, T.; SHINGAKI, R.; FUKUI, K. *Inhibition of swarming motility of Pseudomonas aeruginosa by branched-chain fatty acids.* FEMS Microbiol Lett. 2008. v.281, p.81-6.

IYOBE, S. et al. *Detection of a variant metallo-β-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of Pseudomonas aeruginosa and an Alcaligenes xylosoxidans strain.* Antimicrob Agents Chemother. 2002. v.46, p.2014-16.

JAKOBSEN. *et al*. *Complete Genome Sequence of the Cystic Fibrosis Pathogen Achromobacter xylosoxidans NH44784-1996 Complies with Important pathogenic.* Phenotypes. PLOS ONE. 2013. p.8.

JAYARAO, B. M., DORE´, J. J. E., OLIVER, J.R.S. P. *Restriction fragment*

length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of Streptococcus and Enterococcus species of bovine origin. J. Clin. Microbiol. 1992. v.30, p.2235–2240.

JEFFREY, B. et al. *Lung infections associated with cystic fibrosis.* Clin Microbiol Rev. 2002. v.15, p.194-222.

KAHL, B.C. et al. *Population dynamics of persistent Staphylococcus aureus isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study.* J Clin Microbiol. 2003. v.41, p.4424-7.

KANELLOPOULOU, M. et al. Persistent colonization of nive cystic fibrosis patients with an *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* clone. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004. v.23, p.336-669.

KAUR, M. et al. *Epidemiological typing of clinical isolates of Achromobacter xylosoxidans: comparison of phenotypic and genotypic methods.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009.

KERNEN , Y.; SAUTY, A.; ROULET, M. *Detection and management of early Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis.* Rev Med Suisse. 2005. v.1, p.637-40.

KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Genus Alcaligenes Castellani and Chalmers 1919, 936*[AL]*,* p. 365. *In* Krieg, N.R., and Holt, V. (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, 1984; Vol.1, Williams & Wilkins, Baltimore/London.

KIM, W. et al. *Swarm-cell differentiation in Salmonella enteric serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics.* J Bacteriol. 2003. v.185, p.3111-7.

KIREDJIAN, M. et al. *Alcaligenes piechaudii, a new species from human clinical specimens and the environment*. Int J Syst Bacteriol. 1986. v.36, p.282-7.

KNIPPSCHILD, M.; ANSORG, R. *Epidemiological typing of Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans by antibacterial susceptibility testing, fatty acid analysis, PAGE of whole-cell protein and pulsed field gel electrophoresis.* Zentralbl Bakteriol. 1998. v.288, p.145-57.

KRZEWINSKI, J.W. et al. *Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of Stenotrophomonas maltophilia and Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans from patients with cystic fibrosis.* J Clin Microbiol. 2001. v.39, p.3597-3602.

LAFFLNEUR, K.; JANSSENS, M.; CHARLIER, J. *Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods.* J Clin Microbiol 2002. v.40, p.1085-7.

LAHEY CLINIC. *ß-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.* Disponível em: < http://www.lahey.org/Studies/> Acesso em 25 nov. 2013.

LAMBIASE, A. et al. *Achromobacter xylosoxidans respiratory tract infection in cystic fibrosis patients.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011. v.30, p.973–80.

LEÃO, R.S. et al. *KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli co-infection in a catheter related infection.* Clin Microbiol Infect. 2010.

LEÃO, R.S.; PEREIRA, R.H.V. et. al. *KPC-2 Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates from patients with Cystic Fibrosis.* J Cystic Fibrosis. 2011. v.10, p.140–142.

LEE, K. et al. *Novel acquired metallo-β-lactamase gene, blaSIM-1, in class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea.* Antimicro Agents Chemother. 2005. v.49, p.4485-91.

LI, J. et al. *Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria*. Int J Antimicrob Agents. 2005. v.25, p.11-25.

LIMA, D.F. et al. *Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene carriage among Staphylococcus aureus strains with SCCmec types I, III, IV, and V recovered from cystic fibrosis pediatric patients in Brazil.* Diag Microbiol and Infect Dis. 2013. (aceito para publicação).

LI PUMA, J.J. et al. *Rybotype analysis of Pseudomonas cepacia from cystic fibrosis treatment centers.* J Pediatr.1998. v.113, p.859-62.

LIN, Y.H. et al. *Comparison of polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological typing of Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans in a burn unit.* Diagn Microbiol Infect Dis. 1997. v.28, p.173-8.

LIU, L. et al. *Ribosomal DNA-directed PCR for identification of Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans recovered from sputum samples from cystic fibrosis.* J Clin Microbiol. 2002. v.40, p.1210-3.

LYCZAK, B.J.; CANNON, L.C.; PIER, B.G. Lung infections associated with cystic firosis. Clin Microbiol Rev. 2002. v.15, p.194-222.

MACFARLANE, L. et al. *Successful decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pediatric patients with cystic fibrosis (CF) using a three-step protocol.* J Hosp Infect. 2007. v.65, p.231-6.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.* Trends Microbiol. 2001. v.9, p.34-39.

MAHENTHIRALINGAM, E., CAMPBELL, M.E.; SPEERT, D.P. *Nonmotility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis.* Infect. Immun. 1994. v.62, p.596–605.

MANNO, G. et al. *Antimicrobial use and Pseudomonas aeruginosa susceptibility profile in a cystic fibrosis centre.* Int J Antimicrob Ag. 2005. v.25, p.193-7.

MARQUES, E.A. *Perfil Microbiológico na Fibrose Cística.* Rev Hosp Univ Pedro Ernesto. 2011. p.23-35.

MARTIN, D.W. et al. *Mechanism of conversion to mucoidy in Pseudomonas aeruginosa infecting cystic fibrosis patients.* Proc Natl Acad Sci. 1993. v.90, p.8377-81.

MARTIN, P.; JULLIEN, E.; COURVALIN, P. *Nucleotide sequence of Acinetobacter baumannii aphA-6 gene: evolutionary and functional implications of sequence homologies with nucleotide-binding proteins, kinases and other aminoglycoside-modifying enzymes.* Mol Microbiol. 1988. v.2, p. 615-625.

MATTICK, J.S. *Type IV pili and twitching motility.* Annu Rev Microbiol. 2002. v.56, p.289–314.

MERINO, S.; SHAW, J.G.; TÓMAS, J.M. *Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system.* FEMS Microbiol Lett. 2006. v.263, p.127-35.

MITTELMAN, M.W. *Adhesion to biomaterials, p. 89–127. In M. Fletcher (ed.), The molecular and ecological diversity of bacterial adhesion.* Wiley, New York, N.Y, 1997.

MOISSENET, D. et al. *Colonization by Acaligenes xylosoxidans in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation.* Clin Infect Dis. 1997. v.24, p.274-5.

MONTEIRO, J. et al. *First report of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil.* Antimicrob Agents Chemother. 2009. v.53, p. 333–4.

MOREAU-MARQUIS, S., STANTON, B.A.; O'TOOLE, G.A. *Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway.* Pulm. Pharmacol. Ther. 2007.

MOSKOWITZ, S.M. et al. *Clinical feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa patient with cystic fibrosis.* J. Clin. Microbiol. 2004. v.42, p.1915-1922.

MULET, X. et al. *Biological Markers of Pseudomonas aeruginosa Epidemic High-Risk Clones.* Antimicrol. Agents and Chemot. 2013. v.57, p.5527-5535.

MURPHY,T.A. et al. *Biochemical characterization of the acquired metallo-β-lactamase SPM-1 from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother. 2003. v.47, p.582-7.

MURRAY, P.R. et al. *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed., ASM Press, Washington, D.C, USA, 2004.

NAAS, T. et al. *Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in Pseudomonas aeruginosa.* FEMS Microbiol Lett .1999. v.176, p.411–419.

NEUWIRTH, C. et al. *VEB-1 in Achromobacter xylosoxidans from cystic fibrosis patient, France.* Emerg Infect Dis. 2006. v.12, p.1737-39.

NORDMANN, P.; POIREL, L. *Emerging carbapenemases in Gramnegative aerobes.* Clin. Microbiol. Infect. 2002. v.8, p.321–331.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. *The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria.* Lancet Infect Dis. 2009. v.9, p.228–36.

NOVAIS, A. et al. *Dissemination and persistence of blaCTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups.* Antimicrob Agents Chemother. 2006. v.50, p.2741–2750

OLIVE, D.M.; BEAN, P. *Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.* J Clin Microbiol. 1999. v.37, p.1661-9.

OLIVER, A. et al. *Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística.* Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009. v.27, p.89–104.

O'MAY, C.Y., REID, D.W.; KIROV, S.M. *Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis.* FEMS Immunol Med Microbiol. 2006. v.48, p.373–380.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development.* Mol Microbiol 1998. v.30, p.295-304.

O'TOOLE, G.A., KAPLAN, H.B. & KOLTER, R. *Biofilm formation as microbial development*. Annu. Rev. Microbiol. 2000a. v.54, p.49-79.

OTTEMANN, K.M.; MILLER, J.F. *Roles for motility in bacterial-host interactions*. Mol. Microbiol. 1997. v.24, p.1109–17.

OVERHAGE, J. et al. *Identification of genes involved in swarming motility using a Pseudomonas aeruginosa PAO1 mini-Tn5-lux mutant library.* J Bacteriol. 2007. v.189, p.2164–2169.

PASTERAN, F. et al. *Sensitive and Specific Modified Hodge Test for KPC and Metallo-Beta- Lactamase Detection in Pseudomonas aeruginosa by Use of a Novel Indicator Strain, Klebsiella pneumoniae ATCC 700603.* J. Clin. Microbiol. 2011. v.49, p.4301.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. *Early dissemination of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil.* Antimicrob Agents Chemother. 2009. v.53, p.2702.

PEDERSEN, S.S. et al. *Role of alginate in infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis.* Thorax. 1992. v.47, p.6-13.

PEGUES, D.A. *Burkholderia cepacia in;* Antimicrobial Therapy and Vaccines. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1999. v.2, p.89-93.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; HAASE, G.; KENTRUP, H. *Persistent airway colonization with Alcaligenes xylosoxidans in two brothers with cystic fibrosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998. v.17, p.132-4.

PEIRANO, G. et al. *Carbapenem hydrolysing β-lactamase KPC-2 in Klebsiella pneumoniae isolated in Rio de Janeiro, Brazil.* J Antimicrob Chemother. 2009. v.63, p.265–8.

PEREIRA, R.H.V. *et al*. *Achromobacter xylosoxidans: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients.* J. Clin. Microbiol. 2011. v.49, p.3649–3651.

PICÃO, R.C. et al. *Metallo-β-lactamase detection: Comparative evalution of double-disk synergy versus combined disk*. J Clin Microbiol. 2008. v.46, p.2028-37.

POIREL, L. et al. *Outbreak of extended-espectrum beta-lactamse VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii in a French hospital.* J. Clin. Microbiol. 2003. v.41, p.3542-47.

POLLINI, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo-β-lactamase- producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype.* Clin Microbiol Infect. 2011. p.1460-0691.

POOLE, K. *Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother .2005. v.49, p.479-487.

POTERA, C. *Forging a link between biofilms and disease.* Science 1999. v.283, p.1837–1839.

POURNARAS, S. et al. *Hospital outbreak of multiple clones of Pseudomonas aeruginosa carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4.* J Antimicrob Chemother. 2003. v.51, p.1409–1414.

PRATT, L.A.; KOLTER, R. *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.* Mol. Microbiol. 1998. v.30, p.285–94.

QI, C. et al. *Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical strains collected from 2004 to 2007.* J Clin Microbiol. 2008. v.46, p.1106-9.

RASHID, M.H, KORNBERG, A. *Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa.* PNAS. 2000. v.97, p.4885–4890.

RASKIN, S. et al. *Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients.* J Cyst Fibros. 2008. v.7, p.15-22.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. *Carbapenem-hydrolyzing β-lactamases. Antimicrobiol* Agents Chemother. 1997. v.41, p.223-32.

RASO, T. et al. *Achromobacter xylosoxidans respiratory tract infections in cystic fibrosis patients.* APMIS. 2008. v.118, p.837-41.

RATJEN, F.; DORING, G. *Cystic fibrosis.* Lancet. 2003. v.22, p.681-689.

RENDERS, N.; VERBRUGH, E.H.; BELKUM, A.V. *Dynamics of bacterial colonization in respiratory tract of patients with cystic fibrosis.* Infect. Genet Evol. 2001. v.1, p.29-39.

RIBBECK-BUSCH, K. et al. *A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic Stenotrophomonas maltophilia from plant-associated Stenotrophomonas rhizophila.* Environmental Microbiology. 2005. v.7, p.1853–8.

RICCIO, M.L. et al. *In70 of plasmid pAX22, a blaVIM-1-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette.* Antimicrob Agents Chemother. 2001. v.45, p.1249– 1253.

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.* J Clin Microbiol. 2012. v. 50, p.2688-2694.

ROCHA, G.A. *et al*. *Acinetobacter spp. em indivíduos com Fibrose cística: identificação das espécies, resistência a antimicrobianos e relação clonal.* Dissertação de mestrado. UERJ. 2013.

ROMAN, F. et al. *Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by Haemophilus influenzae in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains.* J Clin Microbiol. 2004. v.42, p.1450-9.

RYDER, C., BYRD, M.; WOZNIAK, D.J. *Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development.* Curr. Opin. Microb. 2007. v.10, p.644-648.

SADER, H. et al. and the SENTRY Participants Group (Latin America). 2003. *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through.* Braz J Infect Dis. 2001. v.8, p.25-79.

SAIMAN, L. et al. *Identification and antimicrobial susceptibility of Alcaligenes xylosoxidans isolated from patients with cystic fibrosis.* J Clin Microbiol. 2001. v.39, p.3942-5.

_____, SIEGEL, J. *The Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants.* Ajlc Suppl – Am J Infect Control. 2003. p.31.

_____, SIEGEL, J. *Infection control in cystic fibrosis.* Clin Microbiol Rev. 2004. v.17, p.57-71.

SANTOS, G.P.; DOMINGOS, M.T.; WITTING, E.O. *Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação.* J Pediatr. (Rio J). 2005. v.81, p.240-4.

SANTOS, F°. L. et al. *Tipagem molecular de amostras de Pseudomonas aeruginosa produtoras de metalo β lactamases isoladas em João Pessoa /PB*. Rev. Bras Anal Clin. 2003. v.35, p.127-31.

SCHWIEBERT, E.M. et al. *CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel.* Physiol. Rev. 1999. v.79, p.145-66.

SCOTT, F.F.; PITT, T.L. *Identification and characterization of transmissible Pseudomonas aeruginosa strains in cystic fibrosis patients in England and Wales.* J Med Microbiol. 2004. v.53, p.609-15.

SEGONDS, C. et al. *Differentiation of Burkholderia Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene and Application to Cystic Fibrosis Isolates.* J Clin Microbiol. 1999. v.37, p. 2201-8.

SEKIGUCHI, J.I. et al. *KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a Citrobacter freundii clinical isolate. Antimicrobial*. Agents and Chemot. 2008. v.52, p.4194-97.

SEMMLER, A.B.T., WHITCHURCH, C.B.; MATTICK, J.S. *Microbiology.* 1999. v.145, p.2863–2873.

SENDA, K. et al. *Multifocal outbreaks of metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa resistant to broad-spectrum β-lactams, including carbapenems.* Antimicrob Agents Chemother. 1996b. v.40, p. 349-353.

SIBLEY, C.D.; RABIN, H.; SURETTE, M. *Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease.* Future Microbiol. 2006. v.1, p.53-61.

SIMMONDS, N.J. *Cystic Fibrosis in the 21st century*. Respiratory Medicine. 2010. v.24, p.85-96.

SHIBATA, N. et al. *PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron.* J Clin Microbiol. 2003. v.41, p.5407-13.

SHIE, S.S.; HUANG, C.T.; LEU, H.S. *Characteristics of Achromobacter xylosoxidans bacteremias in northern Taiwan.* J Microbiol Immunol Infect. 2005. v.38, p.277-82.

SHIMKETS, L.J.; BRUN, Y.V. *Prokaryotic development: strategies to enhance survival. In Prokaryotic Development, pp. 1–7.* Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. 1999.

SHIN, K.S. et al. *Imipenem-resistant Achromobacter xylosoxidans carrying* bla_{VIM-2}*-containing class 1 integron.* Diag Micorbiol Infect Dis. 2005. v.53, p.215-20.

SINGH, K.P. et al. *Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms.* Nature. 2000. v.407, p.762-764.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. *Approved lists of bacterial names.* Int J Syst Bacteriol. 1980. v.30, p.225-420.

SMYTH, A.; WALTERS, S. *Prophylatic antibiotics for cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev. 2003. CD001912.

SOFIANOU, D. et al. *VIM-2 metallo-β-lactamase in Achromobacter xylosoxidans em Europe.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005. v.24, p.854-5.

SPANGERBERG, C. et al. *Comparison of type IV-pilin genes of Pseudomonas aeruginosa of various habitats has uncovered a novel unusual sequence.* FEMS Microbiol Lett. 1995. v.125, p.265-73.

SPILKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J;J. *A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel Achromobacter species.* J Clin Microbiol. 2012. v.50, p 3010–3015.

_____; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. *Identification and distribution of Achromobacter species in cystic fibrosis*. J. Cyst. Fibros. 2012.

ST. GEME, J.W. III.; CUTTER, D. *Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by Haemophilus influenzae type B.* Mol. Microbiol*.* 1996. v.21, p.21–31.

STARNER, T.D. et al. *Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable Haemophilus influenzae biofilm formation end Diminish established biofilms.* Antimicrob Agents Chemother. 2008. v.52, p.137-45.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, K.G.E.; TRUEPER, H.G. *Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives."* Int. J. Syst. Bacteriol. 1988. v.38, p.321-5.

STEPANOVIC, S. et al. *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.* J Microbiol Meth. 2000. v.40, p.175–179.

STRAIT, C. et al. *CFTR gene: molecular analysis in patients from the South Brazil.* Mol Gen Metabol. 2003. v.78, p.259-64.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J. W. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.* Lancet. 2001. v.358, p.135–138.

STOODLEY, P. et al. *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure.* J. Appl. Microbiol. Symp. Ser. 1999. v.85, p.195–285.

TADA, T. et al. *NDM-8 metalo-β-lactamase em uma cepa de Escherichia coli multi-resistente isolados no Nepal.* Agentes Antimicrob Chemother. 2013a. v.57, p.2394-6. .

_____, et al. *IMP-43 and IMP-44 metallo-β-lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother. 2013b. v.57, p.4427-32.

TAN, K. et al. *Alcaligenes infection in cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol. 2002. v.34, p.101-4.

TAGLE, M.S. *Epidemiologia de la fibrosis quística del pancreas en Chile. Revisión de 60 patientes.* Rev. Pediatr. (Santiago). 1988. v.31, p.212-7.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. *How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists.* Infect Control Hosp Epidemiol. 1997. v.18, p.426-39.

TERADA, L.S. et al. *Pseudomonas aeruginosa hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity.* Infect Immun. 1999. v.67, p.2371-6.

THOMASSEN, M.J. et al. *Pseudomonas cepacia: decrease in colonization in patients with cystic fibrosis.* Ann Rev Resp Dis. 1986. v.134, p.669-71.

TOLEMAN, M.A. et al. *Molecular characterization of SPM-1 a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobiol surveillance programme.* J Antimicrob Chemother. 2002. v.50, p.673-9.

TRAGLIA, G.M. et al. *Achromobacter xylosoxidans: An Emerging Pathogen Carrying Different Elements Involved in Horizontal Genetic Transfer.* Curr Microbiol. 2012. p.1-6.

_____, et al. *Distribution of Allelic Variants of the Chromosomal Gene blaOXA-114-like in Achromobacter xylosoxidans Clinical Isolates.* Curr Microbiol. 2013. v.67, p.596–600.

TURTON, J.F. et al. *Identification of Achromobacter xylosoxidans by detection of the bla(OXA-114-like) gene intrinsic in this species.* DiagnMicrobiol Infect Dis. 2011. v.70, p.408–411.

VAN DAELE, S. et al. *Shared genotypes of Achromobacter xylosoxidans strains isolated from patients a cystic fibrosis rehabilitation center.* J Clin Microbiol. 2005. v.43, p.2998-3002.

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.* Syst. Appl. Microbiol. 2013a. v.36, p.1–10.

_____, 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.* Syst and App Microbiol. 2013b. v.36, p.474– 482.

VANEECHOUTTE, M. et al. *Identification of Acinetobacter Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis.* J Clin Microbiol. 1995. v.33, p.11–5.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M., PIOCIOREANU, C.; HEINEN, J.J. *A more unifyng hipothesis for biofilms structures.* FEMS Microbiol. Ecol. 1997. v.24, p.181-183.

VANEECHOUTTE, M. et al. *Rapid identification of Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA).* FEMS Microbiol. Lett. 1992. v.93, p.227–234.

_____ et al. *Identification of Mycobacterium species with amplified rDNA restriction analysis.* J. Clin. Microbiol. 1993. v.31, p.2061–2065.

_____ , et al. *Identification of Acinetobacter Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis.* J Clin Microbiol. 1995. v.33, p.11–5.

VANLAERE, 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. Int J Syst Evol Microbiol. 2008. v.58, p.1580-90.

VAY, C.A. et al. *'In vitro' activity of different antimicrobial agents on gram-negative nonfermentative bacilli, excluding Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp.* Rev Argent Microbiol. 2005. v.37, p.34–45.

VERGISON, A. et al. *National survey of molecular epidemiology of Staphylococcus aureus colonization im Belgian cystic fibrosis patients.* J Antimicrob Chemother 2007. v.59, p.893-9.

VINION-DUBIEL, A.D. et al.*Correlation of wbiI genotype, serotype, and isolate source within species of the Burkholderia cepacia complex.* J Clin Microbiol. 2004. v.42, p.4121-6.

VOYNOW ,J.A.; SCANLIN, T.F. *Cystic fibrosis*. In: Panitch HB, editor. Pediatric pulmonology, the requisites in pediatrics. Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005. p.116-30.

_____, FISCHER, B.M.; ZHENG, S. *Proteases and cystic fibrosis.* Intern J Biochem Cell Biol. 2008. v.40, p.1238-45.

WAGNER, V.E.; IGLEWSKI. *P. aeruginosa biofilms in CF infections*. Clinic Rev Allerg Immunol 2008.

WALTNICK, P.I.; KOLTER, R. *Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm.* Mol. Microbiol. 1999. v.34, p.586–95.

WANG, X.; PRESTON, J.F.III.; ROMEO, T. *The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesion required for biofilm formation.* J Bacteriol. 2004.v.186, p.2724-2734.

WATSON, M.E.; BURNS, J.L.; SMITH, A.L. *Hypermutable Haemophilus influenzae with mutations in mutS are found in cystic fibrosis sputum.* Microbiology. 2004. v.150, p.2947-58.

WEITKAMP, J.H. et al. *Recurrent Achromobacter xylosoxidans bacteremias associated with persistent lymph nove infection in a patient with hyperimmunoglobulin M syndrome.* Clin Infect Dis. 2000. v.31, p.183-87.

WELLINGHAUSEN, N. et al. *Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical Pseudomonas aeruginosa, from patients with cystic fibrosis.* J Clin Microbiol. 2005. v.43, p.4070-5.

_____; WIRTHS, B.; POPPERT, S. *Fluorescence in situ hybridization for rapid identification of Achromobacter xylosoxidans and Alcaligenes faecalis recovered from cystic fibrosis patients.* J Clin Microbiol. 2006. v.44, p.3415-7.

WALSH, T.R. et al. *Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm?* Clin Microbiol Rev. 2005. v.18, p.306-325.

WHITCHURCH, C.B. et al.*Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation.* Science 2002. v.295, p.1497.

WIMPENNY, J.W.T.; COLASANTI, R. *A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models*. FEMS Microbiol. Ecol. 1997. v.22, p.1–16.

WOODS, D.E. et al. Role *of pili in adherence to buccal epithelial cells.* Infect Immun. 1980. v.29, p.1146–51.

WORLITZSCH, D. et al. *Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients.* J. Clin. Investig. 2002. v.109, p.317–325.

YABUUCHI, E.; OHYAMA, A. *Achromobacter xylosoxidans n. sp. from human ear discharge.* Jpn J Microbiol. 1971. v.15, p.477-81.

_____, et al. *Description of Achromobacter xylosoxidans Yabuuchi and Ohyama 1971.* Int J Syst Bacteriol. 1974. v.24, p.470-7.

_____, YANO, I. *Achromobacter gen. nov. and Achromobacter xylosoxidans (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev.* Int J Syst Bacteriol. 1981. v.31, p.477-8.

_____, et al. *Emendation of genus Achromobacter and Achromobacter xylosoxidans (Yabuuchi and Yano) and proposal of Achromobacter ruhlandii (Parker and Vishniac) comb. Nov., Achromobacter piechaudii (Kiredjian et al.) comb. Nov., and Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans (Ruger and Tan) com. Nov.* Microbiol Immunol. 1998. v.42, p.429-38.

YAMAMOTO, M. et al. *Molecular characterization of IMP-type metallo-b-lactamases among multidrug-resistant Achromobacter xylosoxidans.* J Antimicrob Chemother. 2012. p.10.

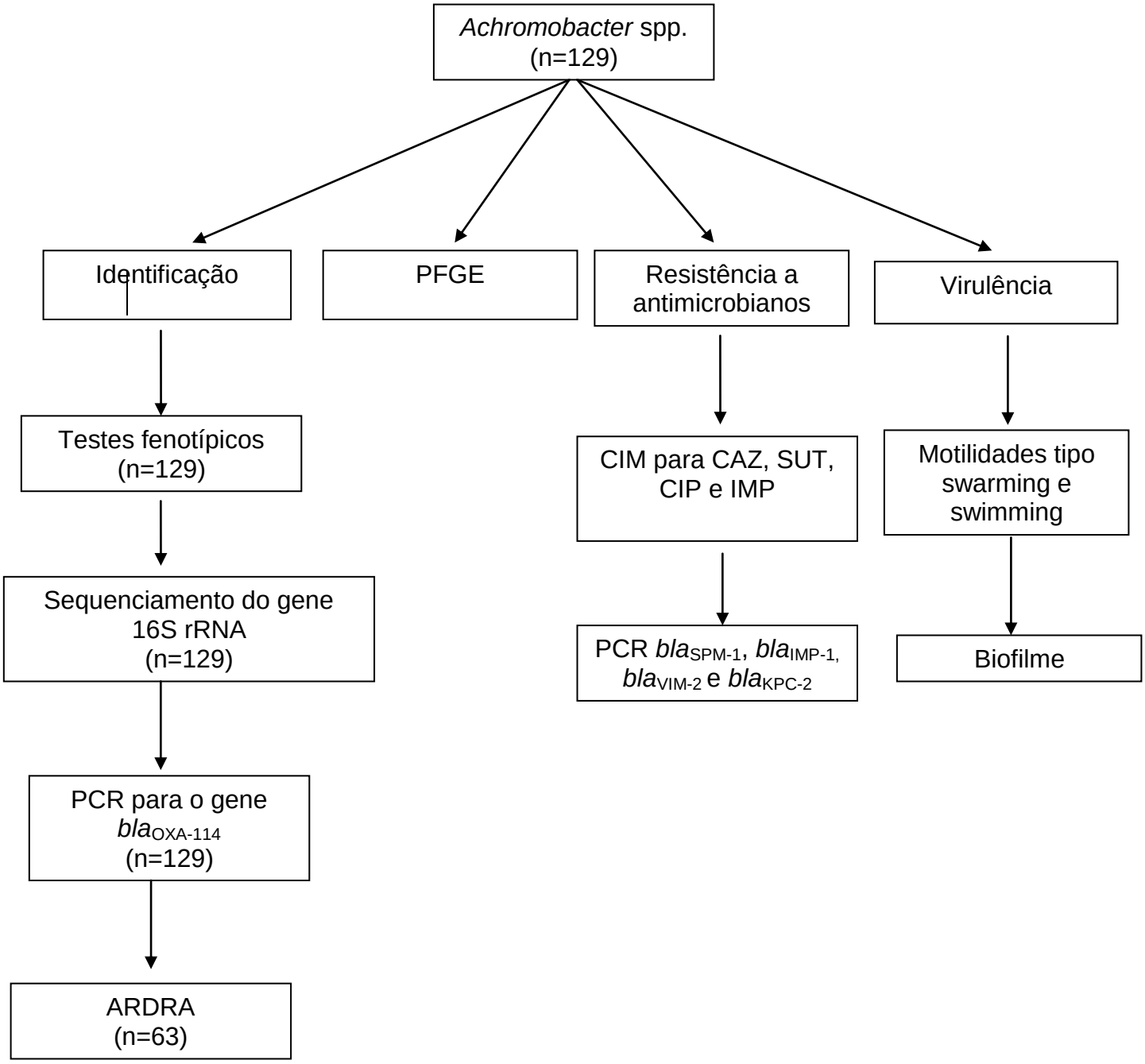
YONG, D. et al. *Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India.* Antimicrob Agents Chemother. 2009. v.53, p.5046-54.

YOUNG, D. et al. *A novel sub-group metallo-beta-lactamase (MBL), AIM-1 emerges in Pseudomonas aeruginosa (PSA) from Australia.* In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 2007. p.47.

ZHANG, L. et al. *Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis.* Antimicrob Agents Chemother. 2005. v.49, p.2921-7.

ZBINDEN, A. et al. *Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing.* J Clin Microbiol. 2007. v.45, p.2270-3.

APENDICE A - Fluxograma das etapas realizadas no estudo



ANEXO A – Pereira R H, et al. Achromobacter xylosoxidans: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 2011. 49: 3649-51.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2011, p. 3649–3651 Vol. 49, No. 10
0095-1137/11/$12.00 doi:10.1128/JCM.05265-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Achromobacter xylosoxidans: Characterization of Strains in Brazilian Cystic Fibrosis Patients▽

Rosana H. V. Pereira,[1] Ana Paula Carvalho-Assef,[2] Rodrigo M. Albano,[2] Tania W. Folescu,[4] Marcia C. M. F. Jones,[1] Robson S. Leão,[1] and Elizabeth A. Marques[2,3]*

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil[1]; Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil[2]; Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil[3]; Instituto Fernandes Figueira, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil[4]; and Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil[5]

Received 28 July 2011; Accepted 1 August 2011

We investigated the possibility of cross-infection among cystic fibrosis patients in two Brazilian reference centers. *Achromobacter xylosoxidans* isolates (*n* = 122) were recovered over a 5-year period from 39 patients. Isolates were genetically heterogeneous, but one genotype was present in 56% of the patients, suggesting that cross-infection may have occurred.

Achromobacter xylosoxidans has been isolated from respiratory samples from cystic fibrosis (CF) patients, but its propensity to chronically colonize and cross-infect them is still unclear. Widespread clones of *A. xylosoxidans* have been described previously (8, 11, 16), so we addressed this issue in two CF reference centers in Brazil. We aimed to evaluate the occurrence of chronic *A. xylosoxidans* colonization and the genetic relatedness of strains isolated from the same patients and to establish the possibility of cross-infection among CF patients.

This study is a retrospective analysis of 179 CF patients receiving routine care, from January 2003 to January 2008, at Instituto Fernandes Figueira (IFF-Fiocruz) (*n* = 130) and Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ) (*n* = 49). IFF-Fiocruz and HUPE-UERJ are two reference centers for pediatric and adult patients, respectively, in Rio de Janeiro, Brazil. The study was approved by the Committee on Ethical Practice of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro (approval no. 2574-CEP-CAAE: 0037.0.228.000-10).

Respiratory samples were cultured in accordance with bacteriological protocols for CF samples (4). Isolates identified as *Achromobacter* spp. by the Vitek 2 Compact system using Gram-negative (GN) cards (reference no. 21341; bioMérieux) were submitted for further identification using a panel of phenotypic tests as previously described (1, 10). To identify each isolate, DNA was extracted by a boiling lysis method, and the whole 16S rRNA gene was PCR amplified, sequenced, and used for BLAST searches against the GenBank database (6). Phenotypic tests and DNA sequencing identified 122 (93.8%) isolates as *A. xylosoxidans*. Eight isolates could be identified only at the genus level and were excluded from the study.

Over the study period, 39 patients (21.8%) had at least one positive culture for *A. xylosoxidans* (22 females and 17 males). Among these, there were 31 pediatric patients (mean age, 9.8 years; range, 2 to 17 years) and 8 adult patients (mean age, 23.8 years; range, 18 to 37 years). *A. xylosoxidans* colonization among pediatric and adult patients was 23.9% (31/130) and 16.3% (8/49), respectively, indicating a high prevalence of pediatric patient colonization compared to that described in most international reports (2, 5). As, on average, CF patient survival is lower in Brazil than in other countries, perhaps Brazilian pediatric patients have more severe lung disease, resembling the clinical status of adult patients in other countries. As a consequence, pulmonary colonization by emergent pathogens might be present earlier. Another possibility is that improved diagnostic tools allow the characterization of rare CF pathogens (3, 15). In total, 122 *A. xylosoxidans* isolates were recovered from 39 patients and positive cultures per patient ranged from 1 to 20. Five patients (12.8%) were chronically colonized by *A. xylosoxidans*. Patients were considered chronically colonized when at least three positive cultures in 1 year were obtained, with a minimum 1-month interval between them for at least 2 years. In 32 cultures, the only isolated microorganism was *A. xylosoxidans*, while in 90 cultures it was associated with other CF pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia* complex. Antibiotics were administered to treat these latter groups of bacteria but not to specifically target *A. xylosoxidans*. Usually, *A. xylosoxidans* appeared after repeated and prolonged treatments for *P. aeruginosa* lung infection (5). Unlike others (7, 15), our population did not show persistent associations with other pulmonary pathogens in patients chronically colonized with *A. xylosoxidans*. This is possibly linked to patient characteristics, including mean age and years of chronic colonization.

A. xylosoxidans isolates were compared by pulsed-field gel

* Corresponding author. Mailing address: Av. 28 de Setembro, 87 fundos, Disciplina de Microbiologia, 3 andar, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: 55 21 28688288. Fax: 55 21 28688376. E-mail: marlic@uerj.br.

▽ Published ahead of print on 17 August 2011.

TABLE 1. Distribution of clonal groups among 122 *A. xylosoxidans* isolates obtained from 39 CF Brazilian patients

Patient[a]	No. of isolates with indicated clonal group[b]																					
	A	C*	D	E*	F*	G*	H*	I	J	K	L	M	N	O*	P	Q*	R	U	V	W	X	Z
1							1															
2						1																
3						1																
4															1							
5						1																
6		3																				
7													2									
8						1																
9				1																		
10	3																					
11														1								
12						1																
13*					1	1		1								15						
14							3												1			
15			1																			
16*						4										15						
17						1																
18						1																
19				1								1										
20		1																				
21						1								1								
22						3			2													
23*				1	10	1										1	1					
24																				1		
25						1																
26						2																
27																		1				
28																1						
29						1										1					1	1
30						1																
31						1																
32						1																
33						1					1											
34						1																
35										5												
36						1																
37						1																
38*				7																		
39*				7																		
Total	3	4	1	17	11	28	4	1	2	5	1	1	2	2	1	33	1	1	1	1	1	1

[a] *, chronically infected patients.

[b] Superscript 1 after clonal group indicates *A. xylosoxidans* clones shared between two patients; superscript 2 after clonal group indicates *A. xylosoxidans* clones shared by more than two patients.

electrophoresis (PFGE) analysis of SpeI-digested genomic DNA (9). Patterns were analyzed by GelCompar II software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), with Dice coefficient analysis. The unweighted pair-group method using average linkages was applied with the bandwidth tolerance set at 1.5%. Isolates clustering together with an 85% level of similarity were considered to belong to the same PFGE type. Among the 122 isolates, 22 different profiles were found, indicating a considerable genetic heterogeneity. Most patients (15/39) carried individual genotypes, and sometimes, the persistence of those clones was associated with the establishment of chronicity. Nevertheless, some patients (7/39) shared the same clone. Chronically colonized patients carried just one clone at a particular period and occasionally exhibited other clones, often in a single appearance and before the establishment of chronicity (Table 1). Currently, studies minimize the possibility of *A. xylosoxidans* transmission by interhuman contacts, with a common genotype observed among pairs of brothers or pairs of friends who were frequently hospitalized at the same time (13, 14). In our study, patients 13 and 16 and patients 38 and 39 (two pairs of cohabiting siblings who were assisted in the same reference center) exhibited shared clones (Table 1).

Epidemiological studies have reported the presence of predominant *A. xylosoxidans* clones in chronically colonized CF patients, suggesting transmission between patients (7, 15, 16, 19). Kanellopoulos et al. (7) indicated that five CF patients were colonized by genetically related *A. xylosoxidans* strains. Lambiase et al. (8) showed that more than half of the *A. xylosoxidans* isolates could be grouped into seven different clusters, suggesting patient-to-patient transmission. Turton et al.

(16) compared isolates from different patients from the same center as well as other centers, revealing that 3 of 6 in one center shared the same cluster. In our patients, 56.4% (22/39) presented only the G genotype between March and October 2005 (Table 1). This is a substantially higher prevalence than that reported by others for their dominant clones (10, 12, 18). Reports of cross transmission with *A. xylosoxidans* in CF, in general, involve few adult patients. We identified a single clone from a large number of patients, mostly children, which was present in both analyzed centers. Patients who also presented with *P. aeruginosa* and/or *B. cepacia* complex infection had more severe disease, characterized by lower body mass index (BMI), lower forced expiratory volume in 1 s (FEV1), and more respiratory exacerbations and hospitalizations. Even though only patients 13 and 16 were siblings, and patients who were hospitalized at similar dates were admitted to separate wards, our results suggest a cross-infection, since all patients were assisted at the same time at a CF clinic. In addition, we could not completely rule out the occurrence of social contacts outside the hospital or a possible contamination from common environmental sources. Based on these considerations, we believe that this was an isolated episode that is not of sufficient strength to justify the revision of infection control measures because the segregation policy is carefully emphasized both in hospitals and in social contact. Furthermore, the G genotype did not persist, even though we still detect *A. xylosoxidans* in our patients and our control measures have proven to be efficient for the control of other bacteria found in CF patients. Additionally, there are no current control measures specifically aimed at *A. xylosoxidans* (17).

To our knowledge, this is the first case of an *A. xylosoxidans* cross-infection in a large number of CF patients. There is still little consensus as to whether *A. xylosoxidans* cross-infection occurs to a significant extent and whether measures such as segregated cohort clinics should be considered within an infection control strategy. Additional studies with more discriminative molecular tools are necessary to elucidate this issue.

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro grant E-26/111.138/2009 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico grant 471708/2008.

We thank Gérson de Araújo Rocha and Luciano Ribeiro da Costa Silva for their technical support.

REFERENCES

1. **Barth, A. L., et al.** 2007. Cepacia fibrosis patient with *Burkholderia pseudomallei* infection acquired in Brazil. J. Clin. Microbiol. **45:**3377–3380.
2. **De Baets, F., P. Schelstraete, K. Van Daele, F. Haerynck, and M. Vanneechoutte.** 2007. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. J. Cyst. Fibrosis **6:**75–78.
3. **Emerson, J., S. McNamara, A. M. Buccat, K. Worrell, and J. L. Burns.** 2010. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. Pediatr. Pulmonol. **45:**363–370.
4. **Gilligan, P. H., D. L. Kirkin, and M. D. Appleman.** 2006. Candida (f), Cystic fibrosis microbiology. Coordinating ed., M. D. Appleman. ASM Press, Washington, DC.
5. **Hansen, A. R., M. Julio, M. Ros-Melo, and S. A. McCulley.** 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. **24:**29–70.
6. **Hirschi, A.** 1992. Direct automated sequencing of 16s rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett. Appl. Microbiol. **14:**213–215.
7. **Kanellopoulou, M., et al.** 2004. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* clone. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **23:**556–559.
8. **Lambiase, A., et al.** 2011. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **30:**977–980.
9. **Leão, R. S., et al.** 2010. Comparison of the worldwide transmissible *Pseudomonas aeruginosa* with isolates from Brazilian cystic fibrosis patients. Trans. J. Microbiol. **81:**1379–1381.
10. **Leão, R. S., et al.** 2010. First report of *Pandoraea* clones from a patient with cystic fibrosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **66:**321–323.
11. **Lim, L., et al.** 2002. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. **40:**1213–1215.
12. **Magal, A., M., et al.** 2010. *Achromobacter xylosoxidans* genomic characterization and correlation of randomly amplified polymorphic DNA profiles with relevant clinical features of cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. **48:**1320–1329.
13. **Steinmetz, H., et al.** 1997. Colonization by *Alcaligenes xylosoxidans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation. Clin. Infect. Dis. **24:**270–275.
14. **Pellicciotta-Lambrecqts, H., B. Kentsop, and G. Hanne.** 1998. Persistent airway colonization with *Alcaligenes xylosoxidans* in two brothers with cystic fibrosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **17:**132–134.
15. **Rao, T., G. Hanna, B. Gruson, M. Zuber, and B. Sarola.** 2008. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infections in cystic fibrosis patients. APMIS **116:**837–841.
16. **Ramos Ramos, C., T. Pounder, N. Bailey, and M. Cormican.** 2006. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients: a retrospective case control study. J. Cyst. Fibrosis. **5:**243–251.
17. **Salman, L.** 2011. Infection prevention and control in cystic fibrosis. Curr. Opin. Infect. Dis. **24:**390–395.
18. **Turton, J. F., et al.** 2011. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the bla(OXA-114-like) gene intrinsic to this species. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **70:**318–321.
19. **Van Daele, K., et al.** 2005. Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center. J. Clin. Microbiol. **43:**3998–3002.