



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

Elenice Rosa de Aguiar Rodrigues

Identificação de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas na Fibrose Cística: comparação entre as técnicas de *Multilocus Sequence Typing*, PCR para o gene *bla*_{OXA-114} e sequenciamento do gene 16S rRNA

Rio de Janeiro

2014

Elenice Rosa de Aguiar Rodrigues

**Identificação de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas na fibrose cística:
comparação entre as técnicas de *Multilocus Sequence Typing*, PCR para o
gene *bla_{OXA-114}* e sequenciamento do gene 16S rRNA**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Coorientador: Dr Alex Guerra Ferreira

Rio de Janeiro

2014

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

R696 Rodrigues, Elenice Rosa de Aguiar.

Identificação de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas na fibrose cística: comparação entre as técnicas de Multilocus Sequence Typing, PCR para o gene blaOXA-114 e sequenciamento do gene 16S rRNA / Elenice Rosa de Aguiar Rodrigues. – 2014.

75 f.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques.

Coorientador: Alex Guerra Ferreira.

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

1. Fibrose cística – Diagnóstico - Teses. 2. Pulmões – Doenças – Teses. 3. *Achromobacter* - Patogenicidade. 4. Tipagem de Sequências Multilocus - Métodos. 5. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado - Métodos. 6. RNA Ribossômico 16S. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Ferreira, Alex Guerra. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.24

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

Assinatura

Data

Elenice Rosa de Aguiar Rodrigues

**Identificação de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas na fibrose cística:
comparação entre as técnicas de *Multilocus Sequence Typing*, PCR para o
gene *bla_{OXA-114}* e sequenciamento do gene 16S rRNA**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de setembro de 2014.

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

Coorientador: Prof. Dr. Alex Guerra Ferreira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Robson de Souza Leão
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

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

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

A Jesus Cristo, exemplo de vida, autor da minha fé, minha bússola em meio à tempestades, por me ensinar a ousar viver além das possibilidades; aos meus pais pelos incontáveis sacrifícios que proporcionaram a existência deste momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da existência, por ser um porto seguro em meio às tempestades da vida, força motriz em circunstâncias desfavoráveis e ventos contrários. Por todo o cuidado nos mínimos detalhes, ao colocar as pessoas certas no meu caminho.

Aos meus pais Elcy e Geni por todo o incentivo e apoio ao longo da caminhada. Por não me deixarem desistir, por suportarem toda a ausência desde a graduação até o presente momento. Principalmente por sonharem este sonho comigo.

Aos meus oito irmãos e meus cunhados Marquinho, Fábio e Paulo por todo incentivo durante a jornada, pelo orgulho visto em seus olhos e palavras ao se referirem à mim e todas as minhas conquistas acadêmicas e profissionais.

Aos meus 12 sobrinhos por se preocuparem e incentivarem ao longo do percurso, principalmente por usarem meu exemplo de vida como incentivo para mudança de paradigmas e perspectivas diante da vida.

Aos meus tios e primos por abraçarem meus sonhos.

Aos amigos do laboratório 2, Daniele Lima, Daniele Pacheco, Selma, Orlando Neto, Guilherme, Géssica Araújo, Meyvianne, Rafael, Scarlet, Adriano, Rosangela, pelos momentos de diversão, companheirismo e trocas de conhecimentos.

Agradeço à Márcia Jones (Marcinha) por ser a grande incentivadora dos estudos com *Achromobacter* spp., mas acima de tudo por ser uma grande amiga e professora. Por vibrar a cada descoberta e conquista do grupo. Jamais me esquecerei da sua paciência em me ouvir contando as novidades dos meus experimentos e de toda a alegria demonstrada com os resultados surpreendentes relacionadas ao nosso “Achromo”!

À Rosana Helena por sua coragem e determinação tanto na vida pessoal quanto profissional e por aceitar o desafio de iniciar os estudos com o gênero *Achromobacter*.

Ao meu Co-orientador Alex, “Meu malvado favorito” (risos), pelas críticas construtivas e exemplo de profissionalismo. Muito obrigada por todo o ensinamento e suporte desde a iniciação científica até os dias atuais.

À Prof.^a Dra. Vânia Merquior por me abrir as portas da microbiologia. Principalmente por ser uma amiga-mãe, grande incentivadora, e que sempre buscou me fazer ver o melhor de mim. Suas sábias estratégias de estudo no 2º semestre da graduação teve um papel fundamental na minha permanência na Universidade e possibilitaram a realização deste sonho que vivo hoje. Jamais me esquecerei deste ato!

À Prof.^a Dra. Elizabeth Marques, minha orientadora e referencial de caráter, liderança e superação. Sinto muito orgulho de ser sua aluna e me sinto muito agraciada pela grande oportunidade de lhe conhecer e ser orientada por essa pessoal tão excepcional, tanto do ponto vista profissional quanto pessoal. Seus conselhos durante a fase de seleção para o mestrado, sua história de vida me ensinou a acreditar que posso ir além das minhas próprias expectativas, basta querer sair da zona de conforto.

Ao Prof. Dr. Robson Leão pelo exemplo de organização, perseverança, disponibilidade em ajudar e compartilhar seus conhecimentos. Obrigada pelas lições engraçadas (Risos)!

A todos os amigos da igreja, em especial aos grandes incentivadores Pr Carlos Alberto Lessa, Carmem, Maria Senhora, Débora, Patrícia, Vânia, Alcides, David Saramago, Regiane, Dayane, Leonardo, Walafe, Natalice, Priscila Cruz, Priscila Feijó, Rejania, Katleen e Jaison, por todo companheirismo, respeito, incentivo e intercessão.

Aos amigos da “selva” (Risos): Fátima, Rafael, Marcos, Taísa, Welisson, Wallace por todo o incentivo e apoio, por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso em todos os momentos.

Às minhas amigas mais chegadas que irmãs: Adriana Faria, Fabiana Barbosa, Nathália Detogne e Viviane Cerqueira. Com vocês vivi os melhores momentos na graduação e nos tornamos muito mais que amigas, nos tornamos irmãs. Crescemos juntas e nos superamos durante a caminhada. Aprendemos a compartilhar os momentos tristes e alegres, a despertar o melhor de nós, a nos respeitar e nos completar em nossas diferenças. A amizade de vocês é um bem precioso que guardarei até o fim, um dos mais belos presentes concedidos pela UERJ.

Ao corpo técnico do Departamento de Microbiologia e Imunologia: Angélica, Denílson, Emanoela, Camila, Carla Freitas, Patrícia, Cristina (Cris), Adriana, Maria

de Lourdes, Raquel e Wagner, pela troca de conhecimento e incentivos nos intervalos entre os experimentos.

À Andréa Fonseca pela amizade, companheirismo e trocas de conhecimentos ao longo do caminho e seu modo “fanfa” de resolver tudo.

À Minha amiga quase espanhola, Beatriz Godoy por estar sempre lado a lado em todos os momentos, mesmo diante da distância entre dois continentes. Por todo o imenso carinho, respeito, cuidado e incentivo nos bastidores e dinâmica do mestrado.

Ao amigo internacional, Jorge Matos, que já chegou ao Brasil marcando territórios (Risos). Por todo o carinho, respeito, incentivo e por ser um grande amigo para todas as horas.

Aos colegas de turma de Mestrado Microbiologia UERJ 2012.1 por toda cumplicidade, trocas de conhecimentos e companheirismo. Vocês tornaram as disciplinas mais divertidas e alegres!

À Denise Oliveira do laboratório de Genoma/UERJ pela amizade, parceria e todo suporte técnico imprescindível para a realização deste trabalho. Pela disposição em abrir mão de alguns dias de suas férias para que este trabalho fosse concluído.

Ao professor Rodolpho Matos Albano do laboratório de Genoma/UERJ pela parceria, suporte técnico e científico para a realização das reações de sequenciamentos das amostras utilizadas neste e outros trabalhos do laboratório 02.

Aos professores Mara, Ana Cláudia, José Augusto, Arnaldo Andrade, João Andrade, Ana Cláudia, Alessandra Saliba, Maria Cristina, Wania, Maria da Graça Luna, Rafael Hirata, Lucimar Milagres, Alexandre Belo e José Roberto por todo o conhecimento transmitido ao longo do curso de mestrado em microbiologia.

Aos amigos do laboratório 01 Raquel, Ana Caroline, Esther, Ana Cláudia, Paula e Maria Angélica pelo companheirismo e momentos de descontração durante as tardes no departamento.

Aos membros da banca (Dr^a Ana Paula, Dr^a Mara Queiroz, Dr^a Karyne Carvalho e Dr Robson Leão) por aceitarem o convite de serem parceiros no aperfeiçoamento desta dissertação.

À UERJ Por abrir as portas para me receber e ser a base da minha formação profissional, tanto no curso de Ciências biológicas quanto no Curso de Mestrado em Microbiologia. Agradeço pela imensa oportunidade de aprender com alguns dos

melhores professores do país. Por ser um local de transmissão de conhecimento, mas também de formação de laços de amizade para toda a vida.

Quando o céu está mais
escuro, Você pode ver as estrelas.

Jordin Sparks

RESUMO

RODRIGUES, Elenice Rosa de Aguiar. **Identificação de *Achromobacter xylosoxidans* isoladas na fibrose cística**: comparação entre as técnicas de *Multilocus Sequence Typing*, PCR para o gene *bla*_{OXA-114} e sequenciamento do gene 16S rRNA. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Achromobacter xylosoxidans tem se destacado como patógeno importante nas infecções pulmonares em pacientes com Fibrose Cística (FC). A similaridade fenotípica e genotípica entre as espécies do gênero dificulta a sua identificação podendo subestimar a real frequência. A identificação adequada é necessária para compreender a epidemiologia e impacto clínico das diferentes espécies de *Achromobacter*. Este estudo comparou os resultados obtidos na identificação das espécies do gênero por sequenciamento do gene 16S rRNA, por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e PCR para o gene *bla*_{OXA-114-like}. Foram avaliadas 30 amostras de *Achromobacter* spp, obtidas de 17 pacientes com FC atendidos em dois centros de referência na cidade do Rio de Janeiro, pertencentes a 18 clones previamente estabelecidos por PFGE. O sequenciamento do gene 16S rRNA, identificou as 30 amostras como *A. xylosoxidans*. O sequenciamento dos produtos de amplificação para o gene *bla*_{OXA-114-like} revelou compatibilidade de 17 amostras com alguma variável do gene e foram caracterizadas como *A. xylosoxidans*. Onze amostras foram compatíveis com o gene *bla*_{OXA-258}, e foram classificadas como *A. ruhlandii*. Duas amostras não obtiveram amplificação. A análise do MLST mostrou que 11 amostras obtiveram correspondência com quatro STs (2, 13, 35, 36) disponibilizado no *Achromobacter MLST website*. Em 15 amostras foram caracterizados dez novos alelos que geraram oito novos STs (198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 e 205). Duas combinações alélicas novas foram observadas em duas amostras caracterizando dois novos STs (206 e 207). Duas amostras não tiveram seus STs definidos. As 30 amostras corresponderam a 14 STs e quatro espécies de *Achromobacter* spp. Dezesete amostras foram identificadas como *A. xylosoxidans*, nove como *A. ruhlandii*, uma *A. dolens* e uma *A. insuavis*. As três técnicas foram concordantes apenas na identificação de 17 amostras de *A. xylosoxidans* (56,6%). A identificação de nove amostras de *A. ruhlandii* foram concordantes nas técnicas de MLST, PCR e sequenciamento para OXA-114. *A. dolens* e *A. insolitus* foram identificados somente por MLST. A comparação entre PFGE e MLST mostrou que os resultados das duas técnicas não são totalmente concordantes. O PFGE caracterizou 18 clones enquanto o MLST identificou 14 STs. Na amostragem foram observados diferentes clones PFGE correspondendo ao mesmo ST e clones PFGE/MLST únicos por paciente. Os resultados deste estudo demonstraram que, o sequenciamento do gene 16S rRNA foi uma boa ferramenta para a caracterização do gênero e a PCR do gene *bla*_{OXA-114} foi útil para a identificação das duas espécies mais frequentes na FC (*A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii*). Entretanto, o MLST teve o melhor desempenho caracterizando todas as espécies descritas. Estudos adicionais são necessários para elucidar a dinâmica da infecção e contribuições das diferentes espécies do gênero *Achromobacter* na FC.

Palavras-chave: Fibrose cística. Identificação das espécies. *Achromobacter*. MLST.

*bla*_{OXA-114-like}. PFGE.

ABSTRACT

RODRIGUES, Elenice Rosa de Aguiar. ***Achromobacter xylosoxidans* species identification of samples isolated in cystic fibrosis**: comparison between techniques Multilocus Sequence Typing, PCR for *bla*_{OXA-114} gene and 16S rRNA gene. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Achromobacter xylosoxidans has been highlighted as an important pathogen in lung infections of patients with cystic fibrosis (CF). Phenotypic and genotypic similarity among species of the genus hampers identification and the real frequency is possibly underestimated. The proper identification is required to understand epidemiology and clinical impacts of different species of *Achromobacter*. This study compared the results obtained of identification of species of the genus by 16S rRNA gene, by Multilocus Sequence Typing (MLST) and by PCR for *bla*_{OXA-114-like} gene. Thirty *Achromobacter* spp. samples were obtained from 17 patients with CF treated in two reference centers Rio de Janeiro city and belonging to 18 clones previously established by PFGE were evaluated. The 16S rRNA gene sequencing identified all samples as *A. xylosoxidans*. The sequencing of the amplification products of *bla*_{OXA-114-like} gene revealed compatibility of 17 samples with some gene variation and were identified as *A. xylosoxidans*. Eleven samples were consistent with the *bla*_{OXA-258} gene, and were classified as *A. ruhlandii*. Two samples didn't obtain amplification. MLST analysis showed 11 samples matching four STs (2, 13, 35, 36) provided by MLST *Achromobacter* site. In 15 samples were characterized ten new alleles, grouped in eight new STs (198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 and 205). Two new combinations of alleles were observed in 2 samples featuring 2 new STs (206 and 207). Two samples didn't have their STs defined. The 30 samples corresponded to 14 STs and four species of *Achromobacter* spp. Seventeen samples were identified as *A. xylosoxidans*, nine as *A. ruhlandii*, one as *A. dolens* and one as *A. insuavis*. The three techniques were consistent only to identify 17 samples as *A. xylosoxidans* (56.6%). The identification of nine samples of *A. ruhlandii* were concordant in MLST, PCR and sequencing for OXA-114 techniques. *A. dolens* and *A. insolitus* were identified only by MLST. The comparison between PFGE and MLST showed that results of the two techniques aren't entirely consistent. PFGE technique characterized 18 clones while MLST identified 14 STs. Among different samples, PFGE different clones were correspondent to the same ST and some PFGE / MLST clones were unique per patient. Results of this study show that 16S rRNA sequencing was a good tool for gender characterization and PCR gene *bla*_{OXA-114} was useful for identification of two most common species in the FC (*A. xylosoxidans* and *A. ruhlandii*). However, MLST had the best performance featuring all described species. Additional studies are required to elucidate the infection dynamics and contribution of the different species of the genus *Achromobacter* in FC.

Keywords: Cystic fibrosis. Identification of species. *Achromobacter*. MLST. *bla*_{OXA-114-like}. PFGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição das espécies de <i>Achromobacter</i> spp. caracterizadas por MLST.....	44
Figura 2 – Árvore neighbor-joining (NJ) baseada nas sequências concatenadas MLST (alinhamento 2249 pb).....	45
Figura 3 – Árvore <i>Neighbor Joining</i> (NJ) com as sequências das 28 amostras com amplificação positiva para o gene <i>bla</i> -OXA-114.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Iniciadores para análise do <i>Multilocus Sequence Typing</i> de <i>Achromobacter spp.</i>	32
Tabela 2 –	Espécies utilizadas no alinhamento das sequências concatenadas dos sete genes do esquema MLST.....	36
Tabela 3 –	Características da amostragem	40
Tabela 4 –	<i>Sequence Typing</i> (ST) de <i>Achromobacter</i> descritos neste estudo....	42
Tabela 5 –	<i>Sequence Typing</i> encontrados entre as espécies de <i>Achromobacter</i>	43
Tabela 6 –	Identificação das espécies de <i>Achromobacter spp</i> por sequenciamento do gene <i>bla</i> _{OXA-114}	46
Tabela 7 –	Comparação entre as técnicas de sequenciamento dos genes 16s rRNA, <i>bla</i> _{OXA-114} e, MLST na caracterização das espécies de <i>Achromobacter</i>	49
Tabela 8 –	Distribuição dos perfis PFGE e STs dentre as amostras de <i>Achromobacter spp.</i>	50
Tabela 9 –	Análise temporal da distribuição dos STs por paciente.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARDRA	Amplified ribossomal DNA restriction analysis
BGN-NF	Bastonetes Gram Negativos não fermentadores
BHI	Brain Heart Infusion
CBc	complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLED	Cysteine lactose electrolyte deficient agar
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O	Densidade ótica
DES	Cepa Epidêmica Dinamarquesa
FC	Fibrose Cística
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Fernandes Figueira
LES	Cepa Epidêmica Liverpool
LMG	Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser-Dessorção/Ionização Time Of-Flight
MLSA	Multi-Locus Sequence Analysis
MLST	Multilocus Sequence Typing
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina
OXA	Oxacilinase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REBRAFC	Registro Brasileiro de Fibrose Cística
SCVs	Small-Colony Variants
SDS-PAGE	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida
ST	Sequence Type
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
Pb	Pares de base
mM	Milimol
pmol	Picomol
mA	Miliamper
U/μL	Unidade por microlitro
UV	Radiação Ultravioleta
NJ	Neighbor-Joining

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA FIBROSE CÍSTICA	18
2	<i>ACHROMOBACTER</i> SPP. NA FIBROSE CÍSTICA	21
2.1	Identificação fenotípica e molecular de <i>Achromobacter</i> spp	23
2.2	Tipagem molecular	27
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo geral	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	Pacientes e Amostras bacterianas	31
5.2	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	31
5.2.1	<u>Extração do DNA bacteriano por lise térmica</u>	31
5.2.2	<u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	32
5.2.3	<u>Análise do produto PCR</u>	33
5.2.4	<u>Purificação das amostras</u>	34
5.2.5	<u>Reações de sequenciamento</u>	34
5.2.6	<u>Precipitação da reação de sequenciamento</u>	35
5.2.7	<u>Análises de Bioinformática</u>	35
5.3	Deteção genotípica de oxacilinase β-lactamase (OXA-114)	37
5.3.1	<u>Extração do DNA bacteriano</u>	37
5.3.2	<u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u>	37
5.3.3	<u>Análise do produto PCR</u>	37
5.3.4	<u>Purificação das amostras amplificadas, reação de sequenciamento e precipitação da reação de sequenciamento</u>	38
5.3.5	<u>Análises de Bioinformática</u>	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Caracterização da amostragem	39
6.2	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	41
6.3	Identificação das espécies de <i>Achromobacter</i> spp	42

6.3.1	<u>MLST</u>	42
6.3.2	<u>PCR e sequenciamento do gene <i>bla_{OXA-114}</i></u>	45
6.4	Comparação entre a identificação das amostras de <i>Achromobacter</i> spp. obtidas no sequenciamento dos genes 16S rRNA, <i>bla_{OXA-114}</i> e a análise MLST	48
6.5	Tipagem molecular: comparação entre os resultados obtidos no PFGE e no MLST	49
6.6	Análise temporal da distribuição dos STs por paciente	51
7	DISCUSSÃO	53
7.1	Identificação de <i>Achromobacter</i> spp	53
7.2	Comparação entre a identificação utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, MLST e PCR e sequenciamento do gene <i>bla_{OXA-114}</i>	59
7.3	Comparação PFGE E MLST	60
7.4	Distribuição dos STs entre os pacientes	62
	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO

“Infeliz da criança que, quando beijada na fronte, apresente sabor salgado. Ela está fadada a morrer precocemente”. Este dizer folclórico norte-europeu, constitui uma das referências mais antigas à Fibrose Cística (FC) (WELHS e SMITH, 1995 *apud* 1 FIRMINA; MARQUES e COSTA, 2011). Crianças nesta condição eram consideradas amaldiçoadas ou enfeitçadas e eram impedidas de serem batizadas na França, Alemanha e Inglaterra (FIRMIDA e LOPES, 2011).

A primeira descrição e documentação da FC ocorreu na Década de 1930 por Dorothy Hansine Andersen (DERICHS, 2013). Nesse período, cerca de 70% das crianças morriam logo no primeiro ano de vida e todas iam a óbito até os 10 anos de idade (LUBAMBA et al. 2012). Graças a avanços na medicina tais como a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos básicos, aliados a progressos terapêuticos e disponibilidade de serviços especializados, atualmente a morte prematura não constitui a sentença dos pacientes com FC (FIRMIDA e LOPES, 2011).

Melhorias no tratamento da doença elevou a expectativa de sobrevivência desses indivíduos para 40 anos. Dados atuais revelam que, a incidência mundial da doença é de cerca de 1 em cada 2500-3000 recém-nascido (CIUCĂ et al. 2014)

Posteriores investigações sobre a doença evidenciaram que, o gosto de sal na pele de portadores da doença ocorre como resultado do aumento da secreção de cloreto de sódio em glândulas sudoríparas. Esta condição passou a ser utilizada como teste diagnóstico para a FC na década de 1959. Mais tarde, na década de 1980, foi descrita a impermeabilidade do cloreto na glândula de suor (LUBAMBA et al. 2012)

Também conhecida como mucoviscidose, a FC é a desordem genética letal de origem recessiva mais comum em caucasianos descendentes de europeus, rara na população africana e nos asiáticos. É caracterizada por uma desordem multissistêmica, incluindo complicações respiratórias, obstrução intestinal, doença pancreática exócrina e obstrução nos ductos hepáticos (CABELLO, 2011; TUGGLE et al. 2014).

Indivíduos com FC apresentam mutações no gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que está localizado no cromossomo 7, em

duas cópias de 230-kb. Este gene codifica uma proteína canal iônico de 1.480 aminoácidos, expressa na membrana apical de células epiteliais localizadas em vários locais como nos pulmões, seios nasais, pâncreas, intestino, canais deferentes, e dutos de suor, além de células do sistema imunológico e células musculares (RITTENHOUSE et al. 2011; WEILER e DRUMM 2013; TUGGLE et al. 2014). Alterações na CFTR ocasionam manifestações anormais no funcionamento das glândulas exócrinas, resultando na composição alterada e aumentada da viscosidade das secreções epiteliais em ductos presentes nestes locais (VOYNOW, FISCHER, e ZHENG 2008).

A doença é causada pela perda de expressão ou função da proteína CFTR. Mutações no gene podem resultar em alterações na maturação intracelular e distribuição anormal da proteína nas células epiteliais, levando ao aumento da absorção de sódio e perda ou redução da secreção de cloro (DERICHS 2013).

Atualmente, cerca de 1.973¹ mutações já foram descritas na CFTR. A mutação mais prevalente na população caucasiana é a F508 Δ que corresponde a 86% dos alelos da FC, uma deleção do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína codificada (LUBAMBA et al. 2012).

Embora a FC seja uma patologia multissistêmica, o sistema respiratório é o mais gravemente afetado. A doença pulmonar é a principal e maior responsável pela morbidade e mortalidade em cerca de 95% dos casos (VOYNOW, FISCHER, e ZHENG 2008; BHATT, 2013; BUSQUETS et al. 2013). A manifestação pulmonar caracteriza-se pela inflamação e comprometimento do transporte mucociliar e consequente infecção crônica das vias respiratórias (FLUME et al. 2009).

No epitélio das vias respiratórias, a função reduzida ou nula da CFTR acarreta não apenas a permeabilidade diminuída de cloro, mas também o aumento da absorção de sódio e água através do epitélio, prejudicando a hidratação da superfície mucosa, resultando em um muco espesso e pegajoso, um ambiente propício para a proliferação microbiana (WEILER e DRUMM, 2013).

¹ Lista de mutações. Disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>. Acesso em 11 ago. 2014.

1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA FIBROSE CÍSTICA

Na FC, infecções respiratórias crônicas causadas por vários agentes bacterianos potencialmente patogênicos e oportunistas são reconhecidos por terem o maior impacto na morbidade e mortalidade nesses pacientes. Além das características próprias do muco, o acúmulo anormal de ceramida nos pulmões e nas células epiteliais desses pacientes gera um aumento da taxa de morte de células epiteliais respiratórias e depósitos de DNA no epitélio respiratório, o que facilita a aderência bacteriana (DÖRING, PARAMESWARAN, e MURPHY, 2011).

Espécies bacterianas variadas podem colonizar o trato respiratório de pacientes com FC, embora apenas um menor número está associado à doença pulmonar. Em geral, na doença pulmonar, as bactérias patogênicas encontram-se associadas a determinadas faixas etárias (YANG, JELSBK, e MOLIN 2011) (BUSQUETS et al. 2013; BALDAN et al. 2014).

A colonização é frequentemente iniciada por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, patógenos bacterianos oportunistas prevalentes nas vias aéreas de pacientes com FC logo no início da vida (0-9 anos). Na maioria dos casos, *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de colonizar os pacientes ainda em idade precoce se estendendo ao longo de toda a vida. A microbiologia destes pacientes torna-se mais complexa com a colonização de outros bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGNNF), como *Stenotrophomonas maltophilia*, membros do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Achromobacter xylosoxidans*, dentre outros (RENDERS et al. 2001; VALENZA et al., 2008; DÖRING, PARAMESWARAN, e MURPHY, 2011; FODOR et al. 2012).

S. aureus é muito frequente em lactentes com FC, sendo encontrado em 30% do lavado broncoalveolar de crianças com idade entre 3 e 6 meses de idade (FOWERAKER, 2009). Além do tradicional fenótipo, casos de infecção crônica por *small-colony variants* (SCVs) de *S. aureus* tem sido observados. Estes fenótipos são difíceis de serem detectados *in vitro*, devido a sua característica de crescimento lento e perda da pigmentação característica de *S. aureus*. Estas cepas estão associadas à maior virulência, níveis elevados de resistência a antimicrobianos e ao declínio da função pulmonar. Estudos com crianças e adultos na Europa mostraram que o morfotipo SCV de *S. aureus* podem ser encontrados em 8% à 33% das

culturas de trato respiratório (KAHL et al. 2003; FOWERAKER 2009; GOERKE e WOLZ 2010; WOLTER et al. 2013).

O elevado aumento de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) tem sido a grande preocupação de vários países, decorrente não só da sua patogenicidade, mas ao efeito das limitações ao tratamento dos pacientes colonizados por esse fenótipo (FOWERAKER, 2009). De acordo com o relato anual da *Cystic Fibrosis Foundation* (2013), a prevalência de MRSA tem aumentado e pode ser encontrado em cerca de 25% dos pacientes com FC.

P. aeruginosa é o patógeno dominante na FC, sendo encontrada em mais de 80% dos pacientes adultos e é a principal causa de mortalidade e morbidade (FELIZIANI et al. 2010; YANG, JELSBK, e MOLIN 2011).

A infecção inicial por *P. aeruginosa* pode ser intermitente, com a presença de vários grupos clonais, geralmente com cepas apresentando o fenótipo não mucóide. Durante o estabelecimento da infecção crônica, eventualmente, apenas uma única linhagem, geralmente ambiental, se diversifica em fenótipos especificamente adaptados ao ambiente pulmonar hostil do paciente com FC, permitindo assim a sua persistência de longo prazo. Na infecção crônica a cepa característica é do fenótipo mucóide devido a hiperprodução do exopolissacarídeo alginato. Geralmente a aquisição deste fenótipo, torna difícil a erradicação do microrganismo (CIOFU et al. 2008; FELIZIANI et al. 2010; LIPUMA 2010; MOWAT et al. 2011; QIN et al. 2012; DAMRON et al. 2013).

P. aeruginosa é capaz de ultrapassar barreiras individuais em pacientes com FC. Cepas epidêmicas, tais como a cepa epidêmica Liverpool (LES), são capazes de infectar centenas de pacientes em diferentes localizações geográficas (CRAMER et al. 2012; LÓPEZ-CAUSAPÉ et al. 2013; JEUKENS et al. 2014). Muitas adquirem o fenótipo de multirresistência, e tem sido associado ao aumento da morbidade em pacientes infectados. Esse fenômeno tem levado a alterações nas políticas de segregação de pacientes com esse fenótipo (FOWERAKER, 2009; LIPUMA, 2010; LÓPEZ-CAUSAPÉ et al. 2013).

Além de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, patógenos clássicos na FC, outros microrganismos podem causar infecções. A antibioticoterapia usada para prevenir, tratar infecções agudas e reduzir frequência de exarcebações tem aumentado a sobrevivência desses pacientes. Este aumento tem sido acompanhado do aumento na frequência de isolamento de outros BGNF como espécies do Complexo

Burkholderia cepacia (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* (FOWERAKER, 2009; MARQUES, 2011; MAHENTHIRALINGAM, 2014).

O gênero *Burkholderia* é composto atualmente por mais de 60 espécies, sendo a maioria encontrada no ambiente e não são patogênicas para o homem. Entretanto, várias espécies são capazes de causar infecções crônicas graves no trato respiratório de pacientes com FC e a maioria das espécies envolvidas são pertencentes ao CBc, com exceção *B. gladioli* (LIPUMA, 2010; BAZZINI, UDINE, e RICCARDI, 2011)

O CBc, é composto por 18 espécies estreitamente relacionadas, que variam entre si em relação a aspectos clínicos e epidemiológicos. Medidas de segregação são adotadas para evitar contaminação cruzada entre pacientes (MAHENTHIRALINGAM, 2014; SEMLER et al., 2014). Embora mudanças tenham ocorrido devido a políticas de controle, a espécie *B. cenocepacia* ainda é a mais frequente na maioria dos centros de atendimento a pacientes com FC e também a mais virulenta e mais transmissível. Esta associada à síndrome cepacia, caracterizada por deterioração pulmonar aguda com bacteremia e sepse com redução da expectativa de vida (FOWERAKER, 2009; BAZZINI et al., 2011; NETO, 2013; SEMLER et al., 2014; BOSZCZOWSKI et al., 2014).

A incidência de *S. maltophilia* infectando pacientes com FC tem aumentado constantemente nos últimos anos, mas seu papel na doença pulmonar ainda não é bem definido (LIPUMA, 2010). Embora possa ser isolado de cultura de pacientes com FC com doença grave, não está associado a deterioração pulmonar (FOWERAKER, 2009). Evidências sugestivas da patogenicidade deste microrganismos tem sido atribuído a sua capacidade de formar biofilme não apenas em superfícies abióticas, mas também no epitélio (POMPILIO et al., 2014).

2 *ACHROMOBACTER* SPP. NA FIBROSE CÍSTICA

O gênero *Achromobacter* e a espécie tipo do gênero *Achromobacter liquefacies* foram proposto pela primeira vez em 1923 por Bergey e colaboradores. Entretanto, a autenticidade da cultura foi considerada duvidosa neste período porque o microrganismo era raramente isolado. Além disso, não houve a caracterização e disponibilização de uma cepa padrão da espécie dentro dos critérios propostos pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, impedindo a inclusão do gênero e da espécie na lista de Nomes Bacterianos Aprovados de 1980 (TULECKE et al., 1965; YABUUCHI e YANO, 1981;<http://www.bacterio.net/achromobacter.html>)

Em 1971, Yabuuchi e Ohyama descreveram pela primeira vez a espécie tipo do gênero *Achromobacter* e a espécie *Achromobacter xylosoxidans*, à partir de culturas isoladas de secreções purulenta de ouvido humano.

Desde sua descrição em 1971, *Achromobacter xylosoxidans*, mudou a nomeação para *Alcaligenes xylosoxidans* e voltou a ser chamado de *Achromobacter xylosoxidans* (VAN et al., 2005; LAMBIASE et al., 2011)

A análise filogenética da sequência do gene 16S rRNA e uma diferença de mais de 10% no conteúdo GC do DNA, evidenciando que a espécie tipo de *Achromobacter* spp, *A. xylosoxidans*, e *Alcaligenes faecalis* pertencem a dois gêneros distintos (YABUUCHI et al., 1998).

Desta forma, *Achromobacter* foi efetivamente instituído como gênero por Yabuuchi e colaboradores (1998) após análise das sequências do gene 16S rRNA, hibridização DNA-DNA, bases do DNA e características bioquímicas.

De acordo com a classificação taxonômica atual, o gênero *Achromobacter* pertence ao grupo beta Proteobacteria, da família Alcaligenaceae, composta por 15 espécies²: *Achromobacter xylosoxidans* (espécie tipo do grupo), *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter spanius*, *Achromobacter marplatensis*, *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter animicus*, *Achromobacter spiritinus*, *Achromobacter*

² List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Disponível em: <http://www.bacterio.net/achromobacter.html>. Acesso em 11 ago. 2014.

pulmonis, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter aegrifaciens*, *Achromobacter anfixer* e *Achromobacter dolens*.

A. xylosoxidans é considerado um patógeno nosocomial oportunista, capaz de causar infecção principalmente em pacientes imunocomprometidos e está associado a uma variedade de infecções, incluindo bacteremia, meningite, peritonites. Surtos nosocomiais tem sido atribuídos a contaminação de soluções desinfetantes, soluções salinas e instrumentos de diagnósticos. *A. xylosoxidans* pode ser encontrado em ambientes do ar livre, algumas plantas, solos úmido e podem sobreviver em superfícies inanimadas de hospitais (AMOUREUX et al., 2013; Wittmann et al., 2014; LIU et al., 2002; MAGNI et al., 2010; LAMBIASE et al., 2011).

As taxas de mortalidade associada à bacteremia por *A. xylosoxydans* variam entre 15 e 30%. Em casos de endocardite causadas por infecções relacionadas ao cateter com *A. xylosoxidans* a taxa de mortalidade é maior que 50% (WITTMANN et al., 2014). *A. ruhlandii*, *A. piechaudii*, *A. denitrificans*, *A. spanius*, *A. insolitus* e *A. marplatensis*, são habitantes do solo e tem sido descrita em alguns poucos casos de infecção humanas (SPILKER, VANDAMME, e LIPUMA, 2013).

A. xylosoxidans é a espécie mais frequente também em pacientes com FC e foi relacionada à infecção pulmonar pela primeira vez em 1985 (JAKOBSEN et al. 2013) e até hoje existem poucos estudos sobre o impacto clínico da colonização e infecção crônica nestes pacientes (DE BAETS et al., 2007; LAMBIASE et al., 2011). Entretanto, dados recentes indicam que a infecção crônica com *A. xylosoxidans* pode resultar em resposta próxima a observada na infecção crônica por *P. aeruginosa*, acelerado declínio da função pulmonar e aumento da resposta inflamatória (RIDDERBERG, WANG e NØRSKOV-LAURITSEN, 2012).

Hansen e colaboradores (2010), destacam um elevado percentual de pacientes com FC, colonizados cronicamente por *A. xylosoxidans* aguardando transplante pulmonar.

A. ruhlandii, desde sua descrição em 1998 por Yabuuchi e colaboradores, foi considerado um microrganismo exclusivamente ambiental, não associado à infecção humana. Entretanto, recentemente, tem sido relatada como a segunda espécie mais frequente em pacientes com FC (RIDDERBERG et al., 2012; SPILKER, VANDAMME e LIPUMA, 2012; SPILKER et al., 2013).

A. ruhlandii é capaz de causar infecção cruzada em pacientes com FC. Em um estudo de vigilância em pacientes, atendidos em dois hospitais universitários

localizados Aarhus e Copenhague entre janeiro de 2000 e dezembro de 2011, 17 de 68 (25%) dos casos de infecções primárias por *Achromobacter* spp, foi associado à cepa epidêmica dinamarquesas (DES), identificada recentemente como *A. ruhlandii* por meio do MLSA. O DES foi caracterizado como um clone, transmissível e excepcionalmente resistente à antimicrobianos. Quando comparado com outros pacientes com FC não infectados pelo DES, os pacientes com DES evoluíram rapidamente para a infecção crônica. Este clone persistiu e circulou entre os dois hospitais durante os 12 anos de estudos (WANG et al., 2013).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre o impacto clínico de *A. ruhlandii* nas infecções humanas. Hansen e colaboradores (2013) realizaram um estudo investigativo em dois pacientes dinamarqueses com FC que apresentavam quadro clínico estável, função pulmonar normal, sem infecção crônica ou cultura positiva para BGNNF. Os autores observaram a piora no quadro clínico nesses pacientes alguns meses antes do primeiro isolamento de *A. ruhlandii*. A piora no quadro foi associada ao contato destes pacientes com pacientes colonizados pelo DES e aquisição da cepa epidêmica.

2.1 Identificação fenotípica e molecular de *Achromobacter* spp

Atualmente, um dos grandes desafios é a compreensão da epidemiologia, ecologia e impacto clínico das infecções humanas por espécies do gênero *Achromobacter*. A taxonômica das espécies pertencentes ao gênero são mal definidas, e a identificação precisa tem sido comprometida (SPILKER et al., 2012). Métodos específicos e confiáveis de identificação são necessários (TURTON et al., 2011). A similaridade fenotípica entre as amostras de *Achromobacter* sp. torna difícil a identificação das espécies e geralmente são referidas como *A.xylosoxidans* ou BGNNF (RIDDERBERG et al., 2012; MAHENTHIRALINGAM, 2014).

As metodologias de identificação fenotípica para o gênero, inclui uma variedade de possibilidades como o uso de testes manuais comerciais ou produzidos no próprio laboratório, sistemas automatizados ou semi-automatizados, sendo necessário uma ampla variedade de teste fenotípicos convencionais. Algumas

espécies necessitam de metodologias moleculares para que a identificação seja concluída (LIU et al., 2002; MAHENTHIRALINGAM, 2014).

Estudos recentes tem apontado a metodologia *Matrix Assisted Laser-Dessorção/Ionização Time Of-Flight* (MALDI-TOF), como ferramenta eficiente, rápida e precisa na identificação de microrganismos, com baixa relação custo/benefício. A técnica gera impressões digitais características e únicas para cada microrganismos, proporcionando a identificação do gênero e espécie. A identificação baseia-se na análise espectral de proteínas, principalmente as ribossomais, de qualquer microrganismo através da ionização por radiação. Os resultados dos espectros de proteínas do microrganismo investigado são comparados com os dados de uma biblioteca de referência espectral (DE BEL et al., 2011; CROXATTO, PROD'HOM e GREUB, 2012; GAUTIER et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Souza e colaboradores (2014) realizaram um estudo comparativo em 76 amostras bacterianas de diferentes espécies isoladas de pacientes com FC, aplicando as metodologias de identificação fenotípica convencional, identificação automatizada, sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF. Os autores observaram que as seis amostras de *A. xylooxidans* identificadas pelo sequenciamento do 16S rRNA foram concordantes na identificação apenas por MALDI-TOF.

A introdução de técnicas moleculares como sequenciamento do gene 16s rRNA conduziram ao aumento no número de bactérias identificadas em pacientes com FC (FERRONI et al., 2002; BITTAR e ROLAIN, 2010; MCGUIGAN e CALLAGHAN, 2014). A técnica consiste na amplificação de genes ribossomais, seguida de reação de sequenciamento e posterior análise em bancos de dados genéticos. Alguns autores acreditam que a ambiguidade nas sequências do gene 16S rRNA pode confundir a discriminação das espécies, principalmente em espécies estreitamente relacionadas (LIU et al., 2002; GOMILA et al., 2011).

Ridderberg e colaboradores (2012) compararam as sequências do gene 16S rRNA de 77 amostras incluindo sete espécies tipo de *Achromobacter* spp. (*A. xylooxidans* [LMG 1863], *A. denitrificans* [CCUG 407], *A. insolitus* [CCUG 47057], *A. marplatensis* [CCUG 56371], *A. piechaudii* [CCUG 724], *A. ruhlandii* [CCUG 38886], e *A. spanius* [CCUG 47062]). A comparação das sequências mostrou incapacidade do gene para discriminar claramente as amostras padrão de *A. spanius*, *A. piechaudii*, *A. marplatensis* e *A. ruhlandii*.

Em um trabalho de comparação filogenética entre *Achromobacter* spp e *Alcaligenes* spp., utilizando as sequências do gene 16S rRNA, Li e colaboradores (2013) demonstraram que a técnica tem boa correlação com a distinção dos dois gêneros.

Uma alternativa ao sequenciamento é a análise de restrição do DNA amplificado (*amplified ribosomal DNA restriction analysis* – ARDRA), que consiste na amplificação do gene 16S rRNA ou 23S rRNA, seguido da digestão por enzima de restrição e visualização em gel de agarose. A técnica tem sido descrita na identificação de *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* e outros BGNNF (RIBBECK-BUSCH et al., 2005; PIEGELMAN, WHISSELL e GREER, 2005; OLIVER et al., 2009).

Buscando uma metodologia rápida de identificação, Turton e colaboradores (2011) apresentaram uma alternativa para a identificação de *A. xylosoxidans*. A técnica consiste na realização da PCR para a detecção do gene *bla*_{OXA-114-like} intrínseco da espécie que codifica a enzima OXA-114.

Neste trabalho, Turton e colaboradores (2011) verificaram a presença do gene *bla*_{OXA-114-like} em 11 amostras de *A. xylosoxidans*, incluindo uma cepa referência da espécie *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. piechaudii*, *A. spanius*, *A. insolitus* e *A. ruhlandii* além microrganismos de outras espécies como *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* e *B. cepacia*. Apenas as amostras de *A. xylosoxidans* apresentaram amplificação para este gene. Neste estudo, oito variantes alélicas do gene *bla*_{OXA-114-like} foram descritas.

Traglia, Almuzara, e Merkier (2013) pesquisaram a presença do gene *bla*_{OXA-114-like}, seguindo as recomendações de Turton e colaboradores (2011), em 19 cepas clínicas de *A. xylosoxidans* pertencentes a 15 clones diferentes. Além desta espécie, *A. denitrificans* e *A. piechaudii* também foram incluídas nos testes. O resultado mostrou que apenas as amostras apresentaram amplificação. O sequenciamento dos produtos de amplificação obtidos no estudo revelaram a presença de 10 novos alelos para o gene *bla*_{OXA-114-like}.

Em um estudo com amostras de *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii*, Papalia e colaboradores (2013) encontraram variações no gene *bla*_{OXA-114-like}, após sequenciamento de produtos da amplificação do gene e descreveram a variável enzimática OXA-258, indicada como exclusiva de *A. ruhlandii* à partir do

sequenciamento de amostras de ambas as espécies. Esses achados, auxiliam significativamente na identificação destes dois microrganismos.

As primeiras diversidades no gênero *Achromobacter* foram obtidas através da combinação de um amplo conjunto de testes fenotípicos, Hibridização DNA-DNA e a análise das sequências deste gene 16S rRNA. Setes espécies foram descritas por meio destas metodologias: *A. xylooxidans*, *A. denitrificans*, *A. insolitus*, *A. marplatensis*, *A. piechaudii*, *A. ruhlandii* e *A. spanius*.

Dois estudos recentes desenvolveram dois esquemas de tipagem molecular multilocus capazes de aumentar a precisão na identificação e caracterização cepas e espécies de *Achromobacter* spp. (JAKOBSEN et al., 2013). Trata-se de uma esquema de análise multilocus (MLST/MLSA) baseado na amplificação, sequenciamento e análise dos produtos de amplificação de genes conservados específico (RIDDERBERG et al., 2012; SPILKER et al., 2012).

A técnica de MLST consiste na identificação de fragmentos internos de genes de manutenção celular. As diferenças nos nucleotídeos encontradas neste genes são determinadas por mutações pontuais e determinam o alelo. À cada gene diferentes são atribuídos diferentes alelos e a combinação dos alelos proporciona um perfil alélico denominado *sequence typing* (ST) que é único para cada isolado. As sequências dos STs são armazenadas em bancos de dados hospedados em diferentes locais do mundo (COOPER e FEIL, 2004; LARSEN et al., 2012; INOUE et al., 2012).

Ridderberg e colaboradores (2012) desenvolveram um esquema baseado em cinco genes conservados (*atpD*, *icd*, *recA*, *rpoB* e *tyrB*) e sequenciamento do gene 16S rRNA e realizaram a análise em 77 amostras de *Achromobacter* spp., provenientes da Europa, Ásia e América do Sul. Neste estudo, os autores observaram maior poder discriminatório do MLSA (com sequências concatenadas contendo 2.098 nucleotídeos) em relação sequenciamento do gene 16S rRNA (com 1.309 nucleotídeos). O esquema foi capaz de diferenciar as setes espécies descritas até o momento do estudo (*A. xylooxidans*, *A. ruhlandii*, *A. denitrificans*, *A. insolitus*, *A. piechaudii*, *A. spanius* e *A. marplatensis*) , além de demonstrar a presença de uma potencial espécie nova designada no estudo com MLSA cluster III.

No mesmo ano de 2012, Spilker e colaboradores também desenvolveram um esquema de análise multilocus baseando-se em 7 genes conservados (*nusA*, *eno*, *rpoB*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* e *nrdA*). Na análise MLST/MLSA realizada em 150 amostras

de *Achromobacter* spp., foram identificados 129 STs e 5 potenciais espécies novas, descritas posteriormente por VANDAMME e colaboradores (2013) como *A. animicus*, *A. mucicolens*, *A. pulmonis*, *A. spiritinus* e *A. pulmonis*.

O mesmo grupo que descreveu o esquema MLST/MLSA (SPILKER et al., 2012b) demonstraram o elevado poder discriminatório do gene *nrdA* na identificação das espécies de *Achromobacter* spp., quando utilizado à parte do esquema.

A maioria das metodologias de identificação genotípicas são executadas por laboratório de pesquisa ou de referências para análise retrospectivas de amostras problemas de identificação (FERRONI et al., 2002). Essa informação reflete a necessidade de adequação dos laboratórios frente ao novo cenário microbiológico na FC.

2.2 Tipagem molecular

A infecção crônica por *Achromobacter* spp tem se tornado um problema potencial crescente na FC e a transmissão cruzada entre pacientes tem sido documentada. Estudos de vigilância são necessários para detectar e controlar possíveis fontes de infecção (HANSEN et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; AMOUREUX et al., 2012; HANSEN et al., 2013)

Algumas técnicas como análise do perfil de proteínas celulares (SDS-PAGE), *Randon Amplifild polymorphic DNA Analysis* (RAPD), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), são as mais utilizadas para estabelecer a relação clonal de cepas envolvidas em surto e cepas epidêmicas (KAUR et al., 2009; CRAMER, WIEHLMANN e TÜMMLER, 2010; DREVINEK e MAHENTHIRALINGAM, 2010).

Dentre as técnicas de tipagem destacadas, o PFGE é uma técnica amplamente utilizada para avaliação de surtos e da disseminação clonal de vários microrganismos. A metodologia consiste na avaliação da diversidade do genoma bacteriano completo através da macrorrestrição por endonucleases, cujos fragmentos gênicos são separados por corrida eletroforética em campo pulsado. Os critérios de interpretação dos dados são realizados de acordo com as recomendações de Tenover e colaboradores (1997): cepas com até três diferenças

de bandas são consideradas relacionadas, com 4-6 diferenças são considerados possivelmente relacionados, e valores maiores seis diferenças de bandas são considerados independentes (VALI et al., 2014). Esta técnica tem sido o método mais utilizado nos estudos epidemiológicos de *A. xylosoxidans* e percentuais altamente discriminatórios tem sido observado nos estudos (RØNNE HANSEN et al., 2006; Kaur et al., 2009).

O esquema MLST, mencionado anteriormente, destaca-se entre as metodologias de tipagem molecular por fornece uma assinatura digital altamente estável. A técnica atualmente é considerado referência para estudos de epidemiologia molecular global e estrutura da população estudada, cujos dados podem ser compartilhados e comparados eletronicamente (CRAMER et al., 2010; DREVINEK e MAHENTHIRALINGAM, 2010; LÓPEZ-CAUSAPÉ et al., 2013).

Atualmente, três bancos de dados estão disponíveis para a análise MLST de diversas espécies bacterianas: <http://www.pasteur.fr/mlst>; <http://pubmlst.org> e www.mlst.net. Entretanto, apenas o segundo *web site* dispõe de um banco de dados para *Achromobacter* spp.

O banco de dados de *Achromobacter* spp. foi desenvolvido recentemente por Keith Jolley da Universidade de Oxford (Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11:595). O acesso no dia 26/05/2014 mostrava apenas 228 perfis MLST (ST) e 553 amostras integravam o banco de dados de <http://pubmlst.org/achromobacter>. Esses números são baixos quando comparados com os 2762 perfis MLST e 5226 isolados de *S. aureus*, com 1239 perfis MLST e 3451 isolados bacterianos de *Burkholderia pseudomallei* e 1836 perfis MLST e 2269 isolados de *P. aeruginosa*.

Dentre as 553 amostras de *Achromobacter* sp. que alimentavam o banco, o maior número eram oriundas de culturas de pacientes com FC (405 amostras). Cento e onze amostras de pacientes sem FC; 12 de ambiente e 25 amostras não teve sua fonte de isolamento informada no banco de dados <http://pubmlst.org/achromobacter>.

3 JUSTIFICATIVA

Diante da natureza polimicrobiana das infecções pulmonares em pacientes com FC, a identificação correta dos microrganismos constitui um parâmetro fundamental para a compreensão dos aspectos microbiológicos e epidemiológicos, favorecendo o entendimento de cada patógeno na evolução do quadro clínico e direcionando as estratégias de manejo destes pacientes. A caracterização laboratorial das espécies de *Achromobacter* na maioria dos laboratórios clínicos baseia-se na identificação fenotípica e, em último caso, amostras cuja identificação em nível de espécie não é alcançada com a aplicação destes testes, são enviadas para identificação molecular em laboratórios de pesquisa.

Em estudos anteriores, Pereira e colaboradores (2011) observaram o aumento na frequência de *A. xylosoxidans* isolados em culturas bacterianas de pacientes acompanhados em dois centros de referência para diagnóstico de tratamento de pacientes com FC no Rio de Janeiro. Nesse estudo, foi observada a capacidade destes microrganismos estabelecerem infecção persistente, transmissão cruzada entre pacientes e a presença de um grupo clonal único colonizando um grande número de pacientes.

Durante o período de estudo de Pereira e colaboradores (2011), as metodologias mais usuais para a identificação de espécies de *Achromobacter* spp baseavam-se na identificação através de um amplo conjunto de provas fenotípicas associado a técnicas moleculares como o sequenciamento do gene 16S rRNA e ARDRA. Posteriormente, novas espécies foram descritas no gênero e novas metodologias moleculares foram propostas para a sua identificação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Comparar a utilização de diversas técnicas moleculares para a identificação de *Achromobacter xylosoxidans* e avaliar o polimorfismo genético das amostras obtidas de pacientes com FC atendidos em dois centros de referência do Rio de Janeiro.

4.2 Objetivos específicos:

- a) confirmar a identificação de *A. xylosoxidans* por PCR e sequenciamento do gene *bla_{OXA-114-like}* em amostras previamente identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA;
- b) confirmar a identificação das *A. xylosoxidans* por *Multilocus Sequence Typing*;
- c) comparar os resultados da identificação obtidos com o sequenciamento prévio do gene 16S rRNA, os resultados da presença do gene *bla_{OXA-114-like}*, e *Multilocus Sequence Typing* ;
- d) identificar os *sequence type* (ST) presentes na amostragem;
- e) Comparar os resultados obtidos na tipagem molecular pelo PFGE e pelo MLST.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Pacientes e Amostras bacterianas

Os critérios de inclusão das amostras bacterianas tiveram como base a escolha de amostras identificadas como *A. xylosoxidans* por testes fenotípicos convencionais e sequenciamento do gene 16S rRNA e que tiveram o Perfil de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), determinados em estudos anteriores realizado por Pereira 2011.

No total, foram incluídas 30 amostras oriundas de 17 pacientes com FC. Destes pacientes, 15 fazem acompanhamento clínico regular no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueiras (IFF) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e dois são acompanhados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), dois centros de referência no Rio de Janeiro, responsáveis pelo atendimento de pacientes com FC pediátricos e adultos, respectivamente.

As amostras foram mantidas 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.

5.2 *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

5.2.1 Extração do DNA bacteriano por lise térmica

As amostras foram semeadas 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 deionizada (diluição de 1:10) para a leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro (B295 II Micronal, SP, Brasil) com $\lambda = 580$. 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 tubos tipo *ependorf* 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, ressuspenso em 600 μ L de água deionizada estéril. O DNA foi obtido após aquecimento destas suspensões a 100°C em banho maria por 10 min e subsequente centrifugação por 10 seg. a 14.000 rpm. Uma vez o DNA extraído, permaneceu em banho de gelo durante a preparação da mistura da reação.

5.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O MLST foi realizado segundo metodologia descrita por Spilker, Vandamme e LiPuma (2012). Para a execução do MLST de *Achromobacter* spp., sete genes *housekeeping* foram selecionados. As sequências dos iniciadores foram obtidas no site <http://pubmlst.org/> e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores para análise do *Multilocus Sequence Typing* de *Achromobacter* spp

Genes	Iniciadores	Tamanho do Amplicon (pb)	Tamanho da sequencia analisada (pb)
<i>nusA</i>	P1 GCCTGCAAGARCCCGACAAG	795	355
	P2 GTCCATSGCGTGCTTGTCTTC		
<i>rpoB</i>	P1 TGCCMTGGAACGGYTACAAC	791	413
	P2 GGCCAGRTASACCTTGATCATCTT		
<i>eno</i>	P1 ATGCCCGTGCCSATGATGAA	613	214
	P2 TCAGGGTGCCGATCTGGTTG		
<i>gltB</i>	P1 TGCAACCGGGCAAGATGTT	685	241
	P2 TCGGACACGATCAGGATGTT		
<i>lepA</i>	P1 CTAYAACCTGAACCTGATCGACAC	524	347
	P2 GCGACTTSGGCGTGAACAC		
<i>nuoL</i>	P1 CATGCACCAAYRACCAGGACAT	880	230
	P2 CGCGAACGCGTAGTGATAGATG		
<i>nrdA</i>	P1 GAACTGGATTCCCCGACCTGTTC	954	449
	P2 TTCGATTTGACGTACAAGTTCTGG		

Fonte: adaptada de SPILKE, VANDAMME e LIPUMA, 2012.

O DNA das amostras foi extraído como descrito no item 2.2.1 e em sequencia, foram feitas reações da PCR para os sete pares de iniciadores. A reação de PCR teve um volume final de 50 μ L, contendo: 20 pmol de cada iniciador, 0,8 mM de dNTP's, 1X buffer de PCR, 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U/ μ L da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 6 μ L de DNA bacteriano. A reação de PCR foi levada ao termociclador (GeneAmp® PCR System 9700/Applied Biosystems, Foster City, USA) sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial de 2 min. a 95°C; 30 ciclos de 30 seg. por 94°C, 30 seg. a 57°C e 1 min. a 72°C; extensão final de 72°C por 5 min. Para todos os genes, as reações de PCR foram realizadas utilizando-se os mesmos volumes de reagentes e a mesma termociclagem, exceto para o gene *nusA*, cuja temperatura de hibridização foi de 59°C.

5.2.3 Análise do produto PCR

O produto de amplificação da PCR (2,0 μ L) foi misturado a 2,0 μ L de corante (0,25% bromofenol / 20% glicerol) e em seguida foi aplicado em gel de agarose a 1,2% (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em tampão 100mL TBE 1X (Tris Base, ácido bórico, EDTA-0,5M e pH 8,0), corado com 10 μ L de SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A corrida de eletroforese ocorreu em cuba horizontal (Gibco Horizon 58/Biometra, Göttingen, Alemanha) com tampão TBE 1X com as seguintes condições: 100V, 100mA por 30 minutos. Os tamanhos dos produtos amplificados foram observados em luz ultravioleta (UV) (DNr / Bio imaging systems - Mini Bis Pro/BioAmerica) tendo por parâmetro o marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

5.2.4 Purificação das amostras

A purificação do *amplicon* (produto da amplificação da PCR) foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA illustra™ GFX™ PCR DNA and GEL band Purification KIT GE, seguindo as recomendações do fabricante. O *amplicon* foi misturado a 500µL do tampão de captura em um sistema composto pelos tubos coletores e colunas GFX™, em que o DNA fica retido após ser centrifugado a 16000 rpm por 30s. O tampão foi descartado e adicionou-se 500µL do tampão de lavagem, submetendo-se a nova centrifugação a 16000rpm por 30s. Os tubos coletores foram descartados e a coluna GFX™ foi transferida para microtubos de 1,5mL novos. Em seguida foram adicionados 40µL do tampão de eluição e após 1min, o microtubo foi centrifugado a 16000 por 1 min. O DNA purificado foi transferido para um microtubo de 200µL. Ao final da purificação, foi realizada corrida em gel por eletroforese para confirmar a integridade do *amplicon* purificado. O produto da reação purificada foi estocado a -20°C.

5.2.5 Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação com dideoxynucleotídeos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Para realização do sequenciamento foi necessário à utilização dos 14 iniciadores descritos na Tabela 1, em uma concentração de 3,2 pmol, conjunto de reagentes para sequenciamento automático de DNA Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems®, Foster City, USA) tampão Big Dye diluído 5X (Applied Biosystems®, Foster City, USA) e água deionizada. Para cada iniciador foi realizada uma solução contendo 4µL de água deionizada, 1,5µL de tampão Big Dye 5X, 1 µL de *primer* e 0,5µL Big Dye. A solução mais o DNA purificado foram adicionados em poços da placa de microtitulação (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode - Applied Biosystems, Foster City, USA). Após o preenchimento dos poços, a microplaca foi vedada com um adesivo termo resistente e submetida à centrifugação por 4000 rpm por 10s, e em seguida foi

colocada em termociclador (Veriti 96 well thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, USA) com as seguintes especificações para reação de sequenciamento: 25 ciclos de 95°C/20s, 50°C/15s e 60°C/1min. As reações para cada iniciador foram realizadas em duplicata.

5.2.6 Precipitação da reação de sequenciamento

Após ciclagem da reação de sequenciamento, os produtos foram submetidos ao processo de precipitação que consistiu em: 2,5µL de EDTA 125 mM e 30µL (3x volume total) de etanol absoluto (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) em cada poço da microplaca. Posteriormente a placa foi vedada com adesivo e papel alumínio, invertida por 4 vezes, incubada em temperatura ambiente por 15 min e em seguida levada a centrifugação (Centrifuge 5810R/Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por 3000 x g por 30 min. A placa foi então invertida e centrifugada brevemente (até atingir a rotação recomendada) a 185 x g. Após essas etapas foram adicionados 30µL de etanol 70% (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) e a microplaca foi levada para centrifuga a 4°C na rotação de 1650 x g por 15 min. Em seguida a placa foi invertida e centrifugada (spin down) a 185 x g por um minuto, em que a contagem iniciou no momento em que o rotor começou a girar. Após remoção do etanol, as amostras secaram em temperatura ambiente e foram adicionados 10µL de formamida para posterior leitura no sequenciador Genetic Analyzer 3500 8-capillary (Applied Biosystems, Foster City, EUA), onde os eletroferogramas foram obtidos na medida em que as amostras passavam por capilares contendo o Polímero de Performance Otimizada (POP7 – Applied Biosystems, Foster City, EUA).

5.2.7 Análises de Bioinformática

A análise das sequências dos genes (*nusA*, *rpoB*, *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* e *nrdA*) foi realizada a partir de um *contig* gerado por intermédio da ferramenta CAP3 sequency assembly program, disponibilizada no site <http://pbil.univ->

lyon1.fr/cap3.php/. Em seguida a sequência foi comparada com dados do *GenBank*, por intermédio da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmação dos genes sabidamente sequenciados.

Para a identificação dos diferentes alelos, caracterização clonal e identificação da espécie mediante MLST, foram utilizadas as ferramentas disponíveis no link <http://pubmlst.org/achromobacter/>. Estas ferramentas permitiram obter o alinhamento das sequências obtidas para cada gene, comparar e procurar por possíveis mutações que possam ter ocorrido. A cada sequência diferente em um locus foi atribuído o número de um alelo e cada combinação única de alelos (perfil alélico) foi atribuído uma *sequence type* (ST).

Para confirmar a identificação fornecida pelo *Achromobacter website*, as sequências concatenadas dos setes genes de cada ST encontrados no estudo foram comparadas com as sequências concatenadas de um ST representativo das 15 espécies do gênero disponibilizado no link <http://pubmlst.org/achromobacter/> (Tabela 2). As comparações foram realizadas com o auxílio do software MEGA5 versão 5, com análises de *Neighbor joining* e suporte estatístico de *bootstrap* com 1.000 repetições.

Tabela 2 - Espécies utilizadas no alinhamento das sequências concatenadas dos sete genes do esquema MLST

Espécie	Referência	ST
<i>A. xylosoxidans</i>	LMG 1863	20
<i>A. pulmonis</i>	LMG 26696	46
<i>A. ruhlandii</i>	LMG 1866	30
<i>A. dolens</i>	LMG 26842	54
<i>A. insuavis</i>	LMG 26846	59
<i>A. marplatensis</i>	LMG 26219	29
<i>A. anfixer</i>	LMG 26857	100
<i>A. aengrifaciens</i>	LMG 26853	81
<i>A. insolitus</i>	LMG 6003	99
<i>A. denitrificans</i>	LMG 2331	102
<i>A. mucicolens</i>	LMG 26685	106
<i>A. animicus</i>	LMG 26690	111
<i>A. spiritinus</i>	LMG 26692	124
<i>A. spanius</i>	LMG 5911	112
<i>A. piechaudii</i>	LMG 1873	122

Fonte: A autora, 2014.

5.3 Detecção genotípica de oxacilinase *bla*_{oxa-114-like}

5.3.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA para a detecção genotípica de oxacilinase *bla*_{oxa-114-like} se deu conforme descrito no item 5.2.1.

5.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do gene *bla*_{oxa-114-like}, foi feita a PCR das amostras utilizando os seguintes iniciadores: OXA-114F2 (5'-CGCATCCTGTTC CAGCA-3') e OXA-114R2 (5'- GTGCCGGTCTTGCCATAC-3') que geram um produto de 509 pb (Turton et al., 2011).

Para a realização da reação de PCR foi preparado uma mistura de reação cujo volume final foi de 50µL, contendo: 10 pmol de cada iniciador, 0,8 mM de dNTP's, 1X buffer de PCR, 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U/µL da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 6µL de DNA bacteriano. A reação de PCR foi levada ao termociclador (GeneAmp® PCR System 9700/Applied Biosystems, Foster City, USA) sob as seguintes condições para amplificação: desnaturação inicial de 3 min. a 95°C; 32 ciclos de 45 seg. por 94°C, 45 seg. a 60°C e 45 seg. a 72°C; extensão final de 72°C por 10 min. Para validar as reações, a amostra de *A. xylosoxidans* LMG 1863 foi utilizada como controle positivo.

5.3.3 Análise do produto PCR

Os produtos de amplificação foram visualizados conforme descrito no item 5.2.3.

5.3.4 Purificação das amostras amplificadas, reação de sequenciamento e precipitação da reação de sequenciamento

A purificação dos produtos de amplificação, a reação de sequenciamento (usando iniciadores específicos para o gene *bla*_{-oxa-114-like}) e precipitação do DNA foram realizados conforme descrito nos itens 5.2.4, 5.2.5 e 5.2.6, respectivamente.

5.3.5 Análises de Bioinformática

A análise das sequências dos gene *bla*_{OXA-114-like} foi realizada conforme o item 5.2.7. Neste alinhamento, utilizou-se como grupo externo a sequencia do gene *bla*_{OXA-66-like} de *Acinetobacter baumani* KF 305663.1.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostragem

As 30 amostras identificadas inicialmente como *A. xylosoxidans* eram pertencentes a 18 clones (estabelecidos por PFGE) exclusivos ou compartilhados entre os pacientes. O número de amostras por paciente variou de um a quatro. As amostras foram obtidas de 17 pacientes com FC atendidos no HUPE e IFF, isoladas a partir da cultura de escarro (n= 28; 93,3%) e aspirado traqueal (n= 2; 6,7%) no período entre junho de 2003 e novembro de 2008. Destes 17 pacientes, 15 (88,2%) eram atendidos no IFF e dois (11,8%) no HUPE, sendo 11 (64,7%) do gênero feminino e seis (35,3%) do gênero masculino. A faixa etária dos pacientes atendidos no IFF variou de 2 a 17 anos. No HUPE, os pacientes apresentaram 23 e 28 anos de idade. (Tabela 3).

Tabela 3 – Características da amostragem

Paciente	Amostra	Clone PFGE	Origem hospitalar	Data de isolamento
P1	6161	P	IFF	04/05/2007
P2	4747	G	IFF	09/05/2005
P3	4400	C	IFF	28/10/2004
P5	6531	E	HUPE	24/08/2007
	6956	E	HUPE	Não informada
	7292	E	HUPE	25/03/2008
	8173	E	HUPE	09/09/2008
P6	4481	A	IFF	02/02/2004
P7	8054	L	IFF	20/10/2008
P8	6081	O	IFF	21/03/2007
	4530	I	IFF	27/01/2005
P9	6042	Q	IFF	15/02/2007
	7437	Q	IFF	05/06/2008
P10	6694	H	IFF	11/10/2007
	7022	V	IFF	17/01/2008
P11	3446	D	IFF	18/06/2003
	4984	G	IFF	19/08/2005
P12	6016	Q	IFF	15/02/2007
	8240	Q	IFF	27/11/2008
P13	6241	M	IFF	21/05/2007
	7291	K	HUPE	31/03/2008
P14	7863	K	HUPE	22/08/2008
	4168	J	IFF	17/06/2004
P15	4928	G	IFF	14/07/2005
	7058	F	IFF	30/01/2008
P16	7527	F	IFF	25/06/2008
P17	5038	U	IFF	22/09/2005
	5131	G	IFF	20/10/2005
P18	5146	Z	IFF	20/10/2005
	7393	X	IFF	12/05/2008

Legenda: IFF- Instituto Nacional de saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira; HUPE – Hospital universitário Pedro Ernesto.

Fonte: A autora, 2014.

6.2 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Dentre as 30 amostras utilizadas no estudo, foram identificados 14 STs, sendo 10 novos e quatro previamente descritos. Os 10 alelos novos foram caracterizados em 15 amostras que geraram oito novos STs (198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 e 205) e duas novas combinações alélicas em duas amostras que corresponderam a dois novos STs (206 e 207). Os quatro STs disponíveis no *pubmlst web site*, foram observados em 11 amostras (ST 2, 13, 35 e 36). O ST de duas amostras (7058/7527) não puderam ser determinados porque um dos alelos (*nrdA*) não apresentou sequências de boa qualidade em todas as reações de sequenciamento e não pode ser definido até a conclusão do estudo.

O genes *eno*, *gltB* e *nuoL* e *nrdA_765*, *nusA* e *rpoB*, apresentaram 1, 1, 1, 1, 2 e 4 variantes alélicas novas, respectivamente. Duas amostras não apresentaram genes com alelos novos, mas apresentaram combinações alélicas não descrita na literatura. O cromatograma das novas variantes alélicas e as novas combinações alélicas acrescidas das informações sobre a amostra foram enviadas para os curadores do esquema MLST, Dr. Theodore Spilker e Dr. John Lipuma da University of Michigan, USA. Estes atribuíram o número aos alelos e determinaram os STs, e adicionaram os novos elementos ao banco de dados do site, disponibilizando-os para consulta pública no link <http://pubmlst.org/achromobacter/>

Os alelos novos foram definidos pelos curadores como *nusA* 91 e 92; *rpoB* 89, 90, 91 e 92; *eno* 83; *gltB* 68; *nuoL* 76; *nrdA_765* 160. Às amostras contendo esses alelos foram atribuídos os STs 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 e 205, descritos pela primeira vez pelo nosso grupo.

Os novos STs 206 e 207, foram consequentes a três variações alélicas que ocorreram nos genes *nusA*, *rpoB* e *nrdA_765* e que geraram dois perfis alélicos (Tabela 4).

Tabela 4 - *Sequence Typing (ST)* de *Achromobacter* descritos neste estudo

Amostras (n)	NusA	rpoB	eno	gltB	lepA	nuoL	nrdA	NRDA_765	ST
1	14	21*	2	4	59	2	2	111*	206
1	6*	26	2	4	59	8	2	36	207
1	6	89**	2	65	59	4	2	36	198
1	22	90**	12	7	49	16	9	92	199
4	9	91**	2	65	87	2	2	36	200
4	91**	26	2	2	62	8	2	36	201
1	91**	92**	2	2	59	8	2	111	202
1	92**	51	20	68**	57	23	19	148	203
2	17	28	24	15	46	76**	11	160**	204
1	1	26	83**	4	59	8	2	36	205
1	1	26	2	4	59	2	5	41	2***
3	6	21	2	2	59	8	2	36	13***
5	17	31	25	7	46	15	11	20	35***
2	17	31	27	16	43	19	11	20	36***

Legenda: * variante alélica determinante do perfil alélico novo; **alelos descritos no estudo; *** alelos previamente definidos.

Fonte: A autora, 2014.

6.3 Identificação das espécies de *Achromobacter* spp

6.3.1 MLST

As 28 amostras que puderam ser tipadas pelo MLST foram identificadas como pertencentes a quatro espécies de *Achromobacter*. Dos 14 STs identificados, nove corresponderam à STs da espécie *A. xylosoxidans* (2, 13, 198, 200, 201, 202, 205, 206 e 207). Três corresponderam a *A. ruhlandii* (35, 36, 204), um ST a *A. dolens* (199) e um a *A. insuavis* (203) (Tabela 5).

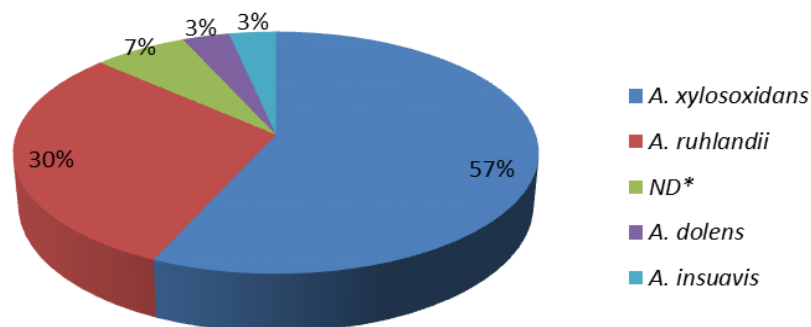
Tabela 5 - *Sequence Typing* encontrados entre as espécies de *Achromobacter* spp

Espécie	ST (n)	Período	Clinica
<i>A.xylosoxidans</i> (n= 17)	2 (1)	06/2004	IFF
	13 (3)	02/2004 – 10/2005	IFF
	198 (1)	10/2004	IFF
	200 (4)	10/2004 – 10/2005	IFF
	201 (4)	02/2007 – 11/2008	IFF
	202 (1)	03/2007	IFF
	205 (1)	10/2008	IFF
	206 (1)	06/2003	IFF
	207 (1)	05/2007	IFF
<i>A.ruhlandii</i> (n=9)	35 (5)	05/2007 – 09/2008	HUPE/IFF
	36 (2)	10/2007 – 03/2008	IFF
	204 (2)	03/2008 – 05/2008	HUPE
<i>A.dolens</i> (n=1)	199 (1)	01/2005	IFF
<i>A.insuavis</i> (n=1)	203 (1)	05/2008	IFF

Fonte: A autora, 2014.

A análise dos dados do MLST mostrou que a maioria das amostras correspondeu a *A. xylosoxidans* (57%), seguido de *A. ruhlandii* (30%) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição das espécies de *Achromobacter* spp. caracterizadas por MLST

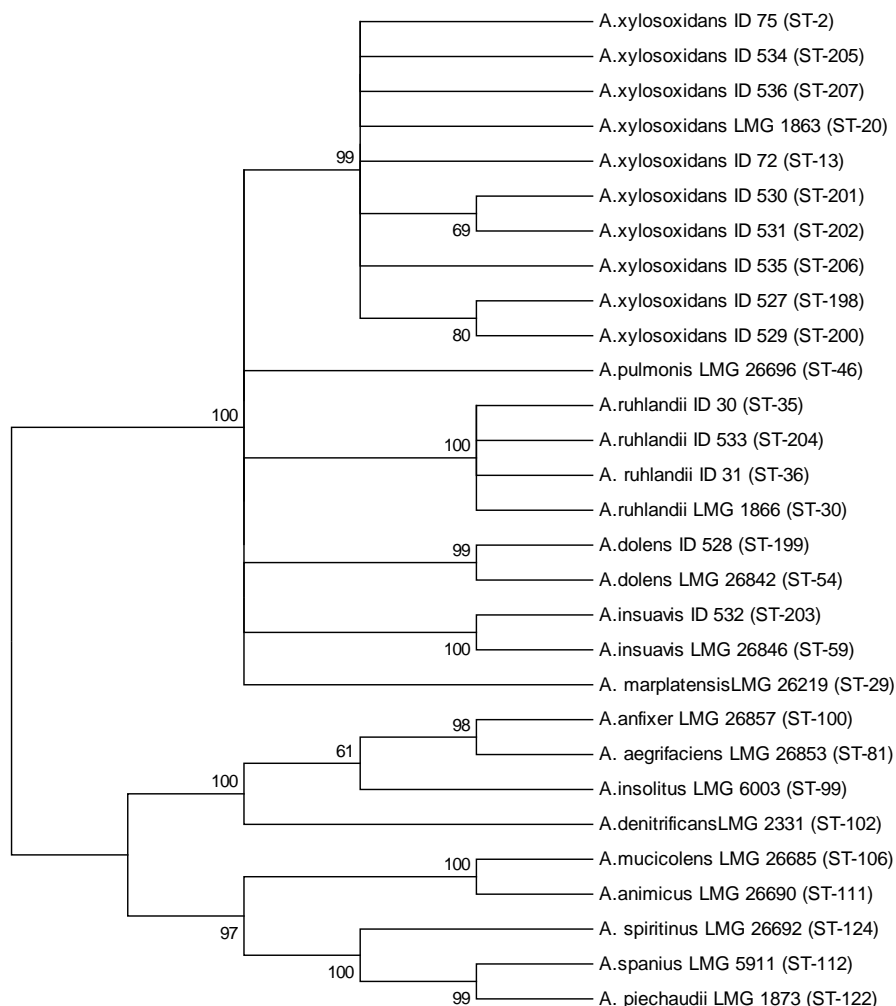


Legenda: ND* - *Sequence Typing* não definido.

Fonte: A autora, 2014.

As seqüências concatenadas dos alelos descritos e identificados na amostragem deste estudo gerando 2249 pb foram comparadas na árvore NJ. Para a comparação filogenética, foi utilizada uma amostra de referência representativa de cada espécie de *Achromobacter* spp descrita na literatura até o término deste trabalho. Cada ST descritos e identificados no estudo agrupou-se no *cluster* das suas respectivas espécies (Figura 2).

Figura 2 – Árvore neighbor-joining (NJ) baseada nas sequências concatenadas MLST (alinhamento 2249 pb)



Nota: Sequência dos STs 2, 13, 35, 36, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206 e 207 identificados no trabalho, e das amostras referências *A.insuavis* LMG 26846, *A.ruhlandii* LMG 1866, *A.dolens* LMG 26842, *A.pulmonis* LMG 26696, *A.xylosoxidans* LMG 1863, *A.marplatensis* LMG 26219, *A.denitrificans* LMG 2331, *A.insolitus* LMG 6003, *A.anfixer* LMG 26857, *A.aegrifaciens* LMG 26853, *A.mucicolens* LMG 26685, *A.animicus* LMG 26690, *A.spiritinus* LMG 26692, *A.spanius* LMG 5911, *A.piechaudii* LMG 1873.
Fonte: A autora, 2014.

6.3.2. PCR e sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114-like}

O sequenciamento dos produtos de amplificação para o gene *bla*_{OXA-114-like} revelou 99-100% de similaridade com variantes alélicas do gene *bla*_{OXA-114-like} em 17

amostras que foram caracterizadas como *A. xylosoxidans*. Onze amostras apresentaram sequências compatíveis com o gene *bla_{OXA-258}* (99% de similaridade), e foram classificadas como *A. ruhlandii*. Duas amostras não obtiveram amplificação e, portanto não tiveram suas sequências analisadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Identificação das espécies de *Achromobacter* spp por sequenciamento do gene *bla_{OXA-114}*

Amostra	Variante OXA-114	Espécie
3446	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
4168	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
4400	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
4481	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
4530	-*	-**
4747	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
4928	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
4984	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
5038	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
5131	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
5146	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
6016	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
6042	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
6081	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
6161	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
6241	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
6531	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
6694	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
6956	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
7022	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
7058	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
7291	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
7292	OXA-258	<i>A.ruhlandii</i>
7393	-*	-**
7437	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
7527	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
7863	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
8054	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>
8173	OXA -258	<i>A.ruhlandii</i>
8240	OXA -114	<i>A.xylosoxidans</i>

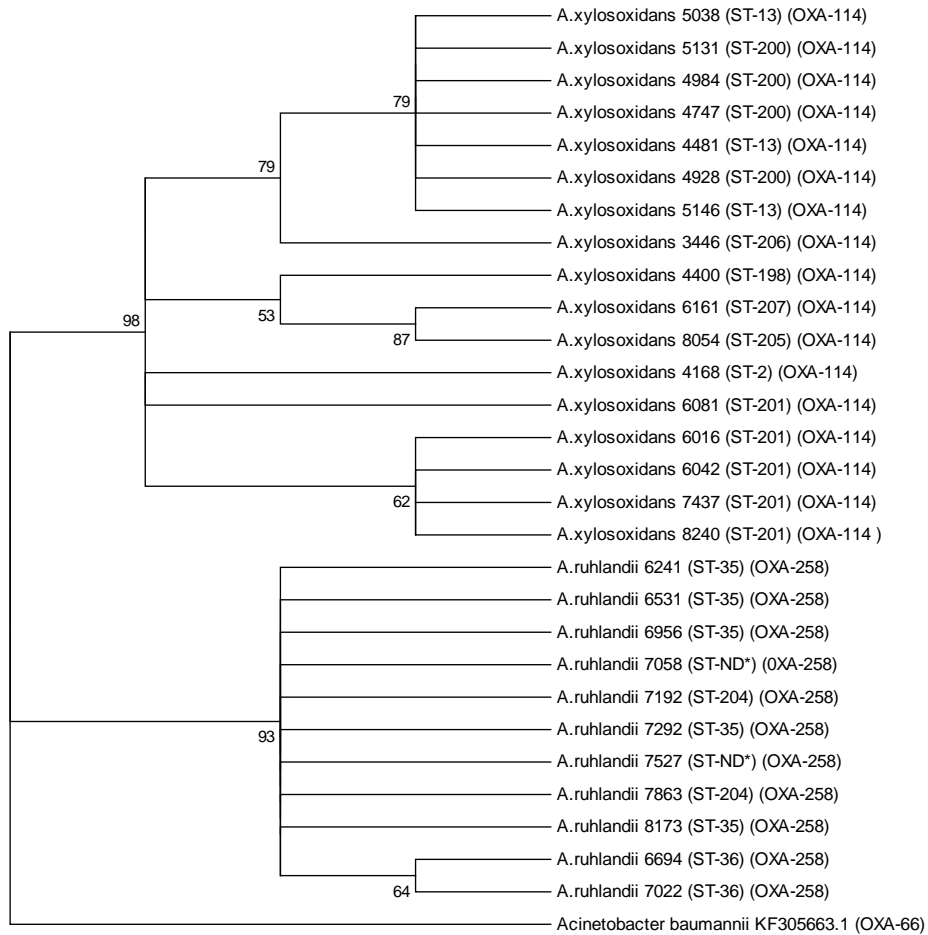
Legenda: * amostra sem amplificação do DNA; ** amostra sem identificação pelo sequenciamento do gene *bla_{OXA-114}*.

Fonte: A autora, 2014.

As sequências de nucleotídeos das 28 amostras foram comparadas com as sequências presentes no banco de dados do *GenBank*. Foi feita a árvore filogenéticas com essas sequências usando o programa MEGA versão 5.1. Dois *clusters* principais foram destacados na árvore filogenética. Todas as amostras com

variáveis OXA-114 tiveram seus ramos próximos agrupados no mesmo *cluster*, enquanto as amostras com a variável OXA-258 se agruparam em ramos próximos, mas em *cluster* distinto do relacionado às variáveis OXA-114 (Figura 3).

Figura 3 – Árvore *Neighbor Joining* (NJ) com as sequências das 28 amostras com amplificação positiva para o gene *bla-OXA-114*



Legenda: ST-ND* - *Sequence Typing* não definido.

Nota: A cepa *Acinetobacter baumannii* KF 305663.1 foi usada como grupo externo.

Fonte: A autora, 2014.

6.4 Comparação entre a identificação das amostras de *Achromobacter* spp. obtidas no sequenciamento dos genes 16S rRNA, *bla*_{OXA-114} e a análise MLST

De acordo com o sequenciamento prévio do gene 16S rRNA, as 30 amostras do estudo pertenceriam à espécie *A. xylosoxidans*.

O sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114} identificou duas espécies: *A. xylosoxidans* em 17 amostras (3446, 4168, 4400, 4481, 4747, 4928, 4984, 5038, 5131, 5146, 6016, 6042, 6081, 6161, 7437, 8054 e 8240) e *A. ruhlandii* em 11 amostras (6241, 6531, 6694, 6956, 7022, 7058, 7291, 7292, 7527, 7863 e 8173). Duas amostras (4530 e 7393) não tiveram amplificação do gene *bla*_{OXA-114}.

O MLST identificou quatro espécies na amostragem: *A. xylosoxidans* (17 amostras) *A. ruhlandii* (9 amostras), *A. dolens* (1 amostra) e *A. insuavis* (1 amostra (Figura 2). Todas as amostras identificadas como *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii* pelo gene *bla*_{OXA-114} tiveram a mesma identificação pelo MLST e as duas amostras não identificadas pelo gene *bla*_{OXA-114}, (4530 e 7393), foram identificadas, respectivamente como *A. dolens* e *A. insuavis*. As duas amostras (7058 e 7527) que não foram encaminhadas para identificação pelo MLST, apresentaram a variável enzimática OXA-258, sendo caracterizadas como *A. ruhlandii* (Tabela 7).

A concordância entre as três técnicas foi observada em 17 amostras (56,66%) para a identificação de *A. xylosoxidans*. Nove amostras de *A. ruhlandii* (30%), foram identificadas apenas nas técnicas de MLST e sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114}. *A. dolens* e *A. insolitus* foram identificados somente pelo MLST.

Tabela 7 - Comparação entre as técnicas de sequenciamento dos genes 16s rRNA, *bla*_{OXA-114} e MLST na caracterização das espécies de *Achromobacter*

Amostra	Sequenciamento 16s rRNA	MLST	Variante OXA
3446	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
4168	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
4400	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
4481	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
4530	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A. dolens</i>	-
4747	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
4928	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
4984	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
5038	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
5131	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
5146	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
6016	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
6042	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
6081	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
6161	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
6241	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
6531	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
6694	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
6956	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
7022	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
7058	<i>A.xylosoxidans</i>	ND*	OXA- 258
7291	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA-258
7292	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA-258
7393	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.insuavis</i>	-
7437	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
7527	<i>A.xylosoxidans</i>	ND*	OXA- 258
7863	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
8054	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114
8173	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.ruhlandii</i>	OXA -258
8240	<i>A.xylosoxidans</i>	<i>A.xylosoxidans</i>	OXA -114

Legenda: ND* - espécie não definida pelo MLST.

Fonte: A autora, 2014.

6.5 Tipagem molecular: comparação entre os resultados obtidos no PFGE e no MLST

Para esta análise foram excluídas as duas amostras que não puderam ter o ST determinado, assim dentre as 28 amostras, o PFGE caracterizou 17 clones enquanto o MLST identificou 14 STs (Tabela 8). Considerando a distribuição dos

STs entre os clones PFGE, observamos correspondência entre ST e clones PFGE para as quatro amostras dos STs 200/PFGE G, para as quatro amostras do ST 201/PFGE Q e para as duas amostras do ST 204/PFGE K. Contrariamente, as amostras do ST 35 corresponderam a dois clones PFGE: E (n=4) e M (n=1). As três amostras do ST 13, corresponderam a três clones PFGE (A, Z, U) e as duas amostras do ST 36 mostraram dois clones PFGE (H e V). Os demais STs corresponderam a clones únicos (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição dos perfis PFGE e STs dentre as amostras de *Achromobacter* spp

Paciente	Amostra	Data	PFGE	ST	Espécie **
P1	6161	04/05/2007	P	207	<i>A.xylosoxidans</i>
P2	4747	09/05/2005	G	200	<i>A.xylosoxidans</i>
P3	4400	28/10/2004	C	198	<i>A.xylosoxidans</i>
P5	6531	24/08/2007	E	35	<i>A.ruhlandii</i>
	6956	Data não informada	E	35	<i>A.ruhlandii</i>
	7292	25/03/2008	E	35	<i>A.ruhlandii</i>
	8173	09/09/2008	E	35	<i>A.ruhlandii</i>
P6	4481	02/02/2004	A	13	<i>A.xylosoxidans</i>
P7	8054	20/10/2008	L	205	<i>A.xylosoxidans</i>
P8	6081	21/03/2007	O	202	<i>A.xylosoxidans</i>
	4530	27/01/2005	I	199	<i>A. dolens</i>
P9	6042	15/02/2007	Q	201	<i>A.xylosoxidans</i>
	7437	05/06/2008	Q	201	<i>A.xylosoxidans</i>
P10	6694	11/10/2007	H	36	<i>A.ruhlandii</i>
	7022	17/01/2008	V	36	<i>A.ruhlandii</i>
P11	3446	18/06/2003	D	206	<i>A.xylosoxidans</i>
	4984	19/08/2005	G	200	<i>A.xylosoxidans</i>
P12	6016	15/02/2007	Q	201	<i>A.xylosoxidans</i>
	8240	27/11/2008	Q	201	<i>A.xylosoxidans</i>
P13	6241	21/05/2007	M	35	<i>A.ruhlandii</i>
	7291	31/03/02008	K	204	<i>A.ruhlandii</i>
P14	7863	22/08/2008	K	204	<i>A.ruhlandii</i>
	4168	17/06/2004	J	2	<i>A.xylosoxidans</i>
P15	4928	14/07/2005	G	200	<i>A.xylosoxidans</i>
	7058	30/01/2008	F	ND*	ND*
P16	7527	25/06/2008	F	ND*	ND*
P17	5038	22/09/2005	U	13	<i>A.xylosoxidans</i>
	5131	20/10/2005	G	200	<i>A.xylosoxidans</i>
P18	5146	20/10/2005	Z	13	<i>A.xylosoxidans</i>
	7393	12/05/2008	X	203	<i>A.insuavis</i>

Legenda: ND*- alelo e espécie não definido pelo MLST; ** - definido no MLST.

Fonte: A autora, 2014.

6.6 Análise temporal da distribuição dos STs por paciente

Para a análise da distribuição dos perfis clonais das amostras de *Achromobacter* spp, por paciente, foram considerados os resultados do MLST. As amostras de *Achromobacter* foram isoladas de 17 pacientes. Nove com apenas uma cultura e oito pacientes com mais de uma cultura. Foram encontradas 17 amostras de *A. xylosoxidans* pertencentes a 10 STs, nove amostras de *A. ruhlandii* pertencentes a três STs, uma amostra de *A. dolens* e uma de *A. insuavis*.

Três STs (13, 200 e 201) de *A. xylosoxidans* foram compartilhados entre os pacientes. O ST 13 foi observado nos pacientes, P6, P17 e P18 (todos do IFF, entre fevereiro de 2004 e outubro de 2005). Quatro pacientes do IFF (P2, P12, P15 e P18), apresentaram o ST 200 entre outubro de 2004 e outubro de 2005. O ST 201 foi observado em dois pacientes irmãos (P9 e P12) entre fevereiro de 2007 e novembro de 2008. Os demais STs (2, 198, 202, 205, 206 e 207) foram únicos por paciente.

Das amostras identificadas como *A. ruhlandii*, o ST 35 foi observado em dois pacientes (P13 e P5), um atendido no IFF (em maio de 2007) e o outro no HUPE (entre agosto de 2007 e setembro de 2008). Dois STs (36 e 204) foram únicos por paciente.

Os STs 199 e 203, correspondentes, respectivamente às espécies *A. dolens* e *A. insuavis* foram observados em pacientes distintos do IFF.

Considerando a análise dos sete pacientes com mais de uma cultura com *Achromobacter*, foram observadas diferentes situações: o mesmo ST em todas as culturas; diferentes STs da mesma espécie; STs distintos correspondentes a espécies distintas em diferentes culturas e diferentes STs de espécies distintas na mesma cultura.

Os pacientes P5, P10 e P14 mostraram os mesmos STs 35, 36 e 204 de *A. ruhlandii*, respectivamente em todas as culturas.

O paciente P15, apresentou *A. xylosoxidans* do ST 2 em junho de 2004 e o ST 200 em julho de 2005. No P18, foi observado em uma mesma cultura realizada em outubro de 2005 diferentes STs (ST 133 e 200) de *A. xylosoxidans*. Em maio de 2008, foi observado o ST 203 da espécie *A. insuavis*.

Os pacientes P9 e P12, que são irmãos, compartilharam o ST 201 de *A. xylosoxidans* além de apresentarem STs que não foram compartilhados. P9 apresentou o ST 199 de *A. dolens* em janeiro de 2005, além do ST 201 de *A. xylosoxidans* em duas culturas (maio de 2007 e junho de 2008). P12 apresentou o ST 200 de *A. xylosoxidans* na cultura realizada em agosto de 2005, além do ST 201 em duas ocasiões (fevereiro de 2007 e em novembro de 2008) (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise temporal da distribuição dos STs por paciente

Paciente (P)	ST	Espécie	Data	Hospital de Origem
P1	207	<i>A. xylosoxidans</i>	05/2007	IFF
P2	200	<i>A. xylosoxidans</i>	05/2005	IFF
P3	198	<i>A. xylosoxidans</i>	10/2004	IFF
P5	35	<i>A. ruhlandii</i>	08/2007	HUPE
	35	<i>A. ruhlandii</i>	Data não informada	
	35	<i>A. ruhlandii</i>	03/2008	
	35	<i>A. ruhlandii</i>	09/2008	
P6	13	<i>A. xylosoxidans</i>	02/2004	IFF
P7	205	<i>A. xylosoxidans</i>	10/2008	IFF
P8	202	<i>A. xylosoxidans</i>	03/2007	IFF
P9	199	<i>A. dolens</i>	01/2005	IFF
	201	<i>A. xylosoxidans</i>	02/2007	
	201	<i>A. xylosoxidans</i>	06/2008	
P10	36	<i>A. ruhlandii</i>	10/2007	IFF
	36	<i>A. ruhlandii</i>	01/2008	
P11	206	<i>A. xylosoxidans</i>	06/2003	IFF
P12	200	<i>A. xylosoxidans</i>	08/2005	IFF
	201	<i>A. xylosoxidans</i>	02/2007	
	201	<i>A. xylosoxidans</i>	11/2008	
P13	35	<i>A. ruhlandii</i>	05/2007	IFF
P14	204	<i>A. ruhlandii</i>	02/2008	HUPE
	204	<i>A. ruhlandii</i>	08/2008	
P15	2	<i>A. xylosoxidans</i>	06/2004	IFF
	200	<i>A. xylosoxidans</i>	07/2005	
P17	13	<i>A. xylosoxidans</i>	09/2005	IFF
P18	200	<i>A. xylosoxidans</i>	10/2005	IFF
	203	<i>A. insuavis</i>	05/2008	
	13	<i>A. xylosoxidans</i>	10/2005	

Legenda: IFF- Instituto Nacional de saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira; HUPE – Hospital universitário Pedro Ernesto.
Fonte: A autora, 2014.

7. DISCUSSÃO

7.1 Identificação de *Achromobacter* spp

Nas últimas décadas a microbiologia da FC tem se tornado altamente complexa. Além dos patógenos bacterianos clássicos envolvidos na infecção crônica, como *P. aeruginosa* e *S. aureus*, “novos patógenos” tem sido frequentes nos espécimes respiratórios destes pacientes, destacando-se espécies de BGNNF (FOWERAKER 2009; ALMUZARA et al. 2010; LAMBIASE et al. 2011).

Nos laboratórios de diagnóstico microbiológico a identificação de BGNNF, geralmente é baseada na identificação fenotípica através de métodos manuais ou automatizada. Entretanto, esta metodologia tem se mostrado inadequada para identificação de microrganismos em pacientes com FC, tendo em vista que estas cepas perderam características metabólicas clássicas. Além disso, algumas cepas com fenótipo de susceptibilidade antimicrobiano associado à espécie, já não apresentam este fenótipo. Em geral, os microrganismos diferem entre si em termos de potencial patogênico e transmissibilidade e a identificação correta em nível de espécie é um fator crítico para o manejo clínico desses pacientes (FERRONI et al. 2002; BARRADO et al. 2013).

O diagnóstico microbiológico específico na FC tem impacto extremamente relevante na qualidade de vida e sobrevida destes pacientes. Um suporte microbiológico de excelência determina a qualidade do acompanhamento clínico, influenciando na sua sobrevida global. A identificação incorreta de um BGNNF compromete medidas de controle de infecção e dificulta a compreensão clara da epidemiologia e história natural da infecção na FC (MARQUES, 2011; LIU et al. 2002).

Dentre os BGNNF associados a infecção pulmonar na FC, a incidência de infecção por *Achromobacter* spp. tem aumentado nos últimos anos (HANSEN et al. 2013). Frequentemente é transitória, embora aproximadamente 2,3% dos pacientes com FC apresentam-se cronicamente infectados (DE BAETS et al. 2006; TRANCASSINI et al. 2014; AMOUREX et al 2012).

No Brasil, Pereira e colaboradores (2011) observaram o aumento na frequência de *A. xylosoxidans* isolados em culturas bacterianas de pacientes acompanhados nos dois centros de referência incluídos no presente estudo, e mostraram a capacidade destes microrganismos estabelecerem infecção persistente, transmissão cruzada entre pacientes e a presença de um grupo clonal único colonizando vários pacientes.

A taxa de colonização/infecção por *A. xylosoxidans* é distinta entre os estudos, variando de 2% na década de 2000 a 21% em 2011, nos Estados Unidos e Brasil, respectivamente (EMERSON et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; (TRANCASSINI et al. 2014). Na América do Sul, entre os anos de 1997 e 2002, a espécie representou 12,5% dos BGNNF nos Centros Médicos Hospitalares (ALMUZARA et al. 2010).

De acordo com o registro americano anual de pacientes com FC (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION PATIENT REGISTRY, 2012), *Achromobacter* spp. pode ser encontrado colonizando o pulmão de aproximadamente 5% dos pacientes com FC. Também no ano de 2012, o registro anual de Fibrose Cística canadense, (CYSTIC FIBROSIS CANADIAN 2012) relatou a ocorrência de *Achromobacter* spp em 3% dos pacientes. No Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC, 2011) *Achromobacter* spp., correspondeu a 2,1% dos microrganismos identificados em pacientes com FC em 2011.

Devido a proximidade de características morfológicas e reatividade bioquímica, a identificação errônea de BGNNF de pacientes com FC pode ocorrer. Algumas amostras de *A. xylosoxidans* compartilham propriedades comuns com isolados não pigmentados de *P. aeruginosa*: ambos são aeróbicos, oxidase positivos, de crescimento a 41 °C, mas não a 4 °C e crescimento em cetrimida, por exemplo. Essas condições geram dificuldades na identificação correta das espécies, principalmente em caso de culturas com ambas as espécies (AMOUREUX et al. 2012; BARRADO et al. 2013). Assim, a prevalência não só de *A. xylosoxidans*, mas também das outras espécies do gênero pode ser maior que os dados publicados.

MALDI-TOF MS tem sido sugerido como uma ferramenta em potencial para a identificação de uma variedade de microrganismos nos laboratórios de microbiologia clínica. A técnica é considerada uma metodologia de identificação que revolucionou o trabalho de identificação de rotina nos laboratórios. Por ser uma técnica rápida e pouco dispendiosa, quando comparada com as metodologias convencionais, tem

sido apontada como promissora e substituta das metodologias empregadas usualmente para identificação (DE BEL et al. 2011; CROXATTO, PROD'HOM, e GREUB 2012; SOUZA et al. 2014).

Souza e colaboradores (2014) realizaram a identificação de sete amostras de *Achromobacter* spp pela técnica de MALDI-TOF MS e por sequenciamento do gene 16S rRNA . Os resultados foram concordantes em ambas as metodologias: seis amostras foram identificadas como *A. xylosoxidans* e uma apenas no gênero.

A limitação desta metodologia encontra-se na necessidade de atualização do banco de dados do espectro de leitura padrão das espécies existentes. O potencial de discriminação reduzido em alguns casos está associado à diferenças taxonômicas relacionadas aos bancos de dados (BIZZINI e GREUB 2010; SOUZA et al. 2014).

Diante da dificuldade na identificação fenotípica das espécies *Achromobacter* spp., o uso de metodologia molecular tem sido imprescindível (COENYE et al. 2002).

De Baets e colaboradores (2007) realizaram um estudo com cepas de *P. aeruginosa* atípicas e cepas de BGNNF, isoladas de 140 pacientes com FC. O grupo observou que algumas das amostras anteriormente identificadas como *P. aeruginosa* atípicas no laboratório de rotina por técnica fenotípica, corresponderam à *A. xylosoxidans*, quando identificadas por meio da técnica de DNA *fingerprinting*. No total da população estudada, ao menos 18% pacientes tiveram uma cultura positiva para *A. xylosoxidans*.

Vários estudos têm proposto metodologias para a identificação destes microrganismos, visando compreender a epidemiologia e elucidar os mecanismos de patogenicidade.

Foram utilizadas no presente estudo, 30 amostras de *A. xylosoxidans* identificadas por um conjunto amplo de testes fenotípicos e por sequenciamento do gene que 16S rRNA em uma etapa anterior deste estudo (PEREIRA 2011). Entretanto, atualmente, a identificação pela metodologia de sequenciamento do gene 16s rRNA tem sido questionada por vários autores.

Apenas três posições polimórficas do gene separam *A. xylosoxidans* de *A. ruhlandii* e apenas um nucleotídeo simples separa *A. piechaudii* de *A. spanius* (RIDDERBERG et al. 2012; SPILKER, VANDAMME e LIPUMA 2013). Além disso, outro fator considerado crítico para a aplicação da metodologia de identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA é a análise das sequências. As sequências

gênicas disponíveis no banco de dados, por vezes não representam de maneira fidedigna o cenário taxonômico do gênero. A atualização do banco de dados genéticos nem sempre acompanham a velocidade das mudanças taxonômicas.

Um aumento expressivo na descrição de novas espécies dentro do grupo tem sido observado recentemente em função dos avanços nas técnicas de biologia molecular, capazes de distinguir as espécies com alta similaridade genética. Trabalhos recentes têm proposto metodologias de identificação baseando-se em genes constitutivos (ENRIGHT e SPRATT, 1999; DIGGLE e CLARKE, 2002; WATERS et al., 2012; LARSEN et al., 2012; INOUYE et al., 2012; LÓPEZ-CAUSAPÉ et al., 2013)

Doi e colaboradores em 2008 descreveram o gene β -lactamase *bla*_{OXA-114} como intrínseco de *A. xylosoxidans* e postularam-no como marcador espécie-específico. Posteriormente, Turton e colaboradores (2011) desenvolveram um protocolo de PCR para a identificação de *A. xylosoxidans* baseando-se na detecção do gene *bla*_{OXA-114}. O protocolo baseou-se nos resultados obtidos no estudo onde todas as amostras de *A. xylosoxidans* tiveram amplificação, exceto as duas outras espécies do gênero *Achromobacter* e os BGNNF testados. Distintas variantes do gene *bla*_{OXA-114} encontradas nas amostras de *A. xylosoxidans* também foram descritas.

Traglia e colaboradores (2013), utilizando os mesmos iniciadores desenhados por Turton e colaboradores (2011), investigaram a presença do gene *bla*_{OXA-114} em 19 amostras de *Achromobacter* spp., previamente identificadas por MLST. Assim como nos estudos de Turton e colaboradores (2011), os autores obtiveram amplificação. Todas as amostras de *A. xylosoxidans* obtiveram amplificação, exceto *A. denitrificans* e *A. piechaudii*.

No estudo de Amoureux e colaboradores (2012), foi verificada a presença do gene *bla*_{OXA-114} em 447 amostras de *A. xylosoxidans* de pacientes com FC, com os iniciadores de Turton e colaboradores (2011). Além destes iniciadores, os autores desenharam iniciadores à partir da sequência do genoma completo de *A. xylosoxidans* cepa AXX-A (Genbank AFRQ01000000). Neste trabalho, cinco novas variantes do gene foram descritas, além de uma variante com 88% de similaridade com o OXA-114, mas diferente da variante OXA-114a em 34 aminoácidos que foi designada OXA-243. Quatro variáveis desta enzima foram caracterizadas (JX206453; JX206454; JX206455; JX206456).

No presente estudo, 28 das 30 amostras previamente caracterizadas como *A. xylosoxidans* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentaram amplificação com os iniciadores do gene *bla*_{OXA-114-like}. Considerando os critérios de Turton e colaboradores (2011), essas 28 amostras seriam identificadas com *A. xylosoxidans*, concordando com a identificação do sequenciamento do gene 16S rRNA. Duas amostras não teriam sua identificação em nível de espécie, discordando da identificação de *A. xylosoxidans* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Em um estudo no ano de 2013, Barrados e colaboradores pesquisaram a presença do gene *bla*_{OXA-114} em 25 amostras de pacientes com FC e 26 de pacientes não FC na Espanha. Os resultados demonstraram que todos os isolados de *A. xylosoxidans* e outras quatro genogrupos do gênero identificadas até o momento do estudo como genogrupo 2a, 12, 14 e 17 mostraram-se capaz de carrear o gene. Esses resultados sugerem que o gene não é específico de *A. xylosoxidans*, conforme proposto por Doi e colaboradores (2008) e Turton e colaboradores (2011).

Resultados similares ao encontrado no estudo de Barrados e colaboradores (2013) foram observados por Papalia e colaboradores (2013) que investigaram a presença do marcador *bla*_{OXA-114} em 28 amostras de *Achromobacter* spp. de pacientes com FC. Todas as amostras foram amplificadas e as sequências de nucleotídeos foram comparadas com todas as sequências disponibilizadas nos *GenBank*. Os autores evidenciaram que em cinco amostras previamente caracterizadas como *A. ruhlandii* pelo MLST (SPILKER, VANDAMME e LIPUMA 2012), as sequências de nucleotídeos diferiam em 40 aminoácidos de todas as variantes do gene *bla*_{OXA-114}. A variante da enzima foi descrita como OXA-258, e foi proposta como marcador molecular de *A. ruhlandii*.

Os achados de Papalia e colaboradores (2013), assim com os de Barrados e colaboradores (2013) contestam o uso exclusivo da análise visual na identificação de *A. xylosoxidans* por PCR do gene *bla*_{OXA-114} e reforçam a necessidade de sequenciamento do produto de amplificação deste gene. Espécies de *A. ruhlandii* podem ser erroneamente identificadas como *A. xylosoxidans* quando apenas o PCR para a detecção do gene é considerado.

Os produtos de amplificação obtidos com a amplificação do gene *bla*_{OXA-114} das 28 amostras foram submetidos ao sequenciamento e alinhadas no Blast, conforme sugerido por Papalia e colaboradores (2013). Dezesete amostras foram relacionadas à alguma variante do gene *bla*_{OXA-114} e foram identificadas como *A.*

xylosoxidans. Onze amostras apresentaram a variante OXA-258 e foram identificadas como *A. ruhlandii*. Nos alinhamentos para ambas as espécies, foram obtidos percentuais de similaridade entre as variáveis de 99% e 100%.

A comparação das sequências das 28 amostras de *Achromobacter* spp. em uma árvore filogenética, mostrou que o sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114} foi capaz de distinguir as amostras de *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii*, em dois cluster diferentes.

Nossos resultados concordam com os achados de Papalia e colaboradores (2013), e evidenciam que apenas a amplificação do gene *bla*_{OXA-114} como critério de análise, identifica erroneamente amostras de *A. ruhlandii* como *A. xylosoxidans*. Esses dados mostram que a identificação das duas espécies mais prevalentes do gênero *Achromobacter* pode ser obtida com a amplificação e o sequenciamento do gênero *bla*_{OXA-114}.

Embora a metodologia de sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114} forneça respostas para a identificação de *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii*, não resolve a questão da identificação das novas espécies do gênero. Nesse contexto, o MLST surgiu como uma ferramenta adicional para a identificação das espécies de *Achromobacter* spp. Recentemente, *A. ruhlandii* e várias outras espécies do gênero *Achromobacter* foram identificadas em pacientes com FC utilizando o esquema MLST proposto nos trabalhos de Ridderberg e colaboradores (2012) e Spilker e colaboradores (2012), utilizado, respectivamente 5 e 7 genes conservados

Em um estudo retrospectivo realizado em um hospital universitário em Madri entre 2002 e 2012 em pacientes com FC, usando a identificação pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *nrdA* 765 e MLST, *A. xylosoxidans* foi a espécie mais prevalente do gênero colonizando cronicamente estes pacientes, correspondendo a 42% dos isolados seguidos de 23,5% de *A. ruhlandii* (BARRADO et al. 2013).

A metodologia de MLST proposta por Spilker e colaboradores (2012) mostrou uma identificação mais abrangente das 30 amostras do presente estudo. A identificação das amostras de *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii* foi idêntica à obtida com o sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114}. As duas espécies não identificadas pelo sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114} foram identificadas como *A. dolens* e *A. insuavis*. Considerando os resultados encontrados no MLST, *A. xylosoxidans* representou 57% das amostras, *A. ruhlandii* 30%; *A. dolens* 3% e *A. insuavis* 3%. Esses resultados são similares aos descritos na literatura para a distribuição das espécies

de *Achromobacter* em FC utilizando-se o esquema MLST: *A. xylosoxidans* é a espécie mais prevalente do gênero nas culturas, seguido de *A. ruhlandii* (RIDDERBERG et al. 2012; SPILKER et al. 2013)

Duas amostras (6,66%) não apresentaram sequências de boa qualidade no gene *nrdA* e não tiveram o alelo *nrdA* definido e, portanto não foram identificadas pelo MLST. Entretanto o sequenciamento do gene *bla_{OXA-114}*, correspondeu a variável OXA-258, indicando que essas amostras são *A. ruhlandii*, o que poderia, elevar o número de amostras de *A. ruhlandii* identificadas no estudo.

7.2 Comparação entre a identificação utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, MLST, PCR e sequenciamento do gene *bla_{OXA-114}*

A comparação entre as três metodologias moleculares evidenciam o grau de complexidade da identificação de *Achromobacter* sp. onde resultados concordantes foram encontrados apenas para 17(56,66%) amostras de *A. xylosoxidans*.

Esses dados apontam para a inadequação do sequenciamento do gene 16S rRNA diante da nova realidade das espécies recém descritas no gênero. Treze amostras seriam erroneamente identificados como *A. xylosoxidans* se apenas o sequenciamento do gene 16S rRNA fosse considerado e *A. ruhlandii* seria excluída da identificação.

As metodologias de MLST e sequenciamento do gene *bla_{OXA-114}* foram mais discriminatórias na identificação das duas espécies mais prevalentes na FC. Dezesete amostras (56.66%) foram concordantes com a identificação de *A. xylosoxidans* e nove amostras (30%) na identificação de *A. ruhlandii*. Por outro lado, espécies menos prevalentes como *A. dolens* e *A. insolitus*, só foram identificadas pelo MLST.

Os dados deste estudo demonstram que a identificação das espécies *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii* pode ser obtida por PCR e sequenciamento do gene *bla_{OXA-114}*. Entretanto, esta alternativa possui limitações na identificação das outras espécies. Embora mais oneroso para os laboratórios de microbiologia clínica, o MLST é uma ferramenta mais adequada para identificação das espécies de *Achromobacter* menos frequentes.

Mahenthiralingam (2014) tem chamado a atenção que a maioria das espécies de *Achromobacter* historicamente são identificadas como *A.xylosoxidans*. Mudanças taxonômicas têm ocorrido dentro do gênero e os laboratórios de microbiologia clínica precisam acompanhar essas mudanças para nortear as políticas de manejo dos pacientes.

A compreensão das características de cada espécie em relação ao seu potencial patogênico é fundamental. Existem raros relatos em relação a *A. xylosoxidans* (HANSEN et al., 2006; HANSEN et al., 2010; PEREIRA, 2013) e nenhum em relação a *A.ruhlandii* e as outras espécies do gênero. Estudos voltados para a identificação e mecanismos de patogenicidade são necessários.

7.3 Comparação PFGE E MLST

O MLST além de oferecer assinatura genética mais estável, oferece vantagens no estudo epidemiológico, quando comparado com o PFGE. Por ser uma análise molecular utilizando sequenciamento, os dados obtidos podem ser comparados com os dados de outros locais, auxiliando na compreensão da epidemiologia mundial da espécie em estudo (LÓPEZ-CAUSAPÉ et al., 2013).

Embora o perfil de restrição pelo PFGE seja usado como método de referência para estudos epidemiológicos, a técnica é aconselhável para estudos de períodos curtos como surtos e se mostra inadequado para estudos de longo prazo. Mutações individuais podem destruir ou criar sítios de restrição, levando a alterações substanciais em perfis de restrição no PFGE. Por outro lado, o MLST, com base em sequenciamento de 7 genes conservados, atualmente é considerada referência para a epidemiologia global e estrutura da população analisada (KIDD et al., 2011; LÓPEZ-CAUSAPÉ et al., 2013)

Waters e colaboradores (2012) compararam o poder discriminatório do PFGE, RAPD e MLST em um estudo com 48 amostras de *P. aeruginosa* isolada de 48 pacientes atendidos em dois hospitais canadenses. Foram identificados 27 STs, 31 clones PFGE e 31 clones RAPD. A comparação entre as três metodologias mostrou maior nível de discriminação entre os resultados obtidos entre MLST e PFGE, sendo observada maior habilidade de detectar cepas clonais no MLST (100%) quando

comparado com o PGFE (86%). A tipagem por RAPD mostrou habilidade de identificar cepas clonais de apenas 69%.

Em nossa amostragem o PFGE identificou 18 grupos clonais enquanto o MLST identificou 14 STs. Observamos correspondência entre ST e grupos PFGE para as quatro amostras dos STs 200/PFGE G, para as quatro amostras do ST 201/PFGE Q e para as 2 amostras do ST 204/PFGE K. Contrariamente, as amostras do ST 35 corresponderam a dois perfis PFGE: E e M. As três amostras do ST 13, corresponderam a três perfis PFGE (A, Z, U) e as duas amostras do ST 36 mostraram dois perfis PFGE (H e V). Os demais STs corresponderam a perfis únicos.

As diferenças encontradas nos resultados obtidos entre as técnicas de MLST e PFGE podem ser justificadas pela dinâmica dos eventos genéticos relacionados ao genoma total em comparação aos genes de manutenção celular. Em geral, as mutações pontuais em genes conservados apresentam taxa de mutação lenta e em menor frequência quando comparado ao DNA total, embora rearranjos gênicos podem levar a alterações nos perfis em ambas as metodologias.

Um único banco de dados está disponível para consulta e comparação entre STs de *Achromobacter* sp e, apenas 228 STs encontravam-se disponíveis na base de dados do site <http://pubmlst.org/achromobacter/> (acesso 02/06/2014). O pequeno número de ST disponíveis quando comparados com o de outros patógenos clássicos na FC, pode ser justificado pela recente criação do banco de dados e esquema MLST para o gênero. Nosso trabalho contribuiu com a manutenção do banco de dados do site fornecendo os alelos *nusA* 91 e 92; *rpoB* 89, 90, 91 e 92; *eno* 83; *gltB* 68; *nuoL* 76; *nrdA_765* 160, além dos STs 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206 e 207.

Comparando nossos resultados com os presentes no banco de dados, identificamos em nossa amostragem quatro STs previamente identificados nos Estados Unidos. Os STs 2 e 13, ambos identificados como *A. xylosoxidans*, oriundos de pacientes com FC em 2010 e 2009, respectivamente. Os STs 35 e 36, identificados como *A. ruhlandii* foram identificados em pacientes não FC em 1998 e 2004, respectivamente. A busca dos dois STs 35 e 36 no banco de dados não mostrou associação destes com espécimes clínicos de pacientes com FC. Desta forma, a ocorrência destes dois STs na nossa amostragem caracteriza a primeira descrição destes na FC.

7.4 Distribuição dos STs entre os pacientes

Na FC, a maioria dos pacientes colonizados por *Achromobacter* spp. abrigam estirpes próprias. Entretanto, a transmissão paciente-paciente tem sido relatada tanto em casos esporádicos como em casos epidêmicos. O caso mais conhecido é o do clone dinamarquês DES. Apesar de toda a política de segregação dos pacientes infectados e o desencorajamento do contato social entre eles, a propagação deste clone entre os centros de acompanhamento de pacientes FC não cessou durante o ano de 2011(WANG et al., 2013). O clone DES foi identificado como *A. ruhlandii* por MLSA e, dentre as suas principais características estão a alta transmissibilidade e elevada resistência à antimicrobianos (RIDDERBERG, WANG e NØRSKOV-LAURITSEN, 2012).

Observamos cepas exclusivas e cepas compartilhadas entre pacientes na nossa amostragem. Entretanto nenhum ST foi amplamente disseminado. Apenas um único ST foi compartilhado entre os dois centros de atendimento à pacientes com FC. O ST 35 da espécie *A. ruhlandii* foi compartilhado por dois pacientes (P13 e P5) atendidos no IFF e HUPE, isolados no ano de 2005. Não foram encontrados ST de *A. xylosoxidans* compartilhado entre pacientes dos dois centros.

A. ruhlandii foi a única espécie cujo ST foi identificado nos dois centros estudados. Chamamos a atenção para a necessidade de maiores estudos envolvendo o potencial de transmissibilidade e circulação desta espécie.

A transmissão interpessoal de *Achromobacter* spp. tem sido relatada entre indivíduos que são intimamente relacionados como irmãos ou doentes que tenham tido contato próximo e prolongado, ou amigos (KRZEWINSKI et al. 2001; HANSEN et al. 2013). No presente estudo, observamos dois pacientes irmãos atendidos no mesmo centro de tratamento compartilhando o mesmo ST. Os pacientes P9 e P12 compartilharam o ST 201 de *A. xylosoxidans*, pertencente ao clone Q, durante o ano de 2007 e 2008.

Embora sejam adotadas políticas de controle no manejo de pacientes com FC durante visitas ao hospital e o contato social entre pacientes seja desencorajado, o ambiente pode atuar como fonte comum de dispersão de clones.

STs distintos de *A. xylosoxidans* foram identificados em mais de um paciente no IFF. O ST 13 colonizou três pacientes (P6, P17 e P18) em 02/2004, 09/2005 e

10/2005, respectivamente. O ST 200 foi identificado nos pacientes P2, P12, P15 e P18, respectivamente em 05/2005, 08/2005, 07/2005 e 10/2005 ambos do IFF. Seis STs (2, 198, 202, 205, 206 e 207) de *A.xylosoxidans* e dois STs exclusivos de (36 e 204) de *A. ruhlandii* foram exclusivos.

A coexistência e substituição de clones e STs é bem caracterizada para *P. aeruginosa*. Em um estudo retrospectivo que comparou os resultados de PFGE e MLST em 100 amostra de *P. aeruginosa* foram identificados pacientes colonizados por clones únicos ou por mais de um simultaneamente. Quatro pacientes apresentaram o mesmo clone de *P. aeruginosa* persistente durante os oito anos do estudo. Outros 4 pacientes apresentaram coexistência de vários clones (de 2 a 4) ou substituição clonal (LÓPEZ-CAUSAPÉ et al, 2014).

Em um estudo retrospectivo entre os anos de 1994 e 2006, Molina e colaboradores (2008), estudaram a dinâmica da população de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) em 77 pacientes com FC, aplicando as metodologias de PFGE e MLST. Destes, 15 pacientes apresentaram culturas com ST únicos de MRSA e três pacientes apresentaram dois STs coexistindo (ST228/ST5 em dois pacientes e ST235/ST247 em um paciente).

Barrados e colaboradores (2013), buscando verificar a dinâmica dos clones de *Achromobacter* spp. na infecção pulmonar, estudaram a relação entre as amostras por PFGE em 40 amostras de *Achromobacter* spp isolados de nove pacientes com FC cronicamente colonizados durante períodos entre um e nove anos. Os resultados demonstraram que oito pacientes abrigaram o mesma cepa ao longo do tempo. Apenas um paciente apresentou substituição clonal após cinco anos do clone inicial.

Pereira e colaboradores (2011) investigaram a possibilidade de infecção cruzada em 122 amostras de *Achromobacter* spp. obtidas de 39 pacientes atendidos em dois centros de referência no Rio de Janeiro entre os anos de 2003 e 2008. Ao longo dos 5 anos, foram identificados 22 diferentes clones PFGE. Quinze pacientes apresentaram clones individuais e persistentes em alguns casos. Sete pacientes compartilharam o mesmo clone. Em pacientes cronicamente colonizados, observou-se a ocorrência de apenas um clone em determinado período e outros clones ocasionais.

Dados similares foram obtidos no estudo de Turton e colaboradores (2011). Em um estudo com 105 amostras de *A. xylosoxidans* obtidas de 83 pacientes

atendidos em oito centros de estudos na Inglaterra. Seis pacientes apresentaram o mesmo clone persistente por cinco anos ou mais.

No presente estudo, foram observados pacientes com STs iguais em todas as culturas; STs da mesma espécie; STs distintos pertencentes à espécies distintas em diferentes culturas e diferentes STs de espécies distintas na mesma cultura.

Dois pacientes (P9 e P18) apresentaram substituição de espécies nas culturas. P9 foi colonizado por *A. dolens* (01/2005) seguido de *A. xylosoxidans* (02/2007 e 06/2008). P18 apresentou dois STs (ST 13 e 200) de *A. xylosoxidans* na mesma cultura realizada no mês em 10/2005, seguido da colonização por *A. insuavis* na cultura realizada em 05/2008.

A recente identificação de *A. dolens* e *A. insuavis* na FC dificulta a compreensão do significado da sucessão destas espécies nestes pacientes.

Nossos resultados em conjunto mostram que, independente da metodologia molecular usada, existe maior predomínio de *A. xylosoxidans* seguido de *A. ruhlandii*. Pouco se sabe sobre os reais efeitos destas e outras espécies do gênero *Achromobacter* na doença pulmonar. Os avanços nas técnicas moleculares têm colaborado significativamente para maior compreensão da epidemiologia destes microrganismos, ressaltando a necessidade de estudos direcionados as espécies menos frequentes do gênero.

CONCLUSÃO

A comparação dos resultados obtidos nas três metodologias moleculares (sequenciamento do gene 16S rRNA, MLST e do sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114}) para a identificação de *Achromobacter* spp. mostrou concordância apenas para 17(56,66%) amostras de *A. xylosoxidans* evidenciando o grau de complexidade desse gênero.

O MLST apontou que a maioria das amostras correspondeu a *A. xylosoxidans* (57%), seguido de *A. ruhlandii* (30%). Além disso, o MLST mostrou ser capaz de identificar as espécies *A. dolens* e *A. insuavis*, não identificadas pelo sequenciamento dos gene 16S rRNA e *bla*_{OXA-114}.

A detecção da OXA-114 por PCR, sem o sequenciamento do produto de amplificação, se apresentou como uma ferramenta inapropriada para a identificação de *A. xylosoxidans*, tendo em vista que o gene *bla*_{OXA-258} também é amplificado com os iniciadores utilizados para a detecção de OXA-114, podendo levar a identificação errônea de *A. ruhlandii* como *A. xylosoxidans*.

Em conjunto, os dados deste estudo demonstram que a identificação das espécies *A. xylosoxidans* e *A. ruhlandii* pode ser obtida por PCR e sequenciamento do gene *bla*_{OXA-114}. Entretanto, esta alternativa possui limitações na identificação das outras espécies. Embora mais oneroso para os laboratórios de microbiologia clínica, o MLST é uma ferramenta mais adequada para identificação das espécies de *Achromobacter* menos frequentes.

A comparação entre a técnica de MLST e PFGE mostrou que a análise de genes conservados proporcionada pela metodologia de MLST, demonstrou maior capacidade em discriminar clones quando comparado com a análise da restrição do DNA cromossômico obtido por PFGE.

O MLST identificou 14 STs na amostragem, sendo quatro já descritos na literatura e 10 descritos pela primeira vez neste estudo. Além disso, este estudo mostrou pela primeira vez a presença dos ST 35 e 36 em pacientes com FC.

A tipagem molecular pelo MLST mostrou ST exclusivos e alguns compartilhados entre pacientes. Entretanto nenhum ST foi amplamente disseminado.

O baixo número de STs descritos e disponíveis nos bancos de dados para o gênero *Achromobacter* demonstra a necessidade de mais estudos voltados para a identificação e epidemiologia das espécies do gênero, a fim de melhorar a compreensão dos mecanismos de patogenicidade destes microrganismos.

REFERÊNCIAS

- Almuzara M, Limansky A, Ballerini V, Galanternik L, FAMIGLIETTI, A. et al. 2010. In Vitro Susceptibility of *Achromobacter* spp. Isolates: Comparison of Disk Diffusion, Etest and Agar Dilution Methods.” International Journal of Antimicrobial Agents 35(1):68–71.
- Amoureux L, Bador J, Siebor E, Taillefumier N, Fanton A et al. Epidemiology and Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from Cystic Fibrosis Patients in Dijon, Burgundy: First French Data. Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society 2012;12(2):170–76.
- _____ ; Bador J, Fardeheb S, Mabilille C, Couchot C et al. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in Hospital, Domestic, and Outdoor Environmental Samples and Comparison with Human Clinical Isolates. Applied and environmental microbiology. 2013; 79(23):7142–49.
- Baldan R, Cigana C, Testa F, Bianconi I, De Simone M et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways Influences Virulence of *Staphylococcus aureus* In Vitro and Murine Models of Co-Infection. 2014.; 9(3); 1-11.
- Barrado L, Brañas P, Orellana MÁ, Martínez MT, García G et al. Molecular Characterization of *Achromobacter* Isolates from Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients in Madrid, Spain. Journal of clinical microbiology. 2013; 51(6):1927–30.
- Bazzini S, Udine C, Riccardi G. Molecular Approaches to Pathogenesis Study of *Burkholderia Cenocepacia*, an Important Cystic Fibrosis Opportunistic Bacterium. Applied microbiology and biotechnology. 2011; 92(5):887–95.
- Bhatt JM. Treatment of Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society. 2013; 22(129):205–16.
- Bittar F, Rolain JM. Detection and Accurate Identification of New or Emerging Bacteria in Cystic Fibrosis Patients. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010; 16(7):809–20.
- Bizzini A, Greub G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, a Revolution in Clinical Microbial Identification. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010;16(11):1614–19.
- Boszczowski I, Do Prado GVB, Dalben MF, Telles RCP, Freire MP et al. Polyclonal Outbreak of Bloodstream Infections Caused by *Burkholderia cepacia* Complex in Hematology and Bone Marrow Transplant Outpatient Units. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2014; 56(1):71–76.

Busquets NP, Baroni MR, Ochoteco MC, Zurbriggen ML, Virgolini S et al. Aislamientos Bacterianos de Muestras Respiratorias de Pacientes Pediátricos Con Fibrosis Quística Y Su Distribución Por Edades. 2013; 44–49.

Cabello GMK. Avanços da genética na Fibrose Cística. Revista HUPE. 2011; 10(4): 36-45.

CANADIAN CYSTIC FIBROSIS REGISTRY 2011 Annual Report. Disponível em: <<http://www.cysticfibrosis.ca/wp-content/uploads/2013/10/Registry2011FINALOnlineEN.pdf>>. Acesso em 11 ago. 2014.

Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P et al. Investigation of the algT Operon Sequence in Mucoïd and Non-Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from 115 Scandinavian Patients with Cystic Fibrosis and in 88 in Vitro Non-Mucoïd Revertants. Microbiology (Reading, England). 2008;154(Pt 1):103–13.

Ciofu O, Hansen CR, Høiby N. Respiratory Bacterial Infections in Cystic Fibrosis. Current opinion in pulmonary medicine. 2013; 19(3):251–58.

Ciucă IM, Pop, L, TĂMAȘ, L.; TĂBAN, S. Cystic Fibrosis Liver Disease - from Diagnosis to Risk Factors. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. 2014; 55(1):91–95.

Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, Lipuma JJ. Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of *Inquilinus Limosus* Gen . Nov ., Sp . Nov . 2002; 40(6):2062–69.

Cooper JE, Feil EJ. Multilocus Sequence Typing--What Is Resolved? Trends in microbiology. 2004;12(8):373–77.

Cramer N, Wiehlmann L, Ciofu O, Tamm S, Høiby N, Tümmler B. Molecular Epidemiology of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Airway Infections in Cystic Fibrosis. PloS one. 2012; 7(11):e 50731.

_____; WiehlmannL, Tümmler B. Microbiology Clonal Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. International Journal of Medical Microbiology. 2010; 300(8):526–33.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. FEMS microbiology reviews. 2012; 36(2):380–407.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Patient Registry. Annual Data Report 2012. Disponível em: <<http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/PatientRegistryReport/2012-CFF-Patient-Registry.pdf>>. Acesso em 11 ago. 2014.

CYSTIC FIBROSIS CONSORTIUM. Cystic Fibrosis Mutation database. Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>>. Acesso em 11 ago. 2014.

Da Conceição Neto, O.C. Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística: caracterização das espécies, avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e da diversidade genética [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2013. 104f

Damron FH, Barbier M, Mckenney ES, Schurr MJ, Goldberg JB. Genes Required for and Effects of Alginate Overproduction Induced by Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on Pseudomonas Isolation Agar Supplemented with Ammonium Metavanadate. *Journal of bacteriology*. 2013; 195(18):4020–36.

De Bel A, Wybo I, Vandoorslaer K, Rosseel P, Lauwers S et al. Acceptance Criteria for Identification Results of Gram-Negative Rods by Mass Spectrometry. *Journal of medical microbiology*. 2011; 60(5):684–86.

De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vaneechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in Cystic Fibrosis: Prevalence and Clinical Relevance. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2006; 6(1):75–78.

Derichs N. Targeting a Genetic Defect: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators in Cystic Fibrosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2013; 22(127):58–65.

Diggle MA, Clarke SC. Rapid assignment of nucleotide sequence data to allele types for multi-locus sequence analysis (MLSA) of bacteria using an adapted database and modified alignment program. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2002; 4(6), 515–7.

Döring G, Parameswaran IG, Murphy TF. Differential Adaptation of Microbial Pathogens to Airways of Patients with Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *FEMS microbiology reviews*. 2011; 35(1):124–46.

Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia Cenocepacia* in Cystic Fibrosis: Epidemiology and Molecular Mechanisms of Virulence. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010; 16(7):821–30.

Duez JM, Hadjait-Savioz M, Siebor E, Astruc K, Bador J et al. In Vitro Synergistic Activity of Combined Piperacillin and Tobramycin Against Clinical Strains of *Achromobacter xylosoxidans*. *Journal of Chemotherapy*. 2010; 22 (2): 139-141

Emerson JMC Nacamara S, BUCCAT AM, WORRELL K, BURNS JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr pulmonol*. 2010; (45):363-70.

Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*. 1999; 7(12), 482–7.

Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL et al. Mucoïdy, Quorum Sensing, Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections. *PloS one*. 2010; 5(9), e12669.

Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesne G, Lenoir G. et al. Use of 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Recovered from Patients Attending a Single Cystic Fibrosis Center. 2002; 40(10):3793–97.

_____; Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesnes G, Lenoir G. et al. Caractéristiques Phénotypiques et Génotypiques Des Souches Atypiques de Bacilles À Gram Négatif Non Fermentants Isolées Chez Des Patients Atteints de Mucoviscidose. *Pathologie Biologie*. 2002; 51(7):405–11.

Firmida MC, Lopes AJ. Aspectos epidemiológicos da Fibrose Cística. *Revista do HUPE*; 2011; 10(4); 12-22.

Firmida MC, Marques BL, Da Costa CH. Fisiopatologia e manifestações clínicas da Fibrose Cística. *Revista do HUPE*; 2011; 10(4); 46-58.

Flume AP, Mogayzeljr PJ, Robinson KA, Goss CH, Rosenblatt RL et al. The Clinical Practice Guidelines for Pulmonary Therapies Committee. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines: Treatment of Pulmonary Exacerbations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009; 180(9):802–8.

Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, et al. The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. *PloS one*. 2012; 7(9):e45001.

Foweraker J. Recent Advances in the Microbiology of Respiratory Tract Infection in Cystic Fibrosis. *British medical bulletin*. 2009; 89:93–110.

Gautier M, Ranque S, Normand A-C, Becker P, Packeu A et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry: Revolutionising Clinical Laboratory Diagnosis of Mould Infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;

Goerke C, Wolz C. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the Cystic Fibrosis Lung. *International journal of medical microbiology*. 2010; 300(8):520–25.

Gomila M, Tvrzova L, Teshim A, Sedláček I, González-Escalona N. et al. *Achromobacter marplatensis* Sp. Nov., Isolated from a Pentachlorophenol-Contaminated Soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2011; 61(9):2231–37.

Hansen RC, Pressler T, Høiby N, Gormsen M. Chronic Infection with *Achromobacter xylosoxidans* in Cystic Fibrosis Patients; a Retrospective Case Control Study. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2006; 5(4):245–51.

_____; Pressler T, Nielsen kg, Jensen pø, Bjarnsholt T, Høiby n. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* Infected Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010; 9(1):51–58.

_____, Pressler T, Ridderberg W, Johansen HK, Skov M. *Achromobacter Species* in Cystic Fibrosis: Cross-Infection Caused by Indirect Patient-to-Patient Contact. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013; 12(6):609–15.

Inouye M, Conway TC, Zobel J, Holt KE. Short Read Sequence Typing (SRST): Multi-Locus Sequence Types from Short Reads. *BMC genomics*. 2012; 13:338, 1-7.

Jakobsen T.H, Hansen MS, Jensen PO, Hansen L, Riber L et al. Complete Genome Sequence of the Cystic Fibrosis Pathogen *Achromobacter xylosoxidans* NH44784-1996 Complies with Important Pathogenic Phenotypes. *PLoS one*. 2013; 8(7):e68484.

Jeukens J, Boyle B, Kukavica-Ibrulj I, Ouellet MM, Aaron SD. et al. Comparative Genomics of Isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic Strain Associated with Chronic Lung Infections of Cystic Fibrosis Patients. *PLoS one*. 2014; 9(2):e87611.

Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG. et al Population Dynamics of Persistent *Staphylococcus aureus* Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis Patients during a 6-Year Prospective Study. 2003; 41(9):4424–27.

Kaur m, Ray P, Bhatti M, Sharma M. Epidemiological Typing of Clinical Isolates of *Achromobacter xylosoxidans*: Comparison of Phenotypic and Genotypic Methods. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2009; 28(9):1023–32.

Krzewinski JAYW, Nguyen CD, Foster JM, Burns JL. Use of Random Amplified Polymorphic DNA PCR To Examine Epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from Patients with Cystic Fibrosis. 2001; 39(10):3597–3602.

Lambiase A, Catania MR, Del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi et al. *Achromobacter xylosoxidans* Respiratory Tract Infection in Cystic Fibrosis Patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2011; 30(8):973–80.

Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50(4):1355–61.

Li X, Hu Y, Gong J, Zhang L, Wang G. Comparative Genome Characterization of *Achromobacter* Members Reveals Potential Genetic Determinants Facilitating the Adaptation to a Pathogenic Lifestyle. 2013; 6413–25.

Lipuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clinical microbiology reviews*. 2010; 23(2):299–323.

Liu L, Coenye T, Burns JL, Whitby PW, Stull TL. et al. Ribosomal DNA-Directed PCR for Identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* Recovered from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. 2002; 40(4):1210–13.

López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Mulet X, Cabot G, Moya M. et al. Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. PloS one. 2013; 8(8):e71001.

Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic Fibrosis: Insight into CFTR Pathophysiology and Pharmacotherapy. Clinical biochemistry. 2012 45(15):1132–44.

Magni A, Trancassini M, Varesi P, Iebba V, Curci A. et al. *Achromobacter xylosoxidans* Genomic Characterization and Correlation of Randomly Amplified Polymorphic DNA Profiles with Relevant Clinical Features [corrected] of Cystic Fibrosis Patients. Journal of clinical microbiology. 2010; 48(4):1035–39.

Mahenthalingam E. Emerging Cystic Fibrosis Pathogens and the Microbiome. Paediatric respiratory reviews. 2014; 15 Suppl 1:13–15.

Marques EA. Perfil microbiológico na fibrose cística. Revista HUPE. 2011; 10(4): 23-35.

Mcguigan L, Callaghan M. The Evolving Dynamics of the Microbial Community in the Cystic Fibrosis Lung. Environmental microbiology. Environmental Microbiology. 2014; 1-13.

Molina A, Del Campo R, Máiz L, Morosini M-I, Lamas A. et al. High Prevalence in Cystic Fibrosis Patients of Multiresistant Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI Capable of Biofilm Formation.” The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2008; 62(5):961–67.

Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, Wright EA, Ledson MJ. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Population Diversity and Turnover in Cystic Fibrosis Chronic Infections. American journal of respiratory and critical care medicine. 2011; 183(12):1674–79.

Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; 27. 89-104.

Papalia M, Almuzara M, Cejas D, Traglia G, Ramírez MS. et al.. OXA-258 from *Achromobacter ruhlandii*: A Species-Specific Marker. Journal of clinical microbiology. 2013; 51(5):1602–5.

Pereira RHV. *Achromobacter* spp na Fibrose Cística: Identificação das espécies, susceptibilidade a antimicrobianos e atributos de virulência [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2013. 128f

Pereira RHV, Carvalho-Assef AP, Albano, RM, Folescu TW, Jones MCF. et al. *Achromobacter xylosoxidans*: Characterization of Strains in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(10):3649–51.

Pompilio A, Ciavardelli D, Crocetta V, Consalvo A, Zappacosta R. et al. *Stenotrophomonas maltophilia* Virulence and Specific Variations in Trace Elements during Acute Lung Infection: Implications in Cystic Fibrosis. *PLoS one*. 2014; 9(2):e88769.

Qin X, Zerr DM, Mcnutt MA, BERRY JE, BURNS JL. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Syntrophy in Chronically Colonized Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012; 56(11):5971–81.

Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC). Relatório Anual de 2011. Disponível em http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro2011_Portugues_site.pdf. Acesso em 11 ago. 2014.

Ribbeck-Busch K, Roder A, Hasse D, De Boer W, Martínez JL. et al. A Molecular Biological Protocol to Distinguish Potentially Human Pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from Plant-Associated *Stenotrophomonas* Rhizophila. *Environmental microbiology*. 2005; 7(11):1853–58.

Ridderberg W, Wang M, Nørskov-Lauritsen N. Multilocus Sequence Analysis of Isolates of *Achromobacter* from Patients with Cystic Fibrosis Reveals Infecting Species Other than *Achromobacter xylosoxidans*. *Journal of clinical microbiology*, 2002; 50(8):2688–94.

Rittenhouse DW, Talbott VA, Anklesaria Z, Brody JR, Witkiewicz AK. et al. Subject Review: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in the Setting of Mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene: Case Report and Review of the Literature. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2011; 15(12):2284–90.

Rosa FR, Dias FG, Nobre LN, Morais HA. Fibrose Cística : Uma Abordagem Clínica E Nutricional Cystic Fibrosis : A Clinical and Nutritional Approach. 2008; 21(6):725–37.

Sanger F, Nicklen V, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase / nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Biochemistry*. 1977; v.74 (12): p. 5463-5467.

Semler DD, Goudie AD, Finlay WH, Dennis JJ. Aerosol Phage Therapy Efficacy in *Burkholderia Cepacia* Complex Respiratory Infections.” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014. 58(7):4005-13

Souza HAPH, De M, Dalla-Costa LM, Vicenzi FJ, De Souza DC, Ried CA. et al. MALDI-TOF: A Useful Tool for Laboratory Identification of Uncommon Glucose Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria Related to Cystic Fibrosis. *Journal of medical microbiology*. 2014. 63(P9):1148-53

- Spiegelman D, Whissell G, Greer CW. A Survey of the Methods for the Characterization of Microbial Consortia and Communities. 2005; 386:355–86.
- Spilker T, Vandamme P, Lipuma JJ. A Multilocus Sequence Typing Scheme Implies Population Structure and Reveals Several Putative Novel *Achromobacter* species. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 50(9):3010–15.
- Spilker T, Vandamme P, lipuma J.J. Identification and Distribution of *Achromobacter* species in Cystic Fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013; 12(3):298–301.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH. et al. Interpreting chromosomal dna restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(9):2233-9.
- Traglia GM, Almuzara M, Merzier AK. Distribution of Allelic Variants of the Chromosomal Gene bla OXA-114-like in *Achromobacter xylosoxidans* Clinical Isolates. *Current Microbiol*. 2013; 67:596–600.
- Trancassini M, Iebba V, Citerà N, Tuccio V, Magni A. et al. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian Cystic Fibrosis Center: Genome Variability, Biofilm Production, Antibiotic Resistance, and Motility in Isolated Strains. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5(April):138.
- Tuggle KL, Birket SE, Cui X, Hong J, Warren J. et al. Characterization of Defects in Ion Transport and Tissue Development in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Knockout Rats. *PloS one*. 2014; 9(3):e91253.
- Tulecke W, Orenski SW, Taggart R.. Isolation of an Organism Resembling *Achromobacter Liquefaciens*. 1965; 89(3):905–6.
- Turton JF, Mustafaa N, Shaha J, Hampton CV, Pike R. et al. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by Detection of the bla_{OXA-114-like} Gene Intrinsic in This Species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 70(3):408–11.
- Vali P, Shahcheraghi F, Seyfipour M, Zamani MA, Allahyar MR. et al. Phenotypic and Genetic Characterization of Carbapenemase and ESBLs Producing Gram-Negative Bacteria (GNB) Isolated from Patients with Cystic Fibrosis (CF) in Tehran Hospitals. *Journal of clinical and diagnostic research*. 2014; 8(1):26–30.
- Van S, Verhelst R, Claeys G, Verschraegen G, Franckx H. et al. Shared Genotypes of *Achromobacter Xylosoxidans* Strains Isolated from Patients at a Cystic Fibrosis Rehabilitation Center. 2005; 43(6):2998–3002.
- Vandamme P, Mooreb ERB, Cnockaerta M, De Brandta E, Svensson-Stadler L. et al. *Achromobacter pulmonis* Sp . Nov . and *Achromobacter spiritinus* Sp . Nov ., from Human Clinical Samples. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013; 36(1):1–10.

- Vidigal PG, Dittmera S, Steinmannb E, Buera J, Rath PM. et al. Adaptation of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis: Molecular Diversity, Mutation Frequency and Antibiotic Resistance. *International journal of medical microbiology*. 2014; 304(5-6): 1-7.
- Voynow JA, Fischer BM, Zheng S. Proteases and Cystic Fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008; 40(6-7):1238–45.
- Wang M, Ridderberg W, Hansen C.R, Høiby N, Jensen-Fangel S. et al. Early Treatment with Inhaled Antibiotics Postpones next Occurrence of *Achromobacter* in Cystic Fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013; 12(6):638–43.
- Waters V, Zlosnik JEA, Yau YCW, Speert DP, Aaron SD. et al. Comparison of Three Typing Methods for *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2012; 31(12):3341–50.
- Weiler C, Drumm ML. Genetic Influences on Cystic Fibrosis Lung Disease Severity. *Frontiers in pharmacology* 2013; 4(April):40.
- Wittmann J, Dreiseikelmann B, Rohde C, Rohde M, Sikorski J. Isolation and Characterization of Numerous Novel Phages Targeting Diverse Strains of the Ubiquitous and Opportunistic Pathogen *Achromobacter xylosoxidans*. 2014; 9(1); e86935.1-13.
- Wolter DJ, Emerson JC, Mcnamara S, Buccat AM, Qin X. et al. *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Independently Associated with Worse Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013; 57(3):384–91.
- Yabuuchi E, Ohyama A. *Achromobacter xylosoxidans* m. sp. from human ear discharge. *Jpn J Microbiol*. 1971; 15:477-81.
- Yabuuchi, E; Yano, I. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Oyama 1974) nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*. 1981; 31. 477-8.
- Yabuuchi E, Kanamura Y, Kosaco Y, Ezaki T. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi e Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Parker and Vishniac) Comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al) comb. nov. *Microbiol Immunol*. 1998; 42. 429-38.
- Yang L, Jelsbak L, Molin S. Microbial Ecology and Adaptation in Cystic Fibrosis Airways. *Environmental microbiology*. 2011; 13(7):1682–89.