



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ludimila Santos da Silva Pentagna

Estudo da hipermutabilidade em espécies do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística

Rio de Janeiro

2020

Ludimila Santos da Silva Pentagna

Estudo da hipermutabilidade em espécies do complexo *Burkholderia cepacia* isolados de pacientes com fibrose cística

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. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

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

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Rio de Janeiro

2020

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

P419 Pentagna, Ludimila Santos da Silva.
Estudo da hipermutabilidade em espécies do complexo *Burkholderia cepacia* isolados de pacientes com fibrose cística / Ludimilia Santos da Silva Pentagna – 2020.
63f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques.
Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão.

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

1. Fibrose cística - Teses. 2. Complexo *Burkholderia cepacia*. 3. Virulência (Microbiologia) - Teses. 4. Mutação (Biologia) - Teses. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Leão, Robson de Souza. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-008.87

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Ludimila Santos da Silva Pentagna

Estudo da hipermutabilidade em espécies do complexo *Burkholderia cepacia* isolados de pacientes com fibrose cística

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. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 25 de agosto de 2020.

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

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Dra. Grasiella Maria Ventura Matioszek

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus por ser a essência da minha existência, aos meus pais Sergio e Marilene, que são meu porto seguro, ao meu marido Ivan e aos meus filhos Kaleb e Stella, os maiores presentes que Deus me enviou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família pelo incentivo, compreensão e força que contribuíram para a conclusão desse trabalho;

Agradeço aos meus orientadores professores Dra Elizabeth de Andrade Marques e professor Dr Robson de Souza Leão, que mesmo sendo profissionais reconhecidamente brilhantes, compartilham seus conhecimentos, desprovidos de qualquer vaidade, motivando seus alunos a serem cada vez melhores e mais capacitados;

Agradeço aos colegas Edgard, Nicoli, Jéssica, Ingrid e Felipe por serem sempre solícitos e companheiros em todos os momentos. Um agradecimento especial a doutoranda Mila pela dedicação, amizade e assistência aos mestrandos do laboratório 2;

Agradeço as técnicas do laboratório 2, Márcia e Elisa, que com muita competência, sabedoria e humildade nos auxiliam no desenvolvimento dos experimentos, nos ajudam a controlar nossas ansiedades e acalmam nossos corações. Vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho;

Agradeço professora Angela, revisora desta dissertação, pelo profissionalismo e pelas observações que contribuíram para a melhora deste trabalho;

Agradeço a todos os professores do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, pelo amor e dedicação que aplicam as disciplinas;

Agradeço à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho;

Agradeço a todos os técnicos da Microbiologia e a secretária Carla pela eficiência e comprometimento com os alunos;

Agradeço aos profissionais do LABACT, em especial à Érica pela contribuição para a realização deste trabalho;

Agradeço a todos os alunos do departamento pelo companheirismo e amizade.

Obrigada a todos!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças à Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

PENTAGNA, Ludimila Santos da Silva. *Estudo da hipermutabilidade em espécies do Complexo Burkholderia cepacia isolados de pacientes com fibrose cística*. 2020. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) é um grupo formado por 24 espécies, a maioria associada a infecção pulmonar crônica em pacientes com fibrose cística (FC), e promovem aceleração do declínio da função pulmonar. O ambiente pulmonar dos pacientes com FC exerce pressão seletiva sobre os patógenos, levando a emergência de características adaptativas a sua persistência. Entre elas, destaca-se a hipermutabilidade (HPM) que se caracteriza pelo aumento na taxa de mutação espontânea e está presente majoritariamente em infecções crônicas. A relação entre o HPM e resistência a antimicrobianos tem sido descrita. Este trabalho objetivou investigar a ocorrência de cepas HPM em espécies do CBc isoladas de pacientes FC com infecção pulmonar crônica. Foram analisadas 147 amostras de CBc isoladas entre janeiro de 2010 à julho de 2018 de 30 pacientes com FC assistidos em dois centros de referência no Rio de Janeiro. A caracterização de amostras HPM foi realizada a partir da determinação da frequência de mutação pelo crescimento em meios sem (população selvagem) e contendo rifampicina (subpopulações). As amostras foram submetidas ao teste de susceptibilidade pela técnica de disco-difusão. Vinte e seis amostras (17,7%) foram classificadas como HPM e observada em 12 (40%) dos pacientes colonizados pelo CBc. A caracterização de amostras HPM dentre as espécies mostrou esse fenótipo em três das sete espécies identificadas: *B. multivorans*, foi a espécie com maior percentual (n=6/18;33,3%), seguida de *B. cenocepacia* (n =17/57;29,8%), independente do genótipo, e *B. vietnamiensis* (3/65;4,61%). Entre as amostras identificadas como *B. cenocepacia* (n=57), o genótipo IIIA apresentou o maior percentual de HPM (12/26; 46,15%), provavelmente por representar a cepa mais virulenta da espécie, com maior potencial de adaptação à ambientes estressantes, como o do pulmão de pacientes com FC. A análise temporal da distribuição das amostras HPM por paciente, mostrou diversos cenários, sendo que a maioria dos pacientes apresentou apenas uma amostra HPM durante o acompanhamento e apenas dois pacientes mostraram todas (P2) ou a maioria (P26) das amostras classificadas como HPM. A presença de cepas HPM e não HPM da mesma espécie (*B. cenocepacia* IIIA) com longos intervalos de tempo entre elas foi observado (P6), sendo uma provável reinfecção pela mesma espécie. O encontro da mesma espécie (*B. cenocepacia* IIIA) com fenótipo HPM e não HPM no mesmo espécime clínico (P13), sugere a possibilidade de coexistência entre a cepa selvagem e a subpopulação a qual deu origem. A comparação do perfil de resistência entre as amostras selvagens e as subpopulações resistentes à rifampicina do CBc, não mostrou diferenças em relação aos antibióticos testados. Embora não tenha sido possível estabelecer essa relação, vale destacar que as mutações podem desempenhar um importante papel na seleção de genes que favorecem as adaptações metabólicas, *quorum sensing*, aderência à superfície do epitélio respiratório e a sobrevivência em ambientes com baixos níveis de oxigênio.

Palavras-chave: Complexo *Burkholderia cepacia*. Hipermutáveis. Antibióticos. Frequência de mutação.

ABSTRACT

PENTAGNA, Ludimila Santos da Silva Pentagna. *Study of hypermutability in species of the Burkholderia cepacia complex isolated from patients with cystic fibrosis*:2020. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The *Burkholderia cepacia* complex (BcC) consist of 24 species, most of all are associated with chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis (CF) and are related to decline of pulmonary function. The lung environment of CF patients exerts selective pressure on pathogens, leading to the emergence of adaptive characteristics for their persistence. Among them, hypermutability (HPM), which is characterized by an increase rate of spontaneous mutation, and is observed mainly in chronic infections. The relationship between the HPM and antibiotic resistance have been described. This study aimed to investigate the occurrence of HPM in BcC species isolated from CF patients with chronic lung infection. We analysed 147 BcC isolates from January 2010 to July 2018 obtained from 30 CF patients assisted in two reference centers in Rio de Janeiro. The HPM characterization was performed using the determination of the mutation frequency by growth in media without (wild population) and containing rifampicin (subpopulations). The isolates were submitted to disk-diffusion test. Twenty-six isolates (17.7%) were classified as HPM, and they were observed in 12 (40%) patients colonized by BcC. The HPM characterization among the BcC species showed this phenotype was detected in three of the seven species identified: *B. multivorans* was the species with the highest percentage (n = 6/18; 33; 3%), followed by *B. cenocepacia* (n=17/57; 29.8%), regardless of genomovar, and *B. vietnamiensis* (3/65; 4.61%). Among *B. cenocepacia* (n = 57), the genomovar IIIA showed the highest HPM rates (12/26; 46.15%), probably it represents the most virulent strain of the species, with the greatest potential for adaptation to stressful environments, such as the lung of CF patients. The temporal analysis of HPM distribution per patient, showed several scenarios. The majority of patients showed only one HPM isolate during the follow-up, and only two patients showing all (P2) or most of all (P26) isolates classified as HPM. The presence of HPM and non-HPM strains of the same species (*B. cenocepacia* IIIA) with long intervals of time, was observed (P6), indicating a probable re-infection by the same species. The detection of the same species (*B. cenocepacia* IIIA) HPM and non-HPM phenotype in the same clinical specimen (P13), suggests the possibility of coexistence between the wild strain and the subpopulation. None difference was observed in the antibiotic resistance profile between wild isolates and rifampin-resistant subpopulations. Although, here, this relation could not be established, it is important highlighting that mutations may play an important role in the selection of genes that can work as an advantage metabolic adaptations, quorum-sensing, adherence to the surface of the respiratory epithelium and the survival of subpopulations in environments with low oxygen levels.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complex. Hypermutable. Antibiotics. Mutation frequency

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Classes de mutação do gene <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>	17
Figura 2 –	Lesão Pulmonar na Fibrose Cística.....	18
Figura 3 –	Sistema de reparo <i>Mismatch Repair System</i>	25
Figura 4 –	Sistema de reparo 8-oxoguanina.....	26
Figura 5 –	Amostra do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> 10677	36
Figura 6 –	Amostra do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> 18645.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Dados do registro Americano de Fibrose Cística da prevalência dos micro-organismos por idade	19
Gráfico 2 –	Dados do Registro brasileiro de Fibrose Cística da prevalência de micro-organismos por idade	19
Gráfico 3 –	Comparação do percentual de resistência das amostras hipermutáveis e não hipermutáveis	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Espécies do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> e o ambiente onde foram descritas	20
Quadro 2 –	Fatores de virulência do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> envolvidos na interação com os fagócitos do hospedeiro.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição das 147 amostras do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> por pacientes.....	34
Tabela 2 –	Frequências de mutação das 147 amostras do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> de pacientes com Fibrose Cística	37
Tabela 3 -	Distribuição de amostras hipermutáveis por espécies do complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	43
Tabela 4 –	Variação da frequência de mutação espontânea nas espécies do complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	43
Tabela 5 -	Perfil de resistência das amostras resistentes à rifampicina	46
Tabela 6 -	Comparação do perfil de resistência das populações selvagens e das subpopulações resistentes à rifampicina.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGNNF	Bacilo Gram Negativo Não Fermentador da Glicose
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CAB	<i>Columbia Agar Base</i>
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EH	Equipamento hospitalar
FC	Fibrose cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
HPM	Hipermutável
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IN	Infecção nosocomial
LBA	Lavado broncoalveolar
LABACT	Laboratório de Bacteriologia
LPS	Lipopolissacarídeo
LPSN	<i>List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature</i>
MEM	Meropenem
MHA	<i>Müller Hinton Agar</i>
MHB	<i>Müller Hinton Broth</i>
MI	Minociclina
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
NR	Não relatado
PAO1	<i>Pseudomona aeruginosa</i> sorotipo O1
PMN	Polimorfonucleares

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PPC	Policlínica Piquet Carneiro
REBRAFC	Registro brasileiro de fibrose cística
Sod B	Superóxido desmutase B
Sod C	Superóxido desmutase C
RE	Retículo endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAm	<i>Ribonucleic acid messenger</i>
SUT	Sulfametoxazol/trimetoprim
TDD	Teste de disco-difusão
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TTC	Trifenil tetrazólico
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidade formadora de colônias
Zmp A	Zincometaloprotease A
Zmp B	Zincometaloprotease B

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
°C	Graus Celsius
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μg	Micrograma
rpm	Rotações por minuto
=	Igual
h	Hora
<i>fr</i>	Frequência de mutação espontânea

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	28
1.1	Geral	28
1.2	Específicos	28
2	METODOLOGIA	29
2.1	Seleção da Amostragem	29
2.2	Verificação da viabilidade e pureza das amostras	29
2.3	Determinação da frequência de mutação	30
2.3.1	<u>Padronização do teste</u>	30
2.3.2	<u>Frequência de Mutação</u>	30
2.4	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)	32
2.4.1	<u>Teste de disco-difusão</u>	32
3	RESULTADOS	33
3.1	<u>Amostras</u>	33
3.2	<u>Análise da frequência de mutação das amostras HPM</u>	36
3.3	<u>Análise do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos</u>	44
3.4	<u>Análise da distribuição das amostras HPM por pacientes</u>	45
3.5	<u>Análise do perfil de resistência entre a população selvagem e a população resistente à rifampicina</u>	48
4	DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO - Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.....	63

INTRODUÇÃO

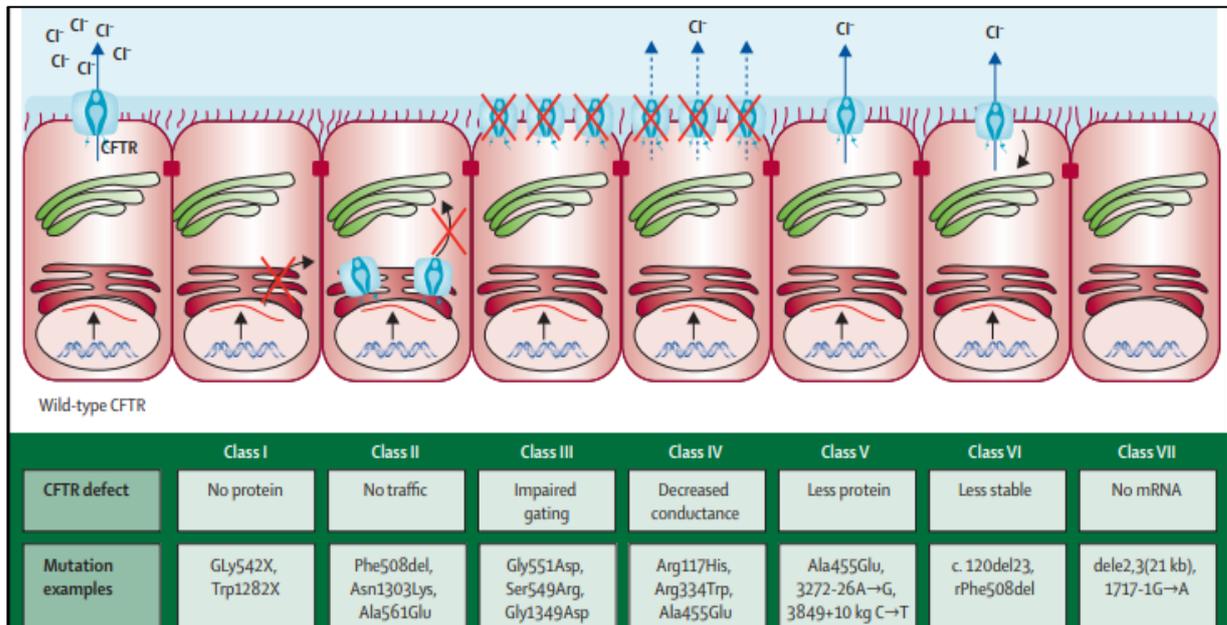
A fibrose cística (FC) é uma doença genética, hereditária de caráter autossômico recessivo, que afeta principalmente a população caucasiana. Ocorre devido a mutações no gene *CFTR* (regulador da condutância transmembrana da fibrose cística), que codifica a proteína de canal iônico CFTR. A proteína CFTR tem a função de transportar os íons cloretos e outros ânions para superfície das células apicais, promovendo o equilíbrio de íons e água (ELBORN, 2016; GOETZ; REN, 2019; MALL; GALLIETA, 2015). A perda total ou parcial da função da proteína reduz a secreção de água para superfície celular, resultando na formação de muco grosso e viscoso, que causa danos nas funções dos sistemas respiratório, digestório e reprodutivo (DAYAMA et al, 2020).

Atualmente, são descritas 2091 mutações neste gene (<http://www.genet.sickkids.on.ca>), porém aproximadamente 15% das variantes genéticas não têm relação com o desenvolvimento da doença. As mutações podem ser classificadas em sete classes, de acordo com a disfunção do receptor CFTR (Figura 1). Todas elas causam prejuízo na secreção de bicarbonato e íons cloreto para superfície das células epiteliais (DE BOECK; AMARAL, 2016).

As mutações de classe I são mutações, em sua maioria, do tipo *nonsense*, na qual ocorre prejuízo na produção da proteína CFTR, devido ao surgimento de códon de parada prematuro, que leva a degradação do RNA mensageiro (RNAm); nas mutações de classe II ocorre a deleção de três pares de bases acarretando na ausência do aminoácido fenilalanina ($\Delta F508$), que afeta o tráfego da proteína, devido ao seu desdobramento (não permite que a proteína seja dobrada em sua forma adequada) ficando retida no retículo endoplasmático (RE) pelo mecanismo de controle, que promove a degradação da proteína prematura, impedindo-a de alcançar a superfície das células epiteliais; nas mutações de classe III a proteína chega à superfície celular, porém o tempo de abertura do canal é insuficiente ou raramente aberto; nas mutações de classe IV, a proteína alcança a superfície da célula, mas há uma redução na condutância dos íons cloro e bicarbonato, levando ao funcionamento inadequado do canal, mesmo estando aberto; mutações de classe V ocorre uma redução de proteínas CFTR funcionais na superfície celular, por cauda de *splicing* alternativo, com consequente formação de RNAm normal e anômalo; na mutação de classe VI ocorre instabilidade da proteína CFTR na superfície celular, devido ao aumento da endocitose da proteína ou pela redução de sua reciclagem de retorno a superfície da célula, levando a uma quantidade limitada de CFTR e as mutação de classe VII são conhecidas como mutações irrecuperáveis, uma vez que não podem ter sua funcionalidade

restabelecida farmacologicamente, devido ao grande número de deleções (DE BOECK; AMARAL; 2016; ELBORN, 2016).

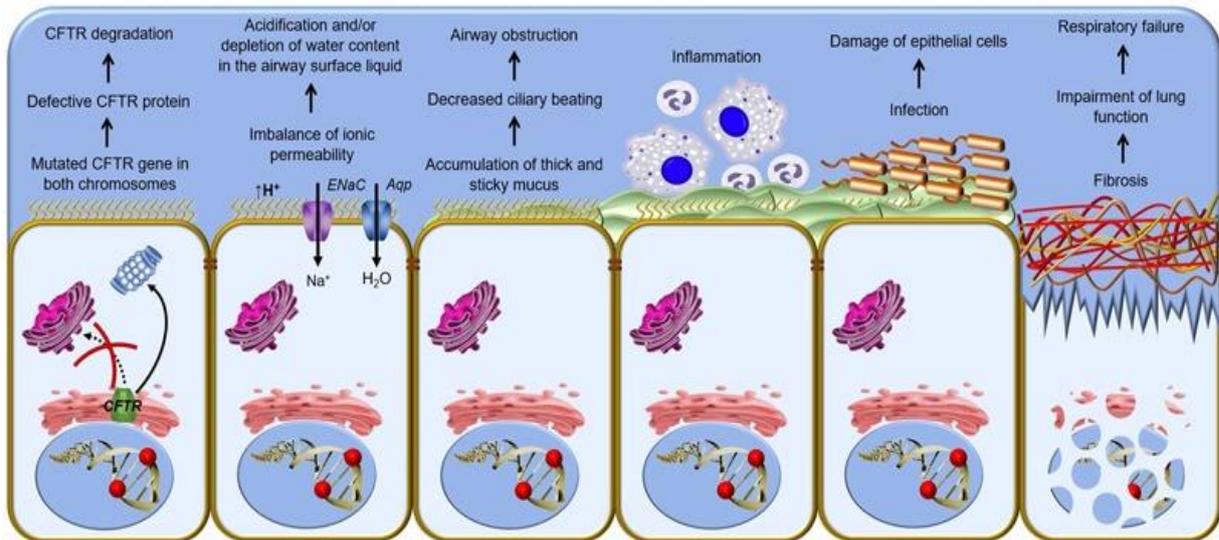
Figura 1- Classes de mutações do gene regulador da transmembrana da fibrose cística



Fonte: Adaptada de DE BOECK; AMARAL, 2016

Embora a FC seja uma doença multissistêmica, as afecções pulmonares são as que contribuem para a maior morbimortalidade dos pacientes. Nos pulmões há um aumento da viscosidade e da espessura do muco, devido ao prejuízo na secreção de cloro e bicarbonato, além do aumento da absorção de sódio, através do canal de sódio presente no epitélio. A retenção do muco nas vias aéreas prejudica a atividade das células ciliadas, impossibilitando-as de promover a expulsão de micro-organismos, tornando o ambiente favorável ao surgimento de infecções, principalmente por patógenos oportunistas, que na maioria das vezes colonizam os pacientes (Figura 2). A colonização pode ser por um ou mais patógenos e tem como consequência exacerbações respiratórias agudas e intensa inflamação com perda progressiva da função pulmonar (DAVIS; ALTON; BUSH, 2007; GOETZ; REN, 2019).

Figura 2 - Lesão pulmonar na Fibrose Cística



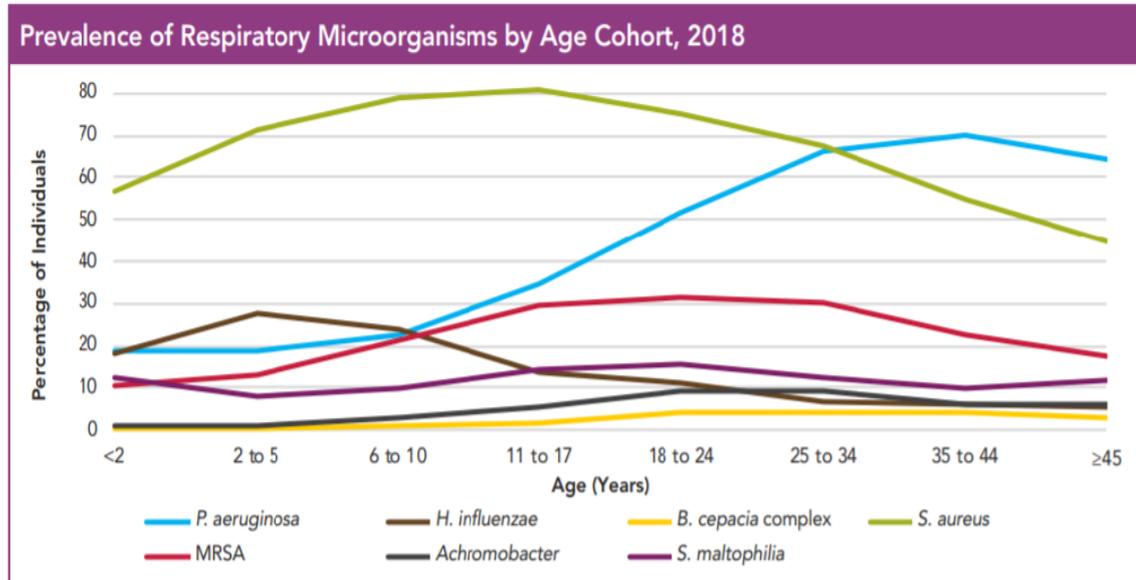
Legenda: Cascata fisiopatológica do distúrbio respiratório na FC – O mecanismo celular da FC inicia com defeitos no gene CFTR e escassez da proteína CFTR na membrana plasmática. Um ciclo vicioso de obstrução das vias aéreas, inflamação e infecção causam danos epiteliais, remodelação pulmonar e doença pulmonar em estágio terminal. ENaC – canal epitelial de sódio; Aqp – aquaporina (tradução nossa).

Fonte: Lopes-Pacheco, 2016

Perfil microbiológico da FC

As bactérias que colonizam os indivíduos com FC, obedecem a uma ordem cronológica para seu surgimento e na maioria das vezes a infecção crônica é estabelecida durante a infância. Os micro-organismos que colonizam crianças com maior frequência são: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Posteriormente, surgem os patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria de difícil erradicação, majoritária na colonização), e bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) (Gráfico1). Outros micro-organismos que emergiram são: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, micobactérias não-tuberculosas, espécies dos gêneros *Ralstonia*, *Cupriavidus* e *Pandora*. Além de vírus como o vírus respiratório sincicial (RSV), adenovírus e influenza, e fungos como as espécies de *Aspergillus* e *Candida*, entre outros (GOETZ; REN, 2019; LUTZ et al., 2011).

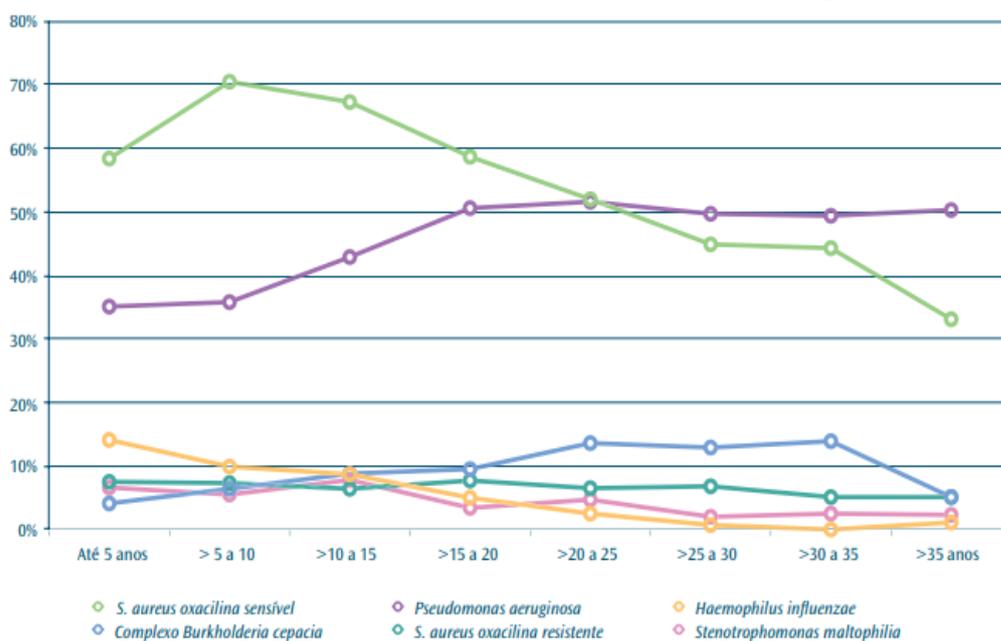
Gráfico 1- Dados do Registro Americano de Fibrose Cística da prevalência dos micro-organismos em relação a idade



Fonte: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2018

No gráfico abaixo, está representada distribuição dos micro-organismo por idade, de acordo com Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC). Comparando os dados com o gráfico Americano de Fibrose Cística (Gráfico 1) observamos uma semelhança na prevalência dos micro-organismos de acordo com a idade do paciente.

Gráfico 2 – Dados do Registro Brasileiro de Fibrose Cística da prevalência dos micro-organismo de acordo com a idade do paciente



Fonte: http://portalgbfec.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC_2017.pdf.

O Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) é um subgrupo do gênero *Burkholderia*, formado por bacilos gram-negativos, não fermentadoras de lactose e ubiqüitários no ambiente. São patógenos oportunistas que causam infecção respiratória crônica em pacientes com FC, resultando no declínio da função pulmonar, com frequentes exacerbações e aumento da mortalidade. (El CHAKHTOURA et al., 2017; NARAYANASWAMY et al., 2019; VANDAMME et al., 1997).

O CBc é constituído de 24 espécies conhecidas, fenotipicamente indistinguíveis, com alta similaridade genética, motivo pelo qual foram, anteriormente, classificadas em genomovares, por convenção taxonômica. A espécie *Burkholderia cenocepacia* é ainda classificada em quatro *clusteres* filogenéticos (IIIA-IIID), no entanto a maioria dos isolados clínicos pertencem aos subgrupos IIIA e IIIB (LIPUMA et al., 2010; ROJAS-ROJAS et al., 2018; SCOFFONE et al., 2017;). A identificação em espécie é realizada de forma precisa através sequenciamento do gene *recA* (RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019; MARTINA et al., 2019). A maioria das espécies de CBc possui genoma extenso, com até 9Mpb, divididos em 2-5 replicons. Esses aspectos favorecem a plasticidade do genoma, permitindo que esses micro-organismos habitem em vários ambientes. No quadro1estão relacionadas as espécies e os ambientes onde geralmente foram descritas (ROJAS-ROJAS et al., 2018).

Quadro 1- Espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* e o ambiente onde foram descritas

(continua)

Espécie	Genomovar	Ambiente Natural	Ambiente Clínico
<i>B. alpina</i>		Solo	NR
<i>B. ambifaria</i>	VII	Rizosfera, solo	FC
<i>B. anthina</i>	VIII	Rizosfera	FC, AH
<i>B. arboris</i>		Rizosfera, solo e água	FC, IN
<i>B. catarinensis</i>		Solo	NR
<i>B. cenocepacia</i>	III	Rizosfera, plantas, solo, água, animais	FC, IN
<i>B. cepacia</i>	I	Rizosfera, solo, água, cebola em decomposição	FC, IN
<i>B. contaminans</i>		Animal	FC, IN
<i>B. diffusa</i>		Solo, ambiente	FC, IN, EH
<i>B. dolosa</i>	VI	Solo, nódulo de a. Glumaceus	FC NR
<i>B. lata</i>		Solo, água, flores	FC, IN
<i>B. latens</i>		NR	FC
<i>B. metallica</i>		NR	FC
<i>B. multivorans</i>	II	Solo	FC, IN, EH
<i>B. paludis</i>		Solo de pântano	NR

Quadro1- Espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* e o ambiente onde foram descritas
(conclusão)

<i>B. puraquae</i>		Solo	H
<i>B. pseudomultivorans</i>		Rizosfera	FC, IN
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	Rizosfera, solo, sedimento	FC
<i>B. seminalis</i>		Semente de arroz, cana de açúcar	FC, IN
<i>B. stabilis</i>	IV		FC, IN, EH
<i>B. stagnalis</i>		Solo	FC, IN
<i>B. territorii</i>		Água	NR
<i>B. ubonensis</i>		Solo	IN
<i>B. vietnamiensis</i>	V	Rizosfera, plantas, solo, água, animais	FC

Legenda: NR - não relatada, FC - fibrose cística, EH - equipamento hospitalar, IN - infecção nosocomial, AH- ambiente hospitalar. Fonte: Adaptado de Rojas-Rojas et al., 2018; *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN)

O conhecimento sobre os mecanismos de virulência de espécies do CBc ainda é limitado, uma vez que a grande heterogeneidade entre as espécies e a produção de diferentes fatores de virulência contribuem de maneira distinta no resultado clínico observado em pacientes com FC. O quadro 2 relaciona alguns fatores de virulência expressos por espécies do CBc e a sua ação sobre fagócitos do hospedeiro.

Quadro 2 - Fatores de virulência do Complexo *Burkholderia cepacia* envolvidos na interação com os fagócitos do hospedeiro (Continua)

Fatores de virulência	Ação	Referências
Morte oxidativa		
Catalase (KatA, KatB e Ka G)	Catalisa peróxido de hidrogênio em água e oxigênio	Lefebvre et al. (2005); Charalabous et al. (2007)

Quadro 2 - Fatores de virulência do Complexo *Burkholderia cepacia* envolvidos na interação com fagócitos do hospedeiro (conclusão)

Superóxido dismutase (SodB e SodC)	Degradação catalítica de superóxido em peróxido de hidrogênio	Keith and Valvano (2007)
Pigmento melanina- <i>like</i>	Pigmento de ação protetiva contra o stresse oxidativo	Keith et al. (2007)
Exopolissacarídeo cepaciano	Redução das espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição da quimiotaxia dos polimorfonucleares (PMN)	Bylund et al. (2006)
Morte não oxidativa		
Zinco metaloproteases (ZmpA e ZmpB)	Degradação proteolítica de moléculas com ação antimicrobiana	Kooi et al. (2006); kooi e Sokol 2009)
Lipopolissacarídeo	Promove resistência à polimixina B e paptídeos do hospedeiro, com ação antimicrobiana.	Loutet et al. (2006)
RpoE (σ^E)	Fator sigma alternativo que regula os genes que conferem resistência à polimixina B, e facilita a resistência a fatores do hospedeiro que promovem a morte não oxidativa	Loutet et al. (2011)
Sobrevivência Intracelular		
RpoN (σ^N)	Fator sigma alternativo que regula o gene que promove o atraso da fusão do fagolissossomo nos macrófagos, tradicionalmente envolvido na regulação de genes em condições ambientais limitada de nitrogênio.	Saldias et al. (2008)
RpoE (σ^E)	Fator sigma alternativo , envolvido na regulação de gene que promovem o atraso da fusão do fagolissossomo em macrófagos, tradicionalmente envolvido na regulação de gene em resposta ao estresse extracitoplasmático/e estresse ao calor	Flannagan e Valvano (2008)
Sistema de secreção Tipo IV	Necessário para sobrevivência intracelular em macrófagos, pode desempenhar um papel no processo endocítico normal.	Sajjan et al. (2008)
Sistema de secreção Tipo VI	Envolvido no rearranjo da actina em macrófagos	Aubert et al. (2008)

Fonte: Porter e Goldeberg, 2011. Tradução nossa.

Burkholderia cenocepacia é a espécie do CBc de maior relevância, uma vez que está associada a casos mais graves por ser o principal agente causador da síndrome cepacia, caracterizada por pneumonia necrotizante e septicemia, frequentemente fatal. Além disso, a espécie está associada a maior transmissão inter-pacientes (SCOFFONE et al., 2017; SOUSA et al., 2017). A linhagem de *B. cenocepacia* ET 12, genomovar IIIA, é conhecida como a mais virulenta, com alta transmissibilidade, multidroga resistente, que causou infecções devastadoras no Canadá e Europa (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010). O tratamento das exacerbações pulmonares causadas pelo CBc, tem sido um desafio, principalmente pelo fato dessas espécies apresentarem resistência intrínseca a maioria dos antibióticos utilizados, que associado a propensão do desenvolvimento de biofilme, reduzem o *clearance* imunológico e aumenta a persistência desses micro-organismos, resultando numa severa infecção pulmonar crônica com rápido declínio da função deste órgão (NARAYANASWAMY et al., 2019). Além disso, o ambiente das vias aéreas dos pacientes com FC, exerce pressão seletiva sobre os patógenos devido ações do sistema imunológico, da antibioticoterapia e limitação de oxigênio. Esses fatores contribuem para o aumento da taxa de mutações, favorecendo o surgimento de amostras hipermutáveis (SOUSA et al., 2017).

Bactérias hipermutáveis, são assim definidas, por apresentarem aumento na taxa de mutação e estão presentes em processos de infecções crônicas, sendo bem documentada na espécie de *P. aeruginosa* envolvidas na colonização das vias aéreas de pacientes com FC. O sistema de reparo de DNA de bases mal pareadas (*Mismatch repair*-MMR), é considerado o principal sistema envolvido no surgimento desse fenótipo (JOLIVET-GOUGEON et al., 2011; OLIVER et al., 2001; OLIVER; MENA, 2010;). O aumento das mutações espontâneas resulta de defeitos nos sistemas de reparo de DNA (OLIVER; MENA, 2010; MARTINA et al., 2014).

Sistema de reparo de DNA

A preservação da informação genética, em organismos vivos é fundamental para a perpetuação das espécies. Para que não ocorram erros durante a replicação, um sistema robusto de reparo e prevenção de erros protege fielmente o DNA. No entanto, a mutagênese desempenha um papel importante para manutenção e evolução através do aumento da taxa de mutação (CHATTERJEE; WALKER, 2017; DENAMUR; MATIC, 2006;). O fenômeno de hipermutabilidade está relacionado a defeitos nos genes que compõem o sistema de reparo e prevenção de erros do DNA (OLIVER; MENA, 2010), o acúmulo de mutações pode provocar efeitos deletérios que comprometem o desempenho das células bacterianas ou podem melhorar

a capacidade de adaptação durante as alterações ambientais. (DENAMUR; MATIC, 2006; TADDEI et al., 1997).

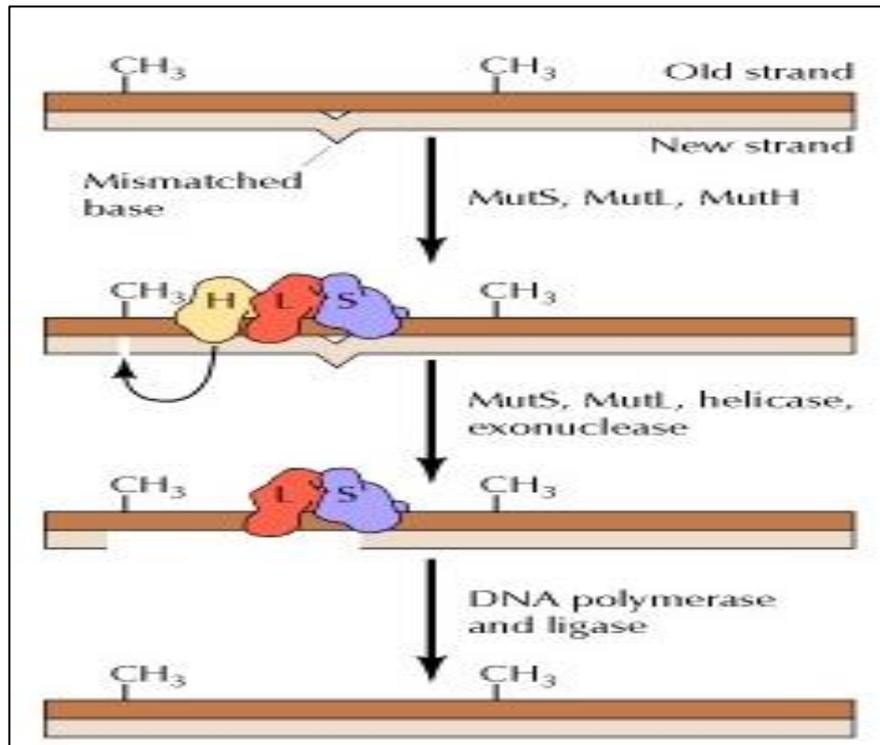
Sistema de reparo de bases mal pareadas (MMR)

O sistema de reparo de bases mal pareadas MMR atua reparando nucleotídeos que tenham sido introduzidos, de forma errada, durante a replicação do DNA (JOLIVET-GOUGEON et al., 2011)

O sistema MMR controla a fidelidade da replicação, além de estar envolvido na manutenção estrutural do cromossomo e evita a recombinação por transferência horizontal (DENAMUR; MATIC, 2006). O grupo de genes que fazem parte desse sistema são *mutS*, *mutL*, *mutH*, *UrvD* ou *mutU*. A inativação de algum desses genes pode levar ao aumento da taxa de mutação (OLIVER; MENA, 2010).

A proteína MutS reconhece e se liga à base mal pareada, a proteína Mut L se liga a MutS e ativa a endonuclease MutH, que cliva a fita não metilada na sequência GATC. A helicase II (UrvD) desenrola a dupla fita permitindo que a excisão ocorra tanto na direção 5` ou 3` (OLIVER; MENA, 2010). (Figura 3)

Figura 3 - Sistema de reparo *Mismatch Repair*



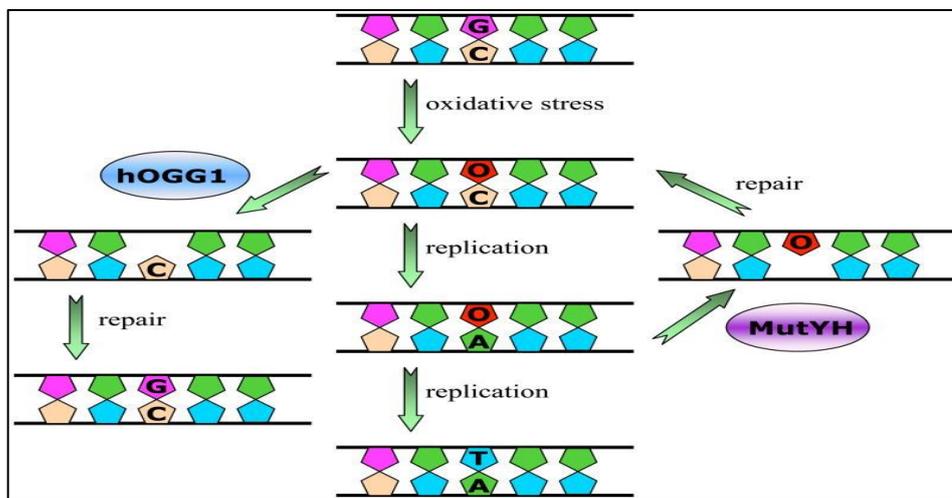
Legenda: O sistema de reparo detecta e extrai bases mal pareadas no DNA replicado recentemente que se distingue da fita parental por não ter sido metilada. O MutS liga-se a base mal pareada, seguida pela MutL. A ligação do MutL ativa o MutH que cliva o sítio de metilação na fita oposta não modificada. O MutS e o MutL juntamente com um helicase e uma exonuclease fazem uma excisão na porção da fita não modificada que contém a base mal pareada. A lacuna é então preenchida DNA polimerase e selada pela DNA ligase (tradução nossa).

Fonte: THE CELL.

Os genes *mutM*, *mutY* e *mutT* estão relacionados a manutenção de genes que sofreram danos oxidativos a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (OLIVER; MENA 2010).

Defeitos no sistema de reparo que previnem as lesões oxidativas pelo 8-oxo-2'-de-oxiguanosina (8-oxodG ou sistema GO), formado pelos genes *mutM*, *mutT* e *mutY*, também podem levar ao surgimento de cepas HPM. Ciofu et al. (2005), mensuraram o nível de 8-oxodG em isolados HPM de *P. aeruginosa* que colonizavam os pulmões de pacientes com FC, e observaram um nível alto deste metabólito (Figura 4).

Figura 4 - Sistema de reparo 8-oxoguanina



Legenda: Reparo de base por excisão da 8-oxoguanina. A presença da 8-oxoguanina causa a transição G:C para T:A como ilustrado no painel central. A BER glicolase humana hOGG1 e MutYH remove os pares de base OG e A de OG:C e OG:A, respectivamente. As enzimas correspondentes em bactérias são MutM/Fpg e MutY. MutT e MutTH1 não são mostradas, mas têm um papel importante na prevenção da incorporação de OG pela hidrólise de (OGTP) (tradução nossa).

Fonte: DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007).

Hipermutabilidade na FC

O aumento na taxa de mutação tem sido associado ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos, principalmente durante as infecções crônicas (MARTINA et al., 2014; OLIVER; MENA, 2010;) e estão também relacionados a adaptação dos micro-organismos aos baixos níveis de oxigênio, aquisição de ferro, adaptação ao biofilme e aderência a superfície do trato respiratório (SOUSA et al., 2017). O interesse sobre o papel de cepas HPM na FC, levou ao surgimento de vários estudos, principalmente com *Pseudomonas aeruginosa*. Oliver et al. (2000) determinaram a taxa de mutação espontânea em 128 isolados de *P. aeruginosa* de 30 pacientes com FC e observaram que 36% dos pacientes eram colonizados por cepas HPM por anos. Além disso, foi observado uma relação entre alta taxa de mutação e evolução da resistência aos antibióticos. No Brasil, um estudo conduzido em três centros de referência, analisaram 179 amostras de *P. aeruginosa* associadas a infecções crônicas em pacientes com

FC, e observaram que 24% das amostras eram HPM e suas subpopulações apresentaram maiores taxas de resistência aos antimicrobianos (LUTZ et al; 2013).

O interesse em estudos de cepas HPM, se estendeu para patógenos mais recentemente descritos em FC. A prevalência de isolados HPM em *Achromobacter* spp. foi avaliada em 90 culturas de 42 pacientes (20 pacientes com infecção crônica e 22 com infecção intermitente) com FC, atendidos em Aarhus, na Dinamarca. Cepas HPM foram observadas apenas nos pacientes com infecção crônica (n=11;55%). (RIDDERBEG; HANDBERG; NØRSKOV-LAURISTEN, 2020)

Estudos da hipermutabilidade em cepas de CBc e seu impacto no aumento da resistência aos antibióticos são raros. Pope et al. (2010) determinaram a taxa de mutação em amostras de *B. cenocepacia* (n=6) e *B. multivorans* (n=2), porém não detectaram cepas HPM. Martina et al. (2014) analisaram 125 amostras de CBc, obtidas de pacientes com e sem FC, além de amostras ambientais e observaram que 13,6% eram HPM, sendo que a maioria (76,5%) estava relacionada a mutações nos genes *mutS* e/ou *mutL*. A maior ocorrência (40,7%) foi detectada nas amostras de pacientes com FC infectados cronicamente. A associação entre hipermutabilidade e resistência aos antimicrobianos foi avaliada, através da concentração inibitória mínima (CIM) com dezessete antibióticos, mas só foi observada em um deles.

As infecções pulmonares pelo CBc estão entre um dos maiores desafios no manejo dos pacientes com FC, resultando em altas taxas de mortalidade. A persistência das infecções é facilitada pela alta resistência aos antimicrobianos e pelo surgimento de mecanismos adaptativos em resposta às condições de estresse do ambiente pulmonar, como antibioticoterapia, redução da disponibilidade de nutrientes e limitação de oxigênio.

Cepas HPM tendem a apresentar modificações em genes que desempenham papel importante na colonização, invasão e sobrevivência destes micro-organismos no hospedeiro, como os genes envolvidos na formação de biofilme e na resistência a antimicrobianos, portanto é necessário que se amplie os estudos da prevalência de isolados HPM em espécies do CBc.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de cepas hipermutáveis em espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* associadas à infecção pulmonar crônica em pacientes com Fibrose Cística provenientes de dois centros de referência da cidade do Rio de Janeiro.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a frequência de mutação em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia*;
- b) Caracterizar dentre as espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* o fenótipo hipermutável;
- c) Analisar temporalmente a distribuição das amostras HPM por paciente;
- d) Analisar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos através de técnica qualitativa nas cepas selvagens e nas subpopulações resistentes à rifampicina.

2 METODOLOGIA

2.1 Seleção da amostragem

No período de janeiro de 2010 à julho de 2018, foram selecionadas 147 amostras de Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), obtidas de 30 pacientes, pediátricos (n=18) e adultos (n=12), com fibrose cística (FC), acompanhados em dois centros de referência na cidade do Rio de Janeiro: Policlínica Piquet Carneiro (PPC), Ambulatório de Fibrose Cística sob a coordenação do Departamento de Doenças do Tórax da Disciplina de Pneumologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram incluídas amostras oriundas de diferentes espécimes clínicos obtidos de pacientes com FC que apresentaram infecção pulmonar crônica, considerando pelo menos três culturas positivas para CBc dentro do período de seis meses (MARTINA et al, 2014 apud NØRSKOV-LAURISTEN et al., 2010).

As amostras foram inicialmente processadas e identificadas como CBc no Laboratório de Bacteriologia (LABACT) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), de acordo com protocolos microbiológicos específicos para FC (ITA-BAC-010/2015 FC/LABACT/HUPE) e encaminhadas para o Laboratório 2 da Disciplina de Microbiologia e Imunologia. As espécies do CBc tiveram sua identificação confirmada através da técnica de espectrometria de massa por tempo de voo e sequenciamento do gene *recA* e foram estocadas a -70°C em meio *Skim Milk* (DIFCO, Hants, Inglaterra), acrescido de 20% de glicerol para posterior análise (VIANNA, 2017).

2.2 Verificação da viabilidade e pureza das amostras

Uma alíquota da amostra em estoque, foi semeada em tubo contendo Caldo Infuso de Cérebro e Coração - *Brain Heart Infusion Broth* – BHI (Becton Dickinson/BD®, Heidelberg, Alemanha), incubada sob agitação por 20 a 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose. Aquelas que não obtiveram crescimento foram mantidas em estufa por mais 24 horas. Dessas as que não

obtiveram crescimento foram semeadas em meio líquido *Luria Bertani*(LB) (Becton Dickinson/BD®, Heidelberg, Alemanha), sob agitação por 20 a 24 horas a 35 ±2°C, em aerobiose. A partir da cultura em meio líquido, alíquotas foram semeadas por esgotamento em ágar *Cystine Lactose Electrolyte Deficient* – CLED (BD®) e incubadas por 48 a 72 horas a 35 ±2°C a fim de serem observadas a viabilidade e pureza das amostras.

Em seguida, as colônias isoladas de cada amostra foram semeadas em Columbia Agar Base - CAB (BD®, Heidelberg, Alemanha), incubadas por 24 a 48 horas a 35 ±2°C, em aerobiose, para realização das seguintes provas fenotípicas: motilidade (Motility, BD®) acrescido de 1% da solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) (INLAB, São Paulo, Brasil); meio de oxidação/fermentação (OF) acrescido de glicose a 1% (BD®, Heidelberg, Alemanha); descarboxilação da lisina e ornitina (BD®, Heidelberg, Alemanha); desaminação da arginina (BD®) e citocromo-oxidase (NEWPROV®, Paraná, Brasil) (LIPUMA et al., 2015).

2.3 Determinação da frequência de mutação

2.3.1 Padronização do teste

O procedimento usado para avaliar a frequência de mutação espontânea (*fr*) foi adaptado a partir de protocolos descritos previamente por Oliver (2000) e Martina (2014). Os parâmetros seguidos por Oliver (2000), estabeleceu o inóculo de uma colônia bacteriana em 20 mL de caldo Müller-Hinton (MHB) que foi incubada a 37°C, *overnight*. Posteriormente as células bacterianas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e os *pallets* foram ressuspensos em 1mL de MHB. Uma alíquota de 100 µL da suspensão e das sucessivas diluições foram plaqueadas em ágar Müller-Hinton (MHA) sem e com rifampicina (300 µg/mL) ou estreptomicina (500 µg/mL). Após 36 horas (h) de incubação, as colônias foram contadas e a *fr* determinada. Foram consideradas HPM as amostras que obtiveram *fr* 20 vezes maior que a frequência de mutação da *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Nos parâmetros seguidos por Martina et al. (2014) uma colônia foi cultivada em 3mL de meio LB e incubada por 12h à temperatura de 37°C. Posteriormente, foram plaqueadas 100 µL das diluições seriadas, em placas com meio LB suplementado com 300 µg/mL de rifampicina e em placas de

LB sem antibiótico. As colônias foram contadas após 24h de incubação nas placas LB sem rifampicina e, após 36h nas placas de LB com rifampicina. Nesta metodologia a taxa de mutação foi determinada através de ensaio de flutuação. As amostras foram classificadas como HPM ou não HPM.

Para padronizar a determinação da frequência de mutação, neste trabalho, inicialmente foram realizados ensaios com um pequeno número de amostras com objetivo de padronizar parâmetros como tempo de incubação e leitura, quantidade de células bacterianas a serem semeadas, volume ideal do meio de cultura para crescimento bacteriano e tempo de crescimento das colônias em placa, para quantificação.

Os tempos de incubação para avaliação do inoculo inicial avaliados para crescimento em meio líquido foram: 12h, 24h e 48h; os volumes do meio testados foram: 10mL, 5mL e 3mL; o tempo de incubação das amostras após serem semeadas em placas para quantificação das colônias foram: 24h, 36h e 48h. O número de células bacterianas foi selecionado entre 10^3 a 10^4 UFC, semelhante ao estabelecido em protocolo prévio (MARTINA et al, 2014).

O protocolo foi estabelecido após a realização de três experimentos, com cinco amostras de CBc, além da *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Os parâmetros foram estabelecidos da seguinte forma: tempo de crescimento em caldo=24h; volume do meio LB= 3mL; inóculo inicial de células bacterianas = 1 a 2 colônias (1 colônia grande ou 2 colônias pequenas) tempo de incubação das placas = 48h. As amostras foram classificadas conforme em HPM e não HPM.

2.3.2 Frequência de mutação

Uma a duas colônias de cada espécie do CBc foi semeada em 3mL de caldo Luria Bertani (LB) (KASVI, Paraná, Brasil) em tubo cônico e foi incubado por 24h, a 37^0 C, sob agitação. Após esse período as amostras foram centrifugadas à 3500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 1mL de caldo LB. Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas em caldo LB, na base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}).

Uma alíquota de 100 μ L da suspensão bacteriana sem diluição e, alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , foram semeadas em placas de LB contendo 300 μ g/mL de rifampicina (Sigma) e 100 μ L das demais diluições foram semeadas nas placas de LB sem antibiótico. As placas foram incubadas à 35 ± 2^0 C, por 48h. As colônias foram quantificadas e

a frequência de mutação foi calculada a partir da divisão do número de colônias que cresceram no meio com rifampicina, pelo número de colônias que cresceram no meio sem antibiótico. A cepa PAO1 referência foi utilizada como controle.

Foram consideradas HPM as amostras que obtiveram a frequência de mutação 20 vezes maior que a média da frequência de mutação da cepa PAO1. Os testes foram realizados em triplicata, com o objetivo de observar a reprodutibilidade dos resultados e foi estabelecida uma média aritmética para as frequências de mutações obtidas nas três análises.

2.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)

2.4.1 Teste de disco-difusão (TDD)

O teste de disco-difusão foi realizado para os antibióticos ceftazidima (CAZ) 30µg, sulfametoxazol - trimetoprima 23,75/1,25 µg (SUT) , minociclina (MI) 30µg e meropenem (MEM) 10µg (Becton, Dickinson and Company, BD, Sparks, Estados Unidos), de acordo com as recomendações de execução de *Clinical Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests 13th Edition* (M02, 2018) e os critérios de interpretação, do *Clinical Laboratory Standards Institute 28th edition*(CLSI, M100-S28, M 02, 2018). As cepas utilizadas para controle foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Esse teste foi realizado na totalidade das amostras e subpopulações resistentes à rifampicina.

Este estudo foi submetido ao comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto através da Plataforma Brasil (Ministério da Saúde – Conselho Nacional de saúde) conforme Folha de Rosto para pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (ANEXO 1).

3 RESULTADOS

3.1 Amostras

O estudo abrangeu um total de 147 amostras do CBc oriundas de 30 pacientes, sendo 18 pacientes do IFF (94 amostras) e de 12 pacientes da PPC (53 amostras). A maior parte das amostras bacterianas foi obtida do escarro (82,31%), seguida pelo *swab* de orofaringe (10,20%). Os demais espécimes clínicos foram abscesso hepático (2,04%), sangue (2,04%) e secreção traqueal (1,36%). Todos os pacientes incluídos no estudo eram cronicamente colonizados pelo CBc por critérios clínicos e bacteriológicos (mais de três culturas positivas no período de seis meses). Entretanto, para alguns pacientes os testes foram realizados em um número menor de amostras devido a inviabilidade das mesmas a partir da recuperação das culturas em estoque.

As espécies identificadas previamente e incluídas no estudo foram: *B. cenocepacia* IIIA (n=26), *B. cenocepacia* IIIB (n=15), *B. cepacia* (n=2), *B. contaminans* (n=3), *B. multivorans* (n=18), *B. pyrrocinia* (n=1), *B. stabilis* (n=1), e *B. vietnamiensis* (n=65). Em 16 amostras de *B. cenocepacia* não foi possível a diferenciação entre os genovares IIIA ou IIIB.

A espécie *B. cenocepacia* ocorreu em 22 dos 30 pacientes. Dez dos pacientes foram colonizados por apenas uma espécie do CBc, sendo elas, *B. cenocepacia* (P18, P27), *B. cenocepacia* IIIA (P5, P15, P13 e P29), *B. contaminans* (P22), *B. multivorans* (P3) e *B. vietnamiensis* (P21 e P28). A presença de pacientes colonizados por duas ou mais espécies do CBc foi observado em 20 pacientes. A associação mais comum entre diferentes espécies em um mesmo paciente foi entre *B. cenocepacia* e *B. multivorans* (P2, P7, P17, P19, P23 e P26) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* por pacientes (continua)

Paciente	Clínica de origem	Número de amostras testadas	Espécie Identificada (n)
P1	IFF	4	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (1) <i>B. vietnamiensis</i> (2) <i>B. multivorans</i> (1)
P2	PPC	7	<i>B. cenocepacia</i> (3) <i>B. cenocepacia</i> IIIA (1) <i>B. multivorans</i> (3)
P3	PPC	2	<i>B. multivorans</i> (2)
P4	IFF	11	<i>B. vietnamiensis</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> IIIB (9)
P5	PPC	1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (1)
P6	PPC	6	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (2) <i>B. cenocepacia</i> IIIB (3) <i>B. cenocepacia</i> (1)
P7	PPC	4	<i>B. multivorans</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> (1) <i>B. vietnamiensis</i> (2)
P8	IFF	8	<i>B. vietnamiensis</i> (7) <i>B. cenocepacia</i> IIIB (1)
P9	IFF	14	<i>B. vietnamiensis</i> (12) <i>B. multivorans</i> (1) <i>B. pyrrocinia</i> (1)
P10	IFF	2	<i>B. cenocepacia</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> IIIA (1)
P11	PPC	3	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (2) <i>B. cenocepacia</i> (1)
P12	PPC	8	<i>B. vietnamiensis</i> (7) <i>B. cenocepacia</i> (1)
P13	PPC	5	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (5)
P14	IFF	3	<i>B. cenocepacia</i> (1)

Tabela 1 – Distribuição das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* por pacientes (conclusão)

			<i>B. cenocepacia</i> IIIA (1) <i>B. cenocepacia</i> IIIB (1)
P15	IFF	2	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (2)
P16	IFF	8	<i>B. vietnamiensis</i> (7) <i>B. stabilis</i> (1)
P17	PPC	7	<i>B. vietnamiensis</i> (2) <i>B. cenocepacia</i> IIIA (3) <i>B. multivorans</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> (1)
P18	IFF	1	<i>B. cenocepacia</i> (1)
P19	IFF	6	<i>B. multivorans</i> (3) <i>B. cenocepacia</i> IIIA (1) <i>B. cenocepacia</i> (2)
P20	PPC	5	<i>B. multivorans</i> (2) <i>B. vietnamiensis</i> (3)
P21	IFF	1	<i>B. vietnamiensis</i> (1)
P22	PPC	2	<i>B. contaminans</i> (2)
P23	PPC	2	<i>B. multivorans</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> (1)
P24	PPC	2	<i>B. contaminans</i> (1) <i>B. cepacia</i> (1)
P25	IFF	3	<i>B. cenocepacia</i> (1) <i>B. cenocepacia</i> IIIA (1) <i>B. cenocepacia</i> IIIB (1)
P26	IFF	6	<i>B. multivorans</i> (3) <i>B. cenocepacia</i> IIIA (3)
P27	IFF	1	<i>B. cenocepacia</i> (1)
P28	IFF	6	<i>B. vietnamiensis</i> (6)
P29	IFF	2	<i>B. cenocepacia</i> IIIA (2)
P30	IFF	16	<i>B. vietnamiensis</i> (15) <i>B. multivorans</i> (1)

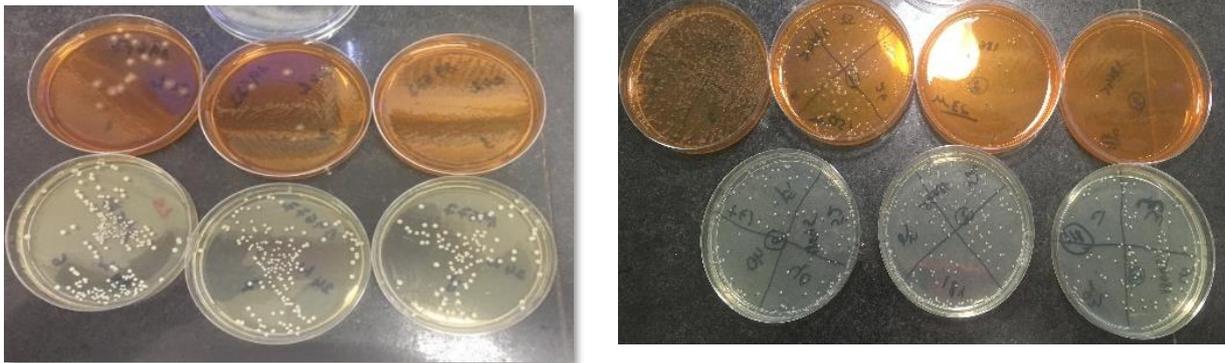
PPC: Policlínica Piquet Carneiro, IFF: Instituto Fernandes Figueira

3.2 Análise da frequência de mutação e classificação das amostras hipermutáveis

Todas as amostras foram submetidas ao teste de determinação da frequência de mutação. A média aritmética da *P. aeruginosa* (PAO1) utilizada nos experimentos foi $3,76 \times 10^{-6}$. A faixa da frequência da taxa de mutação das amostras variou de $5,0 \times 10^{-8}$ a $1,2 \times 10^{-1}$, com média de $1,42 \times 10^{-3}$. Os pacientes P30 e P13 foram os que apresentaram a menor e a maior frequência de mutação, $5,0 \times 10^{-8}$ e $1,2 \times 10^{-1}$, respectivamente.

Nas figuras 5 estão representados os resultados de duas amostras HPM do CBc (10607-A e 18645-B) semeadas em meios sem rifampicina e com rifampicina (meio alaranjado).

Figura 5 - Amostras de *B. cenocepacia* IIIA em meio LB sem rifampicina e meio LB com rifampicina (meio alaranjado)



Vinte e seis amostras (17,68%) recuperadas de 12 pacientes apresentaram frequência de mutação 20 vezes maior que a observada com a PAO1 e foram classificadas como HPM. A frequência de mutação entre as amostras HPM variou de $3,5 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-1}$, com média de $8,15 \times 10^{-3}$.

Tabela 2 - Frequências de mutação das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* de pacientes com Fibrose Cística (continua)

Paciente	Amostra	Ano de isolamento	Espécime Clínico	Espécie	fr
P1	9812	2011	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,5 \times 10^{-5}$
	11856	2011	Swab orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,6 \times 10^{-6}$
	13248	2011	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$2,0 \times 10^{-6}$
	14024	2011	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,5 \times 10^{-6}$
P2	10419	2010	Swab orofaringe	<i>B. cenocepacia</i>	$6,8 \times 10^{-3*}$
	10607	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,0 \times 10^{-4*}$
	18244	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$3,3 \times 10^{-4*}$
	21069	2016	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$7,4 \times 10^{-3*}$
	21218	2017	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$5,0 \times 10^{-4*}$
	21431	2018	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$1,2 \times 10^{-3*}$
	21521	2018	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$9,4 \times 10^{-4*}$
P3	21066	2016	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$2,6 \times 10^{-5}$
	21071	2016	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$8,3 \times 10^{-7}$
P4	19250	2015	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$4,0 \times 10^{-5}$
	19677	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$2,0 \times 10^{-5}$
	19678	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$7,0 \times 10^{-8}$
	19679	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$7,5 \times 10^{-6}$
	19680	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$3,0 \times 10^{-6}$
	19681	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$6,0 \times 10^{-6}$
	19682	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$2,5 \times 10^{-6}$
	20244	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$5,5 \times 10^{-5}$
	20246	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$1,5 \times 10^{-5}$
	20308	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$5,0 \times 10^{-7}$
20310	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$2,0 \times 10^{-5}$	
P5	13191	2011	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,0 \times 10^{-6}$

Tabela 2 - Frequências de mutação das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* de pacientes com Fibrose Cística (continuação)

P6	18242	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	3,0x10 ^{-4*}
	20143	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	1,0x10 ⁻⁶
	20888	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	2,0x10 ⁻⁵
	21063	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	1,0x10 ⁻⁵
	21206	2017	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2,5x10 ^{-4*}
	21512	2018	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	4,0x10 ⁻⁶
P7	13250	2011	Escarro	<i>B. multivorans</i>	1,3x10 ⁻⁶
	21148	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,4x10 ⁻⁵
	21364	2017	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	2,5x10 ⁻⁷
	21254	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	8,0x10 ⁻⁶
P8	14946	2012	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	4,0x10 ⁻⁶
	15761	2012	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	4,0x10 ⁻⁶
	17412	2014	Swab orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	1,3x10 ⁻⁶
	18269	2014	Escarro	<i>B.cenocepacia</i> IIIB	1,5x10 ⁻⁵
	18651	2014	Swab orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	4,7x10 ⁻⁵
	21215	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	6,0x10 ⁻⁵
	21395	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	7,0x10 ⁻⁵
	21465	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,0x10 ⁻⁶
P9	16478	2013	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,0x10 ⁻⁶
	16756	2013	Swab orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	1,5x10 ⁻⁶
	16757	2013	Swab orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	6,7x10 ⁻⁷
	18880	2015	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,4x10 ⁻⁵
	21188	2017	Escarro	<i>B. multivorans</i>	1,0x10 ⁻⁵
	21348	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	3,0x10 ⁻⁶
	21424	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,4x10 ⁻⁵
	21439	2018	Escarro	<i>B. pyrrocinia</i>	5,0x10 ⁻⁷
	21494	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,7x10 ⁻⁶
	21496	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	3,0x10 ⁻⁶
	21525	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,0x10 ⁻⁵
	21639	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	3,0x10 ⁻⁶
	21706	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	3,5x10 ⁻⁵
	21707	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,0x10 ⁻⁵

Tabela 2 - Frequências de mutação das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* de pacientes com Fibrose Cística (continuação)

P10	10734	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$2,0 \times 10^{-5}$
	20313	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,2 \times 10^{-3*}$
P11	19448	2015	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,0 \times 10^{-6}$
	21248	2017	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$4,0 \times 10^{-5}$
	21330	2017	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,2 \times 10^{-5}$
P12	14273	2012	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,0 \times 10^{-6}$
	15755	2012	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$1,0 \times 10^{-5}$
	16832	2013	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,2 \times 10^{-5}$
	16842	2013	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,0 \times 10^{-5}$
	18261	2014	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$3,3 \times 10^{-6}$
	18574	2014	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,0 \times 10^{-5}$
	20309	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$5,0 \times 10^{-6}$
	21005	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$6,0 \times 10^{-5}$
P13	9993	2010	Secreção traqueal	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$5,3 \times 10^{-2*}$
	10018	2010	Secreção traqueal	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$5,0 \times 10^{-6}$
	10067	2010	Sangue	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$9,2 \times 10^{-6}$
	10136	2010	Sangue	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,5 \times 10^{-5}$
	10137	2010	Sangue	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,2 \times 10^{-1*}$
P14	18650	2014	Swab orofaringe	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,8 \times 10^{-6}$
	20223	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$2,0 \times 10^{-5}$
	21453	2018	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$1,5 \times 10^{-5}$
P15	10601	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,6 \times 10^{-7}$
	10996	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,0 \times 10^{-5}$

Tabela 2 - Frequências de mutação das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* de pacientes com Fibrose Cística (continuação)

P16	10140	2010	Secreção orofaringe	<i>B. stabilis</i>	$3,7 \times 10^{-6}$
	10733	2010	Secreção orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	$5,0 \times 10^{-6}$
	13479	2011	Secreção orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,0 \times 10^{-5}$
	19444	2015	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	5×10^{-6}
	19450	2015	Secreção orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,7 \times 10^{-6}$
	21072	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$3,0 \times 10^{-7}$
	21073	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,0 \times 10^{-6}$
	21742	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,0 \times 10^{-4*}$
P17	9955	2010	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,8 \times 10^{-6}$
	10597	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,0 \times 10^{-5}$
	14071	2011	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$3,5 \times 10^{-6}$
	21392	2017	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,7 \times 10^{-3*}$
	21440	2018	Abscesso hepático	<i>B. multivorans</i>	$4,3 \times 10^{-5}$
	21441	2018	Abscesso hepático	<i>B. cenocepacia</i>	$1,7 \times 10^{-7}$
	21450	2018	Abscesso hepático	<i>B. vietnamiensis</i>	$7,0 \times 10^{-6}$
P18	19446	2015	Escarro	<i>B. cepacia</i>	$3,0 \times 10^{-5}$
P19	15048	2012	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$2,5 \times 10^{-6}$
	20906	2016	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$3,3 \times 10^{-5}$
	21003	2016	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$2,9 \times 10^{-6}$
	21004	2016	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$4,0 \times 10^{-7}$
	21460	2018	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$1,8 \times 10^{-7}$
	21592	2018	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$3,5 \times 10^{-5*}$
P20	18113	2014	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$1,3 \times 10^{-6}$
	18506	2014	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$3,3 \times 10^{-6}$
	21001	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,0 \times 10^{-5}$
	21437	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,0 \times 10^{-4*}$
	21514	2018	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,5 \times 10^{-4*}$
P21	19251	2015	Swab orofaringe	<i>B. vietnamiensis</i>	$3,3 \times 10^{-6}$

Tabela 2 - Frequências de mutação das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* de pacientes com Fibrose Cística (continuação)

P22	9954	2010	Escarro	<i>B. contaminans</i>	$2,0 \times 10^{-5}$
	18977	2015	Escarro	<i>B. contaminans</i>	$1,5 \times 10^{-6}$
P23	14557	2012	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$5,8 \times 10^{-3*}$
	17770	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$3,3 \times 10^{-7}$
P24	9904	2010	Escarro	<i>B. contaminans</i>	$8,0 \times 10^{-6}$
	15691	2012	Swab orofaringe	<i>B. cepacia</i>	$2,0 \times 10^{-6}$
P25	17477	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,1 \times 10^{-3*}$
	17579	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i>	$9,5 \times 10^{-5}$
	19249	2015	Swab orofaringe	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	$2,3 \times 10^{-4*}$
P26	14229	2011	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$3,7 \times 10^{-5}$
	18271	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$4,0 \times 10^{-4*}$
	18645	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$1,5 \times 10^{-3*}$
	18688	2014	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	$4,4 \times 10^{-5*}$
	20225	2015	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$6,7 \times 10^{-4*}$
	20237	2015	Escarro	<i>B. multivorans</i>	$6,8 \times 10^{-3*}$
P27	10420	2010	Swab orofaringe	<i>B. cenocepacia</i>	$5,0 \times 10^{-6}$
P28	9873	2010	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$2,5 \times 10^{-5}$
	10015	2010	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,3 \times 10^{-5}$
	10017	2010	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$6,0 \times 10^{-6}$
	10185	2010	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$5,0 \times 10^{-5}$
	10572	2010	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$1,3 \times 10^{-5}$
	12060	2011	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	$4,0 \times 10^{-5}$

Tabela 2 - Frequências de mutação das 147 amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* de pacientes com Fibrose Cística (conclusão)

P29					
	9875	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2,5x10 ⁻⁴ *
	9979	2010	Escarro	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	1,9x10 ⁻⁶
P30					
	20430	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	5,0x10 ⁻⁶
	20718	2016	LBA	<i>B. vietnamiensis</i>	5,0x10 ⁻⁶
	20941	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	3,0x10 ⁻⁶
	20942	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,4x10 ⁻⁵
	20943	2016	LBA	<i>B. vietnamiensis</i>	2,5x10 ⁻⁶
	20944	2016	LBA	<i>B. multivorans</i>	2,5x10 ⁻⁷
	21007	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	3,6x10 ⁻⁶
	21008	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	5,0x10 ⁻⁸
	21076	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	4,2x10 ⁻⁶
	21077	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,8x10 ⁻⁶
	21096	2016	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,0x10 ⁻⁵
	21098	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	4,6x10 ⁻⁵
	21099	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	1,0x10 ⁻⁵
	21124	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,9x10 ⁻⁶
	21142	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,5x10 ⁻⁶
	21143	2017	Escarro	<i>B. vietnamiensis</i>	2,8x10 ⁻⁶

* Amostras classificadas como HPM; LBA: Lavado broncoalveolar

A análise da distribuição de amostras HPM entre as espécies do CBc, mostrou que as duas espécies com maior percentual de amostras HPM foram: *B. cenocepacia* IIIA (46,15%) e *B. multivorans* (33,33%). As espécies *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. pyrrocinia* e *B. stabilis* não apresentaram amostras HPM (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição de amostras HPM por espécies Complexo *Burkholderia cepacia*

Espécie	Total de amostras (n=147)	Hipermutáveis n=26 (%)
<i>B. cenocepacia</i> *	16	4 (25)
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	26	12 (46,15)
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	15	1 (6,67)
<i>B. cepacia</i>	2	0
<i>B. contaminans</i>	3	0
<i>B. multivorans</i>	18	6 (33,33)
<i>B. pyrrocinia</i>	1	0
<i>B. stabilis</i>	1	0
<i>B. vietnamiensis</i>	65	3 (4,61)

* O genótipo não foi caracterizado

A frequência de mutação das 26 amostras HPM variou de $3,5 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-1}$. *B. cenocepacia* IIIA foi a espécie que apresentou uma maior variação de *fr* ($4,4 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-1}$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Variação da frequência de mutação espontânea nas espécies do Complexo

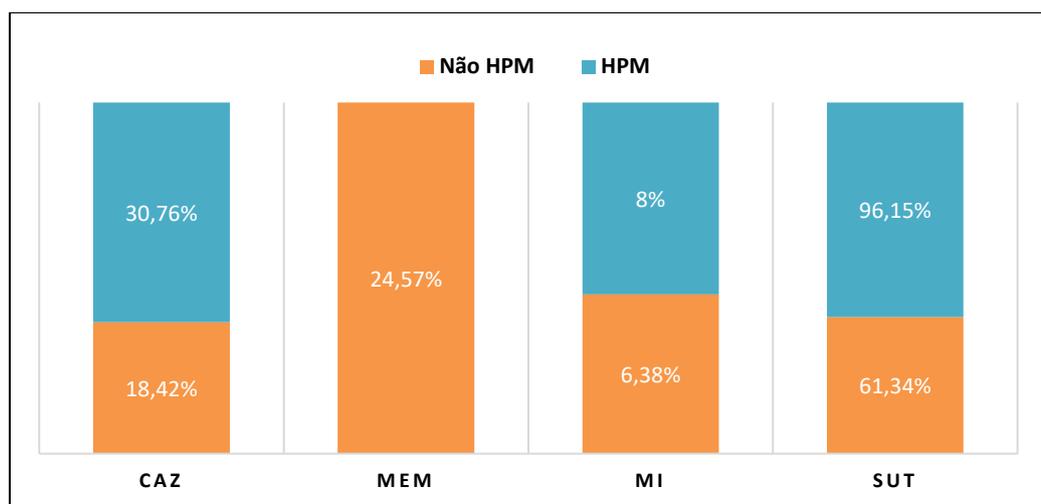
Burkholderia cepacia

Espécie (n = total testadas/HPM)	Variação da frequência de mutação (<i>fr</i>)
<i>B. cenocepacia</i> (16/ 4)	$3,5 \times 10^{-5}$ a $6,8 \times 10^{-3}$
<i>B. cenocepacia</i> IIIA (26/12)	$4,4 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-1}$
<i>B. cenocepacia</i> IIIB (15/1)	$2,3 \times 10^{-4}$
<i>B. multivorans</i> (18/6)	$5,0 \times 10^{-4}$ a $6,8 \times 10^{-3}$
<i>B. vietnamiensis</i> (65/3)	$1,0 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-4}$

3.3 Análise dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

Neste estudo, todas as amostras do CBc foram testadas contra os antimicrobianos CAZ, MEM, MI e SUT pelo método de disco-difusão com o objetivo de avaliar a tendência das amostras HPM ao aumento da resistência, comparando-as com amostras não HPM. Como pode ser observado no Gráfico 3, a menor diferença no percentual de resistência entre as amostras HPM em relação as não HPM foi para MI (1,62%) e o maior para SUT (34,81%). Não foi observada resistência das amostras HPM ao MEM, enquanto as não HPM apresentaram 24,57% de resistência a este antimicrobiano. Dentre os antibióticos testados, o mais efetivo, *in vitro*, foi a MI, tanto para amostras não HPM quanto para HPM, com 94% e 93,62% de suscetibilidade, respectivamente.

Gráfico 3 - Comparação do percentual de resistência das amostras hipermutáveis e não hipermutáveis do complexo *Burkholderia cepacia*



Legenda: HPM - hipermutáveis (n=26); não HPM (n=121); CAZ, ceftazidima; MEM, meropenem; MI, minociclina; SUT, sulfametoxazol/trimetoprima.

3.4 Análise da distribuição das amostras HPM por paciente

Na Tabela 5, estão apresentadas as características das amostras HPM considerando a análise por paciente. As cepas HPM foram observadas em 12 pacientes (40% do total), sete pediátricos (quatro do sexo feminino e três do sexo masculino) e em cinco pacientes adultos (todos do sexo masculino).

Apenas o paciente P2 teve 100% das amostras classificadas como HPM. As sete amostras do paciente isoladas entre 2010 e 2018, foram classificadas como HPM, ocorrendo entre as espécies de *B.cenocepacia* (n=2), *B.cenocepacia* IIIA (n=1) e *B. multivorans* (n=4). A *fr* foi variável mesmo entre as amostras da mesma espécie. O principal marcador de resistência entre elas foi a SUT, observada em todas as amostras.

O paciente P6 apresentou duas amostras de *B. cenocepacia* IIIA classificadas como HPM, com intervalo de isolamento entre elas de três anos. A *fr* entre as duas amostras foi semelhante e SUT foi o único marcador de resistência.

O paciente P26 foi o segundo com maior percentual de amostras HPM (83,3%; n=5). Três amostras de *B. cenocepacia* IIIA são do período de 2014 e duas de *B. multivorans* de 2015. As amostras de *B. multivorans* foram isoladas da mesma amostra de escarro e apresentaram *fr* distintas.

O percentual de amostras HPM observados nos demais pacientes variou de 12,5% (P16) a 66,7% (P25). Cabe destacar os achados no paciente P13. Das cinco amostras de *B. cenocepacia* IIIA isoladas em 2010, duas foram classificadas como HPM, porém de espécimes clínicos diferentes (secreção traqueal e sangue). Essas duas amostras apresentaram as maiores *fr* em comparação com as demais, no entanto possuem os mesmos marcadores de resistência: MI e SUT.

O antibiótico SUT foi o principal marcador de resistência nas populações selvagens e subpopulação resistentes à rifampicina, que mostraram alto percentual de resistência ao SUT (96,15%), seguido de CAZ (26,92%). Somente uma amostra de *B. multivorans* (paciente P23), apresentou sensibilidade a todos os antibióticos (CAZ, MEM, MI e SUT) testados.

Tabela 5 – Perfil de resistência das amostras resistentes à rifampicina (continua)

Paciente (total de amostras /HPM)	HPM	Cepa	Ano de isolamento	Espécime Clínico	fr	População resistente à rifampicina
P2(n=7/n=7)						
	<i>B. cenocepacia</i>	10419	2010	Swab Orofaringe	6,8x10 ⁻³	CAZ, SUT
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	10607	2010	Escarro	1,0x10 ⁻⁴	CAZ, SUT
	<i>B. cenocepacia</i>	18244	2014	Escarro	3,3x10 ⁻⁴	CAZ, SUT
	<i>B. multivorans</i>	21069	2016	Escarro	7,4x10 ⁻³	SUT
	<i>B. multivorans</i>	21218	2017	Escarro	5,0x10 ⁻⁴	SUT
	<i>B. multivorans</i>	21431	2018	Escarro	1,2x10 ⁻³	CAZ, SUT
	<i>B. cenocepacia</i>	21521	2018	Escarro	9,4x10 ⁻⁴	SUT
P6 (n=6/n=2)						
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	18242	2014	Escarro	3,0x10 ⁻⁴	SUT
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	21206	2017	Escarro	2,5x10 ⁻⁴	SUT
P10 (n=2/n=1)						
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	20313	2016	Escarro	2,2x10 ⁻³	CAZ, SUT
P13 (n=5/n=2)						
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	9993	2010	Secreção Traqueal	5,3x10 ⁻²	MI, SUT
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	10137	2010	Sangue	1,2x10 ⁻¹	CAZ, MI, SUT
P16 (n=8/n=1)						
	<i>B. vietnamiensis</i>	21742	2018	Escarro	1,0x10 ⁻⁴	SUT
P17 (n=7/n=1)						
	<i>B.cenocepacia</i> IIIA	21392	2017	Escarro	1,7x10 ⁻³	SUT

Tabela 5 – Perfil de resistência das amostras resistentes à rifampicina (conclusão)

P19 (n=6/n=1)	<i>B. cenocepacia</i>	21592	2018	Escarro	$3,5 \times 10^{-5}$	SUT
P20 (n=5/n=2)	<i>B. vietnamiensis</i>	21437	2018	Escarro	$1,0 \times 10^{-4}$	SUT
	<i>B. vietnamiensis</i>	21514	2018	Escarro	$2,5 \times 10^{-4}$	SUT
P23 (n=2/n=1)	<i>B. multivorans</i>	14557	2012	Escarro	$5,8 \times 10^{-3}$	*
P25 (n=3/n=2)	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	17477	2014	Escarro	$1,1 \times 10^{-3}$	SUT
	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	19249	2015	Swab Orofaringe	$2,3 \times 10^{-4}$	MI, SUT
P26(n=6/n=5)	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	18271	2014	Escarro	$4,0 \times 10^{-4}$	CAZ, SUT
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	18645	2014	Escarro	$1,5 \times 10^{-3}$	SUT
	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	18688	2014	Escarro	$4,4 \times 10^{-5}$	SUT
	<i>B. multivorans</i>	20225	2015	Escarro	$6,7 \times 10^{-4}$	SUT
	<i>B. multivorans</i>	20237	2015	Escarro	$6,8 \times 10^{-3}$	SUT
P29 (n=2/n=1)	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	9875	2010	Escarro	$2,5 \times 10^{-4}$	SUT

*Amostra sensível a todos antibióticos testados; CAZ (ceftazidima, 30µg), MEM (meropenem, 10µg), MI (miniciclina, 30µg), SUT sulfametoxazol/trimetoprima 23,75/1,25µg).

3.5 Análise do perfil de resistência entre a população selvagem e a população resistente à rifampicina

O perfil de resistência também foi avaliado nas subpopulações resistente à rifampicina, com o objetivo de observar diferenças entre a população selvagem e a suas subpopulações. Os marcadores de resistência entre as populações foram os mesmos na maioria das amostras (n=20;76,92%). Em seis ocasiões houveram diferenças entre as populações e as subpopulações, em três delas as subpopulações mostraram um marcador de resistência adicional (P2, P6 e P29), nos quais uma das amostras da subpopulação de *B. multivorans* e duas de *B. cenocepacia* IIIA apresentaram resistência ao CAZ além do SUT. O inverso ocorreu nas outras três ocasiões onde as subpopulações mostraram menos um marcador de resistência em relação a população selvagem: uma das amostras de *B. cenocepacia* IIIA dos pacientes P13 e P 26 não apresentaram resistência a CAZ e uma das amostras de *B. cenocepacia* do P 2 não apresentou resistência ao MEM. Apenas uma amostra (3,85%) de *B. multivorans* (P23) foi sensível a todos os antibióticos, em ambas populações (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação do perfil de resistência das populações selvagens e das subpopulações resistentes à rifampicina
(continua)

Paciente/ espécie	Ano de isolamento	Frequência de mutação	Perfil de resistência da população selvagem	Perfil de resistência da subpopulação resistente a rifampicina
P2				
<i>B. cenocepacia</i>	2010	$6,8 \times 10^{-3}$	CAZ, ME e SUT	CAZ e SUT
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2010	$1,0 \times 10^{-4}$	CAZ e SUT	CAZ e SUT
<i>B. cenocepacia</i>	2014	$3,3 \times 10^{-4}$	CAZ e SUT	CAZ e SUT
<i>B. multivorans</i>	2016	$7,4 \times 10^{-3}$	SUT	SUT
<i>B. multivorans</i>	2017	$5,0 \times 10^{-4}$	SUT	SUT
<i>B. multivorans</i>	2018	$1,2 \times 10^{-3}$	CAZ e SUT	CAZ e SUT
<i>B. cenocepacia</i>	2018	$9,4 \times 10^{-4}$	SUT	CAZ e SUT
P6				
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2014	$3,0 \times 10^{-4}$	SUT	SUT
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2017	$2,5 \times 10^{-4}$	SUT	CAZ e SUT

Tabela 6 – Comparação do perfil de resistência das populações selvagem e das subpopulações resistentes à rifampicina
(continuação)

P10					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2016	$2,2 \times 10^{-3}$	CAZ e SUT	CAZ e SUT	
P13					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2010	$5,3 \times 10^{-2}$	SUT	SUT	
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2010	$1,2 \times 10^{-1}$	CAZ, MI e SUT	MI e SUT	
P16					
<i>B. vietnamiensi</i>	2018	$1,0 \times 10^{-4}$	SUT	SUT	
P17					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2017	$1,7 \times 10^{-3}$	SUT	SUT	
P19					
<i>B. cenocepacia</i>	2018	$3,5 \times 10^{-5}$	SUT	SUT	
P20					
<i>B. vietnamiensis</i>	2018	$1,0 \times 10^{-4}$	SUT	SUT	
<i>B. vietnamiensis</i>	2018	$2,5 \times 10^{-4}$	SUT	SUT	
P23					
<i>B. multivorans</i>	2012	$5,8 \times 10^{-3}$	*	*	

Tabela 6 – Comparação do perfil de resistência das populações selvagem e das subpopulações resistentes à rifampicina
(conclusão)

P25					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2014	$1,1 \times 10^{-3}$	SUT		SUT
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	2015	$2,3 \times 10^{-4}$	MI e SUT		MI e SUT
P26					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2014	$4,0 \times 10^{-4}$	CAZ e SUT		SUT
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2014	$1,5 \times 10^{-3}$	SUT		SUT
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2014	$4,4 \times 10^{-5}$	SUT		SUT
<i>B. multivorans</i>	2015	$6,7 \times 10^{-4}$	SUT		SUT
<i>B. multivorans</i>	2015	$6,8 \times 10^{-3}$	SUT		SUT
P29					
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	2010	$2,5 \times 10^{-4}$	SUT		CAZ e SUT

*P23 – as duas populações foram sensíveis a todos antibióticos

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, quase que a totalidade das amostras de CBc (82,3%) foram obtidas de secreção respiratória de pacientes com FC, e a maioria foi identificada como *B. vietnamiensis* (44,2%), encontrada em 12 dos 30 pacientes. Em dados publicados dos EUA, Canadá e Reino Unido, *B. multivorans* é a espécie mais prevalente entre os pacientes com FC, refletindo uma tendência global (KENNA et al., 2017; LIPUMA, 2010; ZLOSNIK et al., 2015). Curiosamente, um trabalho conduzido em 19 hospitais argentinos que atendem pacientes com FC, apontou *B. contaminans* como a mais prevalente entre a população, chamando atenção para possíveis fontes comum de infecção e de fatores que justifiquem a maior transmissibilidade dessa espécie (CIPOLLA et al., 2018).

Vale ressaltar que na década anterior, *B. cenocepacia* em especial a *B. cenocepacia* IIIA era relatada como a mais frequente nos países da Europa e América do Norte (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010; PRETTO et al., 2013; TURTON et al., 2007). Essa variação de prevalência das espécies temporalmente e entre os países, pode ser explicada, pelas características ambientais e oportunistas desses micro-organismos, e principalmente pela adoção de medidas de segregação aplicadas em muitos centros, fazendo com que novas aquisições de linhagens tradicionalmente associadas à transmissibilidade, como a linhagem ET12 de *B. cenocepacia* IIIA sejam mais raramente isoladas (CIPOLLA et al., 2018; KENNA et al., 2017; MAC DOWELL et al., 2004).

Em pacientes com FC, as espécies do CBc são responsáveis pelo aumento da morbimortalidade, redução da função pulmonar e dano pró-inflamatório (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010; PORTER; GOLDBERG, 2011). Seu papel como patógeno nosocomial e como contaminante de medicamentos, equipamentos e produtos como gel de ultrassom e lenços de clorexidina também tem sido cada vez mais documentado (BECKER et al., 2018; NANINI et al., 2015).

O fenótipo da hipermutabilidade é de alta relevância na FC, uma vez que o aumento da taxa de mutação e a recombinação aceleram a adaptação microbiana ao ambiente pulmonar e, além disso, pode estar relacionado ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e aumento na capacidade de virulência, dificultando a erradicação dos patógenos (RIDDERBERG; HANDBERG; NØRSKOV, 2020).

A maioria dos trabalhos publicados mencionando cepas HPM estão relacionados a infecção crônica respiratória causada por *P. aeruginosa* em pacientes com FC (GOVAN; BROWN; JONES, 2007; KENNA et al., 2007; LUTZ et al., 2013; OLIVER, 2000). Entretanto,

cepas HPM também foram observadas em outros patógenos no cenário da FC, como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Achromobacter* sp e *Stenotrophomonas maltophilia* e mais raramente entre as espécies do CBc (CANFIELD et al., 2013; MARTINA et al., 2014; OLIVER; MARTINA, 2010; RIDDERBERG; HANDBERG; NØRSKOV, 2020; TURRIENTES et al., 2010; WATSON JR; BURNS; SMITH, 2004).

Em pacientes com FC, *P. aeruginosa*, foi o primeiro modelo a revelar a importância e a alta prevalência de cepas HPM, relacionando este fenótipo ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e adaptação ao ambiente pulmonar durante as infecções crônicas (OLIVER; MARTINA, 2010). No Brasil, um único estudo avaliou a frequência de hipermutabilidade em pacientes com FC cronicamente infectado com *P. aeruginosa* e apontou que 25,6% dos isolados eram HPM (LUTZ et al, 2013).

A presença de amostras HPM em outras espécies de BGNNF no contexto da FC como *Achromobacter* sp e *S. maltophilia* também foi analisada (TURRIENTES et al., 2010; RIDDERBERG; HANDBERG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2020). Um estudo foi realizado com 174 amostras de *S. maltophilia*, sendo 60 de origem ambiental, 48 recuperadas de 13 pacientes com FC e 53 isolados clínicos de pacientes sem FC. Não foi observado o fenótipo HPM nos isolados ambientais. Por outro lado, nos casos de indivíduos sem FC, foi encontrado 3% de isolados HPM e 14,6% em FC cronicamente infectados, sugerindo que o maior percentual observado nesse último grupo está relacionado a pressão seletiva destas cepas ao estresse ambiental encontrado no pulmão de pacientes com FC (TURRIENTES et al., 2010).

Um trabalho realizado em um centro dinamarquês de referência em FC, avaliou a prevalência de cepas HPM em 90 amostras do gênero *Achromobacter* sp, oriundas de 42 pacientes, sendo 20 com infecção crônica e 22 com infecção intermitente. Do total de amostras, 44% (40/90) foram classificadas como HPM e estavam presentes em 26% (11/42) dos pacientes. Todas as amostras classificadas como HPM foram obtidas de pacientes com infecção crônica. Desses 11 pacientes, 7 estavam colonizados pela cepa epidêmica de *A. ruhlandii* DES (*Danish Epidemic Strain*). Essa prevalência foi superestimada devido a disseminação da cepa epidêmica entre os pacientes. Excluindo essas cepas, o total de amostras HPM diminuiu para 23% (15/64), isoladas em 31% (4/13) dos pacientes (RIDDERBERG; HANDBERG; NØRSKOV-LAURITSEN, 2020).

Até o momento, apenas dois trabalhos avaliaram a frequência de mutação para determinação do fenótipo de HPM entre espécies do CBc em pacientes com FC (MARTINA et al. 2014; POPE et al , 2010). Pope et al (2010) analisaram amostras de *B. multivorans* (n=2) e *B. cenocepacia* (n=6) isoladas de oito pacientes com infecção crônica e não encontram amostras

HPM, possivelmente pelo pequeno número de amostras testadas. Martina et al (2014) analisaram 125 amostras, sendo 100 obtidas de pacientes com FC, 10 de indivíduos sem FC e 15 de origem ambiental. Do total de amostras, 13,6% (n=17) apresentou o fenótipo HPM sendo 14 amostras em FC, dois em não FC e uma de fonte ambiental. As 14 amostras isoladas de pacientes com FC foram recuperadas de 11 dos 48 (22,9%) pacientes, todos infectados cronicamente. No presente trabalho, aproximadamente 18% da amostragem foi caracterizada como HPM encontrada em 40% (12/30) dos pacientes com infecção crônica. A associação entre a presença do fenótipo HPM e infecção crônica, já está claramente estabelecida na literatura (JOULIVET-GOURGEON et al., 2011; OLIVER; MARTINA, 2010).

Considerando a caracterização do fenótipo HPM entre as espécies de CBc, Martina et al. (2014) encontraram cepas HPM em *B. cepacia* (2/13; 15,4%), *B. multivorans* (1/11; 9,1%), *B. cenocepacia* (5/16; 31,3%) e *B. contaminans* (8/74; 10,8%). Quando calculado o percentual somente entre os isolados classificados com HPM, *B. contaminans* e *B. cenocepacia* foram as espécies que apresentaram maior percentual, aproximadamente 50% e 30%, respectivamente. O alto percentual observado em *B. contaminans* deve-se, provavelmente, ao fato dela ser a mais prevalente na Argentina (CIPOLLA, 2018; MARTINA et al., 2019).

Das sete espécies de CBc identificadas neste estudo, três apresentaram fenótipo HPM, sendo elas *B. cenocepacia* (17/57; 29,8%), *B. multivorans* (6/18; 33,3%) e *B. vietnamiensis* (3/65; 4,6%). Entre as amostras de *B. cenocepacia* as espécies caracterizadas com o genomovar IIIA (12/26; 46,15 %) apresentaram o maior percentual de HPM, provavelmente por representar a cepa mais virulenta da espécie, com maior potencial de adaptação à ambientes estressantes, como o do pulmão de pacientes com FC. Embora o maior número de amostras HPM tenha sido observado em *B. cenocepacia*, o percentual de amostras identificadas como *B. multivorans* classificadas como HPM chama atenção, principalmente por estar distribuída em apenas três pacientes (P2, P23 e P26).

Um estudo conduzido em Boston analisou por técnica de sequenciamento de nova geração a diversidade de *B. dolosa*, em cinco indivíduos com FC, previamente infectados por um clone epidêmico dessa espécie durante um surto. As análises foram conduzidas em uma única amostra de escarro de cada paciente, exceto um paciente (P2) que teve duas amostras analisadas devido a uma exacerbação pulmonar e mudança no regime de antibióticos. Em um único paciente (P5), a comunidade de *B. dolosa* teve mais mutações (n=199) do que a população de outros pacientes. A análise de todos os 199 genes mutados exclusivos da população do paciente, revelou uma única mutação envolvida no reparo do DNA em uma posição conservada no *mutL*, cujos defeitos são conhecidos por estar relacionados ao fenótipo de HPM. Esse foi o

primeiro trabalho que detectou cepas HPM com aplicação de ferramentas moleculares em uma espécie do CBc (LIEBERMAN et al., 2014).

Em nosso estudo a média da frequência de mutação entre as amostras HPM foi de $8,15 \times 10^{-3}$ ($3,5 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-1}$). Vale a pena destacar que duas amostras, do mesmo paciente, apresentaram *fr* elevada ($5,3 \times 10^{-2}$ e $1,2 \times 10^{-1}$) contribuindo para aumento da média aritmética. *B. vietnamiensis*, a espécie mais prevalente em nosso estudo, apresentou frequência média de mutação de $1,7 \times 10^{-4}$ ($1,0 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-4}$). *B. cenocepacia* IIIA, apresentou média frequência de mutação de $8,5 \times 10^{-3}$ ($4,4 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-1}$), *B. multivorans* mostrou média *fr* de $3,0 \times 10^{-3}$ ($5,0 \times 10^{-4}$ a $6,8 \times 10^{-3}$). No trabalho realizado por Martina et al. (2014) as amostras HPM foram distribuídas entre as espécies de *B. cepacia* (n=2) com média de *fr* de $3,58 \times 10^{-7}$, *B. cenocepacia* (n=4) apresentando média de *fr* $4,08 \times 10^{-7}$, *B. contaminans* (n=8) com média de *fr* $8,42 \times 10^{-6}$. *B. lata* e *B. multivorans* só tiveram uma amostra HPM, com *fr* $2,18 \times 10^{-6}$ e $7,91 \times 10^{-7}$, respectivamente. Comparando as médias das *fr* entre as espécies comuns nos dois estudos (*B. cenocepacia* e *B. multivorans*) observamos que os valores da *fr* encontradas no presente trabalho foram relativamente maiores. Essas diferenças podem ser explicadas, em parte, pela origem clonal das amostras assim como pela variedade de espécimes onde as amostras foram recuperadas (escarro, secreção traqueal, LBA, sangue), nos quais podem exercer pressão seletiva distinta.

Analisando os pacientes com amostras HPM, um único paciente (P13) apresentou duas amostras que se destacaram por apresentar as maiores frequências de mutação, na ordem de grandeza 10^{-2} e 10^{-1} . Amostras com essas ordens de grandeza, de forma geral estão associados a mutação *jackpot*, que ocorre quando a mutação surge no início do crescimento celular, levando a um excesso de mutantes em um dos experimentos triplicados (HEDDLE, 1999; KENNA et al., 2007). Em nosso estudo, essa possibilidade foi excluída já que os experimentos foram realizados em triplicata garantindo a reprodutibilidade dos testes.

A relação entre hipermutabilidade e resistência aos antimicrobianos vem sendo fortemente apontada em diversos estudos (CIOFU et al., 2005; OLIVER et al., 2000; SANZ-GARCIA; HERNANDO-AMADO; MARTÍNEZ, 2018). Neste trabalho, a análise comparativa do perfil de resistência entre as amostras selvagens e as subpopulações resistentes à rifampicina, não mostrou diferenças em relação aos antibióticos testados. O número reduzido de antibióticos avaliados (n=4) e recomendados para o TDD, pode ter sido uma limitação. Por outro lado, um trabalho realizado com a exposição de amostras HPM a um número maior de antibióticos (n=17) pela determinação da CIM, também não mostrou relação entre HPM e aumento da

resistência, e esta ocorreu para apenas um dos antimicrobianos testados (MARTINA et al., 2014).

Embora não tenha sido possível estabelecer a relação da resistência aos antibióticos entre a população selvagem e a subpopulação resistente à rifampicina neste estudo, vale destacar que as mutações podem desempenhar um importante papel na seleção de genes que favorecem as adaptações metabólicas, *quorum sensing*, aderência à superfície do epitélio respiratório e a sobrevivência das subpopulações em ambientes com baixos níveis de oxigênio (SOUSA et al., 2017).

A diversidade genômica das espécies do CBc e a resistência intrínseca à diversos antibióticos conferem a essas bactérias uma vultosa habilidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, independente de expressarem o fenótipo HPM, sendo complexo estabelecer que hipermutabilidade é um fator determinante para persistência destes micro-organismos no ambiente pulmonar de indivíduos com FC. É necessário que mais estudos sejam realizados para elucidar o papel das cepas HPM do CBc nas infecções causadas por estas bactérias.

CONCLUSÃO

A frequência de mutação determinada em 147 amostras caracterizou 17,7% delas como HPM tendo sido observada em 40% dos pacientes colonizados cronicamente pelo Complexo *Burkholderia cepacia*;

A caracterização de amostras HPM dentre as espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* mostrou o fenótipo HPM em três das sete espécies identificadas: *B. multivorans*, foi a espécie com maior percentual de amostras HPM, seguida de *B. cenocepacia* independente do genótipo e *B. vietnamiensis*;

Entre as amostras identificadas como *B. cenocepacia*, o genótipo IIIA apresentou o maior percentual de HPM, provavelmente por representar a cepa mais virulenta da espécie, com maior potencial de adaptação à ambientes estressantes, como o do pulmão de pacientes com FC;

A análise temporal da distribuição das amostras HPM por paciente, mostrou diversos cenários sendo que a maioria dos pacientes apresentou apenas uma amostra HPM durante o acompanhamento e apenas dois pacientes mostraram todas ou a maioria das amostras classificadas como HPM;

O aparecimento do fenótipo HPM na mesma espécie (*B. cenocepacia* IIIA) após longo intervalos de tempo entre elas foi observado, sendo uma provável reinfecção pela uma mesma espécie;

O encontro da mesma espécie (*B. cenocepacia* IIIA) com fenótipo HPM e não HPM no mesmo espécime clínico (P13 e P29), sugere a possibilidade da coexistência entre a cepa selvagem e a subpopulação a qual deu origem;

A comparação do perfil de resistência entre as amostras selvagens e as subpopulações resistentes à rifampicina do CBc, não mostrou diferenças em relação aos antibióticos testados, não sendo possível estabelecer uma relação entre hipermutabilidade e o aumento da resistência aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- BECKER, K. A. et al. Sphingolipids as targets for inhalation treatment of cystic fibrosis. *Advanced drug delivery reviews* vol. 133 (2018): 66-75, Aug 2018. doi:10.1016/j.addr.2018.04.015.
- CANFIELD, G. S. et al. Evolution in Fast Forward: a Potential Role for Mutators in Accelerating Staphylococcus aureus Pathoadaptation. *Journal of Bacteriology*, v195(3)2013:615-628, Feb 2013. DOI: 10.1128/JB.00733-12.
- CHATTERJEE, N.; WALKER G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* vol. 58,5 (2017): 235-263, Jun 2017. DOI:10.1002/em.22087.
- CHOPRA I. ; O'NEIL A. J.; MILLER K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Update*. v6, issue 3, 137-145 , June 2003.
- CIOFU, O. et al. Occurrence of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in CysticFibrosis Patients Is Associated with the Oxidative StressCaused by Chronic Lung Inflammation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. vol. 49,6 2005, 2276-2282, June 2005.
- CIPOLLA, L. et al. Prevalence of Burkholderia cepacia complex species in cystic fibrosis patients in Argentina during the period 2011-2015. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* vol. 36,7 (2018): 431-434, Oct 2018. DOI:10.1016/j.eimc.2017.09.002.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing.2018.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-eighth Informational Supplement (M100-S28). 2018
- COLQUE, C. A. et al. Hypermutator Pseudomonas aeruginosa Exploits Multiple Genetic Pathways To Develop Multidrug Resistance during Long-Term Infections in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 64,5 e02142-19. 21 Apr. 2020. DOI:10.1128/AAC.02142-19.
- COOPER GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Figure 5.26, Mismatch repair in mammalian cells. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9900/figure/A807>.
- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2018 Disponível em: www.cff.org.
- Cystic Fibrosis Mutation Database. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca>
- DAVID, S. S.; O'SHEA V. E; KUNDU S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* vol. 447,7147 (2007): 941-50. doi:10.1038/nature05978
- DAVIES, J. C; ALTON, E. W. F. W.; BUSH, A. Cystic fibrosis. *BMJ (Clinical research ed.)* vol. 335,7632: 1255-9, Dec 2007. il. color.DOI:10.1136/bmj.39391.713229.AD.

- DAYAMA, G. et al. Interactions between the gut microbiome and host gene regulation in cystic fibrosis. *Genome medicine* vol. 12,1 12. 28 Jan. 2020. DOI:10.1186/s13073-020-0710-2.
- DE BOECK, K.; AMARAL, M. D. Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet. Respiratory medicine* vol. 4, 662-674, 2016 August. doi:10.1016/S2213-2600(16)00023-0.
- DENAMUR, E.; MATIC I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Molecular microbiology* vol. 60,4 (2006): 820-7, May 2016. DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x.
- 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* vol. 16,7 (2010): 821-30, Jul 2010. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03237.x.
- ELBORN, J Stuart. "Cystic fibrosis." *Lancet (London, England)* vol. 388,10059 (2016): 2519-2531, 2016 Apr. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00576-6.
- EL CHAKHTOURA, N. G. et al. A 17-Year Nationwide Study of Burkholderia cepacia Complex Bloodstream Infections Among Patients in the United States Veterans Health Administration. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 65,8 (2017): 1253-1259. doi:10.1093/cid/cix559.
- FUSCO, D. et al. Excess of mutational jackpot events in expanding populations revealed by spatial Luria–Delbrück experiments. *Nat Commun* 7, 12760 (2016). Oct 2016. <https://doi.org/10.1038/ncomms12760>.
- GOETZ, D.; REN, C. L. Review of Cystic Fibrosis. *Pediatric annals* vol. 48,4 (2019): e154-e161, 2019 Apr. DOI:10.3928/19382359-20190327-01.
- GOVAN J. RW, BROWN A. R.; JONES A. M. Evolving epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection . *Future Microbiology* vol. 2,2 (2007): 153-64, Apr 2007. DOI:10.2217/17460913.2.2.153.
- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. Disponível em: <http://portalgbefc.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC 2017.pdf>
- HASSAN, A. A.; COUTINHO C. P.; SÁ-CORREIA I. Burkholderia cepacia Complex Species Differ in the Frequency of Variation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Expression During Cystic Fibrosis Chronic Respiratory Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 9 273. 31 Jul. 2019, DOI:10.3389/fcimb.2019.00273.
- HARRISON, F. "Microbial ecology of the cystic fibrosis lung." *Microbiology (Reading, England)* vol. 153,Pt 4 (2007): 917-923. 2007 Apr. DOI:10.1099/mic.0.2006/004077-0.
- HEDDLE, J. A. On clonal expansion and its effects on mutant frequencies, mutation spectra and statistics for somatic mutations in vivo. *Mutagenesis* vol. 14,3 (1999): 257-60 May 1999. DOI:10.1093/mutage/14.3.257.
- JOLIVET-GOUGEON, A. et al. Bacterial hypermutation: clinical implications. *Journal of medical microbiology* vol. 60,Pt 5 (2011): 563-573, May 2011. DOI:10.1099/jmm.0.024083-0.

KENNA, D. T. et al. Hypermutable in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis." *Microbiology (Reading, England)* vol. 153,Pt 6 (2007): 1852-1859. Jun 2007
doi:10.1099/mic.0.2006/005082-0.

KENNA D. T. D. et al. Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology*. 2017 Apr;66(4):490-501, Mar 2017. DOI: 10.1099/jmm.0.000458.

LIEBERMAN, T. D. et al. Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. *Nature genetics* vol. 46,1 (2014): 82-7, Jan 2014. DOI:10.1038/ng.2848.

LIPUMA, J. J. Assessing Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: What More Should Be Done?. *Journal of clinical microbiology* vol. 53,7 (2015): 2006-7, Jul 2015.
doi:10.1128/JCM.01218-15.

LIPUMA, J. J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* vol. 23,2 : 299-323, Apr 2010. doi:10.1128/CMR.00068-09.

LOPES-PACHECO, M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in pharmacology* vol. 10 1662. 21 Feb. 2020, il. color.
DOI:10.3389/fphar.2019.01662.

LUTZ, L. et al. Bacteriologia da Fibrose Cística. *Rev. HCPA & Fac. Med. Univ. Fed. Rio Gd. do Sul ; 31(2): 168-184, 2011.*

LUTZ, L. et al. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. *Journal of clinical microbiology* vol. 51: 927-30, Mar 2013.

MALL, M. A.; GALIETTA, L. J. V. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* vol. 14: 561-70, June 2015. DOI:10.1016/j.jcf.2015.06.002.

MARTINA P. F. et al. *Burkholderia cepacia* complex: 11 years of surveillance in patients with Cystic Fibrosis in Posadas, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología.* , Dec 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.08.002> .

MARTINA, P. et al. Hypermutation in *Burkholderia cepacia* complex is mediated by DNA mismatch repair inactivation and is highly prevalent in cystic fibrosis chronic respiratory infection. *International journal of medical microbiology : IJMM* vol. 304,8 (2014): 1182-91, Nov 2014. DOI:10.1016/j.ijmm.2014.08.011.

MCDOWELL, A. et al. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *Journal of medical microbiology* vol. 53,Pt 7 (2004): 663-668, Jul 2004. DOI:10.1099/jmm.0.45557-0.

MENA, A. et al. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *Journal of bacteriology* vol. 190,24 (2008): 7910-7, OCT 2008 . doi:10.1128/JB.01147-08.

NANNINI et al. Polyclonal outbreak of bacteremia caused by *Burkholderia cepacia* complex and the presumptive role of ultrasound gel. *The Brazilian Journal of Infections Diseases.* 2015;1 9(5):543-545, Aug 2015.

NARAYANASWAMY V. P. et al. In Vitro Activity of a Novel Glycopolymer against Biofilms of Burkholderia cepacia Complex Cystic Fibrosis Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2019. - Vol. 63 e00498-19. 24 May. 2019. DOI:10.1128/AAC.00498-19.

Oliver, A. et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science (New York, N.Y.)* vol. 288,5469 (2000): 1251-4, May 2000. DOI:10.1126/science.288.5469.1251.

OLIVER A, MENA A. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010 Jul;16(7):798-808. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03250.x.

POPE, C F et al. "Approaches to measure the fitness of Burkholderia cepacia complex isolates." *Journal of medical microbiology* vol.59, Pt6 (2010):679-686. Jun 2010. doi:10.1099/jmm.0.017830-0

PORTER, L. A.; GOLDBERG J. B. Influence of neutrophil defects on Burkholderia cepacia complex pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 1 9. 18 Nov. 2011. doi:10.3389/fcimb.2011.00009.

PRETTO, L. et al. Genetic similarity of *Burkholderia cenocepacia* from cystic fibrosis patients. *Braz J Infect Dis* [online]. 2013, vol.17, n.1, pp.86-89, Jan 2013.ISSN 1413-8670. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.002>.

RAGUPATHI N. K. D.; VEERARAGHAVAN B. Accurate identification and epidemiological characterization of Burkholderia cepacia complex: an update . *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 18:7 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0306-0>.

RIDDERBERG W.; JENSEN HANDBERG K.; NØRSKOV-LAURITSEN N. Prevalence of hypermutator isolates of *Achromobacter* spp. from cystic fibrosis patients. *International Journal of Medical Microbiology:IJMM*. 2020 Feb;310(2):151393. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151393.

ROGERS, G. B. "Inflammation, age and changing microbiology: the search for causation in the cystic fibrosis airways." *The European respiratory journal* vol. 50,5 1701935. 16 Nov. 2017, DOI:10.1183/13993003.01935-2017.

ROJAS-ROJAS F. U. et al. El controvertido complejo Burkholderia cepacia, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenos de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* Volume 51(1), 84-92. January–March 2019.

SANZ-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO S.; MARTÍNEZ J. L. Mutational Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Resistance to Ribosome-Targeting Antibiotics. *Frontiers in genetics* vol. 9 451. 18 Oct. 2018. DOI:10.3389/fgene.2018.00451.

SCOFFONE, V. C. et al. *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Frontiers in microbiology* vol. 8 1592. 22 Aug. 2017, doi:10.3389/fmicb.2017.01592.

SOUSA, S. A. et al. "Burkholderia cepacia Complex Regulation of Virulence Gene Expression: A Review." *Genes* vol. 8,1 43. 19 Jan. 2017. DOI:10.3390/genes8010043.

TADDEI, F et al. "Role of mutator alleles in adaptive evolution." *Nature* vol. 387,6634 (1997): 700-2. June 1997. DOI:10.1038/42696.

TURRIENTES, M. C. et al. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. *Applied and environmental microbiology* vol. 76,6 (2010): 1746-58, Mar 2010. DOI:10.1128/AEM.02817-09.

TURTON, J. F et al. Identification of *Achromobacter xylosoxidans* by detection of the bla(OXA-114-like) gene intrinsic in this species. *Diagnostic microbiology and infectious disease* vol. 70,3 (2011): 408-11, Jul 2011. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.02.007.

VANDAMME, P. et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* vol. 47,4 (1997): 1188-200, Oct 1997. doi:10.1099/00207713-47-4-1188.

VIANNA, E. de F. Identificação das espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística: comparação entre as técnicas de *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry* e o sequenciamento do gene *recA*. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

WATSON JR, M. E.; BURNS J. L.; SMITH A. L. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology (Reading, England)* vol. 150,Pt 9 (2004): 2947-2958, Sep 2004. DOI:10.1099/mic.0.27230-0.

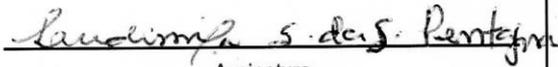
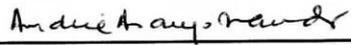
ZLOSNIK, J. E. A. et al. *Burkholderia* species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada. 30 years' experience. *Annals of the American Thoracic Society* vol. 12,1 (2015): 70-8, Jan 2015. DOI:10.1513/AnnalsATS.201408-395OC.

ANEXO - Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Complexo Burkholderia cepacia em pacientes com Fibrose Cística isolados em dois centros de referência no Rio de Janeiro: prevalência e epidemiologia molecular.			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 150			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas , Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Ludimila Santos da Silva Pentagna			
6. CPF: 094.414.387-31		7. Endereço (Rua, n.º): SOARES COUTO SANTA TEREZINHA 299 MESQUITA RIO DE JANEIRO 26554220	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: 21964346462	10. Outro Telefone:
		11. Email: ludimilapentagna@globo.com	
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>26 / 09 / 19</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ		13. CNPJ:	14. Unidade/Órgão: Faculdade de Ciências Médicas
15. Telefone: (21) 2868-8005		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: _____		CPF: _____	
Cargo/Função: _____			
Data: ____ / ____ / ____		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
<p align="right">Profª Andréa Araújo Brandão Vice Diretora / FCM Matr. 32364-2 ID. Func. 32300530</p>			