



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Edgard de Freitas Vianna

Estudo longitudinal de clonalidade em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de indivíduos com Fibrose Cística com colonização crônica das vias aéreas

Rio de Janeiro

2022

Edgard de Freitas Vianna

Estudo longitudinal de clonalidade em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de indivíduos com Fibrose Cística com colonização crônica das vias aéreas

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Rio de Janeiro

2022

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

V617 Vianna, Edgard de Freitas.

Estudo longitudinal de clonalidade em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de indivíduos com Fibrose Cística com colonização crônica das vias aéreas / Edgard de Freitas Vianna. - 2022.

135 f.

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

Coorientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

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

1. Fibrose Cística – Complicações – Teses. 2. Complexo *Burkholderia cepacia* – Genética – Teses. 3. Infecções por *Burkholderia* – Epidemiologia – 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 616.24

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Edgard de Freitas Vianna

Estudo longitudinal de clonalidade em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de indivíduos com Fibrose Cística com colonização crônica das vias aéreas

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

Aprovada em 28 de março de 2022.

Coorientador:

Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques (orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Vânia Lucia Carreira Merquior

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Mônica de Cássia Fírmida

Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

À Deus, por pertencer totalmente a Ele.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Maristela e ao meu filho Theo, por trilhar essa jornada e sonhar meus sonhos.

A minha família, em especial meus avós Terezinha e Antônio Cosme (*in memoriam*) e minha mãe Luzimar, que permitiram que eu chegasse até aqui.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Elizabeth Marques, um presente de Deus. Por me conceder a honra de ser seu aluno, um exemplo de dedicação e profissionalismo, um exemplo de vida. Não tenho palavras para agradecer todo ensinamento transmitido ao longo dessa jornada.

Ao professor Robson Leão e a família do Laboratório 2, Mila Muraro, Márcia Jones, Nicoli Izzy, Fabrina, Ingrid, Ludmila, Elisa, Yan, Jéssica, pela atenção, amizade e por todo ensinamento transmitido.

A minha eterna “equipe CBc”, Cassiana, Flávia e Érica, por todo companheirismo, ensinamento e ajuda nos momentos necessários.

Aos meus Colegas e amigos do Laboratório Richet e do Genoma-UERJ pela parceria e incentivo durante todo o projeto.

A parceria do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (LAPIH/IOC/Fiocruz), em especial a Prof. Ana Paula Assef.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À nossa incrível secretária Carla, pela atenção, dedicação e amor com que conduz seu trabalho e nos auxilia nas questões burocráticas.

A todos aqueles que torceram por mim e que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho alcançasse seu objetivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro para a execução desse projeto.

Muito obrigado!

A teoria sem a prática vira “verbalismo”, assim como a prática sem teoria vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade.

Paulo Freire

RESUMO

VIANNA, Edgard de Freitas. **Estudo longitudinal de clonalidade em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de indivíduos com Fibrose Cística com colonização crônica das vias aéreas.** 2022. 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária, multissistêmica, associada a infecção crônica e declínio da função pulmonar. A colonização crônica por cepas do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) está associada a alta transmissibilidade, virulência e resistência a múltiplos antimicrobianos, levando a um pior prognóstico. O contínuo monitoramento dessas cepas estão diretamente relacionadas as práticas de prevenção e controle de infecções. O objetivo deste trabalho foi avaliar a similaridade genética em amostras do CBc recuperadas de pacientes com FC com colonização crônica das vias aéreas, provenientes de dois centros de referência no Rio de Janeiro. O sequenciamento do gene *recA* e MALDI-TOF MS foram utilizados para identificação das espécies. A avaliação de clones e agrupamentos foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e de produtos gerados pela espectrometria de massa, respectivamente. O método de difusão em ágar foi usado para determinação da sensibilidade a meropenem, minociclina, sulfametoxazol+trimetoprima (SXT) e ceftazidima. A única amostra recuperada de sítio extra pulmonar (abscesso hepático) foi submetida ao Sequenciamento de Nova Geração (SNG). Um total de 111 amostras coletadas no período de janeiro de 2010 a fevereiro de 2018 foram analisadas. *B. vietnamiensis* (n=48/43,24%), *B. cenocepacia* IIIA (n=29/26,12%), *B. cenocepacia* IIIB (n=17/15,31%), *B. multivorans* (n=13/11,71%), *B. contaminans* (n=2/1,8%) e apenas uma (0,9%) amostra de *B. cepacia* e *B. stabilis*, foram identificadas pelo sequenciamento do gene *recA*. MALDI-TOF MS identificou 100% das amostras a nível de gênero e 63,95% a nível de espécie. Considerando a minoração do ponto de corte para ≥ 1.700 , 98 isolados (88,28%) foram identificados a nível de espécie. Como ferramenta para tipificação, MALDI-TOF MS apresentou maior poder discriminatório comparativamente ao PFGE, entretanto apresentou agrupamentos de diferentes espécies no mesmo perfil. A partir do PFGE foram caracterizados 78 pulsotipos e as espécies que apresentaram maior número de pulsotipos foram *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* IIIA. Apenas dois pulsotipos de *B. cenocepacia* IIIA foram compartilhados entre os pacientes. Dos seis pacientes que foram selecionados para análise longitudinal, a maioria apresentou colonização por diferentes espécies do CBc e pulsotipos variados, da mesma forma, nos pacientes colonizados por uma única espécie, pulsotipos variados também foram observados. Setenta e uma amostras (63,96%) apresentaram resistência a pelo menos um marcador antimicrobiano testado, destacando-se o SXT (100%). Nenhuma amostra selecionada apresentou produto de amplificação compatível ao gene *sul1*. A partir da análise do SNG, a amostra do abscesso hepático foi caracterizada como sendo ST-28 (ET12), sendo a primeira descrição deste ST no Brasil. Além disso, foram caracterizados os fatores de resistência, virulência e elementos genéticos móveis. Os resultados indicaram que MALDI-TOF MS é útil na identificação a nível de gênero, mas requer melhorias que permitam uma identificação mais precisa a nível de espécies, e maior validação como ferramenta para tipificação de amostras do CBc. Pelo PFGE, variados pulsotipos foram caracterizados demonstrando a colonização intermitente, mas poucas cepas foram compartilhadas entre os pacientes, destacando a eficácia das medidas de segregação nas instituições de referência. O gene *sul1*, não foi associado a resistência a SXT, sugerindo estar relacionada a outros mecanismos. A análise do NGS, revelou determinantes invasivos usados por *B. cenocepacia* IIIA (ET12) no processo de disseminação da bactéria para outros locais de infecção (extrapulmonar).

Palavras-chave: Complexo *Burkholderia cepacia*; fibrose cística; *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry*; Sequenciamento do gene *recA*.

ABSTRACT

VIANNA, Edgard de Freitas. *Longitudinal study of clonality in samples of Burkholderia cepacia Complex isolated from individuals with Cystic Fibrosis with chronic colonization of the airways.* 2022. 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Cystic fibrosis (CF) is a multisystem hereditary disease associated with chronic infection and decline in lung function. Chronic colonization by *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) is associated with high transmissibility, virulence and resistance to several antimicrobials, leading to a worse prognosis. Continuous monitoring of these strains is related to infection prevention and control practices. The aim of this study was to evaluate genetic similarity of Bcc isolates recovered from CF patients with chronic airways colonization, from two CF centers in Rio de Janeiro. *recA* gene sequencing and MALDI-TOF MS were used for species identification. Evaluation of clones and clusters was performed using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and products generated by mass spectrometry, respectively. Disk diffusion method was used to determine susceptibility to meropenem, minocycline, trimethoprim+sulfamethoxazole (SXT) and ceftazidime. The single isolate recovered from an extrapulmonary specimen (liver abscess) was submitted to Next Generation Sequencing (NGS). A total of 111 isolates collected from January 2010 to February 2018 were analyzed. *B. vietnamiensis* (n=48/43.24%), *B. cenocepacia* IIIA (n=29/26.12%), *B. cenocepacia* IIIB (n=17/15.31%), *B. multivorans* (n= 13/11.71%), *B. contaminans* (n=2/1.8%) and only one (0.9%) sample of *B. cepacia* and *B. stabilis* were identified by *recA* gene sequencing. Using MALDI-TOF MS 100% of isolates were identified at the genus and 63.95% at the species levels. By decreasing cut-off values for ≥ 1.700 , 98 isolates (88.28%) were identified at species level. Employing typification methods, high genetic diversity was evident by MALDI-TOF MS than PFGE, however different species was observed in an unic cluster. Using PFGE, 78 pulsotypes were characterized, *B. vietnamiensis* and *B. cenocepacia* IIIA isolates showed a higher number of pulsotypes. Only two pulsotypes of *B. cenocepacia* IIIA were shared among patients. Among six patients selected for longitudinal analysis, most of all showed colonization by different Bcc species with different pulsotypes. In patients with a single species different pulsotypes have also been observed. Seventy one isolates (63.96%) showed resistance to at least one antimicrobial, highlighting SXT (100%). None amplification product compatible with *sul1* gene was detected among selected isolates. Using NGS analysis, ST-28 (ET-12) was characterized in the isolate recovered from liver abscess. This was the first description in Brazil. In addition, resistance factors, virulence and mobile genetic elements were characterized. The results proved that MALDI-TOF MS is useful for identification at the genus level but requires improvements that allow a more precise identification at species level, and validation as a tool for Bcc isolates typification. By PFGE, several pulsotypes were characterized demonstrating intermittent colonization, and just a few strains were shared among patients, highlighting the segregation measures effectiveness in CF reference centers. The *sul1* gene was not associated with SXT resistance, suggesting relation with other mechanisms. Invasive determinants observed in *B. cenocepacia* IIIA (ET-12) related to spreading the isolate to other sites of infection (extrapulmonary) were revealed by NGS analysis.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complex; cystic fibrosis; Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry; *recA* gene sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Classes de mutações do CFTR.....	18
Figura 2 -	Prevalência de micro-organismos respiratórios encontrados na FC por idade.....	20
Quadro 1 -	Significado da pontuação e categorias obtidas através do Módulo flexAnalysis do MALDI-TOF MS	36
Figura 3 -	Dendrograma e análise de clusters das 111 amostras a partir das análises dos espectros de massa do MALDI-TOF MS.....	62
Figura 4 -	Dendrograma dos perfis de PFGE obtidos das 111 amostras do CBc...	66
Figura 5 -	Análise longitudinal a partir dos pulsotipos obtidos das amostras dos pacientes colonizados cronicamente por uma única espécie do CBc.....	69
Figura 6 -	Análise longitudinal a partir dos pulsotipos obtidos das amostras dos pacientes colonizados cronicamente por mais de uma espécie do CBc..	70
Figura 7 -	Identidade média de nucleotídeos entre as cepas 21440 e J2315.....	75
Figura 8 -	Ilhas genômicas (IG) identificadas na amostra 21440 a partir do alinhamento ao genoma da cepa J2315, cromossomos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) pelos métodos de previsão IslandViewer4 SIGI-HMM e IslandPath-DIMOB.....	83
Figura 9 -	Sequências CRISPR identificadas pela ferramenta CRISPR-Cas++.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Perfil de caracterização fenotípica das espécies do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>B. gladioli</i> e <i>Pandoraea</i> spp.....	25
Tabela 2 -	Genomas completos de espécies do CBc depositados no NCBI....	28
Tabela 3 -	<i>Sequence Typing</i> de isolados do CBc procedentes do Brasil de pacientes com FC depositados no PubMSLT.....	29
Tabela 4 -	Distribuição dos pacientes em relação ao registro da amostra, mutações do gene CFTR, data da coleta, espécime clínico e origem.....	52
Tabela 5 -	Identificação das amostras do CBc pelo Sequenciamento do gene <i>recA</i> e por espectrometria de massa pelo MALDI-TOF MS.....	55
Tabela 6 -	Desempenho entre a identificação das amostras do CBc pelo sequenciamento do gene <i>recA</i> e por espectrometria de massa pelo MALDI-TOF MS.....	59
Tabela 7 -	Perfis de não sensibilidade aos antimicrobianos das 71 amostras do CBc por instituição de atendimento.....	71
Tabela 8 -	Perfis de não sensibilidade aos antimicrobianos das 111 amostras do CBc por espécie, isoladas de 28 pacientes com FC, atendidos em dois centros de referência no Rio de Janeiro.....	72
Tabela 9 -	Amostras analisadas para detecção do gene <i>sul1</i> pela Reação em Cadeira da Polimerase.....	74
Tabela 10 -	Características genômicas da amostra 21440 a partir do sequenciamento de nova geração.....	75
Tabela 11 -	Determinantes de resistência a antimicrobianos da amostra comparada a cepa J2315.....	77
Tabela 12 -	Fatores de Virulência da amostra 21440 comparada a cepa J2315	80
Tabela 13 -	Fatores de virulência e genes de resistência encontrados em IGs da amostra 21440.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
AMR	Resistência Antimicrobiana
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrCAST	Comitê Brasileiro de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana
CAB	Columbia Ágar Base
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CD	Sequência Codificante
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CFTR1	<i>Cystic Fibrosis Mutation Database</i>
CFTR2	Clinical and Functional Translation of CFTR
CGE	<i>Center of Genomic and Epidemiology</i>
CIP	Ciprofloxacina
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Deficient</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CRISP	Repetições Palindrômicas Curtas com Espaçamento Intercalado Regularmente Agrupado
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DMIP	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifostatado
ECFSR	Registro de Pacientes da <i>European Cystic Fibrosis Society</i>
ENA	<i>European Nucleotide Archive</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>

FC	Fibrose Cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FEP	Cefepime
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FV	Fator de Virulência
GC	Guanina-Citosina
GEN	Gentamicina
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueiras
IG	Ilha Genômica
INM	Identidade Nucleotídica Média
IPM	Imipenem
IOF	Instituto Oswaldo Cruz
LABACT	Laboratório de Bacteriologia
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LEV	Levofloxacina
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MEM	Meropenem
MIN	Minociclina
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OF	Oxidação/Fermentação
OMF	Fator de Membrana Externa
PATRIC	<i>Pathosystems Resource Integration Center</i>
PB	Polimixina B
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>

PGAP	<i>Prokaryotic Genome Annotation Pipeline</i>
PHASTER	<i>PHage Search Tool Enhanced Release</i>
PHDC	Philadelphia-Washington, Distrito de Colúmbia
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
PTZ	Piperacilina-Tazobactam
PubMLST	<i>Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity</i>
QPIT	Teste Quantitativo de Iontoforese de Pilocarpina
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
REBRAFC	Registro Brasileiro de Fibrose Cística
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Solução de dodecil sulfato de sódio
SNG	Sequenciamento de Nova Geração
SI	Sequência de Inserção
ST	<i>Sequence Type</i>
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprima
TBE	Tris-Borato-EDTA
TDD	Teste de Difusão em Disco
TOB	Tobramicina
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VFDB	<i>Virulence Factor Database</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
≥	Maior ou igual a
<	Menor que
>	Maior que
+	Adição ou positivo
-	Negativo
±	Mais ou menos
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Mb	Milhões de pares de bases ou Megabases
mEq/L	Milésima parte de um equivalente grama por litro de solução
rpm	Rotação por minuto
m/z	Massa/carga
mL	Mililitro
L ou l	Litro
G ou g	Gramma
μL	Microlitro
μg	Micrograma
U	Unidade
μM	Micrômetro
V	Volts
x	Multiplicação
pb	Pares de base
s	Segundo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	17
1	OBJETIVOS.....	32
1.1	Geral.....	32
1.2	Específicos.....	32
2	METODOLOGIA.....	33
2.1	Seleção da amostragem.....	33
2.2	Reativação das amostras e caracterização por provas fenotípicas.....	34
2.3	Identificação por espectrometria de massa.....	35
2.3.1	<u>Processamento das amostras bacterianas e análise dos espectros de massa.....</u>	35
2.4	Identificação pelo sequenciamento do gene <i>recA</i>.....	36
2.4.1	<u>Obtenção do DNA bacteriano por lise térmica, quantificação e amplificação do gene <i>recA</i>.....</u>	36
2.4.2	<u>Análise do DNA bacteriano por eletroforese em gel de agarose.....</u>	37
2.4.3	<u>Purificação do produto de amplificação.....</u>	38
2.4.4	<u>Sequenciamento do gene <i>recA</i>.....</u>	39
2.4.5	<u>Análise das sequências do gene <i>recA</i>.....</u>	40
2.5	Análise e geração de agrupamentos obtidos por espectrometria de massa.....	40
2.6	Polimorfismo genético por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	41
2.6.1	<u>Suspensão de células e montagem dos blocos de agarose.....</u>	41
2.6.2	<u>Digestão do DNA dos plugs de agarose.....</u>	42
2.6.3	<u>Corrida eletroforética e coloração do gel de agarose.....</u>	42
2.6.4	<u>Análise de dados e geração de dendrograma.....</u>	43
2.7	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	43
2.7.1	<u>Método de difusão em ágar.....</u>	43
2.8	Deteção de gene de resistência <i>sul1</i> por Reação em Cadeira da Polimerase.....	43
2.8.1	<u>Obtenção do DNA bacteriano por lise térmica.....</u>	44

2.8.2	<u>Preparo da mistura da reação para a PCR e detecção do gene <i>sul1</i></u>	44
2.8.3	<u>Preparo do gel, corrida eletroforética e análise do DNA bacteriano</u>	44
2.9	Sequenciamento do genoma completo da amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar	45
2.9.1	<u>Extração e purificação do DNA</u>	45
2.9.2	<u>Biblioteca genômica</u>	45
2.9.3	<u>Sequenciamento de nova geração e montagem do genoma</u>	46
2.9.4	<u>Anotação do genoma</u>	47
2.9.5	<u>Submissão do genoma em banco de dados</u>	47
2.10	Teste de sensibilidade a antimicrobianos realizado com a amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar	47
2.10.1	<u>Método de difusão em ágar ampliado</u>	47
2.11	Análises de bioinformática a partir do sequenciamento genômico	48
2.11.1	<u>Seleção do genoma bacteriano para análise comparativa</u>	48
2.11.2	<u>Alinhamento dos genomas</u>	48
2.11.3	<u>Tipagem molecular por <i>Multilocus Sequence Typing in silico</i></u>	49
2.11.4	<u>Identificação de genes de resistência e virulência</u>	49
2.11.5	<u>Identificação de elementos móveis</u>	49
3	RESULTADOS	51
3.1	Características da amostragem	51
3.2	Identificação do CBc pelo sequenciamento do gene <i>recA</i> e por espectrometria de massa	54
3.3	Análise de agrupamentos gerados através do produto da espectrometria de massa	61
3.4	Tipagem das amostras por eletroforese em gel de campo pulsado	64
3.5	Análise longitudinal a partir da tipagem das amostras por PFGE	68
3.6	Análise comparativa entre os dendrogramas e agrupamentos obtidos através do PFGE e MALDI-TOF MS dos pacientes crônicos	68
3.7	Teste de sensibilidade a antimicrobianos	71
3.8	Detecção de gene de resistência <i>sul1</i> por Reação em Cadeira da Polimerase	73
3.9	Sequenciamento e anotação do genoma da amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar	74
3.9.1	<u>Seleção do genoma bacteriano para análise comparativa</u>	75

3.10	Teste de sensibilidade a antimicrobianos aplicado a amostra proveniente do abscesso hepático.....	76
3.11	Tipagem molecular por <i>Multilocus Sequence Typing in silico</i>.....	76
3.12	Identificação de genes de resistência.....	76
3.13	Identificação de genes de virulência.....	79
3.14	Determinação de elementos móveis.....	82
4	DISCUSSÃO.....	86
4.1	Da ocorrência das espécies do CBc identificadas através do sequenciamento do gene <i>recA</i>	86
4.2	Das variações do perfil de identificação das amostras no MALDI-TOF MS	88
4.3	Dos grupos gerados através do dendrograma por MALDI-TOF MS	90
4.4	Da tipagem molecular por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	92
4.5	Da análise longitudinal por PFGE	94
4.6	Da análise comparativa entre os dendrogramas e agrupamentos obtidos através do PFGE e MALDI-TOF MS dos pacientes crônicos	96
4.7	Da sensibilidade a antimicrobianos e detecção do gene <i>sul1</i> por PCR	97
4.8	Da análise do sequenciamento genômico da amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar	99
	CONCLUSÕES.....	104
	REFERÊNCIAS.....	106
	ANEXO A - Aprovação do comitê de ética.....	127
	ANEXO B - Comprovação de submissão do 1º artigo científico.....	134
	ANEXO C - Comprovação de submissão do 2º artigo científico.....	135

INTRODUÇÃO

Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é uma patologia autossômica recessiva, que acomete aproximadamente 80.000 pessoas em todo mundo, predominantemente ascendentes do norte da Europa, em uma proporção de 1 a cada 3.500 nascidos (YU; SHARMA, 2020).

Atingindo mais de 31.199 indivíduos nos Estados Unidos, conforme o registro anual de pacientes da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) em 2019. Mundialmente, cerca de 1.000 novos casos são diagnosticados todos os anos, com mais de 75% de pacientes diagnosticados aos 2 anos de idade (CHEN *et al.*, 2021).

De acordo com os dados mais recentes publicados no Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) até o ano de 2019 foram registrados 5.773 indivíduos com FC, e destes 2.981 (51,64%) do sexo masculino, 3.991 (69,13%) de raça branca e 1.561 (27,0%) oriundos do estado de São Paulo.

A patologia é decorrente de mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (*cftr*), que codifica uma proteína do canal iônico de classe transportadora do tipo ABC, igualmente denominada CFTR, composta por 1.480 aminoácidos, que conduz íons cloreto em membranas de células epiteliais exócrinas (LINK; NAYAK, 2020).

Mutações neste gene comprometem a função da proteína CFTR, proporcionando numerosas alterações fisiopatológicas que caracterizam as diversas manifestações clínicas em indivíduos com FC. Os movimentos de íons, fluidos e muco são comprometidos, acarretando processos inflamatórios, infecções e danos a múltiplos órgãos (SHTEINBERG *et al.*, 2021).

Devido à ampla distribuição da proteína CFTR no organismo, a FC é caracterizada como doença multissistêmica, uma vez que várias glândulas exócrinas são frequentemente afetadas, apresentando manifestações nos sistemas pulmonar, gastrointestinal e reprodutivo (FONSECA *et al.*, 2020).

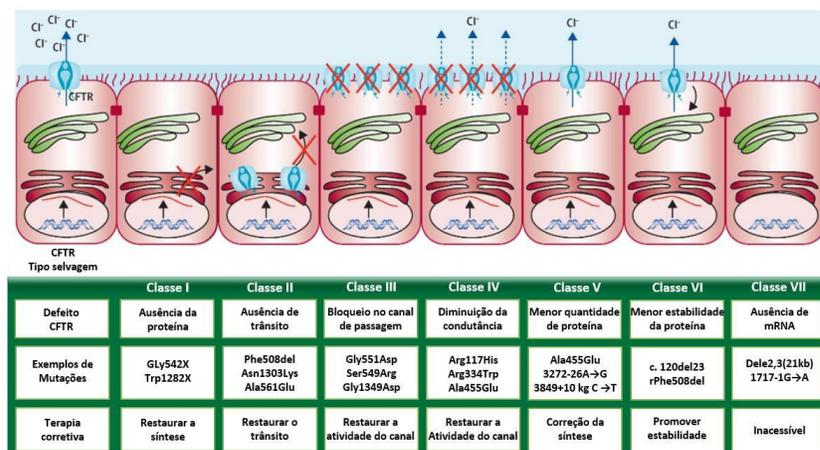
Atualmente, conforme *The Cystic Fibrosis Mutation Database* (CFTR1) disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca> e *The Clinical and Functional TRanslation of CFTR*

(CFTR2), disponível em <http://cftr2.org>. foram descritas 2.107 mutações no gene *cftr*, das quais aproximadamente 382 mutações estão relacionadas a FC. Mutações do *cftr* foram estratificadas em 7 classes com base em suas mutações classificadas em grupos de acordo com a forma como diminuem a síntese, função ou estabilidade da proteína CFTR (Figura 1).

Mutações descritas na classe I correspondem a ausência de proteína, resultam de anormalidades devido a deleções ou inserções, ou mutações sem sentido, que geram terminação prematura de códon; Mutações de Classe II levam à tradução de uma proteína que não consegue alcançar estabilidade conformacional no retículo endoplasmático acarretando em degradação prematura; As de classe III levam a um defeito do canal de passagem devido à resposta prejudicada a agonistas, embora a proteína esteja presente na membrana plasmática; Mutações de classe IV levam a atenuação na condutância do canal; Mutações de classe V levam a uma redução na abundância de proteínas de CFTR funcional devido à síntese reduzida ou maturação ineficiente de proteínas; Aquelas incluídas na classe VI levam a desestabilização do CFTR na superfície celular; e Mutações de classe VII que consideram separadamente grandes deleções que podem anular a produção de mRNA da CFTR (LOPES-PACHECO, 2019; DE BOECK, 2020; MALL *et al.*, 2020).

Novas classes vem sendo descritas com o avanço da pesquisa genômica, auxiliando no processo de compreensão das alterações celulares distintas, colaborando para o desenvolvimento de fármacos específicos (LOPES-PACHECO, 2019).

Figura 1 - Classes de mutações do CFTR.



Fonte: Adaptado de De Boeck, 2020.

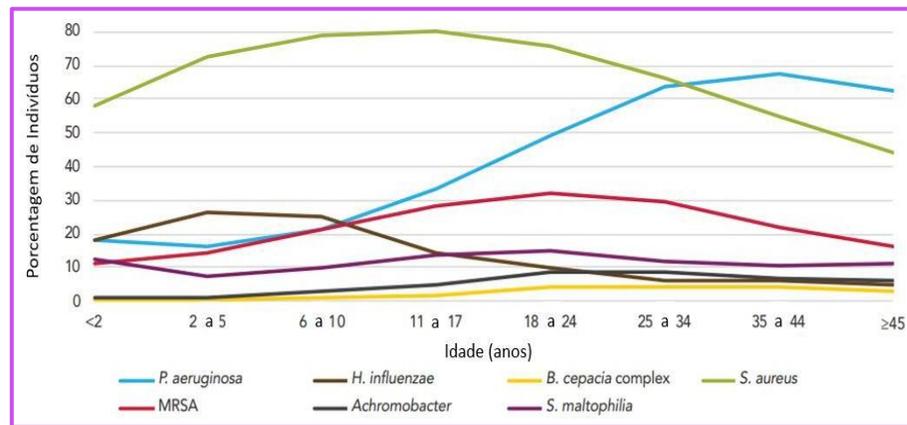
Dentre as mutações descritas, cerca de 90% dos indivíduos acometidos pela doença possuem a mutação variante F508Del (deleção da fenilalanina na posição 508), sendo 50% homocigotos, enquanto 40% heterocigotos apresentam variantes de função mínima ou função residual mais rara (DOULL, 2019).

Várias complicações podem ocorrer no sistema digestivo devido ao bloqueio dos dutos de órgãos exócrinos adjacentes por muco espesso, como o pâncreas e a vesícula biliar, o que resulta comumente em déficit nutricional, principalmente em lipídios e vitaminas (LINK; NAYAK, 2020).

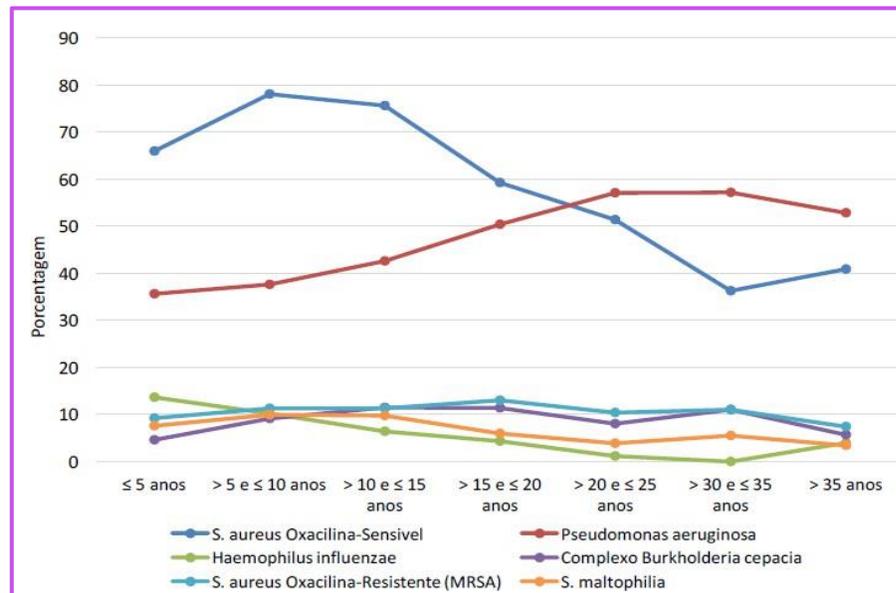
O comprometimento da função pulmonar é a principal causa de mortalidade entre os pacientes com FC. As disfunções no canal CFTR, levam ao desequilíbrio iônico, alterando o pH e a viscosidade do muco comprometendo a depuração mucociliar e imunidade inata, apresentando manifestações como pneumonias, dispneia, bronquietacias e hemoptise (STAHL, 2020). Exacerbações pulmonares são manifestações características fundamentais do comprometimento respiratório por recorrentes infecções, cronicidade, e inflamações demasiadas (NG *et al.*, 2020; STANFORD; DAVE, 2020).

Conforme dados da CFF (2019), dentre os micro-organismos predominantemente isolados na infecção pulmonar na FC estão: *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e o Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), sendo observada uma predisposição e sequência temporal na colonização das vias aéreas, de acordo com a faixa etária, apesar da antibioticoterapia constante, assim como, observado no REBRAFC (2019) (Figura 2) (MARQUES, 2011; SCIALO *et al.*, 2020; FRANÇOISE *et al.*, 2020).

Figura 2 - Prevalência de micro-organismos respiratórios encontrados na FC por idade.



(a)



(b)

Legenda: (a) Dados fornecidos pelo Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry; (b) Dados fornecidos pelo Registro Brasileiro de Fibrose Cística em pacientes acompanhados (n= 3.348).

Fonte: Adaptado de CFF e REBRAFC, 2019.

A investigação clínica para diagnóstico da FC é realizada através da triagem neonatal pela dosagem do tripsinogênio imunorreativo, que se apresenta como um marcador indireto da doença, avaliando a integridade da função pancreática do paciente. A triagem foi implementada em quase

todos os países europeus, nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Rússia, Turquia e Brasil (DE BOEK, 2020).

A comprovação do diagnóstico é realizado por meio do teste quantitativo de iontoforese de pilocarpina (QPIT), caracterizado como padrão-ouro, considerando positivos os valores de cloreto e sódio no suor maiores que 60 mEq/L em pelo menos duas aferições (SCHMIDT; SHARMA, 2020; SHTEINBERG *et al.*, 2021).

Complexo *Burkholderia cepacia* na Fibrose Cística

O Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) é classificado como um subgrupo pertencente ao gênero *Burkholderia* constituído por espécies intimamente relacionadas que possuem cerca de 97,7% de similaridade do gene 16S RNA, grandes genomas (7,5 a 8,5 Mb), valores de hibridização DNA-DNA moderados (30 a 60%) e composição de base de DNA com alto conteúdo de guanina + citosina (G+C) de aproximadamente 62 a 68 mol%. Destacando-se por serem fenotipicamente indistinguíveis (LIPUMA *et al.*, 2001; VANDAMME; DAWYNDT, 2011; RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019).

Atualmente o CBc é composto por 24 espécies amplamente distribuídas no meio ambiente: *Burkholderia aenigmatica*, *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia catarinenses*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia contaminans*, *Burkholderia difusa*, *Burkholderia dolosa*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia latens*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia paludis*, *Burkholderia puraquae*, *Burkholderia pseudomultivorans*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia stagnalis*, *Burkholderia territorii*, *Burkholderia ubonensis* e *Burkholderia vietnamiensis* (DE SMET *et al.*, 2015; ONG *et al.*, 2016; BACH *et al.*, 2017; WEBER; KING, 2017; MARTINA *et al.*, 2018; DEPOORTER *et al.*, 2020).

Os micro-organismos pertencentes ao CBc estão entre os patógenos oportunistas mais importantes isolados em indivíduos com FC e em infecções relacionadas à assistência à saúde, destacando sua maior virulência em pacientes colonizados cronicamente. De acordo com a CFF (2019), 2,6% (811) dos pacientes em acompanhamento são colonizados pelo CBc.

No panorama nacional, conforme o último relatório realizado em 2019 do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC), considerando o total de 3.348 pacientes, CBc foi identificado em 280 pacientes (8,36%), apresentando-se como o quarto principal micro-organismo isolados nesses pacientes.

Epidemiologicamente, *B. multivorans* e *B. cenocepacia* são as espécies mais comumente encontradas em pacientes com FC, apresentam maior transmissibilidade entre pacientes, declínio acelerado da função pulmonar e aumento da mortalidade antes e após o transplante pulmonar (RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019; BLANCHARD; WATERS, 2019).

A espécie *B. cenocepacia* destaca-se como a principal responsável pelo quadro de pneumonia necrosante, agravamento da insuficiência respiratória e bacteremia, muitas vezes fatal denominada “síndrome cepacia” (ABBOTT *et al.*, 2016).

A partir do sequenciamento genético do gene *recA* a espécie *B. cenocepacia* foi segmentada em quatro subgrupos filogenéticos (IIIA a IIID), destacando-se epidemiologicamente os grupos IIIA e IIIB (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000).

Cepas do subgrupo *B. cenocepacia* IIIA, como a ET-12 (ST-28) e a Tcheca (ST-32) foram responsáveis por epidemias no Canadá e na Europa. A disseminação global da cepa ET-12 foram associadas ao contato entre pacientes em acampamentos de verão organizados para indivíduos com FC. Além disso, as exacerbações pulmonares mostram-se mais comuns e significativas em pacientes colonizados cronicamente por essa cepa (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010; SOMAYAJI *et al.*, 2020).

Já, cepas epidêmicas do subgrupo *B. cenocepacia* IIIB foram encontradas predominantemente nos Estados Unidos da América (EUA), incluindo o clone Midwest e PHDC (Philadelphia–Washington, DC), disseminadas também em pacientes europeus (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010; LIPUMA *et al.*, 2010).

Embora surtos causados por cepas de *B. multivorans* tenham sido descritos em centros de tratamento nos EUA (ST-25, ST-179) e na França (ST-16), estudos sugerem que as cepas são adquiridas de fontes não humanas, como o ambiente natural (água, solo, entre outros) (BIDDICK *et al.*, 2003; BALDWIN *et al.*, 2008; PEETERS *et al.*, 2017; LOOD *et al.*, 2021).

Burkholderia contaminans destaca-se como a espécie mais frequentemente reportadas em pacientes FC espanhóis e argentinos. As infecções são de natureza transitória, e não associadas a um declínio na função pulmonar, sendo importante ressaltar que as circunstâncias que levam ao

estabelecimento de infecções por *B. contaminans* ainda permanecem desconhecidas, apesar de estudos sugerirem uma origem ambiental e/ou nosocomial (NUNVAR *et al.*, 2016; CIPOLLA *et al.*, 2017; SAVI *et al.*, 2019).

Burkholderia vietnamiensis torna-se particularmente interessante pela capacidade de fixação de nitrogênio que a liga fortemente a reservatórios ambientais, podendo ser considerada um excelente modelo para investigação quanto a aquisição na comunidade e sua adaptação pulmonar (CESCUTTI *et al.*, 2013). Como característica fundamental dessa espécie, observa-se uma maior sensibilidade a aminoglicosídeos como à tobramicina e azitromicina comparativamente a outras espécies do CBc (RHODES; SCHWEIZER, 2016).

Devido ao avanço e a otimização de técnicas no processo de identificação, novas espécies vem sendo descritas e inseridas dentro do CBc, a identificação dessas espécies torna-se indispensável para pacientes com FC, implicando na escolha de melhores estratégias de tratamento e controle da infecção (MARQUES, 2011; RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019).

Identificação do Complexo *Burkholderia cepacia*

As espécies do CBc são classificadas nas etapas de identificação presuntiva como bacilos Gram negativos não fermentadores, não-formadores de esporos, aeróbicos, móveis, catalase positivo e oxidase variável, produtoras ou não de pigmentos, hemólise variável e temperatura para o crescimento variando entre 30°C e 35°C (VANDAMME *et al.*, 1996; LIPUMA *et al.*, 2010).

Apesar do amplo perfil de provas bioquímicas, a identificação fenotípica das espécies torna-se limitada devido a variabilidade dos resultados e a não completude de todas as espécies (Tabela 1). Assim como, a imprecisão dos sistemas comerciais automatizados para identificação do CBc demonstram baixa sensibilidade e especificidade, com isolados erroneamente identificados como *Burkholderia gladioli*, *Pandoraea* spp., *Ralstonia pickettii*, *Achromobacter xylosoxidans*, e *Stenotrophomonas maltophilia* (LIPUMA *et al.*, 2001).

Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) como aplicação proteômica baseada em espectrometria de massa tem sido utilizado na prática clínica, apresentando vantagens como facilidade, velocidade e precisão

quando comparada aos métodos bioquímicos convencionais, ainda que seu elevado custo inicial limite a inserção dessa metodologia na maioria dos laboratórios (TSUCHIDA *et al.*, 2020).

Entretanto, estudos realizados com isolados do CBc utilizando o MALDI-TOF MS apontam altas taxas de concordância para identificação em nível de gênero (97 a 100%) e grande oscilações para identificação correta em nível de espécie (23 a 97%), requerendo ainda aprimoramento da técnica (DE DIOS *et al.*, 2016; VICENZI *et al.*, 2016; SFEIR, 2018; Poonawala *et al.*, 2018; FURLAN *et al.*, 2019; WONG *et al.*, 2020).

Devido às inconsistências na identificação das espécies do CBc por métodos fenotípicos, alvos moleculares como os genes: 16S rRNA, *recA*, *hisA* e *rpsU* são amplamente utilizados para discriminação das espécies do CBc. O sequenciamento do gene *recA* (proteína essencial para reparação e recombinação do DNA) destaca-se como a metodologia de referência, apresentando entre 94% a 95% de similaridade entre os diferentes genomovares (iniciadores específicos das espécies) MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000; RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019; JIN *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Perfil de caracterização fenotípica das espécies do Complexo *Burkholderia cepacia*, *B. gladioli* e *Pandoraea* spp.

Test	B. cepacia complex																			
	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. anthina</i>	<i>B. arboris</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. contaminans</i>	<i>B. diffusa</i>	<i>B. dolosa</i>	<i>B. lata</i>	<i>B. latens</i>	<i>B. metallica</i>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. pseudomultivorans</i>	<i>B. pyrrocinia</i>	<i>B. seminalis</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. ubonensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. gladioli</i>	<i>Pandoraea</i> spp.
Oxidase ^b	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	+	V	V
Growth:																				
MacConkey ^c	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
BCSA ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V
42°C ^c	V	V	V	V	V	V	V	+	-	+	+	+	+	V	+	-	V	+	-	V
Yellow pigment	V	-	V	-	V	V	-	-	V	-	V	-	-	V	V	-	-	-	V	-
Brown pigment	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-
Hemolysis ^d	V β	-	V β	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	V β	-	-	-	V β	-	-
Acid from ^e :																				
Maltose ^b	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Lactose ^b	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	-
D-Xylose ^c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	+	-
Sucrose ^b	+	V	V	+	V	+	V	-	V	+	V	-	-	V	V	-	+	+	-	-
Adonitol ^b	+	V	+	V	V	+	V	+	V	+	+	+	V	+	+	+	-	-	+	-
Nitrate reduction ^{c,g}	V	V	V	V	-	V	+	+	V	-	-	+	V	V	-	-	V	V	V	V
Lysine decarboxylase ^b	+	V	V	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	-	+	-	-
Ornithine decarboxylase ^c	-	-	+	V	V	-	-	-	V	-	-	-	-	V	V	+	-	-	-	-
Esculin hydrolase ^{c,g}	V	-	-	V	V	V	-	-	V	-	+	-	-	-	V	-	-	-	V	-
Gelatinase ^{c,g}	+	-	+	V	V	+	V	-	V	V	+	-	-	V	+	+	+	-	V	-
PNPG or ONPG ^{b,f}	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	V

Legenda: a +, >90% dos isolados são positivos; V, 10 a 90% são positivos; -, <10% dos isolados são positivos; b Número de amostras de cada espécie testada: *B. ambifaria*, 51; *B. anthina*, 24; *B. arboris*, 16; *B. cenocepacia*, 928; *B. cepacia*, 181; *B. contaminans*, 54; *B. diffusa*, 16; *B. dolosa*, 57; *B. lata*, 25; *B. latens*, 6; *B. metallica*, 7; *B. multivorans*, 715; *B. pseudomultivorans*, 11; *B. pyrrocinia*, 85; *B. seminalis*, 19; *B. stabilis*, 73; *B. ubonensis*, 2; *B. vietnamiensis*, 145; *B. gladioli*, 280; e *Pandoraea* spp., 75. c Número de amostras de cada espécie testada: *B. ambifaria*, 18; *B. anthina*, 16; *B. arboris*, 13; *B. cenocepacia*, 139; *B. cepacia*, 23; *B. contaminans*, 7; *B. diffusa*, 6; *B. dolosa*, 12; *B. lata*, 11; *B. latens*, 6; *B. metallica*, 3; *B. multivorans*, 109; *B. pseudomultivorans*, 11; *B. pyrrocinia*, 5; *B. seminalis*, 13; *B. stabilis*, 27; *B. ubonensis*, 2; *B. vietnamiensis*, 36; *B. gladioli*, 27; e *Pandoraea* spp., 9. d Hemólise em sangue de carneiro; β, beta-hemólise; e As provas de oxidação foram registradas após 2-7 dias de incubação; f PNPG, p-nitrofenil-b-d-glicosídeo; g Os resultados apresentados foram obtidos com o API 20NE test strip.

Fonte: LIPUMA *et al.*, 2015.

Tipagem por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A tipagem bacteriana apresenta-se como ferramenta para discriminar cepas bacterianas extensamente utilizada na investigação de surtos e controle epidemiológico. A *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) ou eletroforese em gel de campo pulsado é considerada como abordagem

molecular de terceira geração para tipagem de bactérias. É uma técnica complexa com um poder discriminatório muito elevado (NEOH *et al.*, 2019; LOPEZ-CANOVAS *et al.*, 2019).

A técnica necessita do uso de eletroforese em gel de agarose em campo pulsado para segregar enzimas ou fragmentos de DNA do genoma, dependentes do tamanho molecular de cada fragmento, inferindo a atribuição clonal da bactéria testada subsequentemente baseada nas bandas de DNA separadas por padrões (NEOH *et al.*, 2019; LOPEZ-CANOVAS *et al.*, 2019).

Através de PFGE, foi possível analisar a transmissibilidade de cepas do CBc em centros de tratamento no Canadá, em 2002, entre indivíduos com FC, indicando que as cepas da espécie *B. cepacia* (Genomovar III) foram as mais potencialmente transmissíveis (SPEERT *et al.*, 2002).

Entre 2011 e final de 2012, foi realizado um estudo epidemiológico de surtos nosocomiais por *B. cepacia* em pacientes com FC do Hospital Masih Daneshvary, no Irã. Todas as amostras apresentaram um padrão de PFGE análogo com 100% de similaridade, inferindo que as infecções observadas possam ter se espalhado a partir de uma única fonte (DALLAL *et al.*, 2014). Assim como, observado em estudo epidemiológico de monitoramento em pacientes portadores ou não de FC no Reino Unido, revelando representantes de *B. cenocepacia* ET-12 entre a população (KENNA *et al.*, 2017).

A partir da análise da similaridade de espectros de massa entre cepas do mesmo clone, MALDI-TOF MS junto a programas de bioinformática tem sido avaliado como ferramenta de tipificação, usado com êxito em alguns isolados de *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium difficile*, *Salmonella entérica* e *Yersinia enterocolitica*, entre outros. Apresentando vantagens aos métodos de referência como PFGE e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (KARGER, 2016; SAUGET *et al.*, 2017; STEENSELS *et al.*, 2017).

Entretanto, ainda são necessários estudos que validem a aplicação do MALDI-TOF MS com esta finalidade, tendo em vista sua baixa reprodutibilidade e variação nos resultados de algumas bactérias como, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, *E. coli* (ST131, ST69, ST405, ST393), *V. cholera*, *Enterococcus* resistente à vancomicina, que mostram *clusters* diferentes do obtido no PFGE (JIANG *et al.*, 2019; RANGBERG *et al.*, 2019; NEOH *et al.*, 2019). Até o momento apenas um estudo empregando a metodologia da espectrometria de massa com a finalidade de tipagem em espécies do CBc foi encontrado com amostras de *B. contaminans* (FIAMANYA *et al.*, 2021).

Sequenciamento de Nova Geração (SNG)

Com o avanço de metodologias aplicadas ao estudo da genética, o sequenciamento de nova geração (SNG), ou sequenciamento do genoma completo (SGC) tem sido empregado cada vez mais na microbiologia médica e aplicada como ferramenta de alta *performance* para a pesquisa genômica (BALLOUX *et al.*, 2018).

A partir das informações obtidas através do NGS, múltiplas aplicações são possíveis como: análise filogenética, tipagem de micro-organismos com maior precisão comparativamente às metodologias atuais aplicadas (PFGE e MLST), identificação de genes de resistência antimicrobiana (AMR) e genes relacionados a virulência, análise do mobiloma (detecção de plasmídeos, sequencias de inserção, ilhas genômicas, bacteriófagos), entre outros (BALLOUX *et al.*, 2018; ROSSEN *et al.*, 2018).

Atualmente, 1.987 genomas completos de espécies do CBc foram depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) e *European Nucleotide Archive (ENA)/GenBank*, totalizando 3.717 sequências genômicas (*shotgun*) (Tabela 2).

Recentemente, em 2019, um grupo de estudos em Toronto, Canadá, descreveu a transmissão de uma cepa *B. cenocepacia* ET-12 (ET12-Bc) em um centro de atendimento a indivíduos com FC, no período de 2008 a 2017. Os isolados foram analisados usando o NGS permitindo a investigação epidemiológica sugerindo a transmissão das cepa, apesar das precauções de controle de infecção aplicadas (BLANCHARD *et al.*, 2020).

A ampliação do banco de dados de NGS de cepas do CBc ajudarão a identificar clones específicos de cada região, sendo útil na vigilância epidemiológica (RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019).

Tabela 2 - Genomas completos de espécies do CBc depositados no *National Center for Biotechnology Information*

<i>Espécies do CBc</i>	<i>Genoma</i>	<i>Cromossomos</i>	<i>Plasmídeos</i>
<i>B. aenigmatica</i>	7	0	0
<i>B. ambifaria</i>	83	3	5
<i>B. anthina</i>	32	3	2
<i>B. arboris</i>	6	0	0
<i>B. catarinenses</i>	1	0	0
<i>B. cenocepacia</i>	446	3	3
<i>B. cepacia</i>	237	3	2
<i>B. contaminans</i>	91	3	3
<i>B. difusa</i>	20	3	0
<i>B. dolosa</i>	23	3	0
<i>B. lata</i>	19	3	0
<i>B. latens</i>	9	3	1
<i>B. metallica</i>	10	3	0
<i>B. multivorans</i>	368	3	2
<i>B. paludis</i>	3	0	0
<i>B. puraquae</i>	2	0	0
<i>B. pseudomultivorans</i>	12	2	1
<i>B. pyrrocinia</i>	14	3	1
<i>B. seminalis</i>	16	3	0
<i>B. stabilis</i>	9	3	1
<i>B. stagnalis</i>	105	3	0
<i>B. territorii</i>	38	3	0
<i>B. ubonensis</i>	309	3	1
<i>B. vietnamiensis</i>	127	3	5

Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Burkholderia%20cepacia%20complex%20\[Organism\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Burkholderia%20cepacia%20complex%20[Organism])

A partir do NGS é possível a realização *in silico* do MLST, determinando o *Sequence Typing* (ST) com base na variação de nucleotídeo entre as sequências de DNA de genes conservados, classificados conforme seu perfil alélico (SCHÜRCH *et al.*, 2018).

De acordo com a plataforma *Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity* (PubMLST), atualmente foram submetidos 3.747 isolados pertencentes ao CBc, sendo 2.073 provenientes de indivíduos com FC e classificados um total de 683 STs. Destes, 43 isolados são procedentes do Brasil, possuindo 24 STs classificados (Tabela 3).

Tabela 3 - *Sequence Typing* de isolados do Complexo *Burkholderia cepacia* procedentes do Brasil de pacientes com FC depositados no PubMSLT (continua)

<i>Isolados</i>	<i>Espécies do CBc</i>	<i>Genomovar</i>	<i>Ano</i>	<i>ST</i>
R-24988	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	1996	1563
270t1	<i>B. pseudomultivorans</i>	-	1997	393
R-24955	<i>B. multivorans</i>	II	1998	24
LMG 31097	<i>B. vietnamiensis</i>	-	1999	1731
R-66712	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2011	369
R-66716	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	2011	911
R-66728	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2011	1046
R-66734	<i>B. difusa</i>	-	2011	1047
R-66738	<i>B. cepacia</i>	I	2011	1049
R-66750	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2011	1056
R-66755	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2011	1056
R-66766	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2011	1056
R-66754	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2011	1057
R-66730	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2012	369
R-66715	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	2012	911
R-66729	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	2012	911
R-66732	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	2012	911
R-66724	<i>B. contaminans</i>	-	2012	1045
R-66742	<i>B. multivorans</i>	II	2012	1051
R-66745	<i>B. cenocepacia</i>	IIIA	2012	1052
R-66748	<i>B. cenocepacia</i>	IIIA	2012	1054
R-66761	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2012	1056
R-66765	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2012	1057
R-66737	<i>B. vietnamiensis</i>	-	2012	1057
R-66740	<i>B. multivorans</i>	II	2013	17
R-66744	<i>B. multivorans</i>	II	2013	17
R-66695	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	369
R-66722	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	369
R-66725	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	369
R-66733	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	369
R-66735	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	369
R-66721	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	2013	911
R-66739	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	1050
R-66747	<i>B. cenocepacia</i>	IIIA	2013	1053
R-66749	<i>B. cenocepacia</i>	IIIA	2013	1055
R-66753	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2013	1057
R-66731	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2014	369

Tabela 3 - *Sequence Typing* de isolados do Complexo *Burkholderia cenocepacia* procedentes do Brasil de pacientes com FC depositados no PubMSLT (conclusão)

R-66762	<i>B. vietnamiensis</i>	V	2014	1056
MS-2140	<i>B. cenocepacia</i>	IIIA	2018	28
R-24989	<i>B. cenocepacia</i>	IIIB	-	381
Bv-27	<i>B. cenocepacia</i>	IIIA	-	382
R-24929	<i>B. arboris</i>	-	-	1339
R-22005	<i>B. seminalis</i>	-	-	1398

Fonte: Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity

Disponível em: <https://pubmlst.org>

Resistência aos antimicrobianos

As infecções causadas por espécies do CBc são desafiadoras, pois exibem resistência significativa a muitos antimicrobianos. Estes microorganismos são capazes de aderir às células epiteliais e a mucina, invadindo e adaptando-se no interior das células epiteliais das vias aéreas e macrófagos, assim como, a capacidade da formação de biofilmes (LORD *et al.*, 2020).

As espécies do CBc destacam-se por serem intrinsicamente resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, devido a mecanismos como, bombas de efluxo (RND-1, RND-3, RND-4, RND-8, RND-9 e RND-10), produção de β -lactamases PenA, PenB e PenR (*AmpR*), fator sigma alternativo RpoE e barreira de permeabilidade da membrana externa (lipopolissacarídeos e porinas) (RHODES; SCHWEIZER, 2016; RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019).

Devido as espécies do CBc apresentarem extenso perfil de resistência aos antimicrobianos na clínica laboratorial, os critérios interpretativos dos testes específicos de sensibilidade disponíveis são apenas para um número limitado de antimicrobianos. Conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2020), testes de sensibilidade poderão ser utilizados para os seguintes antimicrobianos: ceftazidima, cloranfenicol, levofloxacina, meropenem, minociclina, sulfametoxazol-trimetoprima e ticarcilina-clavulanato.

Entretando, devido a grande variabilidade e má reprodutibilidade dos testes, implicando diretamente na inconsistência entre os resultados clínicos e resultados de susceptibilidade, o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e o Comitê Brasileiro de

Teste de Suceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST), não preconizam pontos de corte, e não recomendam a utilização do teste de sensibilidade na orientação da farmacoterapia (REGAN; BHATT, 2019; LORD *et al.*, 2020; WOOTTON *et al.*, 2020; HUSE *et al.*, 2021).

Não há um consenso sobre a melhor maneira de tratar essas infecções e ainda não existem protocolos de tratamento padrão para erradicação. No entanto, o tratamento de exacerbações pulmonares em pacientes infectados por CBc, baseia-se na utilização de sulfametoxazol-trimetoprima, como primeira droga de escolha, seguida de ceftazidima e cefalosporinas de espectro estendido, uma vez que há resistência intrínseca a ação de muitas outras classes de antimicrobianos. Acredita-se que a erradicação bem-sucedida reduza o declínio da função pulmonar, ou seja, a morbimortalidade, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (FROST *et al.*, 2021; HUSE *et al.*, 2021).

Justificativa

As infecções crônicas 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 não só pela elevada resistência a antimicrobianos, como pelo desenvolvimento de mecanismos adaptativos em resposta a condições de estresse locais, como antibioticoterapia, disponibilidade de nutrientes e limitação de oxigênio, produzindo múltiplas variantes fenotípicas que emergem da linhagem clonal inicial.

A utilização de diversas ferramentas moleculares permite o maior conhecimento da epidemiologia das infecções pelo CBc, corroborando as evidências de que pacientes com FC podem adquirir patógenos de outros pacientes com FC.

Proceder à investigação de quais cepas circulam nesses pacientes pode viabilizar a caracterização dos clones mais comuns no Brasil, estabelecer a relação entre eles, e com outros já relatados ao redor do mundo, além de permitir uma análise evolutiva nas infecções crônicas.

Esse estudo justifica-se ante à necessidade de monitoramento de pacientes com FC colonizados cronicamente por cepas do CBc.

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a similaridade genética em amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) recuperadas de pacientes com Fibrose Cística com colonização crônica das vias aéreas, provenientes de dois centros de referência na cidade do Rio de Janeiro

1.2 Específicos

- a) Identificar as espécies do CBc por espectrometria de massa e analisar a formação de agrupamentos pela análise dos perfis gerados;
- b) Identificar as espécies do CBc pela análise do sequenciamento do gene *recA*;
- c) Analisar o polimorfismo genético das amostras através da *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*;
- d) Analisar comparativamente os dendrogramas e agrupamentos obtidos através do PFGE e MALDI-TOF MS das amostras isoladas dos pacientes crônicos;
- e) Determinar a sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados na clínica para tratamento das infecções pelo CBc;
- f) Determinar a presença do gene de resistência *sul1* por Reação em Cadeia da Polimerase;
- g) Realizar o sequenciamento do genoma completo de uma amostra do CBc isolada de espécime clínico extra pulmonar; e
- h) Aplicar análises de bioinformática a partir do sequenciamento genômico da amostra isolada do sítio extra pulmonar.

2. METODOLOGIA

2.1 Seleção da amostragem

Foram selecionadas 189 amostras bacterianas do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) da coleção de bactérias do Laboratório 02 – Microbiologia da Fibrose Cística (LabMiFC), do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), compreendendo o período de coleta de janeiro de 2010 a fevereiro de 2018.

As amostras em estoque foram oriundas de diversificados espécimes clínicos (secreção de orofaringe, escarro e sangue) identificados inicialmente como pertencentes ao CBc pelo Laboratório de Bacteriologia (LABACT) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), responsável pelo acompanhamento microbiológico dos pacientes, de acordo com protocolos específicos utilizados por este laboratório (ITA-BAC-010/2015 FC/LABACT/HUPE).

As amostras do CBc foram provenientes de pacientes com FC apresentando colonização pulmonar crônica. Estes identificados como crônicos quando apresentaram no mínimo três culturas positivas para CBc no período de seis meses (LEE *et al.*, 2003).

Os pacientes foram assistidos pela equipe de FC da Policlínica Piquet Carneiro/HUPE e do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueiras (IFF) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Ambos centros de referência em FC no estado do Rio de Janeiro, no tratamento de pacientes adultos e pediátricos, respectivamente.

Dados demográficos foram obtidos e posteriormente as amostras bacterianas em estoque, e coletadas as informações, tais como: nome do paciente, primeira e segunda variantes do gene CFTR, centro de referência, número de matrícula do paciente na instituição de saúde, data da coleta, número de registro interno atribuído a amostra, espécime clínico e identificação prévia dos microorganismos realizadas por métodos fenotípicos.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto através da Plataforma Brasil (Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde), CAAE 16427019.8.0000.5259 (Ref. 3.460.239) (Anexo A).

Por tratar-se de um estudo retrospectivo e descritivo, não foi necessária a solicitação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Assim como, não houve solicitação de exames adicionais aos pacientes. Os dados foram divulgados através de códigos que não identificaram os indivíduos.

2.2 Reativações das amostras, viabilidade e triagem por provas fenotípicas

As amostras bacterianas foram obtidas da coleção de bactérias, onde foram conservadas a -70°C em meio *Skim Milk* (DIFCO, Hants, Inglaterra), acrescido de 20% de glicerol. Uma alíquota de aproximadamente 100 μL foi retirada e semeada em Caldo Infuso de Cérebro e Coração - *Brain Heart Infusion Broth* – BHI (Becton Dickinson/BD[®], Heidelberg, Alemanha), incubadas sob agitação por 20 a 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em aerobiose.

Após crescimento em meio líquido, alíquotas foram semeadas por esgotamento em ágar *Cystine Lactose Electrolyte Deficient* – CLED (BD[®]) com a finalidade de serem observadas quanto a viabilidade e pureza das amostras, iniciando a identificação através da análise morfológica das colônias. As placas foram incubadas por 48 a 72 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica.

Posterior ao crescimento em CLED, colônias de cada amostra foram semeadas em Columbia Agar Base - CAB (BD[®], Heidelberg, Alemanha), incubadas por 24 a 48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica, para realização das provas bioquímicas/fenotípicas.

Após a obtenção de cultura pura recente em meio sólido, foram realizados os testes fenotípicos como triagem para inclusão no CBc, utilizando os seguintes meios para a identificação: *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 (BD[®], Heidelberg, Alemanha), desaminação da arginina (BD[®]), descarboxilação da ornitina (BD[®]) e para realização da prova de verificação da citocromo-oxidase foram utilizadas tiras comerciais (NEWPROV[®], Paraná, Brasil).

Como referência para identificação fenotípica foi observado o preconizado pela *American Society of Microbiology* na 11^a edição do Manual de Microbiologia Clínica (LIPUMA *et al.*, 2015).

2.3 Identificação por espectrometria de massa

2.3.1 Processamento das amostras bacterianas e análise dos espectros de massa

As amostras que apresentaram o perfil de provas fenotípicas para o CBc, foram selecionadas e semeadas em ágar sangue de carneiro 5% (ASC) (PlastLabor®, Rio de Janeiro, Brasil) incubadas por 24 h a 48 h a 35 °C \pm 2°C, em estufa bacteriológica. Uma colônia de cada amostra bacteriana foi aplicada em duplicata com o auxílio de palito de madeira à placa de aço inoxidável em triplicata. Após aplicação da colônia, adicionou-se 1 μ L de ácido fórmico a 98% e foi adicionado 1,0 μ L solução matricial saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha).

Utilizando o instrumento Microflex LT - Bruker Daltonics MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha), os espectros de massa foram determinados pelo programa MALDI Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha), adquiridos em modo de íons positivos lineares a uma frequência de laser de 60 Hz através de uma relação massa/carga (m/z) de 2.000 a 20.000 Da. realizada por análise automatizada e interativa dos dados pelo Módulo FlexControl™ v. 3.3 (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha).

Os espectros de massa por meio dos valores de escore (pontuação) atribuídos foram eletronicamente transformados em uma lista de picos comparados a um banco de dados de referência, obtendo um escore (log) calculado entre 0.000 e 3.000.

Os espectros de massa das amostras foram analisados através do Módulo flexAnalysis™ v. 3.3 (Bruker Daltonics GmbH®) e considerados os critérios interpretativos pelo fabricante (Tabela 1), seguidos de adaptações por Rocca e colaboradores (2020), e Wong e colaboradores (2020):

Quadro 1 - Significado da pontuação e categoria obtidas através do Módulo flexAnalysis™ do MALDI-TOF MS

		<i>Descrição</i>	<i>Cor</i>
Pontuação	2.300 – 3.000	Alta probabilidade de identificação da espécie	Verde
	2.000 – 2.299	Segura identificação do gênero, Identificação provável da espécie	Verde
	1.700 – 1.999	Provável identificação do gênero	Amarelo
	0.000 – 1.699	Identificação não confiável	Vermelho
Categorias	A	Consistência na espécie: a melhor pontuação foi classificada com a coloração verde. Outras pontuações que se enquadram na coloração verde foi classificada como pertencente a mesma espécie que o primeiro. A primeira pontuação na faixa amarela foi classificada como pelo menos do mesmo gênero do primeiro.	
	B	Consistência no gênero: a melhor pontuação foi classificada como verde ou amarelo. Outras pontuações que se enquadram na coloração verde ou amarela foram classificadas como pertencente ao mesmo gênero do primeiro.	
	C	Sem consistência: Não apresenta consistência de gênero e espécie. Verificar a existência de misturas microbianas.	

Fonte: Adaptado do manual do usuário do MALDI Biotyper CA System.

Quando um valor de pontuação ≥ 2.000 foi alcançado, a divergência das pontuações entre a ordem de classificação de identificação das espécies foi analisada, obedecendo a diferença de 10% (0.200) entre a primeira espécie e a seguinte.

O calibrador padrão de massa *Bruker Bacterial Test Standard* (Bruker Daltonics GmbH®) composto do extrato de alfa peptídeo de *E. coli* DH5 e proteínas adicionais foi utilizado como calibrador dos espectros de massa do equipamento, assim como as cepas controles de *B. cepacia* ATCC® 25608, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 e *E. coli* ATCC® 25922.

2.4 Identificação pelo Sequenciamento do gene *recA*

2.4.1 Obtenção do DNA bacteriano por lise térmica, quantificação e amplificação do gene *recA*

As amostras foram semeadas no meio CAB (BD[®]), incubadas por 24 h a 48 h a 35 °C ±2°C, em estufa bacteriológica, alíquotas por meio de alça bacteriológica foram ressuspensas em 600 µL de água deionizada, posteriormente aquecidas por 10 min à 100°C e submetidas a centrifugação por 30 segundos em 16.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante contendo DNA obtido por lise térmica (SAMBROOK *et al.*, 1989) foi armazenado em tubo de polipropileno e utilizado para realização da PCR.

O DNA bacteriano obtido foi quantificado pelo fluorímetro Qubit[®] v. 2.0 (Invitrogen[™], Eugene, OR, USA). A reação de PCR para o gene *recA* foi realizada conforme desenvolvido por Mahenthiralingam e colaboradores (2000), com adaptações. Foram utilizados 10 ng do produto de extração adicionados a 50 µL de mistura de reação para PCR, contendo 0,2 U/µL de Platinum *Taq* DNA polimerase, 1 µL (250 µM) de cada desoxinucleotídeo trifosfatado - dNTP, 1,5 µL (1,5 µM) de MgCl₂ e 5 µL de tampão 5X para PCR (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA). Vinte picomoles de cada iniciador foram adicionados à reação e água deionizada qsp 100 µL. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems[®], Califórnia, USA), utilizando desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C (temperatura de hibridação dos iniciadores) e 90 segundos a 72°C. Uma extensão final de 10 minutos a 72°C foi aplicada ao término dos ciclos.

Para obtenção do produto de amplificação (1040 bp), foram utilizados os iniciadores BCR1 (5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3') e BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3') (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000). O tamanho do produto e a posição dos iniciadores são em relação a *B. multivorans* ATCC[®] 17616 *recA* sequence U70431.

2.4.2 Análise do DNA bacteriano por eletroforese em gel de agarose

A partir da amplificação, o resultado foi confirmado através da eletroforese em gel de agarose ultrapura (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) a 1,5% em tampão de borato de sódio (SB *buffer*), 1 a 10 mM, pH 8,0, 1X. O gel de agarose foi vertido em cuba Horizon[®] 11 x 14 cm (Life Technologies[®], Gaithersburg, EUA). Após a solidificação, foi adicionado tampão SB *buffer* 1X e aplicado 2 µL do DNA amplificado de cada amostra em conjunto com 1 µL de GelRed[™]

(Biotium[®], Califórnia, EUA) e 1 μ L de corante azul de bromofenol e xileno cianol. A corrida eletroforética foi realizada à 100V por 15 minutos.

O gel foi visualizado e a imagem capturada (fotografia) realizada através de um transiluminador de luz ultravioleta e um sistema digital de captação de imagens DigiDoc-It[™] Imaging System (UVP[®], Califórnia, EUA). O tamanho das sequências foi estimado através da comparação com padrão de peso molecular *ladder* 100pb (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) utilizado na corrida.

2.4.3 Purificação do produto de amplificação

Após constatação da banda correspondente à amplificação do gene *recA* (1040 pb), o produto foi submetido à purificação em coluna, utilizando *kit* de purificação de DNA por centrifugação da Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega[®], Madison, WI, USA).

De acordo com as especificações do fabricante, foi realizado o processamento das amostras: adicionando 10 μ L de solução de ligação à membrana e inserida a mini coluna no tubo de coleta, o produto de PCR preparado foi transferido para a montagem da minicoluna. Foi incubado à temperatura ambiente por 1 min, centrifugado a 16.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente o fluxo foi descartado e reinserta a mini coluna no tubo da coleção, adicionado 700 μ L de solução de lavagem de membrana e centrifugado a 16.000 rpm por 1 minuto. Foi descartado o fluxo restante, reinserta a mini coluna e repetido o processo de lavagem da membrana com 500 μ L da solução de lavagem de membrana e realizada nova centrifugação a 16.000 rpm durante 5 minutos.

O tubo foi esvaziado e centrifugado, com a tampa da centrífuga aberta para permitir a evaporação de resíduos de etanol. Foi transferida a pequena mini coluna para um tubo de micro centrífuga limpo de 1,5 mL, adicionado 50 μ L de água ultrapura à mini coluna. Foi incubado por 1 minuto, centrifugado a 16.000 rpm durante 1 min e descartada a mini coluna.

O DNA purificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, seguindo as mesmas especificações anteriormente descritas. Em seguida, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e um sistema digital de captação de imagens DigiDoc-It[™] Imaging System (UVP[®],

Califórnia, USA), para confirmação da pureza, manutenção e qualidade do DNA purificado. Posteriormente foi conservado a -20°C até a realização da reação de sequenciamento.

2.4.4 Sequenciamento do gene *recA*

Foram preparadas as reações de sequenciamento utilizando o BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, EUA), conforme orientações do fabricante.

Em uma placa de microtitulação de polipropileno de 96 poços para PCR, foram utilizados 4 iniciadores por amostra: BCR1 (5'-TGACCGCCGAGAAGAGCAA-3'); BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC-3'); BCR3 (5'-GTCGCAGGCGCTGCGCAA-3'); e BCR4 (5'-GCGCAGCGCCTGCGACAT-3'), cujas posições (5'-3') no gene *recA* do CBc correspondem a, 2-20, 1044-1024, 513-530 e 528-511, nucleotídeos respectivamente. As temperaturas de hibridação dos referidos iniciadores corresponderam à 58°C .

Para cada reação, foram adicionados 2 μL do DNA purificado (correspondendo a 20 ng) à 8 μL do mistura de reação de PCR (volume de reação de 10 μL), contendo 5 μL de água estéril, 1,5 μL de tampão de sequenciamento 5X, 1 μL da solução contendo o iniciador (3,2 pmol) e 0,5 μL do Big-dye (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). A reação foi realizada em quadruplicata para cada iniciador, em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Foster City, EUA), utilizando 1 min de desnaturação inicial a 96°C , seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 96°C , 15 segundos a 50°C e 2 min a 60°C . Não foi aplicada extensão final. Seguindo as orientações do fabricante, a rampa de temperatura foi ajustada, no intuito de impedir mudanças bruscas de temperatura ($>1^{\circ}\text{C}/\text{seg}$), evitando assim a geração de ruídos na leitura dos nucleotídeos.

Em seguida, o DNA (volume de 10 μL) foi precipitado, utilizando o seguinte protocolo: 2,5 μL de EDTA 0,125 M, 30 μL de etanol absoluto, misturado por inversão, deixando 15 min a temperatura ambiente, centrifugado a 4.000 rpm a 4°C por 45 min, descartado o sobrenadante por inversão, centrifugado rapidamente com a placa invertida, adicionado 30 μL de etanol 70%, centrifugado a 4.000 rpm a 4°C por 15 min, descartado o sobrenadante por inversão da placa, centrifugada a placa invertida a 4.000 rpm por 1 minuto.

Posteriormente foi realizada a desnaturação em termociclador (60°C por 20 min) e adicionado 10 µL de formamida. A placa foi novamente colocada em termociclador (95° por 5 min) e imediatamente no gelo por 5 min e injetada no sequenciador *Genetic Analyzer 3500* (Applied Biosystems®, Foster City, EUA), onde os eletroferogramas foram obtidos na medida em que as amostras passavam por capilares contendo Polímero de Performance Otimizada (Applied Biosystems®).

2.4.5 Análise das sequências do gene *recA*

Através das sequências obtidas, os *contigs* (sequências únicas de DNA) foram dispostos no programa Geneious 7.1.5 (Biomatters®, Auckland, New Zealand) e alinhados junto as sequências de referência para cada espécie do CBc com ajuda do programa Mega v.7.0 (KUMAR *et al.*, 2016), com exceção da espécie *B. puraquae*, descrita posteriormente a nosso estudo. O alinhamento foi usado para construção das árvores filogenéticas no mesmo programa (THOMPSON *et al.*, 1997).

Regiões homólogas e variáveis entre as sequências obtidas do gene *recA* das amostras de referência e das clínicas também foram avaliadas comparativamente entre si com auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), presente na base de dados *GenBank*® (NCBI, Bethesda, EUA).

2.5 **Análise e geração de agrupamentos obtidos por espectrometria de massa**

Através do Módulo flexAnalysis™ v. 3.3 (Bruker Daltonics GmbH®), os espectros de massa obtidos foram extraídos e analisados pelo programa Bionumerics v. 6.6 (Applied Maths®, Sint Marten Letem, Bélgica). O Dendograma foi obtido considerando a homologia entre as amostras determinada pelo coeficiente de Dice, aplicando o ponto de corte $\geq 85\%$ e a análise de *cluster* pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (POT *et al.*, 2017).

2.6 Polimorfismo genético por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Para realização da técnica de polimorfismo genético por PFGE, foi utilizado o protocolo POPLRNCEB 04 do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (LAPIH/IOC/Fiocruz) (SADER *et al.*, 1993; LOUREIRO *et al.*, 2002; RIBOT *et al.*, 2006).

2.6.1 Suspensão de células e montagem dos blocos de agarose

As amostras foram semeadas em ágar nutriente inclinado (Oxoid, Hampshire, UK) e incubadas a 35-37°C por 18-24h. As amostras foram suspensas em 1mL da solução BSC (Tris 100 mM, EDTA 100 mM [pH 8,0]), obtendo a turvação equivalente a padrão 3 da escala de McFarland. Foi transferida uma alíquota de 200 µL de cada amostra para um microtubo de polipropileno, e incluído 5 µL de solução de proteinase K 50 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e homogeneizado.

Para preparação dos blocos de agarose foi utilizada Agarose Seakem Gold a 1% (Lonza, Atlanta, EUA) em tampão Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1mM [pH 8,0]). A agarose foi dissolvida em forno de microondas e deixada em banho-maria a 50°C por 5 min, posteriormente foi adicionado 5 mL de SDS (solução de dodecil sulfato de sódio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 20%.

As suspensões de células de cada amostra foram homogeneizadas e misturadas a 200µL da agarose nos poços moldados para PFGE (Bio-Rad, Berkeley, EUA). Após solidificação em temperatura ambiente, os moldes foram retirados e vertidos em tubo cônico de polipropileno de 15mL contendo 2 mL de solução de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM [pH 8,0], N-Lauril sarcosil 10% [Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA]) e 5 µL de proteinase K. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 2 horas. Após o período de incubação foram realizadas 3 lavagens por 10 min com H₂O Mili-Q, em banho-maria a 50°C, seguida de uma lavagem com tampão TE estéril (Tris 1M pH 8,0, EDTA 0,5 M [pH 8,0], H₂O). Os blocos foram estocados em temperatura de refrigeração (2 a 8°C) até sua utilização.

2.6.2 Digestão do DNA nos blocos de agarose

Os blocos (*Plugs*) de agarose foram cortados em aproximadamente 1/3 do tamanho dos originais, com o auxílio de uma lâmina de bisturi e realocados em um microtubo de polipropileno contendo 5 µL de tampão 10X Red Buffer, adicionado de 45µL de H₂O Mili-Q, por 30 min em temperatura de refrigeração.

Posteriormente, a solução foi removida e adicionadas 0,5 µL da enzima BCuI (SpeI) - (Thermo Scientific) (ROJO-BEZARES *et al.*, 2011) adicionados de 5 µL de tampão 10X Red Buffer e 45µL de H₂O Mili-Q em cada microtubo. A incubação foi realizada por 3 horas a 37°C.

2.6.3 Corrida eletroforética e coloração do gel de agarose

Para corrida eletroforética foi utilizado gel de agarose Seakem Gold (Lonza, Atlanta, EUA) a 1,1% em tampão TBE (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 0,5 mM, [pH 8,0]) 0,4X. Foi utilizada a matriz para gel de agarose de 100 mL e suporte contendo pentes que serviram como molde para produzir 15 cavidades (poços) no gel. Os blocos (*plugs*) de agarose foram inseridos nos poços nas sequencias de 2 a 14, e nos poços de números 1 e 15 foram incluídos o padrão de peso molecular para PFGE, Lambda PFG Ladder N034K 50-1.000 kb (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA). O suporte contendo o pente foi colocado no molde e adicionado agarose a 50°C, até sua solidificação.

A corrida eletroforética foi realizada através do sistema Contour-clamped Homogeneous Electrical Field DR III (Bio-Rad, Berkeley, EUA), considerando a seguinte programação: Pulso inicial de 5 segundos e Pulso final de 35 segundos, 6.0V/cm durante 17 h em tampão TBE 0,4X a 14°C.

Em seguida os géis foram corados com 50 µL de Gel Red em solução de TBE 1X e visualizados sob iluminação UV utilizando o aparelho L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) e o programa L-Pix Image (Loccus Biotecnologia).

2.6.4 Análise de dados e geração de dendrograma

Os resultados foram analisados a partir do dendrograma gerado através do programa Bionumerics v. 6.6 (Applied Maths®, Sint Marten Letem, Bélgica). A homologia entre as amostras tipadas foi determinada pelo coeficiente de Dice com valores $\geq 85\%$ e a correlação para agrupamento pelo método UPGMA, considerando a otimização de 1.0% e tolerância de 1.5%.

2.7 **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

2.7.1 Método de difusão em ágar

A sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método do teste de difusão em disco (TDD) em ágar Mueller-Hinton (OXOID, Hampshire, UK) para os seguintes antimicrobianos: Meropenem 10 μg (MEM) (Oxoid, Hampshire, UK), Minociclina 30 μg (MIN) (Oxoid, Hampshire, UK), Sulfametoxazol/Trimetoprima 1,25/23,75 μg (SXT) (Oxoid, Hampshire, UK), e Ceftazidima 30 μg (CAZ) (Oxoid, Hampshire, UK), de acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institutes* (CLSI, 2020). Foram classificadas como resistentes a múltiplas drogas (MDR), as amostras que apresentaram perfil de resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

2.8 **Detecção de gene de resistência *sul1* por Reação em Cadeira da Polimerase**

Para detecção do gene *sul1* foram selecionadas algumas amostras caracterizadas como resistentes ao antimicrobiano Sulfametoxazol/Trimetoprima a partir do resultados do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco.

2.8.1 Obtenção do DNA bacteriano por lise térmica

Conforme item 2.4.1.

2.8.2 Preparo da mistura da reação para a PCR e detecção do gene *sul1*

Para detecção do gene *sul1* a PCR foi realizada de acordo com Toleman e colaboradores (2007), com adaptações. Para a reação foi utilizado 1 µL do sobrenadante incorporado em 23 µL da mistura de reação para PCR (0,5 µL [1 U] de Platinum Taq DNA polimerase [Invitrogen, Carisbad, EUA], 2 µL [250 µM] de cada desoxinucleotídeo trifosfatado - DNTP [Invitrogen, Carisbad, EUA], 0,75 µL [50mM] de MgCl₂ [Invitrogen, Carisbad, EUA] e 5 µL de tampão 10X para PCR [Invitrogen, Carisbad, EUA]). De cada iniciador foram utilizados 3 microlitros concentrados a 20 pmol adicionados à reação. A amplificação foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems®), utilizando desnaturação inicial por 5 min a 95°C, seguida por 33 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 64°C e 2 min a 72°C. E uma extensão final de 8 min a 72°C foi aplicada ao término dos ciclos.

Conforme Chung e colaboradores (2015) foram utilizados os iniciadores *sul1* F-(ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTGA) e R-(CTAGGCATGATCTAACCCCTCGGTCT), para obtenção do produto de amplificação de 840 pb. Como controle positivo foram utilizadas as cepas *P. aeruginosa* CCBM3282 e CCBM5939.

2.8.3 Preparo do gel, corrida eletroforética e análise do DNA bacteriano

O resultado da amplificação foi realizada através da eletroforese em gel de agarose ultrapura (Invitrogen, Carisbad, EUA) a 1,2% e acrescido de 2,5µL do corante SYBER® Safe (Invitrogen, Carisbad, EUA). O gel foi vertido em uma cuba horizontal (Horizon 11-14, GIBCO BRL, Life

Technologies). Após a solidificação, foi adicionado tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 100V por 25 minutos.

O gel foi visualizado e fotografado através de um transiluminador de luz ultravioleta e um sistema digital de captação de imagens (UVP BioImagin Systems DIGI DOC-IT System. Upland, CA, USA). O tamanho das sequências foi estimado através da comparação com padrão de peso molecular (ladder 100pb, Invitrogen, Carisbad, EUA).

2.9 Sequenciamento do genoma completo da amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar

2.9.1 Extração e purificação do DNA

Uma única amostra proveniente de um abscesso hepático, foi selecionada para realização do sequenciamento do genoma completo. A amostra foi semeada em meio CAB (BD[®]), incubada por 24 h a 48 h, a 35 °C \pm 2°C, em estufa bacteriológica. Para obtenção e purificação do DNA foi utilizado o kit PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen, Carisbad, EUA), conforme protocolos fornecidos pelos fabricantes.

2.9.2 Biblioteca genômica

A partir do kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina Inc. EUA), uma reação contendo 5 μ L (0,2ng/ μ L) do DNA, 10 μ L do tampão Tagment DNA Buffer e 5 μ L de Amplicon Tagment Mix foi utilizada para construção de cada biblioteca. As reações foram montadas em microplaca de 96 poços (Axygen, Califórnia, EUA). Após centrifugação, a placa foi levada ao termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e aquecida a 55°C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 5 μ L de Neutralizer Tagment Buffer e 25

μL de DNA marcado e neutralizado em cada poço, e incubada a placa em temperatura ambiente por 5 minutos.

Posteriormente foi adicionada a cada poço a reação contendo 5 μL de cada índice, 15 μL de Nextera PCR Master Mix e 5 μL de PCR Primer Cocktail. A placa foi selada, centrifugada e acondicionada no termociclador, utilizando a seguinte programação: ciclagem de 72°C por 3 min, 95°C por 30 segundos, 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 5 min e 30 segundos. No processo de amplificação, foram adicionados os iniciadores complementares.

Para realização da purificação da biblioteca foram utilizadas microesferas magnéticas e adicionados 30 μL de AMPure XP beads em cada poço contendo a reação de PCR. Após 5 min de incubação a placa de reação foi acondicionada sobre uma placa magnética para imobilização das microesferas ligadas ao DNA. Foram realizados dois processos de lavagem com etanol a 80% e secagem a temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 52,5 μL de *Resuspension Buffer* (Illumina Inc. EUA) a cada poço e aguardado o período de 5 min para completar o processo de eluição do DNA. O sobrenadante foi removido com pipeta e acondicionado em microtubo.

2.9.3 Sequenciamento de nova geração e montagem do genoma

O sequenciamento foi realizado através da plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc, USA) e a corrida selecionada foi a *paired-end*. Foram adicionados ao cartucho de reagente, 600 μL da biblioteca e acondicionados no equipamento de sequenciamento Illumina MiSeq para formação dos clusters. Em seguida o equipamento efetuou os processos de clusterização, síntese, geração das imagens e incorporação. As corridas foram realizadas em dois ciclos com 300 (2 x 150 pb) e 500 (2 x 250 pb) utilizando o kit Reagente MiSeq v2 (Illumina Inc, EUA).

Para montagem do genoma foi utilizado o programa A5-Miseq v. 25.2 de acordo com Coil e colaboradores (2015).

2.9.4 Anotação do genoma

A anotação do genoma bacteriano foi realizada através das plataformas *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) e *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) v.3.6.2 (<https://patricbrc.org>).

2.9.5 Submissão do genoma em banco de dados

O genoma completo da amostra 21440 foi depositado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), no *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ) e *European Nucleotide Archive* (ENA)/*GenBank* sob número de acesso JAAEAM000000000. BioProject registrado sob número: PRJNA579836 e BioSample: SAMN13134299. A versão do projeto recebeu número de acesso JAAEAM010000000, e consistiu em sequências de JAAEAM010000001-JAAEAM010000096. A Anotação foi adicionada à NCBI *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP).

2.10 Teste de sensibilidade a antimicrobianos realizado com a amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar

2.10.1 Método de difusão em ágar ampliado

O método do teste de difusão em disco (TDD) em ágar Mueller-Hinton (OXOID, Hampshire, UK) foi utilizado para os seguintes antimicrobianos: Meropenem 10 µg (MEM) (Oxoid, Hampshire, UK), Minociclina 30 µg (MIN) (Oxoid, Hampshire, UK), Sulfametoxazol/Trimetoprima 1,25/23,75 µg (SXT) (Oxoid, Hampshire, UK), e Cefotaxima 30 µg (CAZ) (Oxoid, Hampshire, UK), de acordo com as recomendações do CLSI (2020). Foram

incluídos também os antimicrobianos não padronizados pelo CLSI para o CBc: Tobramicina 10 µg (TOB) (Oxoid, Hampshire, UK), Polimixina B 30 UI (PB) (Oxoid, Hampshire, UK), Amicacina 30 µg (AMI) (Oxoid, Hampshire, UK), Gentamicina 10 µg (GEN) (Oxoid, Hampshire, UK), Imipenem 10 µg (IPM) (Oxoid, Hampshire, UK), Levofloxacin 5 µg (LEV) (Oxoid, Hampshire, UK), Piperacilina-tazobactam 100/10 µg (PTZ) (Oxoid, Hampshire, UK), Ciprofloxacino 5 µg (CIP) (Oxoid, Hampshire, UK) e Cefepime 30 µg (FEP) (Oxoid, Hampshire, UK).

Utilizamos como controle as cepas *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

2.11 Análises de bioinformática a partir do sequenciamento genômico

2.11.1 Seleção do genoma bacteriano para análise comparativa

O algoritmo fast K-mer foi aplicado para análise da comparação genômica usando a ferramenta *KmerFinder* v.3.1, com cálculo da Identidade Nucleotídica Média (INM) a partir do algoritmo ANIb (HASMAN *et al.*, 2014; RODRIGUEZ-R *et al.*, 2016), disponível na plataforma *Center of Genomic and Epidemiology* (CGE) (<http://genomicepidemiology.org>).

O genoma referência foi localizado e recuperado no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.11.2 Alinhamento dos genomas

Os contigs da amostra 21440 foram alinhados e reordenados comparativamente a amostra referência J2315, cromossomos 1, 2, 3 e plasmídeo (HOLDEN *et al.*, 2009), através do programa *Progressive Mauve software*.

2.11.3 Tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing in silico*

A determinação da tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing in silico* foi realizada através da plataforma *Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity* (PubMLST) disponível em <https://pubmlst.org> (JOLLEY *et al.*, 2018).

2.11.4 Identificação de genes de resistência e virulência

A determinação dos genes de resistência antimicrobiana foi realizada através da ferramenta PATRIC AMR e pela ferramenta ResFinder v.3.2 para identificação de genes de resistência antimicrobiana e/ou mutações cromossômicas (ZANKARI *et al.*, 2012; WATTAM *et al.*, 2016).

Os genes relacionados aos fatores de virulência foram identificados pela plataforma *Virulence Factor Database* (VFDB) e *Victors Virulence Factor* (LIU *et al.*, 2019; SAYERS *et al.*, 2019).

2.11.5 Identificação de elementos móveis

Para determinação da presença de plasmídeos, a investigação foi realizada manualmente através da plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTN) v. 2.10.0+. A ferramenta *PHAge Search Tool Enhanced Release* (PHASTER) foi utilizada para identificação e anotação das sequências de fagos (ZHENG *et al.*, 2000; ARNDT *et al.*, 2016).

As Sequências de Inserções (SI) foram identificadas e anotadas através da ferramenta *ISfinder* (SIGUIER *et al.*, 2014). As Ilhas Genômicas (IGs) foram analisadas pela ferramenta *IslandViewer4's*, a partir dos métodos de predição SIGI-HMM e *IslandPath-DIMOB* (BERTELLI *et al.* 2017).

Para identificação das Repetições Palindrômicas Curtas com Espaçamento Intercalado Regularmente Agrupado (CRISPR), foi utilizada a ferramenta CRISPR-Cas++, da plataforma CRISPRs *web server* (ABBY *et al.*, 2014; COUVIN *et al.*, 2018).

3. RESULTADOS

3.1 Características da amostragem

No período de janeiro de 2010 a fevereiro de 2018, foram selecionadas 189 amostras bacterianas caracterizadas pelo LABACT como cepas do CBc. Destas, 78 amostras não obtiveram crescimento, classificadas como inviáveis para o estudo. As 111 amostras viáveis foram provenientes de 28 pacientes: 78 (70,27%) amostras de 18 pacientes atendidos no IFF e 33 (29,72%) de 15 pacientes na PPC. Cinco pacientes sofreram transição de instituição devido a mudança de faixa etária durante o período estudado, e as amostras foram alocadas conforme a distribuição temporal da coleta em ambas as instituições.

O número de amostras por paciente variou de uma (0,9%) a 15 (13,51%). Considerando os espécimes clínicos, foram obtidas 94 (84,68%) amostras de escarro, 12 (10,81%) orofaringe, 3 (2,7%) lavado bronco-alveolar, uma (0,9%) de sangue e uma (0,9%) de abscesso hepático (Tabela 4).

A partir das informações obtidas em prontuários, quanto as variantes de mutação no gene CFTR, foram encontradas 7 mutações distintas, e observada uma prevalência para F508del presente em 19 (67,85%) pacientes. Destes, 12 (63,15%) pacientes foram classificados com variantes heterozigóticas para essa mutação, enquanto 7 (36,84%) homozigóticas; Sete (25%) pacientes não apresentaram a mutação F508del; apenas 1 (3,57%) paciente apresentou mutação indefinida e outro (3,57%) não realizou a genotipagem.

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes em relação ao registro da amostra, mutações do gene CFTR, data da coleta, espécime clínico e origem clínica (continua)

Paciente	Número da Amostra	Mutação 1	Mutação 2	Data da coleta	Espécime Clínico	Origem
1	9812	F508del	F508del	13/01/2010	Escarro	PPC
	11856			14/02/2011	Swab de Orofaringe	PPC
	13248			07/07/2011	Escarro	PPC
	14024			07/12/2011	Escarro	PPC
2	10607	F508del	V232D	02/08/2010	Escarro	PPC
	18244			01/08/2014	Escarro	PPC
	21069			21/10/2016	Escarro	PPC
	21218			04/08/2017	Escarro	PPC
	21431			26/01/2018	Escarro	PPC
3	21066	F508del	G85E	21/10/2016	Escarro	PPC
	21071			21/10/2016	Escarro	PPC
4	19250	F508del	Indefinido	26/02/2015	Escarro	IFF
	19677			09/06/2015	Escarro	IFF
	19678			09/06/2015	Escarro	IFF
	19679			09/06/2015	Escarro	IFF
	19680			12/06/2015	Escarro	IFF
	19681			24/06/2015	Escarro	IFF
	19682			24/06/2015	Escarro	IFF
	20244			03/12/2015	Escarro	IFF
	20246			08/12/2015	Escarro	IFF
	20310			04/01/2016	Escarro	IFF
	5			10319	F508del	3272-26A>G
13191		01/07/2011	Escarro	PPC		
6	18242	F508del	Indefinido	01/08/2014	Escarro	PPC
	20143			09/10/2015	Escarro	PPC
	20888			15/07/2016	Escarro	PPC
	21063			21/10/2016	Escarro	PPC
	21206			07/07/2017	Escarro	PPC
7	12178	2789+5G>A	S446X	23/03/2011	Swab de Orofaringe	IFF
	13250			12/07/2011	Escarro	IFF
	21148			19/05/2017	Escarro	PPC
	21364			24/11/2017	Escarro	PPC
8	14946	G85E	Indefinido	01/08/2012	Escarro	IFF
	15761			03/12/2012	Escarro	IFF
	17412			27/01/2014	Swab de Orofaringe	IFF
	18269			04/08/2014	Escarro	IFF
	18651			03/11/2014	Swab de Orofaringe	IFF
	21215			24/07/2017	Escarro	IFF
	21395			07/12/2017	Escarro	IFF

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes em relação ao registro da amostra, mutações do gene CFTR, data da coleta, espécime clínico e origem clínica (continuação)

9	16756	F508del	Indefinido	19/08/2013	Swab de Orofaringe	IFF	
	16757			19/08/2013	Swab de Orofaringe	IFF	
	18880			05/01/2015	Escarro	IFF	
	20851			04/07/2016	Escarro	IFF	
	21188			10/07/2017	Escarro	IFF	
	21348			13/11/2017	Escarro	IFF	
	21424			22/01/2018	Escarro	IFF	
	10	10734	F508del	F508del	19/08/2010	Escarro	IFF
20313				06/01/2016	Escarro	IFF	
11	9882	F508del	G551D	22/01/2010	Escarro	IFF	
	9883			22/01/2010	Escarro	IFF	
	10689			13/08/2010	Escarro	IFF	
	19448			10/04/2015	Escarro	PPC	
	21330			27/10/2017	Escarro	PPC	
12	14273	F508del	F508del	13/02/2012	Escarro	IFF	
	15755			03/12/2012	Escarro	IFF	
	18261			04/08/2014	Escarro	IFF	
	18574			06/10/2014	Escarro	IFF	
	20309			11/01/2016	Escarro	IFF	
	21005			23/09/2016	Escarro	PPC	
13	10067	Sem análise	Sem análise	22/03/2010	Sangue	PPC	
14	18650	A561E	Indefinido	03/11/2014	Swab de Orofaringe	IFF	
	20223			26/10/2016	Escarro	IFF	
15	10996	F508del	F508del	17/11/2010	Escarro	PPC	
16	10140	F508del	F508del	01/04/2010	Swab de Orofaringe	IFF	
	10733			16/08/2010	Swab de Orofaringe	IFF	
	13479			08/08/2011	Swab de Orofaringe	IFF	
	19444			26/03/2015	Escarro	IFF	
	21072			17/10/2016	Escarro	IFF	
	21073			18/10/2016	Escarro	IFF	
	17	9955	S4X	120del123	22/02/2010	Escarro	IFF
		10597			19/07/2010	Escarro	IFF
14071				05/12/2011	Escarro	IFF	
21392				04/01/2017	Escarro	PPC	
21440				06/02/2018	Abscesso Hepático	PPC	
18	19446	Indefinido	Indefinido	06/04/2015	Escarro	IFF	
19	15048	3120G-A	3120G-A	17/08/2012	Escarro	IFF	
	21003			26/09/2016	Escarro	PPC	
	21004			23/09/2016	Escarro	PPC	
20	18506	G85E	G85E	27/06/2014	Escarro	PPC	

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes em relação ao registro da amostra, mutações do gene CFTR, data da coleta, espécime clínico e origem clínica (conclusão)

21	19251	F508del	F508del	02/03/2015	Swab de Orofaringe	IFF
22	9954	G542X	3849+10kbC→T	22/02/2010	Escarro	PPC
	18977			30/01/2015	Escarro	PPC
23	14557	F508del	R334W	25/05/2012	Escarro	PPC
24	9875	F508del	F508del	25/01/2010	Escarro	IFF
25	17477	F508del	Indefinido	05/02/2014	Escarro	IFF
	19249			23/02/2015	Swab de Orofaringe	IFF
26	14229	F508del	G542X	31/10/2011	Escarro	IFF
	18271			30/07/2014	Escarro	IFF
	18645			13/10/2014	Escarro	IFF
	18688			17/11/2014	Escarro	IFF
	20225			21/10/2015	Escarro	IFF
27	20430	F508del	Indefinido	22/02/2016	Escarro	IFF
	20718			31/05/2016	LBA	IFF
	20941			08/09/2016	Escarro	IFF
	20942			08/09/2016	Escarro	IFF
	20943			16/09/2016	LBA	IFF
	20944			16/09/2016	LBA	IFF
	21007			04/10/2016	Escarro	IFF
	21008			04/10/2016	Escarro	IFF
	21009			04/10/2016	Escarro	IFF
	21076			29/12/2016	Escarro	IFF
	21077			29/12/2016	Escarro	IFF
	21098			27/03/2017	Escarro	IFF
	21099			27/03/2017	Escarro	IFF
	21124			08/05/2017	Escarro	IFF
	21142			11/05/2017	Escarro	IFF
28	9873	F508del	3120+1G>A	18/01/2010	Escarro	IFF
	10015			08/03/2010	Escarro	IFF
	10017			08/03/2010	Escarro	IFF
	10185			12/04/2010	Escarro	IFF
	12060			14/03/2011	Escarro	IFF

Legenda: LBA: Lavado bronco-alveolar; IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da criança e do adolescente Fernandes Figueira; e PPC: Policlínica Piquet Carneiro.

Fonte: O autor, 2021.

3.2 Identificação do CBc pelo sequenciamento do gene *recA* e por espectrometria de massa

A partir da metodologia aplicada através do instrumento Microflex LT - Bruker Daltonics MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH®, Leipzig, Alemanha) e pelo sequenciamento do gene

recA, metodologia padrão-ouro para identificação molecular das espécies do CBc, as seguintes identificações foram obtidas conforme descrito na tabela 5.

Através da identificação pelo sequenciamento do gene *recA* obtivemos os seguintes resultados: quarenta e oito (43,24%) amostras foram caracterizadas como *B. vietnamiensis*, 29 (26,12%) *B. cenocepacia* IIIA, 17 (15,31%) *B. cenocepacia* IIIB, 13 (11,71%) *B. multivorans*, duas (1,8%) *B. contaminans*, uma (0,9%) *B. cepacia* e uma (0,9%) *B. stabilis*.

Tabela 5 – Identificação das amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* pelo sequenciamento do gene *recA* e por espectrometria de massa - MALDI-TOF MS (continua)

Paciente	Nº da amostra	Gene <i>recA</i>	MALDI-TOF MS	Escore
1	9812	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.050
	11856	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.030
	13248	<i>B. multivorans</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.274
	14024	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.770
2	10607	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	1.901
	18244	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.354
	21069	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.196
	21218	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	1.893
	21431	<i>B. multivorans</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.953
3	21066	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	1.767
	21071	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	2.075
4	19250	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.118
	19677	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.801
	19678	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.210
	19679	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.088
	19680	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.014
	19681	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.199
	19682	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.958
	20244	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.854
	20246	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.937
	20310	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.057
5	10319	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	1.911
	13191	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.424

Tabela 5 – Identificação das amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* pelo sequenciamento do gene *recA* e por espectrometria de massa - MALDI-TOF MS (continua)

6	18242	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.722
	20143	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.965
	20888	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.195
	21063	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1.982
	21206	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	2.319
7	12178	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.038
	13250	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	1.929
	21148	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.268
	21364	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.075
8	14946	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.925
	15761	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.279
	17412	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.114
	18269	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	<i>B. vietnamiensis</i>	2.170
	18651	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.699
	21215	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.825
	21395	<i>B. multivorans</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.061
9	16756	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.036
	16757	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.151
	18880	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.118
	20851	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.085
	21188	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.103
	21348	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.150
	21424	<i>B. multivorans</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.096
	10734	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.984
10	20313	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.105
	9882	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.192
11	9883	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.128
	10689	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	1.979
	19448	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	1.769
	21330	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	1.753
	14273	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.201
12	15755	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	2.050
	18261	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.317
	18574	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.307
	20309	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.296
	21005	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.372

Tabela 5 – Identificação das amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* pelo sequenciamento do gene *recA* e por espectrometria de massa - MALDI-TOF MS (continua)

13	10067	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.196
14	18650	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.944
	20223	<i>B. cenocepacia IIIB</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.802
15	10996	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.863
16	10140	<i>B. stabilis</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.353
	10733	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.007
	13479	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.022
	19444	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.026
	21072	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.140
	21073	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.269
17	9955	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.038
	10597	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.013
	14071	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.186
	21392	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.076
	21440	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.170
18	19446	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	2.054
19	15048	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	1.946
	21003	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. multivorans</i>	2.016
	21004	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	2.123
20	18506	<i>B. multivorans</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.303
21	19251	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.891
22	9954	<i>B. contaminans</i>	<i>B. pyrrocinia</i>	2.267
	18977	<i>B. contaminans</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.990
23	14557	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.986
24	9875	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.092
25	17477	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.130
	19249	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.895
26	14229	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	2.089
	18271	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.979
	18645	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.103
	18688	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.007
	20225	<i>B. multivorans</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1.956

Tabela 5 – Identificação das amostras do Complexo *Burkholderia cepacia* pelo sequenciamento do gene recA e por espectrometria de massa - MALDI-TOF MS (conclusão)

	20430	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.211
	20718	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.224
	20941	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.222
	20942	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.063
	20943	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.269
	20944	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.259
	21007	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.295
27	21008	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.217
	21009	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.083
	21076	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.228
	21077	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.239
	21098	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.073
	21099	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.317
	21124	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.203
	21142	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.234
	9873	<i>B. cenocepacia IIIA</i>	<i>B. cenocepacia</i>	2.135
	10015	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.223
28	10017	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.178
	10185	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	1.933
	12060	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2.280

Nota: Identificação pelo MALDI-TOF MS, conforme critérios interpretativos padronizados pela Bruker Daltonics®: *score*: 0.000 – 1.699 - Identificação não confiável; 1.700 - 1.999 – Provável identificação do gênero; 2.000 – 2.299 Segura identificação do gênero e provável a nível de espécie; e 2.300 – 3000 – Alta identificação de espécie.
Fonte: O autor, 2021.

Todas as amostras (100%) foram identificadas pelo MALDI-TOF MS como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, apenas 7 (6,3%) como alta identificação a nível de espécie e 64 (57,65%) como provável a nível de espécie (Tabela 5). Considerando a minoração no ponto de corte para ≥ 1.700 , totalizamos um percentual de 88,28% (n=98) de identificação a nível de espécie.

Treze (11,71%) isolados foram identificados incorretamente, quando comparadas aos resultados obtidos pelo método de referência, destes nove (69,23%) receberam uma pontuação entre 2.000 a 3.000, sendo dois (22,22%) isolados com pontuação acima de 2.300. A maior parte dos erros de identificação ocorreu com amostras da espécie *B. multivorans* (n = 6/46;15%), que foram identificadas como *B. vietnamiensis* ou *B. cenocepacia* (Tabela 6).

Tabela 6. Desempenho da identificação das espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* pelo sequenciamento do gene *recA* e por espectrometria de massa - MALDI-TOF MS

Sequenciamento do gene <i>recA</i>	MALDI-TOF MS (n/%)
<i>B. vietnamiensis</i> (n = 48)	
2.300 - 3.000	4/8,33
2.000 – 2.299	38/79,16
1.700 – 1.999	5/10,41
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	1/2,08
	1 <i>B. cenocepacia</i> (1.699)
<i>B. cenocepacia IIIA</i> (n = 29)	
2.300 - 3.000	2/6,89
2.000 – 2.299	15/51,72
1.700 – 1.999	10/34,48
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	2/6,89
	1 <i>B. multivorans</i> (2.016)
	1 <i>B. vietnamiensis</i> (2.076)
<i>B. cenocepacia IIIB</i> (n = 17)	
2.300 - 3.000	1/5,88
2.000 – 2.299	7/41,17
1.700 – 1.999	8/47,05
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	1/5,88
	1 <i>B. vietnamiensis</i> (2.170)
<i>B. multivorans</i> (n = 13)	
2.300 - 3.000	0/0
2.000 – 2.299	3/23,07
1.700 – 1.999	4/30,76
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	6/46,15
	4 <i>B. vietnamiensis</i> (2.303, 2.274, 2.096 e 2.061)
	2 <i>B. cenocepacia</i> (1.956 e 1.953)

Tabela 6. Desempenho da identificação das espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* pelo sequenciamento do gene *recA* e por espectrometria de massa - MALDI-TOF MS (conclusão)

<i>B. contaminans</i> (n = 2)	
2.300 - 3.000	0/0
2.000 – 2.299	0/0
1.700 – 1.999	0/0
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	2/100
	1 <i>B. pyrrocinia</i> (2.267)
	1 <i>B. vietnamiensis</i> (1.990)
<i>B. stabilis</i> (n = 1)	
2.300 - 3.000	0/0
2.000 – 2.299	0/0
1.700 – 1.999	0/0
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	1/100
	1 <i>B. cenocepacia</i> (2.353)
<i>B. cepacia</i> (n = 1)	
2.300 - 3.000	0/0
2.000 – 2.299	1/100
1.700 – 1.999	0/0
0.000 – 1.699	0/0
Identificação incorreta	0/0

Nota: Identificação pelo MALDI-TOF MS, conforme critérios interpretativos padronizados pela Bruker Daltonics®: *score*: 0.000 – 1.699 - Identificação não confiável; 1.700 - 1.999 – Provável identificação do gênero; 2.000 – 2.299 Segura identificação do gênero e provável a nível de espécie; e 2.300 – 3000 – Alta identificação de espécie.
Fonte: O autor, 2021.

Os resultados apresentados foram publicados pelo nosso grupo no artigo: Vianna, E.F., Pentagna, L.S.S., Menezes, N.I.M. et al. *Decreasing the Cut-off Score Value of MALDI-ToF MS Increase the Identities of Burkholderia cepacia Complex Species*. Curr Microbiol 78, 2259–2263 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02493-x>. (Anexo B).

3.3 Análise de agrupamentos gerados através do produto da espectrometria de massa

As 111 amostras foram analisadas quanto ao agrupamento em perfis nomeados de A a HC e encontrados 85 grupos, considerando o ponto de corte $\geq 85\%$ de similaridade (Figura 3).

B. cenocepacia (n=47) apresentou o maior número de agrupamentos (n=41;48,23%). A segunda espécie com maior número de agrupamentos foi *B. vietnamiensis* (n=54) com 36 (42,35%) grupos, prevalendo o perfil O em oito amostras. Para a espécie *B. multivorans* (n=8) foram observados 8 (9,41%) perfis, e para as espécies identificadas com *B. cepacia* (n=1) e *B. pyrrocinia* (n=1), cada amostra foi representada por um grupo.

Diferentes espécies foram agrupadas no mesmo perfil: as amostras 21218 (*B. multivorans*) e 18688 (*B. cenocepacia*) foram agrupadas no perfil FB e as amostras 21066 (*B. multivorans*) e 20718 (*B. vietnamiensis*) incluídas no perfil PB.

Considerando a análise de amostras que apresentaram perfis com 100% de similaridade, foram observadas somente nas espécies *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia*. Curiosamente, no perfil O, exclusivo para *B. vietnamiensis*, foram observadas duas situações distintas com 100% de similaridade. Uma delas, em duas amostras (21424 e 21348) recuperadas do paciente 9 e a outra situação foi observada em 3 amostras (21124, 21076, 20941) recuperadas do paciente 27. Ainda observado em *B. vietnamiensis*, nota-se adicionalmente dois grupos: o perfil Z (na amostra 21215 do paciente 8 e amostra 13479 do paciente 16) e o perfil U, com duas amostras (18261 e 14273) recuperadas do mesmo paciente (12).

Figura 3 - Dendrograma e análise de clusters das 111 amostras a partir das análises dos espectros de massa do MALDI-TOF MS (continua)

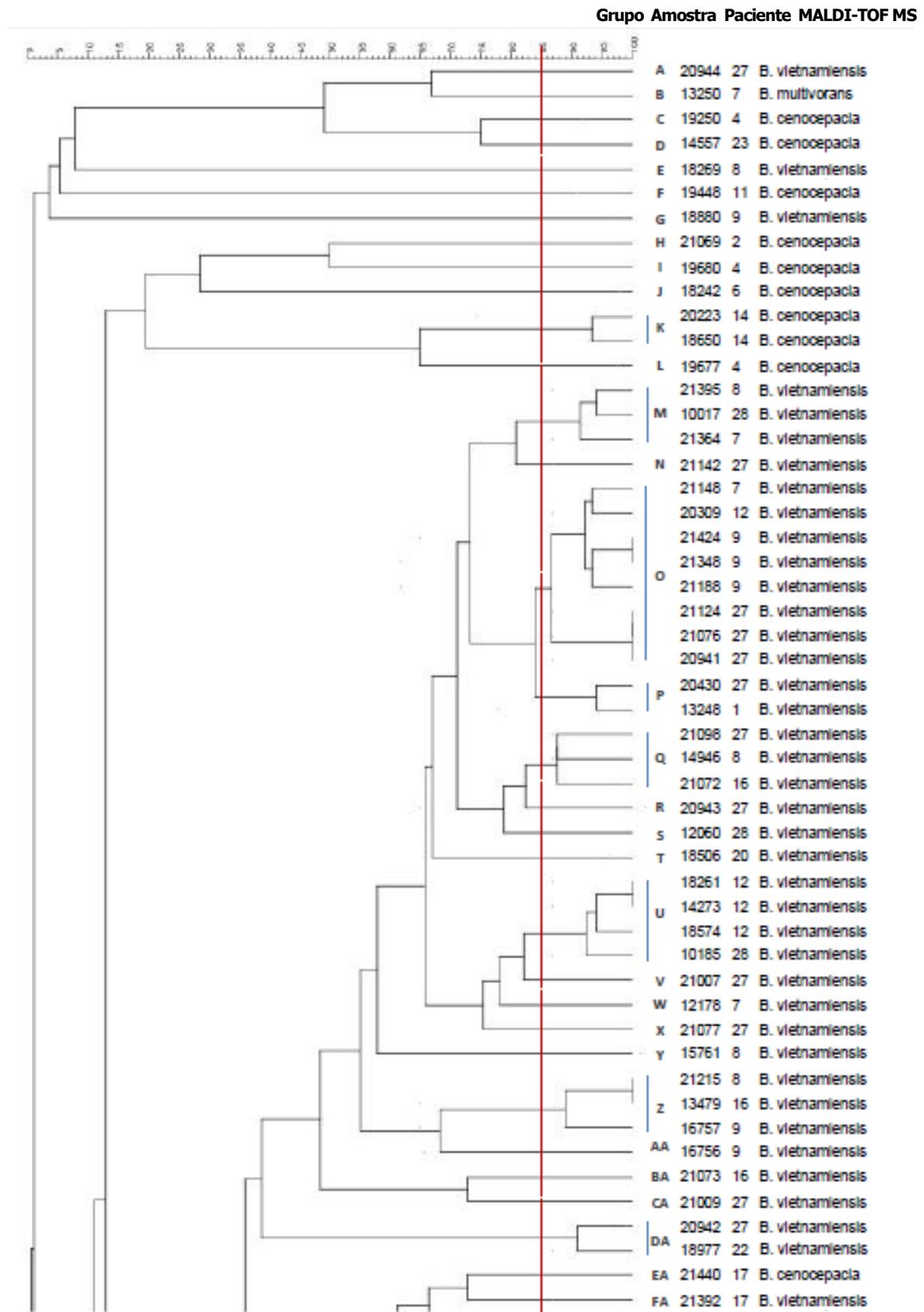


Figura 3 - Dendrograma e análise de clusters das 111 amostras a partir das análises dos espectros de massa do MALDI-TOF MS (continuação)

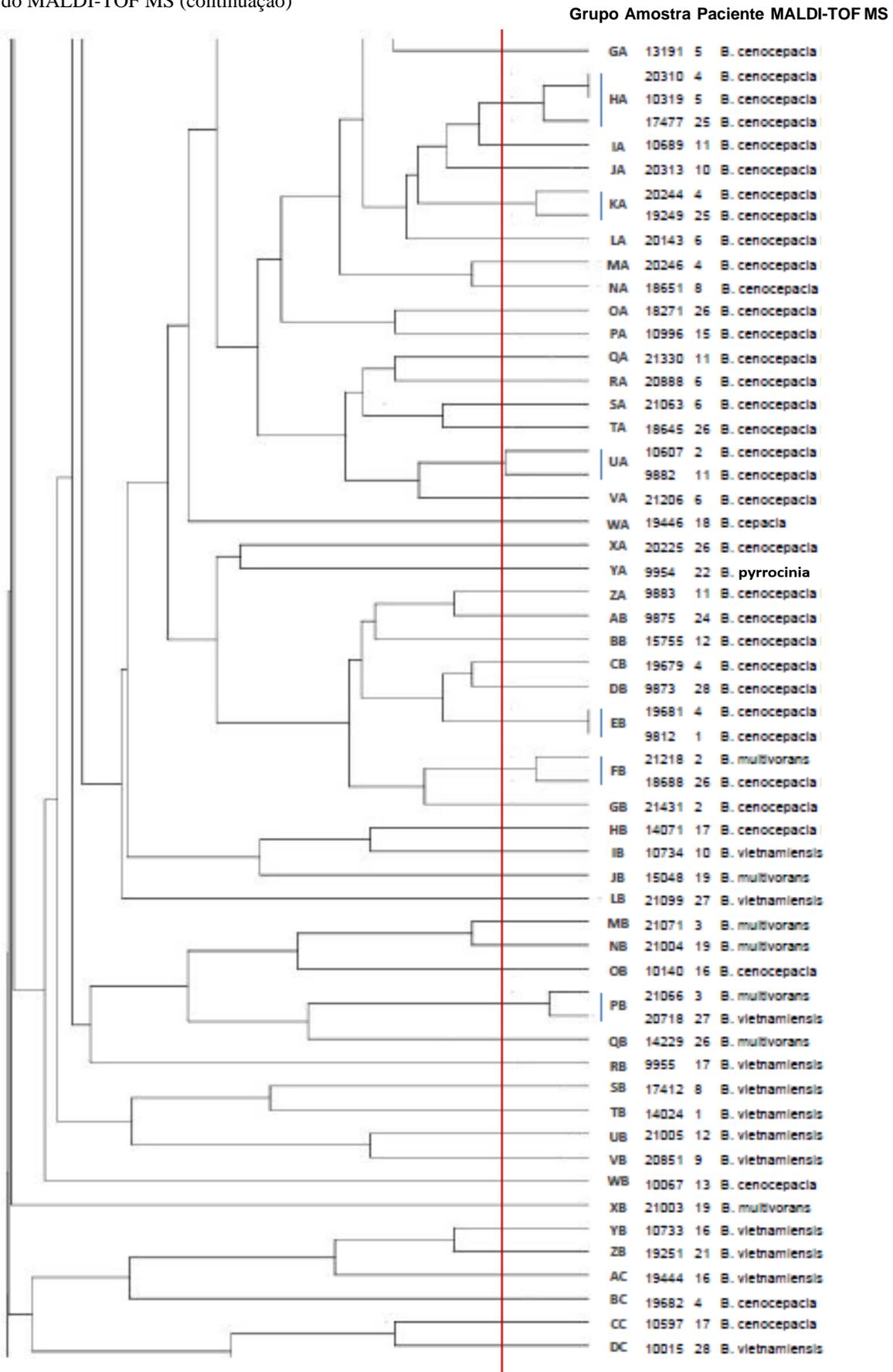
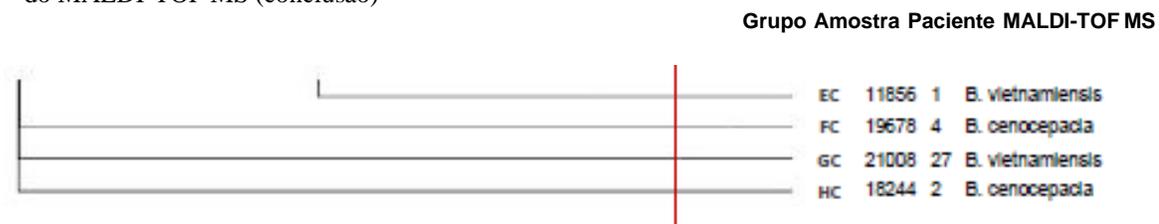


Figura 3 - Dendrograma e análise de clusters das 111 amostras a partir das análises dos espectros de massa do MALDI-TOF MS (conclusão)



3.4 Tipagem das amostras por eletroforese em gel de campo pulsado

As 111 amostras foram analisadas quanto a relação de similaridade, nomeados de A a ZB e encontrados 78 pulsotipos, considerando o ponto de corte $\geq 85\%$ de similaridade (Figura 4).

B. vietnamiensis (n=48) apresentou o maior número de pulsotipos (n=32;41,02%), prevalecendo o EA em seis amostras (21099, 21124, 21076, 20944, 20309 e 21098), sendo cinco delas encontradas no mesmo indivíduo (paciente 27). *B. cenocepacia* (n=46) foi a segunda espécie com maior número de pulsotipos (n=28;35,89%), segmentadas em subgrupos, a saber: *B. cenocepacia* IIIA (n=29) com 17 pulsotipos (21,79%) e *B. cenocepacia* IIIB (n=17) com 11 pulsotipos (14,10%).

Para a espécie *B. multivorans* (n=13) foram observados 12 (15,38%) pulsotipos. Nas espécies identificadas como *B. contaminans* (n=2), *B. stabilis* (n=1) e *B. cepacia* (n=1), cada amostra foi representada por um pulsotipo.

Nota-se que nesta análise não foram encontradas diferentes espécies ou subgrupos apresentando o mesmo pulsotipo.

Amostras que apresentaram perfis com 100% de similaridade, foram observadas somente nas espécies *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* IIIA e IIIB. Em relação a *B. vietnamiensis* foram observados três pulsotipos encontrados nos mesmos pacientes (pulsotipo A – paciente 7; pulsotipo EA – paciente 27; pulsotipo HA – paciente 12). Essas amostras tiveram intervalos de isolamento em períodos inferiores a 6 meses.

Para *B. cenocepacia* IIIA foram observados quatro pulsotipos (J, TA, BB e MB) sendo dois deles compartilhados entre pacientes distintos (pulsotipo J – pacientes 1 e 11; pulsotipo TA – pacientes 24 e 28) e dois nos mesmos pacientes (pulsotipo BB – paciente 11; pulsotipo MB –

paciente 4). Quanto a *B. cenocepacia* IIIB, dois pulsotipos (HB e KB), com 100% de similaridade entre as amostras foram encontrados no mesmo paciente (paciente 6).

Figura 4 - Dendrograma dos perfis de PFGE obtidos das 111 amostras do CBc (continua)

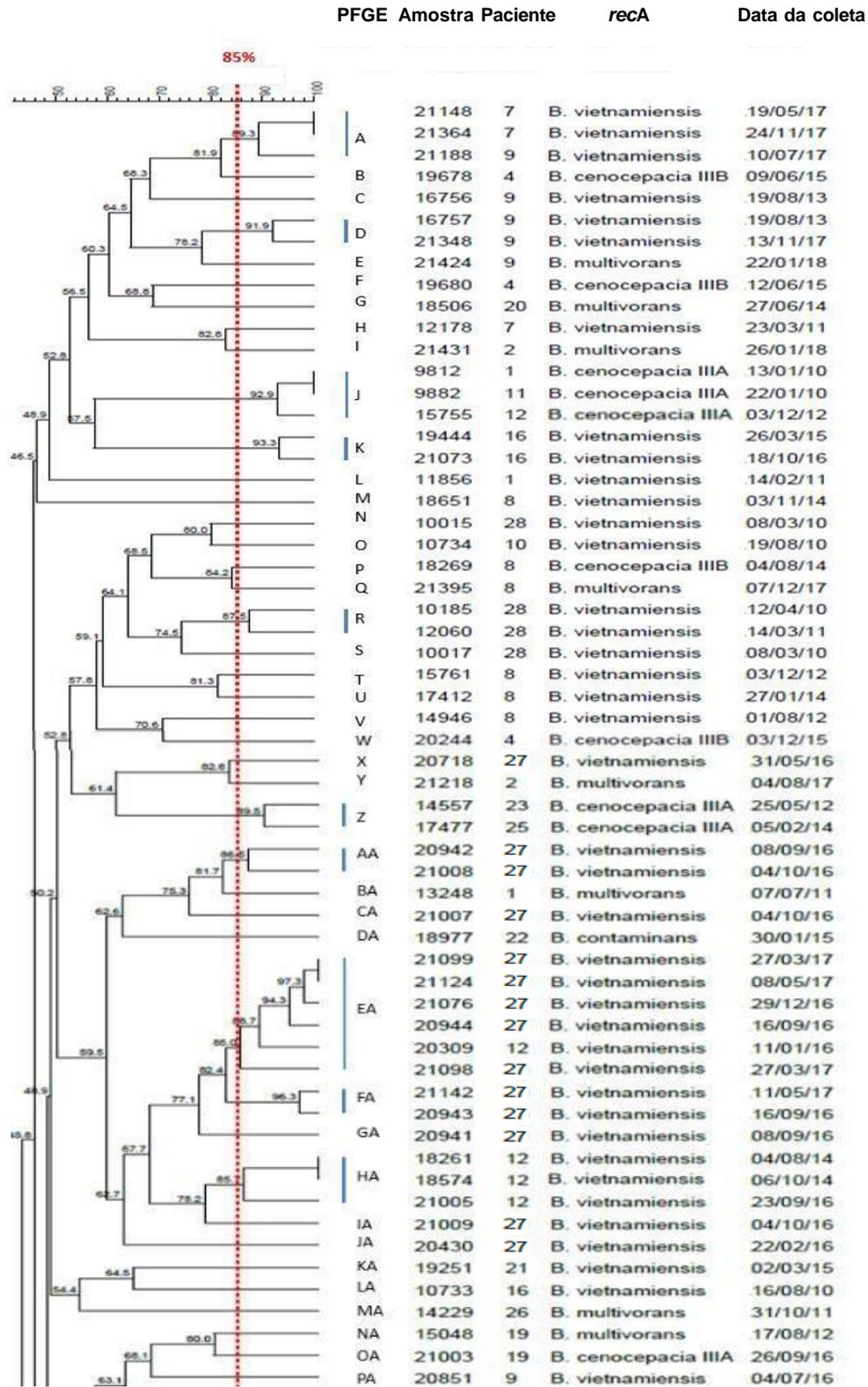
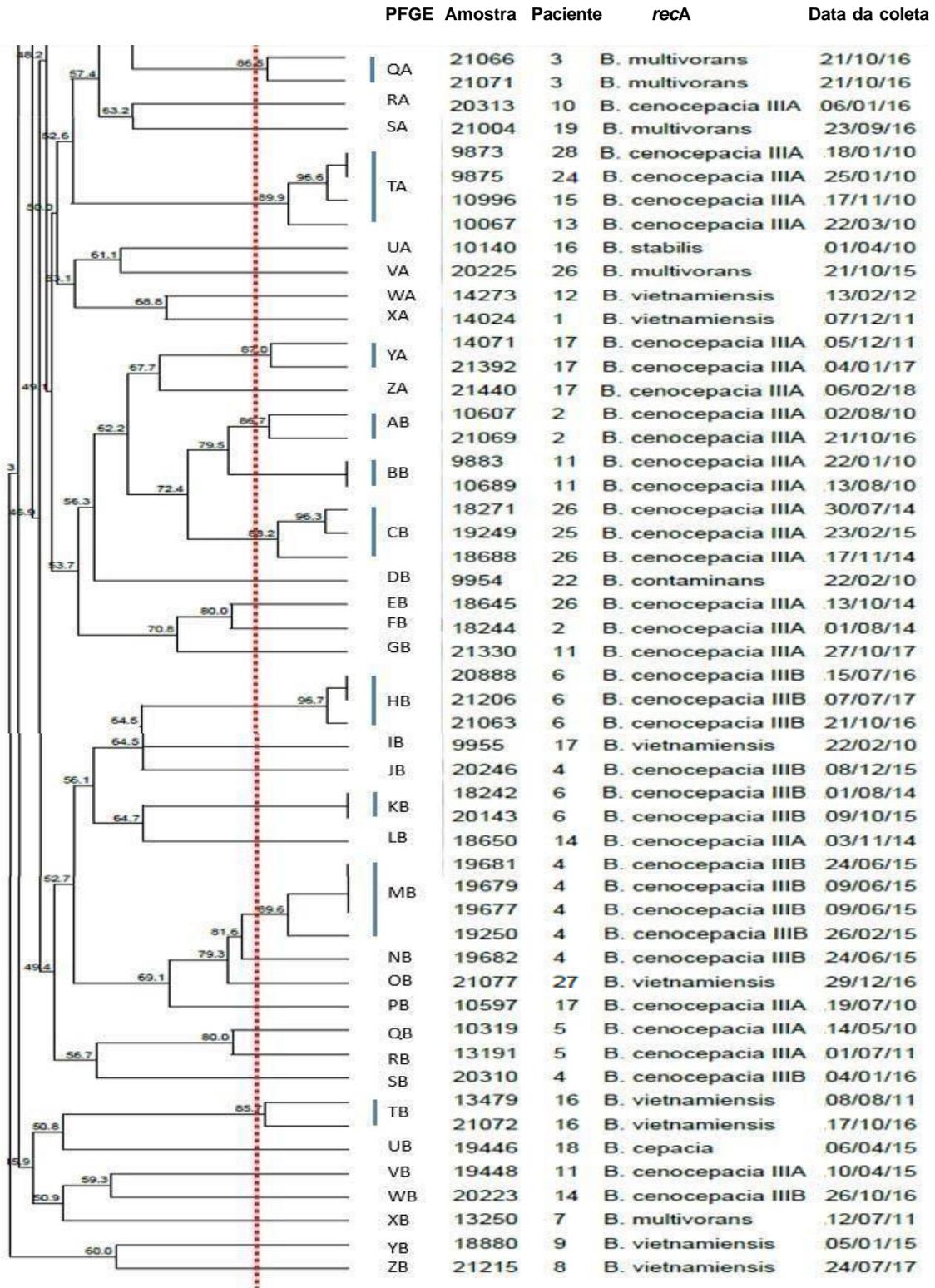


Figura 4 - Dendrograma dos perfis de PFGE obtidos das 111 amostras do CBc (conclusão)



3.5 Análise longitudinal a partir da tipagem das amostras por PFGE

Para esta análise foram selecionados os pacientes que apresentaram no mínimo seis amostras em diferentes períodos, totalizando seis pacientes (4, 8, 9, 12, 16 e 27) (Figuras 5 e 6).

Dois pacientes (4 e 27) foram colonizados cronicamente por uma única espécie no período. As dez amostras recuperadas do paciente 4, identificadas como *B. cenocepacia* IIIB, foram agrupadas em sete pulsotipos, sendo o MB o pulsotipo observado em quatro amostras recuperadas no ano 2015. O paciente 27, que apresentou maior número de amostras (n=15), foi colonizado exclusivamente por *B. vietnamiensis*, com grande diversidade de pulsotipos (n=9), destacando o pulsotipo EA, encontrado em seis amostras recuperados nos anos de 2016 e 2017.

Para os demais pacientes houve colonização intermitente por diferentes espécies do CBc no período. Entretanto, observou-se o predomínio de uma espécie no período, mas com pulsotipos distintos.

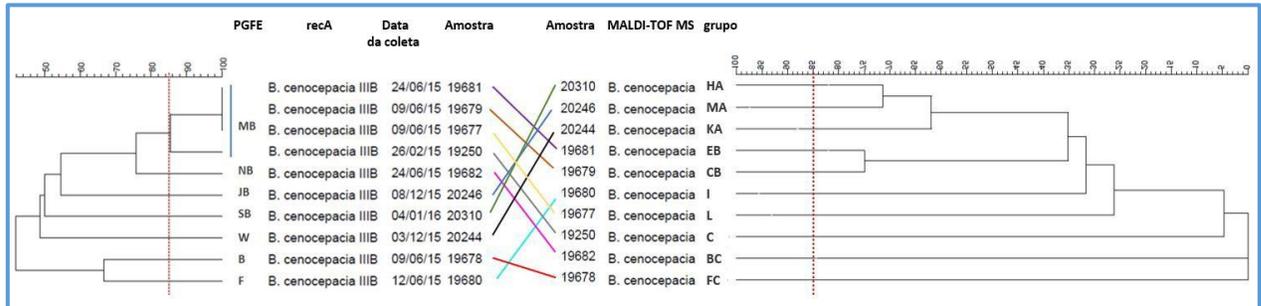
3.6 Análise comparativa entre os dendrogramas obtidos através do PFGE e MALDI-TOF MS dos pacientes crônicos

Considerando os seis pacientes selecionados para análise longitudinal (Figuras 5 e 6), os agrupamentos gerados através do produto da espectrometria de massa demonstraram maior poder de discriminatório na análise das amostras de três pacientes (4, 16 e 27) quando comparados aos pulsotipos.

Em alguns casos, os isolados com pulsotipos idênticos foram agrupados em diferentes clusters pelo MALDI-TOF MS. Em apenas duas situações, algumas amostras que apresentaram o mesmo pulsotipo foram também pertencentes ao mesmo grupamento de espectro de massa (paciente 12-pulsotipo HA-grupamento U; paciente 27-pulsotipo EA-grupamento O).

Figura 5 – Análise longitudinal a partir dos pulsotipos obtidos das amostras dos pacientes colonizados cronicamente por uma única espécie do CBc

Paciente 4



Paciente 27

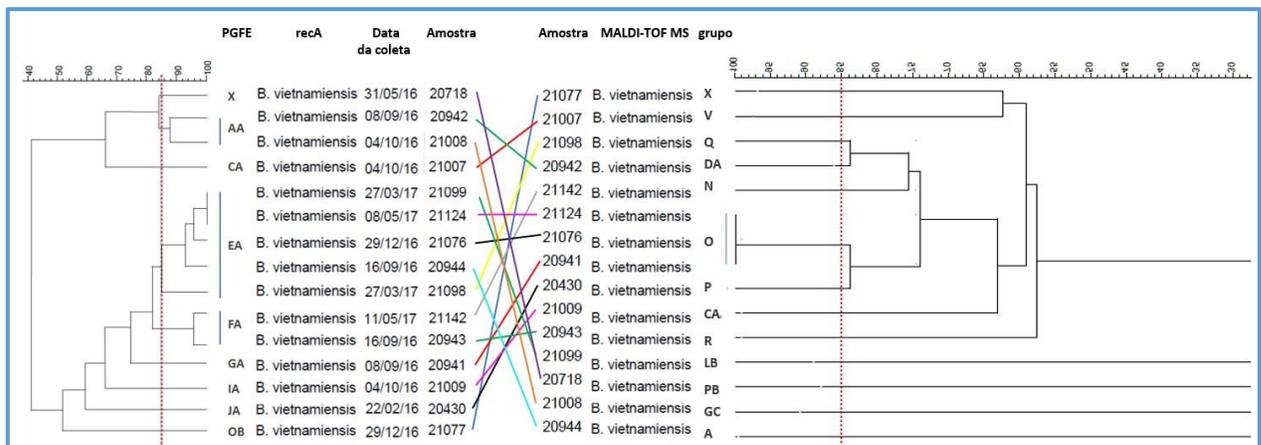
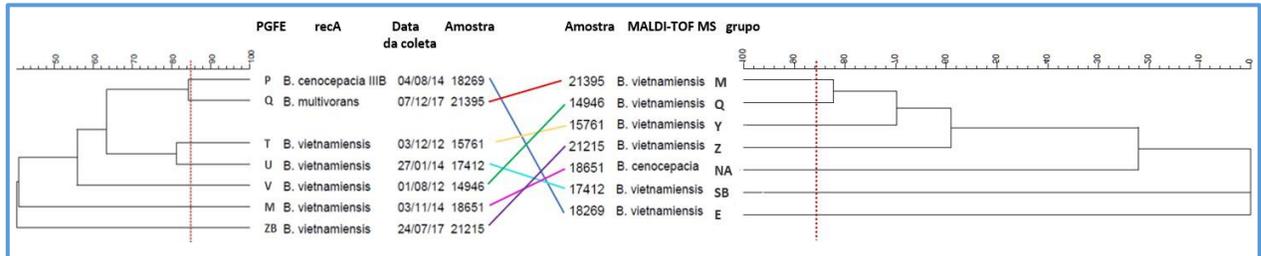
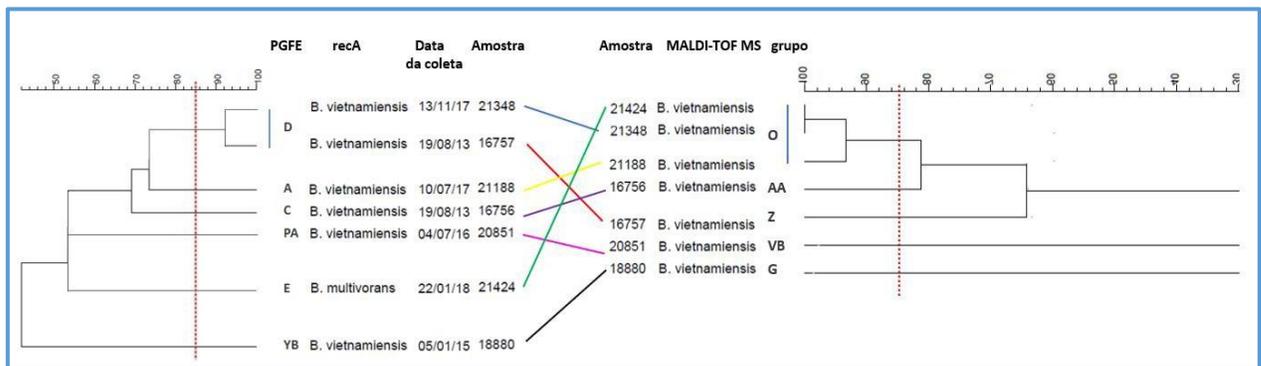


Figura 6 – Análise longitudinal a partir dos pulsotipos obtidos das amostras dos pacientes colonizados cronicamente por mais de uma espécie do CBc

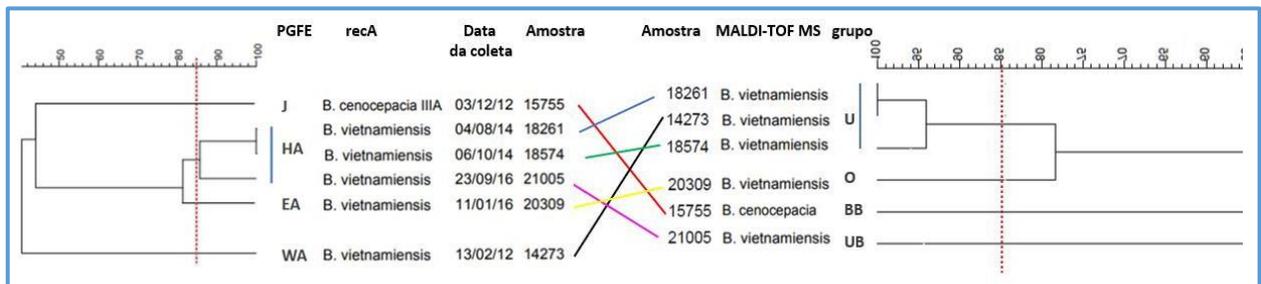
Paciente 8



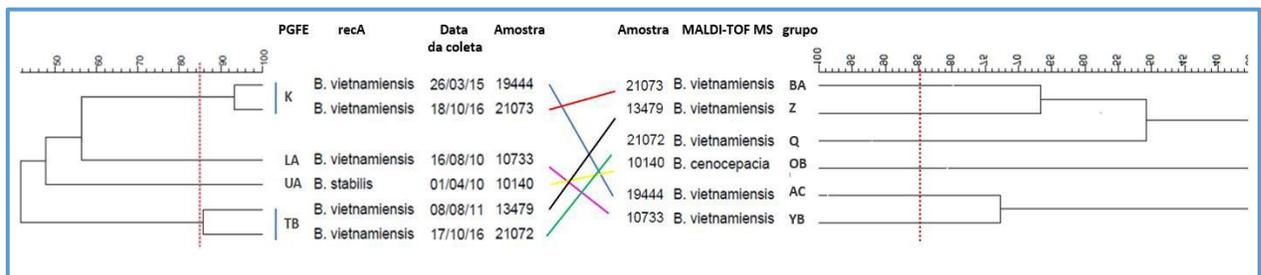
Paciente 9



Paciente 12



Paciente 16



3.7 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A partir do método de difusão em ágar foram obtidos e analisados os perfis de não susceptibilidade aos antimicrobianos: ceftazidima (CAZ), meropenem (MEM), minociclina (MIM) e sulfametoxazol+trimetoprima (SXT), utilizados no tratamento de infecções do CBc, classificados em perfis de A a F (Tabela 7).

Setenta e uma (63,96%) amostras apresentaram resistência a pelo menos um marcador testado. Destacando a prevalência do perfil F para 34 (30,63%) amostras e C para 15 (13,51%) amostras.

Tabela 7 – Perfis de não sensibilidade aos antimicrobianos das 71 amostras do CBc por instituição de atendimento

<i>Perfil</i>	<i>Marcadores de Não Sensibilidade</i>	<i>IFF N de amostras</i>	<i>HUPE N de amostras</i>	<i>Total</i>
A	CAZ-MEM-MIN-SXT	4	1	5
B	MEM-MIN-SXT	5	0	5
C	CAZ-MEM-SXT	12	3	15
D	CAZ-SXT	3	1	4
E	MEM-SXT	5	3	8
F	SXT	24	10	34

Legenda: CAZ: ceftazidima; MEM: meropenem; MIN: minociclina; e SXT: sulfametoxazol+trimetoprima; IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da criança e do adolescente Fernandes Figueira; e PPC: Hospital Universitário Pedro Ernesto na Policlínica Piquet Carneiro.

Fonte: O autor, 2021.

Os perfis foram analisados de acordo com as espécies encontradas em nosso estudo (Tabela 8). Dentre estes foram observados em 33 (46,47%) amostras de *B. vietnamiensis*, o perfil F como o mais prevalente, presentes em 15 (45,45%) amostras. Destaca-se a presença de todos os seis perfis encontrados a partir dos antimicrobianos utilizados para essa espécie. Assim como, a prevalência desses perfis em amostras de pacientes do IFF (90,9%/n=30).

Para as amostras da espécie *B. cenocepacia* IIIA, observamos dentre os 5 perfis apresentados, a prevalência dos perfis C e F com 6 (40%) amostras cada.

Ambas as amostras de *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* IIIA, apresentaram o perfil C, classificados como MDR, por apresentarem resistência simultânea aos antimicrobianos ceftazidima (CAZ), meropenem (MEM) e sulfametoxazol+trimetoprima (SXT).

As amostras de *B. cenocepacia* IIIB apresentaram prevalência nos perfis D e F. Cinco (50%) amostras com resistência a sulfametoxazol+trimetoprima (SXT) e 2 (20%) a ceftazidima (CAZ) e sulfametoxazol+trimetoprima (SXT).

As amostras de *B. multivorans*, *B. cepacia* e *B. stabilis*, apresentaram prevalência no perfil F, resistência apenas ao antimicrobiano sulfametoxazol+trimetoprima (SXT).

Tabela 8 – Perfis de não sensibilidade aos antimicrobianos das 111 amostras do CBc por espécie, isoladas de 28 pacientes com FC, atendidos em dois centros de referência no Rio de Janeiro (continua)

	<i>Perfil</i>	<i>Marcadores de Não Sensibilidade</i>	<i>IFF</i>	<i>HUPE</i>
<i>B. vietnamiensis</i>	A	CAZ-MEM-MIN-SXT	3	0
	B	MEM-MIN-SXT	3	0
	C	CAZ-MEM-SXT	6	0
	D	CAZ-SXT	1	0
	E	MEM-SXT	4	1
	F	SXT	13	2
<i>B. cenocepacia</i> IIIA	A	CAZ-MEM-MIN-SXT	0	1
	B	MEM-MIN-SXT	1	0
	C	CAZ-MEM-SXT	4	2
	E	MEM-SXT	0	1
	F	SXT	3	3
<i>B. cenocepacia</i> IIIB	A	CAZ-MEM-MIN-SXT	1	0
	B	MEM-MIN-SXT	1	0
	C	CAZ-MEM-SXT	1	0
	D	CAZ-SXT	2	0
	F	SXT	3	2
<i>B. multivorans</i>	C	CAZ-MEM-SXT	1	0
	E	MEM-SXT	1	1
	F	SXT	3	3

Tabela 8 – Perfis de não sensibilidade aos antimicrobianos das 111 amostras do CBc por espécie, isoladas de 28 pacientes com FC, atendidos em dois centros de referência no Rio de Janeiro (conclusão)

<i>B. contaminans</i>	C	CAZ-MEM-SXT	0	1
	D	CAZ-SXT	0	1
<i>B. cepacia</i>	F	SXT	1	0
<i>B. stabilis</i>	F	SXT	1	0

Legenda: CAZ: Ceftazidima; MEM: Meropenem; MIN: Minociclina; SXT: Sulfametoxazol+Trimetoprima; IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da criança e do adolescente Fernandes Figueira; e PPC: Hospital Universitário Pedro Ernesto na Policlínica Piquet Carneiro.

Fonte: O autor, 2021.

3.8 Detecção de gene de resistência *sul1* por Reação em Cadeira da Polimerase

Para esta análise foram selecionadas 17 amostras de acordo com cada perfil de sensibilidade observado no estudo (A – F), incluindo impreterivelmente a resistência ao antimicrobiano SXT, variando de 1 (5,88%) a 9 (52,94%) amostras por perfil (Tabela 9). Contudo, não foram encontrados o produto de PCR compatível com a amplificação do gene *sul1*.

Tabela 9 – Amostras analisadas para detecção do gene *sul1* pela Reação em Cadeira da Polimerase

<i>Nº da amostra</i>	<i>Sequenciamento do gene recA</i>	<i>Perfil de resistência</i>
15761	<i>B. vietnamiensis</i>	
20942	<i>B. vietnamiensis</i>	A
20430	<i>B. vietnamiensis</i>	B
9882	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	
13479	<i>B. vietnamiensis</i>	C
21077	<i>B. vietnamiensis</i>	
18269	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	D
21098	<i>B. vietnamiensis</i>	E
12060	<i>B. vietnamiensis</i>	
13191	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	
13250	<i>B. multivorans</i>	
18261	<i>B. vietnamiensis</i>	
18574	<i>B. vietnamiensis</i>	F
21004	<i>B. multivorans</i>	
21009	<i>B. vietnamiensis</i>	
21124	<i>B. vietnamiensis</i>	
21142	<i>B. vietnamiensis</i>	

3.9 Sequenciamento e anotação do genoma da amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar

O sequenciamento genômico foi realizado para a amostra de *B. cenocepacia* 21440, recuperada em 2018, única amostra proveniente de uma cultura de abscesso hepático de paciente com FC, do sexo feminino, 18 anos, branca, com histórico prévio de pneumonias recorrentes desde 3 meses de idade, esteatorreia e dificuldade de ganho de peso ponderal, diagnosticada com FC com 2 anos e 4 meses de idade, com 2 testes do suor com concentrações de cloreto acima de 60mEq/L (64,5 e 99 mEq/L, respectivamente) e identificação das variantes do gene CFTR: S4X e 120del23.

A anotação do genoma foi realizada nas plataformas RAST e PATRIC, onde foram encontrados as seguintes características expressas na Tabela 10:

Tabela 10 – Características genômicas da amostra 21440 a partir do sequenciamento de nova geração

<i>Características genômicas</i>	
<i>Conteúdo GC%</i>	67,3%
<i>Cobertura</i>	18
<i>Tamanho</i>	7.728.731
<i>Scaffolds (n)</i>	96
<i>RNA (n)</i>	69
<i>CDs (n)</i>	7.760
<i>N50</i>	160.353

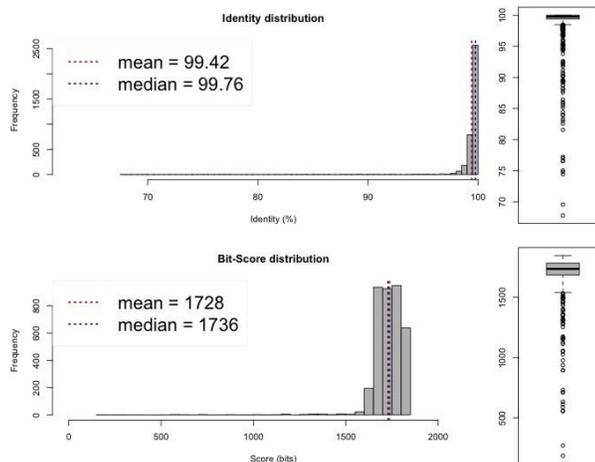
Legenda: GC: Guanina-citosina; Scaffolds: agrupamento de contigs; RNA: ácido ribonucleico; CD: sequências codificantes; e N50: número de *contigs* correspondentes ao valor de N50.

Fonte: O autor, 2021.

3.9.1 Seleção do genoma bacteriano para análise comparativa

Utilizando o algoritmo K-mer fast, a cepa *B. cenocepacia* J2315 foi selecionada como referência para comparação genômica. A identidade nucleotídica média (INM) entre as estirpes 21440 e J2315 foi de 99,42% (Figura 7): INM de via única: 98,58% (SD: 4,79%), a partir de 3894 fragmentos; INM 2 unilateral: 99,42% (SD: 1,87%), a partir de 6169 fragmentos; e INM de duas vias: 99,42% (SD: 1,82%), a partir de 3721 fragmentos.

Figura 7. Identidade média de nucleotídeos entre as cepas 21440 e J2315



3.10 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos aplicado a amostra proveniente do abscesso hepático

Os resultados do diâmetro (mm) de cada zona foram mensurados para antimicrobianos não padronizados pelo CLSI para CBc, para a amostra sequenciada (21440). Apresentando os seguintes valores: tobramicina (0), polimixina (0), amicacina (0), gentamicina (0), imipenem (9), ciprofloxacina (15), levofloxacina (18), piperacilina/tazobactam (39) e cefepima (40).

3.11 Tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing in silico*

Os seguintes perfis alélicos foram obtidos: *atpD* (15), *gltB* (11), *gyrB* (9), *recA* (14), *lepA* (11), *phaC* (6) e *trpB* (12), resultando em uma sequência classificada como ST-28, pertencente ao complexo clonal 31.

3.12 Identificação de genes de resistência

Através da ferramenta PATRIC AMR foram identificados 64 genes especializados que codificam resistência a 67 antimicrobianos, 28 classes de antimicrobianos e genes relacionados a 10 mecanismos de resistência (Tabela 11).

Os principais genes que codificam resistência aos aminoglicosídeos foram: aminoglicosídeo-6-fosfotransferase, *gidB* (16SRNA), APH (3') - II / APH (3') - XV (transferase) e S12p (proteína ribossômica SSU).

Genes relacionados a resistência as quinolonas foram: *gyrA* (subunidade da girase do DNA), *gyrB* (subunidade B da girase do DNA), EmrAB-TolC (sistema de efluxo de múltiplas drogas), EmrAB-OMF (fator de membrana externa (OMF) associada à lipoproteína associada) e proteína H de ligação ao DNA-NS.

Apenas um gene foi encontrado relacionado à resistência aos carbapenêmicos pertencente a família OprD (porina de baixa permeabilidade da membrana externa).

Nenhum gene de resistência antimicrobiana e/ou mutações cromossômicas foram identificados pela ferramenta ResFinder.

Tabela 11. Determinantes de resistência a antimicrobianos da amostra comparada a cepa J2315 (continua)

Mecanismo	Produto	Gene	J2315
Alvos para antimicrobianos	Dihidrofolato redutase	<i>folA</i> , Dfr	-
	DNA girase	<i>gyrA</i>	+
		<i>gyrB</i>	+
	Subunidade beta de RNA polimerase dirigida por DNA	<i>rpoB</i>	+
	Alanina racemase	Alr	+
	Fator de alongamento de translação	EF-Tu	-
	proteína carreadora sintase KASII (3-oxoacil-acil)	KasA	-
	D-alanina-D-alanina ligase	Ddl	+
	UDP-N-acetil glucosamina	<i>MurA</i>	+
	Diidropteroato sintase	<i>folP</i>	+
		EF-G	-
	Fator de alongamento de translação G	Rho	+
	isoleucil-tRNA sintase	Iso-tRNA	-
	Subunidade beta de RAN direcionada ao DNA	<i>rpoC</i>	+
	Proteína ribossomal SSU	S12p	+
		S10p	-
	1-deoxi-D-xilulose5-fosfato redutase isomerase	Dxr	+

Tabela 11. Determinantes de resistência a antimicrobianos da amostra comparada a cepa J2315 (continuação)

Bomba de efluxo	Sistema de efluxo multidroga EmrAB-OMF, próton de membrana interna / antiportador de drogas EmrB	EmrAB-OMF	-
		MdtABC-TolC	+
	Resistência à tetraciclinas, bomba de efluxo MFS – não classificada		+
	Fator de membrana externa – lipoproteína associada ao sistema de efluxo MdtABC	MdtABC-OMF	+
	Sistema de efluxo multidroga EmrAB-OMF, Fator de membrana externa associada ao sistema MexXY/AxyXY	MexXY-OMP	-
	Proteína de efluxo MacA específica para macrolídeo	MacA	+
	Ligação de ATP de exportação de macrolídeo/proteína permease MacB	MacB	+
Regulador de expressão	Ativador de genes indutíveis por peróxido de hidrogênio	OxyR	+
	Proteína de ligação ao DNA H-NS	H-NS	+
Enzima de inativação	beta-lactamase classe C	<i>ampC</i>	+
	Aminoglicosídeo 6-fosfotransferase		+
	beta-lactamase classe A	<i>penA</i>	+
	beta-lactamase classe D		+
	APH(3')-II/APH(3')-XV Aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase		+
Enzima de ativação antimicrobiana	Catalase-peroxidase KatG	KatG	+
Proteína de proteção antimicrobiana	Undecaprenil-difosfatase BcrC	BcrC	+

Tabela 11. Determinantes de resistência a antimicrobianos da amostra comparada a cepa J2315 (conclusão)

Proteína de alteração de da carga da parede celular	Glicerofosforil diester fosfodiesterase	GdpD	-
	CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato 3-fosfatidiltransferase	PgsA	+
Proteína moduladora de permeabilidade	Porina de baixa permeabilidade de membrana externa	OprB family	+
		OprD family	+
Proteína de substituição de alvo de antimicrobiano	Enoil-acil-transportador de proteína redutase [NADH]	<i>fabV</i>	+
Gene conferindo resistência via ausência	16SrRNA guanina527-N7-metiltransferase	<i>gidB</i>	+

Legenda: - ausente; e + presente.

Fonte: O autor, 2021.

3.13 Identificação de genes de virulência

Quarenta e sete genes relacionados à virulência foram identificados por comparação com as sequências de referência do banco de dados como possíveis fatores de virulências (FV) específicas da cepa. Os genes foram segregados de acordo com os mecanismos de ação e produtos (Tabela 12). Apenas o gene *pabB* não foi encontrado em J2315.

Tabela 12. Fatores de virulência da amostra 21440 comparada a cepa J2315 (continua)

Mecanismo	Produto	Gene	J2315	Plataforma
Antifagocitose	Polissacarídeo capsular, biossíntese de ácido graxos	<i>wcbR</i>	+	VFDB
	Proteína semelhante a Palmitoiltransferase	<i>wcbT</i>	+	
	UDP-3-O-[3-hidroxiiristoil] N-acetilglucosamina deacetilase	<i>wcbS</i>	+	
	P-ribosil glicinamida formiltransferase	<i>purN</i>	+	Victors
Invasão	Quimiotaxia proteína metiltransferase	<i>cheR</i>	+	VFBD
	Regulador de quimiotaxia – transmite sinais quimiorreceptores para componentes do motor flagelar	<i>cheY</i>	+	
	Fosfatase-resposta de quimiotaxia	<i>cheZ</i>	+	
	Proteína de formação de anel P de corpo basal flagelar	<i>flgA</i>	+	
	Proteína de modificação de bastão do corpo basal flagelar	<i>flgD</i>	+	
	Proteína de bastão flagelar basal	<i>flgC</i>	+	
		<i>flgG</i>	+	
	Proteína de biossíntese flagelar	<i>flhA</i>	+	
		<i>flhB</i>	+	
		<i>fliP</i>	+	
		<i>fliQ</i>	+	
		<i>fliR</i>	+	
		<i>fliS</i>	+	
	Proteína do anel L flagelar	<i>flgH</i>	+	
	Proteína de rotação do motor flagelar	<i>motA</i>	+	
	Proteína de troca do motor flagelar	<i>fliG</i>	+	
		<i>fliM</i>	+	
<i>fliN</i>		+		
Proteína flagelar do anel P	<i>flgI</i>	+		

Tabela 12. Fatores de virulencia da amostra 21440 comparada a cepa J2315 (continuação)

	Proteína flagelar	<i>fliJ</i>	+	
	ATP sintase específica do flagelo	<i>fliI</i>	+	
	Regulador positivo da atividade da proteína CheA	<i>cheW</i>	+	
	Fator sigma de RNA polimerase para operon flagelar	<i>fliA</i>	+	
Sinalização intracelular	Proteína de domínio EAL	<i>cdpA</i>	+	VFDB/ Victors
Metabolismo	Sintase do Corismato	<i>aroC</i>	+	Victors
	Desidrogenase contend FAD/FMN		+	
	Peptidilglicano lipideo II flippase MurJ	<i>mviN</i>	+	
	Proteína de dominio relacionado à citidiltransferase		+	
	Argininosuccinato sintase	<i>argG</i>	+	
	3-isopropilmalato desidrogenase	<i>leuB</i>	+	
	3-deidroquinato sintase	<i>aroB</i>	+	
	fosfoenolpiruvato sintase	<i>ppsA</i>	+	
	Fosfoserina aminotransferase	<i>serC</i>	+	
	Transportador ABC, proteina permease (cluster 10, nitrato/sulfonatp/bicarbonato)		+	
	P-ribosilformilglicinamidina ciclo-ligase	<i>purM</i>	+	
	Fator de alongamento de translação Tu	<i>tufA</i>	+	
	Antranilato sintase, componente amidotransferase, Para-aminobenzoato sintase, componente amidotransferase	<i>trpG</i>	+	
	Antranilato sintase, componente aminase	<i>pabB</i>	-	
	Subunidade ampla de acetolactato sintase	<i>ilvI</i>	+	
Reparo de DNA	Proteína RecA	<i>recA</i>	+	

Tabela 12. Fatores de virulência da amostra 21440 comparada a cepa J2315 (conclusão)

Replicação, recombinação e reparo	Endonuclease III	<i>nth</i>	+
Quorum sensing	Proteína de ligação a RNA Hfq	<i>hfq</i>	+
Resposta ao Estresse	Fator sigma de RNA polimerase	<i>rpoE</i>	+

Legenda: +: presente; VFDB: Virulence Factor Database; e Victors: Victors Virulence Factor

Fonte: O autor, 2021.

3.14 Determinação de elementos móveis

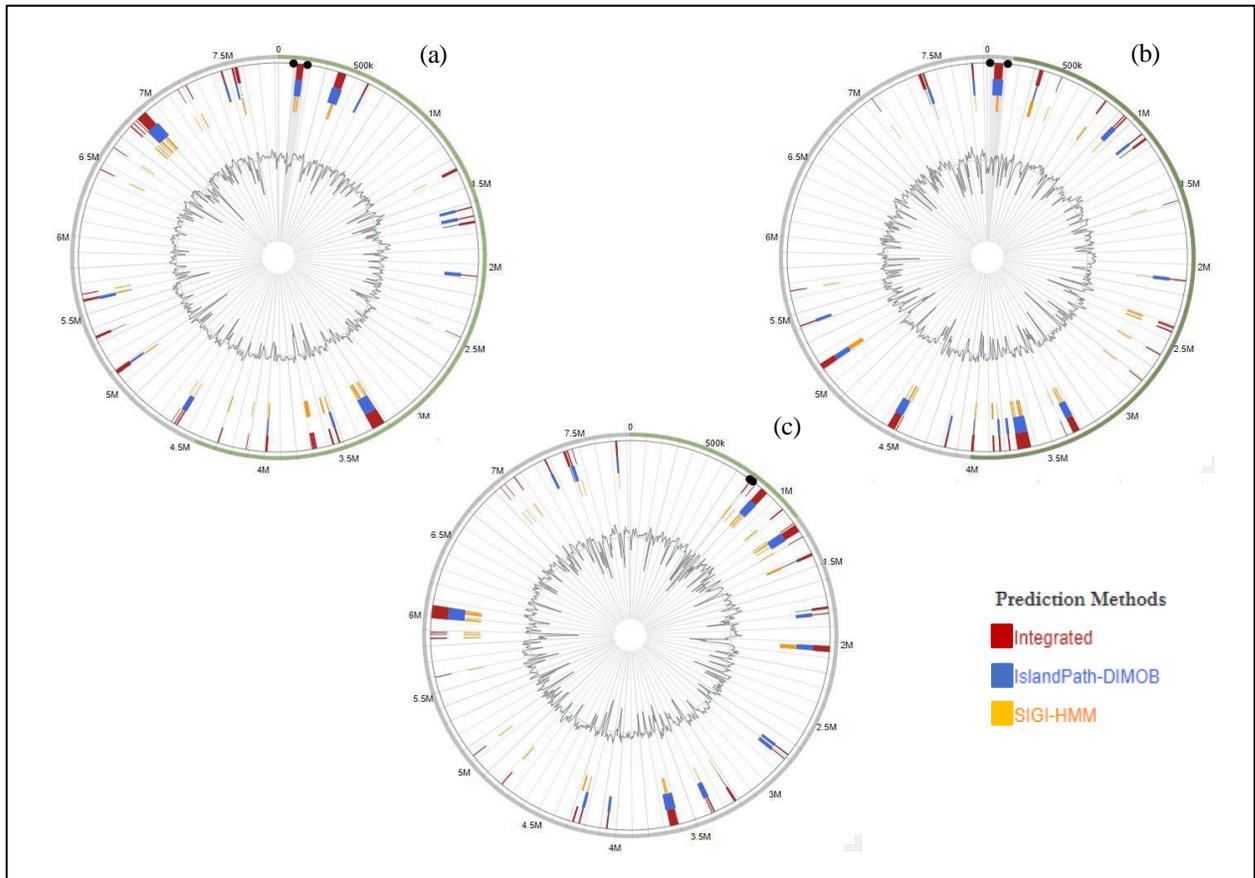
As seqüências de inserção (SIs), elementos transponíveis, foram observadas no genoma pertencente a 2 famílias: IS3 (ISBcen7, ISBcen16, ISBmu6, ISBxe1) e IS5 (ISBuce2).

Foi detectado apenas um plasmídeo de 80.374 pb (conteúdo GC de 61,69%). Sua análise sequencial revelou a presença de genes associados a características catabólicas e uma proteína de montagem de pilus de transferência conjugada (TraF, TraH, TraK, TraK, TraU, TraW, TraD, TraN). Nenhum fago foi encontrado usando a metodologia proposta.

As Ilhas Genômicas (IGs) específicas para a amostra 21140 foram detectadas por comparação entre pares de sua seqüência genômica com os cromossomos 1, 2 e 3 do isolado ET-12 de *B. cenocepacia* J2315 (Figura 8).

Combinando os dois métodos, SIGI-HMM - baseado no viés de uso de códons com uma abordagem de modelo de Hidden Markov, e IslandPath-DIMOB - baseado no viés de nucleotídeos e presença de genes de mobilidade - um total de 57, 54 e 57 GIs foram previstos por pelo menos um método nos cromossomos 1, 2 e 3 em comparação com MS-2140, respectivamente. Os tamanhos dos IGs variaram de 84.683 a 4.006 kb.

Figura 8. Ilhas genômicas (IG) identificadas na amostra 21440 a partir do alinhamento ao genoma da cepa J2315, cromossomos 1 (a), 2 (b) e 3 (c) pelos métodos de previsão IslandViewer4 SIGI-HMM e IslandPath-DIMOB.



Fonte: O autor, 2021.

Os FVs e genes de resistência antimicrobiana previamente descritos foram encontrados nas IGs da amostra 21440 (Tabela 13).

Tabela 13 – Fatores de virulência e genes de resistência encontrados em IGs da amostra 21440.

Localização da Ilha	comprimento	Localização do gene	Produto
Cromossomo 1			
5070232 - 5097488	27256	5070232 - 5070534	Proteína de ligação a DNA H-NS
5070232 - 5079319	9087	5070232 - 5070534	Proteína de ligação a DNA H-NS
377340 - 432412	55072	393060 - 393662	Undecaprenil-difosfatase BcrC
574538 - 586302	11764	580617 - 583091	DNA girase subunidade B
6851249 - 6918761	67512	6917997 - 6918761	Proteína de rotação motora flagelar MotA
Cromossomo 2			
330752 - 356112	25360	330752 - 331054	Proteína de ligação a DNA H-NS
330752 - 352346	21594	330752 - 331054	Proteína de ligação a DNA H-NS
45377 - 100449	55072	61097 - 61699	Undecaprenil-difosfatase BcrC
7723326 - 7735416	12090	7727405 - 7729879	DNA girase subunidade B
Cromossomo 3			
1075180 - 1084267	9087	1083965 - 1084267	Proteína de ligação a DNA H-NS
3607593 - 3662665	55072	3623313 - 3623915	Undecaprenil-difosfatase BcrC
7728819 - 7740909	12090	7732898 - 7735372	DNA girase subunidade B

Fonte: O autor, 2021.

Foram analisadas 7760 sequências, apenas 4 foram identificadas como repetições palindrômicas curtas com espaçamento intercalado agrupado (CRISPR), classificadas com evidência de nível 1 (Figura 6).

Figura 9. Sequências CRISPR identificadas pela ferramenta CRISPR-Cas++.

Sequence 95486_413_peg_2824 [3276 bp] [1 CRISPR] [1 spacers] [1 evidence level] [0 Cas] [0 genes]

Sequence 95486_413_peg_3022 [453 bp] [1 CRISPR] [1 spacers] [1 evidence level] [0 Cas] [0 genes]

Sequence 95486_413_peg_5684 [2541 bp] [1 CRISPR] [1 spacers] [1 evidence level] [0 Cas] [0 genes]

Sequence 95486_413_peg_5859 [1866 bp] [1 CRISPR] [1 spacers] [1 evidence level] [0 Cas] [0 genes]

Os resultados apresentados foram publicados pelo nosso grupo no artigo: de Freitas Vianna, E., Izzy Miotto Menezes, N., Muraro de Almeida, M., Alvim Dutra de Freitas, F., da Costa Ferreira Leite, C., Cassia Firmida, M., Ribeiro Iglesias de Medeiros, D., Souza Leão, R., Mattos Albano, R., & Andrade Marques, E. (2021). *Genomic analysis of Burkholderia cenocepacia isolated from a liver abscess in a patient with cystic fibrosis*. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 10.1111/apm.13177. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/apm.13177> (Anexo C)

4. DISCUSSÃO

4.1 Da ocorrência das espécies do CBc identificadas através do sequenciamento do gene *recA*

A despeito da maior sobrevida alcançada pelos pacientes com FC nos últimos anos, a recorrente infecção pulmonar permanece como a principal causa de morbimortalidade desses indivíduos (BLANCHARD; WATERS, 2019).

As infecções crônicas por algumas espécies do CBc na FC são continuamente associadas a resultados desfavoráveis, incluindo declínio clínico acelerado da função pulmonar e aumento da mortalidade, substancialmente pior quando comparados a outras bactérias que compõem o perfil microbiológico na FC (BELL *et al.*, 2019). Esses aspectos ressaltam a importância da caracterização do CBc durante o processo crítico para escolha do tratamento antimicrobiano adequado, como também nas práticas de prevenção e controle de infecções (RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019).

Em nosso estudo, através do sequenciamento molecular do gene *recA*, observamos a maior ocorrência das espécies *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia*, sendo possível através desta técnica a segregação em subgrupos filogenéticos.

Analisando a ocorrência das espécies do CBc, considerando a prevalência por paciente, observamos uma maior colonização por *B. cenocepacia* pelo subtipo IIIA. Já, *B. vietnamiensis* foi a segunda espécie predominante.

Considerando os estudos da última década, foram observados resultados similares a dois centros de referência brasileiros. O primeiro, descrito por Capizzani e colaboradores (2017), com 24 pacientes cronicamente colonizados por CBc, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de 2011 a 2014. Os paciente foram colonizados predominantemente por *B. vietnamiensis* (n=14/58,33%), *B. cenocepacia* IIIA (n=5/20,83%) e IIIB (n=2/8,33%), e *B. multivorans* (n=2/8,33%). E apenas um (4,16%) paciente cada com as espécies *B. cepacia*, *B. difusa* e *B. contaminans*.

O segundo estudo, realizado por Vicenzi e colaboradores (2016), com 16 pacientes, foram analisadas 36 amostras procedentes do Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da

Universidade Federal do Paraná (UFPR), no período de 2003 a 2009, as espécies predominantes foram: *B. cenocepacia* com 61,11% (n=22), sendo 33,4% pertencentes ao subtipo IIIA e 30,6% a IIIB, e *B. vietnamiensis* com 30,6% (n=11).

Já no estudo realizado por Dentini e colaboradores (2017), no centro de referência da Universidade de Campinas, São Paulo, em 26 pacientes, no período de 2000 a 2014, considerando uma amostra por paciente, as espécies mais comumente encontradas foram *B. cenocepacia*, seguida de *B. multivorans*.

Uma grande variabilidade na distribuição das espécies do CBc é encontrada ao redor do mundo, embora sejam observadas as maiores taxas de prevalência para *B. cenocepacia* e *B. multivorans* (RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019). Em recente estudo de coorte retrospectivo realizado por Somayaji e colaboradores (2020), com 88 crianças e adultos com FC acompanhados no *Hospital for Sick Children* and *St. Michael's Hospital* (Toronto, Ontário, Canadá), de 1997 a 2018, demonstrou a prevalência de *B. multivorans*, correspondendo a 51% e *B. cenocepacia* em 38% das amostras. Zlosnik e colaboradores (2015), avaliando a epidemiologia ao longo de 30 anos (1981 a 2011), na Colúmbia Britânica, Canadá, analisaram 688 isolados, onde houve a prevalência de *B. cenocepacia* (44,91%) e *B. multivorans* (40,84%). *B. vietnamiensis* foi descrita como terceira mais prevalente, representando 6,25% dos isolados.

No Reino Unido, *B. multivorans* foi reportada como a espécie mais prevalente entre os pacientes com FC, afetando 56% (n=192), seguida por *B. cenocepacia* IIIA (15%; 52 pacientes) (KENNA *et al.*, 2017). Todavia, em estudo retrospectivo, de 2005 a 2015, realizado pelo *Cystic Fibrosis Centre* em Milão, Itália, em seguimento de 21 pacientes, totalizando 151 isolados do CBc, as espécies mais prevalentes foram *B. cenocepacia* (38%), *B. stabilis* (19%) e *B. multivorans* (14,2%) (TERI *et al.*, 2018).

Torna-se interessante ressaltar que no Brasil, os dados do REBRAFC (2019) não contemplam a identificação por espécies do CBc, assim como, os registros anuais de pacientes nos EUA (CFF, 2019) e na Europa (ECFSPR, 2019).

As atribuições a diferentes perfis epidemiológicos no mundo para o CBc ainda não estão estabelecidas, entretanto acredita-se estar relacionados a alguns fatores como a aquisição de cepas por fontes ambientais, uma maior diversidade devido a aplicação das medidas, delimitando a transmissão cruzada entre pacientes, assim como, impedindo a disseminação de cepas mais

virulentas como *B. cenocepacia* IIIA. Outro fator está relacionado a inexistência de protocolo único para tratamento antimicrobiano entre os centros propiciando diferentes perfis epidemiológicos.

Destacamos também a dificuldade no processo de identificação em laboratórios não especializados, limitados por vezes a métodos fenotípicos, e a constante atualização de diversificados métodos moleculares (16S rRNA, *recA*, *hisA* e *rpsU*) utilizados em laboratórios de estudo/referência, descrevendo novas espécies, ampliando ou reorganizando sua taxonomia. Esta ausência de padronização na metodologia de identificação entre os estudos divulgados e centros de referência, restringem assim a caracterização das espécies do CBc, limitando os dados dos relatórios anuais apenas ao gênero.

4.2 Das variações do perfil de identificação das amostras no MALDI-TOF MS

O CBc possui uma organização taxonômica complexa e dinâmica com novas espécies identificadas ou reclassificadas ao longo dos anos. A identificação incorreta dessas espécies representa um problema para o tratamento de pacientes com FC e para o controle epidemiológico, tornando-se um desafio para os laboratórios de microbiologia (DE DIOS *et al.*, 2016; SFEIR, 2018).

MALDI-TOF MS tem sido usado para identificar cepas do CBc isoladas de pacientes com FC apresentando resultados variáveis para nível de espécie comparado ao sequenciamento do gene *recA* (metodologia de referência) (FEHLBERG *et al.*, 2013; VICENZI *et al.*, 2016; FURLAN *et al.* 2019).

Nosso estudo corrobora a precisão do sistema MALDI-TOF MS para identificação a nível de gênero. No entanto, considerando o ponto de corte ≥ 2.000 , mostrou uma correlação total de 63,96% a nível de espécie. Entre as espécies avaliadas, *B. vietnamiensis* apresentou o maior percentual de identificação à nível de espécie. Seguido de *B. cenocepacia*, não sendo possível através do MALDI-TOF MS diferenciar em subgrupos filogenéticos.

Em estudo realizado por De Dios e colaboradores (2016), com 49 amostras do CBc, no período de 2010 a 2015, MALDI-TOF identificou com precisão 98 e 71,42% dos isolados a nível de gênero e espécie, respectivamente.

Em 2020, Wong e colaboradores apresentaram um estudo com 95 isolados do CBc, onde MALDI-TOF MS identificou 100% das amostras a nível de gênero. Apenas as amostras de *B. dolosa* foi corretamente identificada em espécie. As espécies *B. multivorans* e *B. cenocepacia*, apresentaram 80 e 50% de identificações corretas, respectivamente.

Porém, resultados controversos em análise realizada por Furlan e colaboradores (2019) com 22 amostras do CBc, 50% dos isolados foram identificadas como pertencentes a outros gêneros. As demais amostras (n=11/50%) foram identificadas como CBc, e apenas 3 (13,63%) foram corretamente identificadas a nível de espécie. Nossos isolados clínicos de *B. contaminans* e *B. multivorans* foram identificados incorretamente pelo MALDI-TOF MS, como também relatado anteriormente por Fehlberg e colaboradores (2013), em estudo realizado com 91 amostras do CBc, onde 3,29% (n=3/11) de *B. multivorans* e 13,18% (12/12) amostras de *B. contaminans* apresentaram 100% de identificação incorreta.

Em nosso estudo, encontramos uma maior frequência de erros de identificação para isolados de *B. contaminans*. Essas identificações erradas podem ser atribuídas à alta similaridade genética dos isolados com espectros de massa semelhantes, variando de acordo com os bancos de dados, bem como, com a ausência de seu espectro no próprio banco de dados (CLINICAL CLSI, 2017; POONAWALA *et al.*, 2018).

Para pacientes com FC, o pior cenário é a identificação incorreta de *B. cenocepacia* como sendo de outras espécies, uma vez que esta é particularmente preocupante devido à sua alta transmissibilidade entre os pacientes e associação com a síndrome de cepacia. Três isolados de *B. cenocepacia* foram identificados incorretamente pelo MALDI-TOF com pontuação ≥ 2.000 .

Os resultados variáveis entre os estudos podem ser explicados em parte, a versão espectral correspondente do banco de dados utilizado; o alto grau de homologia genética compartilhada por isolados do CBc; o número de diferentes espécies incluídas; e ponto de corte utilizado (POONAWALA *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2020).

Embora os estudos comumente considerem a identificação a nível de espécie em amostras com pontuação ≥ 2.000 (DESAI *et al.*, 2012; POONAWALA *et al.*, 2018; OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021). Alguns estudos mostram protocolos adaptados para otimizar a precisão da identificação, principalmente para micro-organismos de difícil caracterização, como diminuição do ponto de corte para identificação em espécie proposto pelos fabricantes.

Barberis e colaboradores (2014) validaram uma pontuação ≥ 1.700 para identificação em espécie de uma ampla e diversificada coleção de bastonetes Gram-positivos, o MALDI-TOF MS pelo método direto de aplicação foi utilizado para identificação de 202 amostras de *Corynebacterium* spp., em conjunto aos métodos do sequenciamento do gene 16S rRNA e do gene *rpoB*. Considerando um *score* entre 1.700 e 2.000 para caracterização a nível de espécie, foram incluídas 49 amostras às 153 já classificadas a nível de espécie conforme os critérios do fabricante (*score* ≥ 2.00), perfazendo um total de 100% de identificação.

Assim como, Alatoon e colaboradores (2012) avaliaram a identificação de 92 isolados clínicos de espécies de *Corynebacterium* através do MALDI-TOF MS comparada a identificação molecular (sequenciamento do gene *rpoB* ou 16S rRNA), mostrando que todos os 80 (87%) isolados foram corretamente identificados em espécie, considerando também uma pontuação ≥ 1.700 .

Considerando a aplicação de uma minoração no ponto de corte para ≥ 1.700 em nosso estudo, 98 (88,28%) dos isolados alcançariam a identificação em espécie, resultados comparáveis ao alcançado através da metodologia de referência (sequenciamento do gene *recA*). *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* seriam as espécies que obteriam um maior número de amostras identificadas a nível de espécie 97,91 e 93,47%, respectivamente. A minoração do ponto de corte permitiria a ampliação do nível de identificação das amostras do CBc a nível de espécie, impactando no processo de monitoramento e maior rapidez na aplicação de medidas de segregação de pacientes com FC colonizados pelas espécies do CBc. Hoje, os pacientes com FC nos centros de referência, sabidamente colonizados por CBc são apenas segregados dos demais pacientes colonizados por outros gêneros dentro do perfil microbiológico na FC.

Até momento, apenas o estudo publicado pelo nosso grupo, avaliou o desempenho de identificação pelo MALDI-TOF MS considerando a diminuição dos pontos de corte comparado aos resultados obtidos pelo sequenciamento do gene *recA* (VIANNA, 2021).

4.3 Dos grupos gerados através do dendrograma por MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS associado a programas de bioinformática tem sido avaliado quanto ao potencial para tipagem de cepas bacterianas. Múltiplos estudos exploram o poder discriminatório a partir da análise proteômica para tipagem de cepas bacterianas, entretanto, apresentando resultados variáveis (SPINALI *et al.*, 2015; NEOH *et al.*, 2019; OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021).

Steensels e colaboradores (2017) avaliaram o uso do MALDI-TOF MS como uma ferramenta para tipagem em surto de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em unidade de terapia intensiva neonatal comparado aos resultados de PFGE. Quinze isolados foram analisados, e foi relatada a concordância de 93% entre as técnicas aplicadas, bem como, para tipagem de *spa* presente em cepas de *S. aureus*.

Para cepas de *Listeria monocytogenes*, Jadhav e colaboradores (2015) observaram índices discriminatórios comparáveis, apresentando apenas 3% de diferença entre as técnicas (PFGE e MALDI-TOF MS), sugerindo a análise de espectros de massa como uma técnica rápida e econômica de tipagem dessa espécie, permitindo a utilização em rastreamento de fontes.

Avaliando outros micro-organismo, García-Salguero e colaboradores (2020) investigaram a capacidade de MALDI-TOF MS para discriminar diferentes clones de *Acinetobacter baumannii*, a partir de 21 isolados com diferentes características epidemiológicas e fenotípicas. A análise resultou em 8 grupos clonais por PFGE e apenas 3 grupos pelo MALDI-TOF MS. Não apresentando equivalência entre os resultados obtidos.

Assim como descrito por Jiang e colaboradores (2019), ao avaliarem o poder discriminatório superestimado da espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) para tipagem de clones de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos, em 44 isolados. PFGE diferenciou esses isolados em 16 pulsotipos distintos, enquanto MALDI-TOF MS segregou os isolados em apenas quatro grupos, apresentando 60% de correspondência da composição do cluster.

Conforme dados em literatura, apenas um estudo descrito até o momento inclui a análise de uma espécie pertencente ao CBc. Fiamanya e colobadoradores (2021) investigaram o MALDI-TOF MS para detecção de surtos clonais de *B. contaminans* comparado a PFGE, em 55 amostras, incluindo isolados de pacientes com FC. MALDI-TOF MS discriminou com sucesso (100% de sensibilidade e especificidade) isolados em clusters clonais, além de reconhecer isolados não tipificáveis por PFGE.

Em nosso estudo, foram encontrados 85 grupos formados a partir do dendrograma obtido pelo MALDI-TOF MS apresentando maior poder discriminatório comparativamente ao PFGE, entretanto apresentando o agrupamento de diferentes espécies no mesmo perfil, concordando com os estudos menos favoráveis a aplicação da tipagem pela proteômica.

Nosso estudo com o objetivo de analisar longitudinalmente os pacientes colonizados cronicamente incluiu amostras de espécies distintas, que podem ser limitantes a análise dos espectros de massa com a finalidade para tipificação.

Alguns fatores tem sido relacionados às divergências nos resultados, como a ausência de picos (m/z), técnica aplicada no processo de identificação e extração dos dados, variação ou similaridade genética das espécies, assim como, limitações encontradas a partir do tamanho e qualidade do banco de dados (LÓPEZ-RAMOS *et al.*, 2020; HUBER *et al.*, 2021).

4.4 Da tipagem molecular por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

As análises sobre as correlações entre espécies bacterianas a partir da genotipagem molecular objetivam a caracterização da origem do surto ou infecção e impulsionam a compreensão da diversidade e evolução microbiana (ZULKEFLI *et al.*, 2016; NEOH *et al.*, 2019).

Dada a relevância da epidemiologia das infecções causadas pelo CBc em pacientes com FC, incluindo novas aquisições e expansão clonal crônica ou intermitentes, sua completude contribui significativamente para a compreensão das exacerbações pulmonares (KENNA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, considerando a análise conjunta de diferentes espécies do CBc observamos através da PFGE uma grande variedade de pulsotipos, das quais as espécies *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* IIIA apresentaram o maior número de pulsotipos. Considerando 100% de similaridade, destacamos pulsotipos que permaneceram nos mesmos pacientes por intervalos médio de 4 meses e apenas dois pulsotipos de *B. cenocepacia* IIIA foram compartilhados, apresentando apenas o pulsotipo J em pacientes (1 e 11) de instituições diferentes (IFF e PPC) no mesmo período.

Ampliando nosso estudo, considerando o ponto de corte para $\geq 85\%$ de similaridade entre as amostras, quatro outros pulsotipos foram compartilhados entre pacientes, onde apenas os pulsotipos A (*B. vietnamiensis*) e Z (*B. cenocepacia* IIIA) foram observados em instituições diferentes.

Em estudo realizado por Capizzani e colaboradores (2017), no acompanhamento de 9 pacientes cronicamente colonizados pelo CBc, isolados de diferentes pacientes tinham perfis diferentes, indicando a ausência de infecção cruzada. Entretanto, em dois pacientes foram isolados *B. vietnamiensis* de diferentes pulsotipos, e posteriormente caracterizados com similar *sequence type* (ST1056) através da técnica de MLST. Os autores supõem que devido os pacientes estarem separados uns dos outros, as cepas podem ter sido originadas de uma fonte comum de contaminação ou adquiridos no meio ambiente, pois cepas do CBc apresentam uma distribuição generalizada na natureza como, no solo, água, plantas e animais.

Em estudo proposto com a finalidade de avaliar a epidemiologia da espécie *B. cenocepacia* em 23 pacientes com FC no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), foram observamos diferentes pulsotipos, onde a maioria foi composta por apenas um isolado. Em 15 isolados de *B. cenocepacia* IIIA, foram caracterizados 9 pulsotipos e em 8 isolados de *B. cenocepacia* IIIB, 5 pulsotipos, sugerindo a ocorrência de múltiplos grupos clonais de *B. cenocepacia*, inferindo a ausência de transmissão cruzada entre pacientes com FC (PRETTO *et al.*, 2013, grifo nosso).

Em estudo de maior abrangência realizado por Kenna e colaboradores (2017), PFGE foi usado para estimar a proporção de 264 isolados pertencentes a 194 pacientes com FC, acompanhados em 73 hospitais no Reino Unido, no período de 2013 a 2015. De acordo com este estudo, cepas de *B. multivorans*, *B. cenocepacia* IIIA e IIIB foram compartilhadas principalmente entre irmãos.

Apesar da PFGE ser referência para tipificação, existem limitações relacionadas a técnica, incluindo sua utilização para análise de isolados de períodos muito distantes um dos outros, como no decurso de nosso estudo (2010 – 2018), mutações individuais podem destruir ou criar sítios de restrição, levando a modulações substanciais em perfis de restrição no PFGE, exigindo a necessidade da complementação com outras metodologias (KARGER, 2016; SAUGET *et al.*, 2017; LOPEZ-CANOVAS *et al.*, 2019).

Existem questionamentos quanto sua utilização para tipificação de cepas intimamente relacionadas como CBc; apesar da relação obtida através da restrição enzimática ser utilizada como

uma diretriz, pode não ser rigorosamente uma verdadeira medida filogenética. Assim como, a possibilidade de algumas cepas não serem tipadas por PFGE. Como medida para minimizar tais limitações os estudos habitualmente inferem a utilização da redução de pontos de corte para as análises de similaridade (NEOH *et al.*, 2019; STEENSELS *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, apesar de observados apenas dois pulsotipos entre os mesmos pacientes, e um único pulsotipo entre as instituições de referência, uma maior probabilidade de transmissão cruzada não pode deixar de ser considerada, podendo diferentes pulsotipos apresentarem o mesmo *sequence type*. Outro ponto, seria a fonte comum de origem de cepas, como por exemplo, provenientes do meio ambiente (CAPIZZANI *et al.*, 2017).

Os poucos exemplos de cepas compartilhadas em nosso estudo sugerem que as medidas de segregação impedindo infecções cruzadas existentes para o CBc são amplamente eficazes, principalmente no que tange a infecções por cepas virulentas como *B. cenocepacia* IIIA, mais associada com o declínio rápido da função pulmonar.

4.5 Da análise longitudinal por PFGE

Um critério de cronicidade de referência para colonização pelo CBc ainda não foi definido, decerto pela dificuldade no processo de caracterização das espécies. Comumente é utilizado o descrito por Lee e colaboradores (2003) para *P. aeruginosa*, utilizado também em nosso estudo (COUTINHO *et al.*, 2011; BARRADO *et al.*, 2013; SOMAYAJI *et al.*, 2020, HATZIAGOROU *et al.*, 2020).

No presente estudo, apesar de todos os pacientes serem classificados como colonizados cronicamente pelo CBc, para a análise longitudinal optamos por selecionar os pacientes que apresentaram, no mínimo, seis amostras em períodos distintos. Destes, apenas dois pacientes exibiram colonização pela mesma espécie (*B. cenocepacia* IIIB e *B. vietnamiensis*). Para os demais pacientes, apesar de observada a colonização intermitente por espécies do CBc, encontramos o predomínio de uma espécie com pulsotipos variados.

Em estudo realizado por Martina e colaboradores (2019), em Posadas, Argentina, no período de 2007 a 2017. Dos 64 pacientes, 5 (7,81%) foram classificados como cronicamente

colonizados e relatada infecção ou coinfeção por uma única espécie do CBc. Assim como descrito por Teri e colaboradores (2018) em estudo realizado no período de 2005 a 2015 em Milão, Itália, que analisou uma cepa por paciente/ano (n=21), a fim de verificar a permanência ou variação entre as espécies, observando a permanência do mesmo genótipo desde a primeira colonização.

Entretanto, Vasiljevic e colaboradores (2016), no *National CF Center* em Belgrado, Sérvia, avaliaram, no período de 2010 a 2013, 34 pacientes colonizados cronicamente pelo CBc. A maioria dos isolados encontrados pertenciam a dois pulsotipos pela PFGE, enquanto outros foram representados por um número limitado de isolados, indicando a colonização por cepas epidemiologicamente relacionadas. Ressalta-se que de acordo com os autores, práticas de segregação não estavam presentes nos centros de atendimentos devido a poucos recursos e espaços limitados.

As transições entre as espécies inicialmente colonizadas por outra prevalente observadas em nosso estudo, é corroborada por outros relatos de genotipagem que salientam que a infecção crônica é comumente associada a uma única cepa do CBc. É também possível verificar casos de coinfeção transitória com espécies distintas, principalmente tratando-se do processo inicial da infecção (MEDINA-PASCUAL *et al.*, 2012; PRETTO *et al.*, 2013; apud Yang., 2006; ZLOSNIK *et al.*, 2015; VASILJEVIC *et al.*, 2016).

Apesar de múltiplos pulsotipos observados em nosso estudo, apenas amostras do paciente 12 com pulsotipo EA (*B. vietnamiensis*) apresentou compartilhamento com outro paciente, destacando a importância do processo de segregação aplicado em nossos centros de referência.

A diversidade dos pulsotipos pode estar relacionada às mutações no sítio de restrição da enzima *SpeI*, alterando o padrão de restrição, levando à formação de diferentes pulsotipos, mesmo apresentando maior poder discriminatório que *XbaI* em técnica de PFGE. Contudo, podem apresentar o mesmo *sequence type* através do MLST (CHUA *et al.*, 2011; CAPIZZANI *et al.*, 2015).

4.6 Da análise comparativa entre os dendrogramas e agrupamentos obtidos através do PFGE e MALDI-TOF MS dos pacientes crônicos

Devido a importância no acompanhamento de pacientes colonizados pelo CBc, o contínuo processo de otimização de técnicas que permitam uma tipagem dessas cepas faz-se necessário, MALDI-TOF MS associado a programas de bioinformática, reúne condições que poderiam ser de ampla utilidade, entretanto, se comprovada sua capacidade discriminatória satisfatória (KARGER, 2016; STEENSELS *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, considerando apenas os pacientes selecionados para análise longitudinal, a análise da espectrometria de massa demonstrou um maior poder discriminatório através dos grupos gerados a partir do dendrograma. Entretanto, isolados que tiveram pulsotipos idênticos foram agrupados em diferentes clusters gerados pelo MALDI-TOF MS. Apenas duas amostras de dois pacientes foram reunidas nos mesmos grupos pelo MALDI-TOF MS, demonstrando baixa correlação entre as técnicas aplicadas.

Alguns estudos tem apresentados resultados favoráveis para tipificação utilizando a espectrometria de massa para algumas espécies como *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* e inadequados para outras espécies como *A. baumannii* e *B. contaminans* (JADHAV *et al.*, 2015; STEENSELS *et al.*, 2017; GARCÍA-SALGUERO *et al.*, 2020).

É interessante considerar que a tipagem obtida por PFGE e MALDI-TOF MS mensuram propriedades celulares diferentes. Entretanto, numericamente os conjuntos de dados para análise por ambas técnicas apresentam semelhanças, ainda que, em média, o número de picos (m/z) em um espectro de massa seja superior à quantidade dos fragmentos de restrição do PFGE (SPINALI *et al.*, 2015; GARCÍA-SALGUERO *et al.*, 2020).

Ainda que seja interessante a aplicação da proteômica para a tipificação, principalmente com foco no acompanhamento de pacientes colonizados cronicamente por cepas do CBc, são necessários mais estudos com a finalidade de padronização e estabelecimento de protocolos que permitam seu uso de forma segura.

4.7 Da sensibilidade a antimicrobianos e detecção do gene *sul1* por PCR

A resistência antimicrobiana (AMR) tornou-se um desafio relevante no tratamento de infecções pulmonares em FC, particularmente relacionada a infecções crônicas, com cepas adaptadas (ZEMANICK *et al.*, 2020; SCOFFONE *et al.*, 2021).

Em nosso estudo, as amostras apresentaram seis perfis de não sensibilidade aos antimicrobianos testados, onde o maior percentual de não sensibilidade foi observado para o antimicrobiano SXT, droga de escolha para tratamento de infecções pelo CBc.

Realizando a análise por espécie, as amostras de *B. vietnamiensis*, *B. cenocepacia* IIIB e *B. cenocepacia* IIIA exibiram não sensibilidade ao SXT em aproximadamente metade dos isolados seja isoladamente ou resistência associadas a outros antimicrobianos, associados ao perfil MDR.

Nossos resultados divergem dos encontrados por Díez-Aguilar e colaboradores (2019), em estudo realizado no período de 2003 a 2016, com amostras oriundas de 5 países (Espanha, Irlanda do Norte, Holanda, EUA e Austrália), com 100 amostras de *Burkholderia* spp. No estudo em questão, 72, 56 e 44% dos isolados foram suscetíveis a SXT, CAZ e MEM, respectivamente. Demonstrando maior susceptibilidade a SXT.

Como também descrito por Sethi e colaboradores (2020), ao analisarem 530 amostras do CBc durante o período de 2007 a 2016, no norte da Índia, foi observada maior resistência à CAZ, MEM, sendo SXT considerada a melhor escolha terapêutica para infecções pelo CBc.

Poucos estudos avaliam o perfil de sensibilidade a antimicrobianos considerando as espécies do CBc. Em estudo realizado por Capizzani e colaboradores (2017), em 24 amostras do CBc, MEM e CAZ foram os antimicrobianos mais eficazes contra *B. vietnamiensis*, e MIM e SXT para *B. multivorans* e *B. contaminans*, respectivamente.

Cipolla e colaboradores (2015), descrevem que metade 46% (n=15) dos isolados de *B. contaminans* foram resistentes a SXT, entretanto 76% (n=25) sensíveis a MIN, MEM e CAZ. Já, para a espécie *B. cenocepacia* foram observadas 100% (n=17) de resistência a SXT e MIM e 47% (n=8) a CAZ e MEM.

Em nosso estudo, os perfis de não sensibilidade descritos para as espécies *B. vietnamiensis*, *B. cenocepacia* (subgrupos IIIA e IIIB) e *B. multivorans* que demonstram um menor número de amostras, foram os que apresentam a associação de antimicrobianos, inferindo a necessidade de

utilização de mais de um antimicrobiano no tratamento de infecções por essas espécies, enfatizando o extenso perfil de resistência aos antimicrobianos (HUSE *et al.*, 2021). Para as demais espécies, o pequeno número de amostras apresentou-se como fator limitante ao estudo.

O antimicrobiano sulfametoxazol+trimetoprima, apesar de sua recente escassez no mercado nacional para uso endovenoso, ainda é utilizado como primeira opção terapêutica para tratamento de infecções pelo CBc, seguidas ou associadas a outras drogas como, ceftazidima e meropenem, ou em combinação com aminoglicosídeos. A sua utilização durante a terapia por décadas e considerando recorrentes internações de pacientes crônicos, sua exposição proporciona a indução de resistência a esta droga, observada também em nossos resultados (CAPIZZANI *et al.*, 2017).

Existem dificuldades inerentes ao teste de sensibilidade para as espécies do CBc, a começar pelos critérios interpretativos e padronização dos testes. No documento preconizado pelo comitê americano, CLSI, existem pontos de cortes estabelecidos para poucas drogas, já no documento europeu (EUCAST) e brasileiro (BrCAST), não são descritos pontos de corte para amostras do CBc. Essa ausência é justificada por possíveis variáveis metodológicas (DD, MIC, e automatização), com diferentes desempenhos dos métodos e incorretas correlações com os resultados clínicos, tornando discutíveis a reprodutibilidade e confiança dos resultados, especialmente por se tratar por um grupo composto por 24 espécies (HUSE *et al.*, 2021).

É interessante destacar, que apesar da utilização em diversos estudos/pesquisas dos critérios do documento americano a espécie do CBc utilizada para determinação dos pontos de corte não foi estabelecida.

Atualmente não existem evidências que apoiam as diretrizes ou consensos para erradicação do CBc. Entretanto, para infecções causadas pela espécie *B. cenocepacia*, devido seu perfil de virulência, a tentativa de erradicação é comumente aplicada em centros de referência envolvendo uma combinação de antimicrobianos (VAZIRANI *et al.*, 2021).

A resistência a sulfametoxazol pode estar diretamente relacionada a presença do gene *sul1* (dihidropteroato sintase resistente a sulfonamida), que catalisa a formação de 7,8-dihidropteroato a partir do ácido para-aminobenzóico e 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina-pirofosfato, uma etapa chave na via biossintética do folato, comumente apresentada em estudos por cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. maltophilia*, entre outros (MENDES *et al.*, 2020; YAKOUT; ALI, 2020; ZHOU *et al.*, 2021).

Notamos que nas 17 amostras, não sensíveis ao SXT, selecionadas para a pesquisa do gene *sul1*, não foram encontrados o produto de PCR compatível com a amplificação desse gene. Sugerindo que possa estar relacionada a presença de outros genes como, *sul2*, *folA*, *folP*, Dfr, Dhfr ou por bombas de efluxo como, BpeEF-OprC responsável pelo efluxo de cloranfenicol, fluoroquinolonas, sulfametoxazol, tetraciclinas e trimetoprima (PODNECKY *et al.*, 2017; RHODES *et al.*, 2018).

4.8 Da análise do sequenciamento genômico da amostra do CBc isolada do espécime clínico extra pulmonar

A colonização crônica pelo CBc está associada à perda significativa da função pulmonar, e a ocorrência da *síndrome de cepacia* é caracterizada por septicemia e pneumonia necrosante. Poucos relatos de infecções extrapulmonares por CBc em pacientes com FC são descritos na literatura (CANNY *et al.*, 1988; FRASER *et al.*, 1995; DENIS *et al.*, 2019).

Durante o acompanhamento dos pacientes cujas amostras foram incluídas no presente estudo, foi recuperado em um dos pacientes uma amostra de CBc de uma cultura de abscesso hepático. Por se tratar de um caso raro, optamos por realizar o sequenciamento do genoma e a descrição do caso clínico originando uma publicação (VIANNA, *et al.*, 2021) (Anexo B).

Realizamos a análise do sequenciamento completo do genoma da amostra 21440 denominada MS-2140, comparativamente à amostra referência *B. cenocepacia* J2315.

B. cenocepacia J2315 pertencente à linhagem ET12 encontrada na maioria dos surtos em pacientes com FC, associada a alta patogenicidade e múltiplos fatores de virulência (HOLDEN *et al.*, 2009). Neste estudo, a cepa MS-2140 foi identificada e classificada como ST-28, pertencente ao complexo clonal 31, utilizando a técnica de MLST (*in silico*).

Até o momento, 80 isolados caracterizado como ST-28 foram encontrados no Reino Unido, Canadá, EUA, Nova Zelândia e Bélgica, pertencentes a pacientes com FC, conforme descrito no PubMLST (<https://pubmlst.org>), sendo esta a primeira descrição desta cepa no Brasil, destacando sua disseminação pelo mundo.

Devido à pressão seletiva de estresse do ambiente hospedeiro na FC, mutações podem ocorrer de forma contínua, afetando o perfil de virulência e a resistência antimicrobiana, exigindo o reconhecimento desses mecanismos adaptativos. A resistência mutacional é comumente descrita, pois provém de uma população suscetível à amplificação de mutações em genes que afetam a atividade de fármacos (mutações pontuais) (SOUSA *et al.*, 2017).

Apresentando um maior número de fatores envolvendo resistência a antibióticos, a cepa MS-2140 mostrou genes de resistência a outros antimicrobianos, como mupirocina (*folA*, Dfr), trimetopim (Iso-tRNA), isoniazida (*KasA*) e tigeciclina (S10p).

As bombas de efluxo são um dos principais mecanismos de resistência em bactérias do CBc. Em comparação com o reportado para a cepa J2315, dois genes distintos foram encontrados: *EmrAB-TolC*, que confere maior resistência a fluoroquinolonas, e *MexXY*, que resulta em resistência de múltiplas classes de antimicrobianos (β -lactâmicos, carbapenêmicos, cefamicinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas, quinolonas, antibióticos fenólicos e macrolídeos) (MUNITA; ARIAS, 2016).

Nenhum gene especificamente associado à resistência à polimixina, colistina e cicloserina foi encontrado. Em contraste, genes que conferem resistência à classe de antibióticos peptídicos (*rpoC*, *rpoB*, *GdpD*, *BcrC*, *PgsA*) foram detectados. As espécies do CBc são intrinsecamente resistentes à ação das polimixinas devido a vários mecanismos, envolvendo alterações na estrutura do LPS, metaloproteases de zinco, sistema de efluxo e fator sigma *RpoE* (MOFFATT *et al.*, 2019). O fator sigma alternativo *RpoE* foi evidenciado em nosso estudo.

Genes de resistência foram observados contra MEM, SXT, LEV e FEP, apesar da sensibilidade descrita pelo DDT, ser considerada como cepa multisensível, corroborando estudos anteriores que não revelaram correlação direta da expressão gênica com seu fenótipo (SALLOUM *et al.*, 2018).

Diferentes bancos de dados foram usados para detectar genes de resistência e, embora o programa ResFinder apresente informações específicas para genes adquiridos, esse banco de dados aceita apenas consultas de sequências de nucleotídeos para comparação. Por outro lado, o PATRIC AMR apresenta uma comparação baseada no BLAST realizada comparativamente a vários bancos de dados de genes com curadoria externa. No entanto, como ambos requerem atualização constante de metadados e novas sequências genômicas estão disponíveis em taxas crescentes, a metodologia de sequenciamento de DNA está melhorando rapidamente, e algumas diferenças entre as análises

realizadas em ambos os bancos podem ser observadas (ZANKARI *et al.*, 2012; WATTAM *et al.*, 2017).

Vários FVs foram registrados em cepas do CBc envolvendo fatores sigma, *quorum sensing* (regulador da resposta ao estresse extracitoplasmático), biossíntese flagelar, aquisição de ferro, ativadores, repressores, sistemas reguladores de dois componentes, toxina-antitoxina, sRNA e Hfq (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010). A motilidade mediada pelo flagelo é um fator importante na penetração das barreiras epiteliais do hospedeiro, promovendo a disseminação para outros locais de infecção, como os extrapulmonares (URBAN *et al.*, 2004).

Dentre os FVs observados, houve predomínio do mecanismo de invasão relacionado à proteína de biossíntese flagelar (flg-, flh-, fli-, mot-) e ao fator sigma da RNA polimerase para o *operon* flagelar (*cdpA*) na amostra de referência, também descrita em *B. pseudomallei* K96243.

Outras FVs foram encontrados, como a chaperona Hfq (membro da ampla família de proteínas Sm), que se liga ao sRNA, sugerindo um papel putativo na virulência, resistência ao estresse e motilidade. Além disso, foi observado o fator sigma *RpoE* necessário para sobrevivência a alta temperatura, alta osmolaridade e sobrevivência intracelular (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010).

Em contraste com J2315, a amostra estudada apresentou a via de biossíntese de *pabB*, p-aminobenzoato, bem como a expressão da proteína lipoato ligase B, descrita em *B. pseudomallei* 668, como transposon mutante, investigada na imunogenicidade protetora e avaliada como candidata a vacinas (SILVA; DOW, 2013).

Apesar das comparações feitas, estudos relatam que cerca de 15% dos genes de *B. cenocepacia* J2315 ainda não têm função prevista ou apenas função generalizada (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010).

A análise genômica em MS-2140 revelou genes relacionados à resistência antimicrobiana e virulência. A presença desses genes sugere um impacto funcional na cepa, também estimulado por mecanismos adaptativos e intrínsecos, com genes de resistência (*folA*, *Dfr*, Iso-tRNA, *KasA*, *S10p*, *EmrAB-TolC*, *MexXY*) e FV relacionados à evasão celular e invasão (motilidade flagelar) como sobrevivência em ambientes hostis. No entanto, mais estudos genômicos e funcionais são necessários para entender mecanismos dessa patogênese.

As ilhas genômicas (IGs) são definidas como agrupamentos de genes de provável origem horizontal em genomas bacterianos que também estão envolvidos na evolução bacteriana,

incorporando grandes blocos de sequências genômicas, que podem conter genes que codificam fatores de virulência, características metabólicas e resistência a antibióticos (BERTELLI *et al.*, 2017).

Muitas IGs foram encontradas comparativamente a cepa referência através da ferramenta IslandViewer (BERTELLI *et al.*, 2017). Em média, 56 IGs foram previstas por pelo menos um dos métodos aplicados, aos cromossomos 1, 2 e 3. Nenhuma das IGs foi conservada entre J2315 e MS-2140. Genes de virulência e de resistência antimicrobiana previamente descritos foram encontrados em IGs, sendo comumente associados a mecanismos como invasão, modulações regulatórias da resistência a antibióticos e expressão de genes direcionados a antibióticos em espécies suscetíveis.

O plasmídeo encontrado em nosso estudo apresentou cobertura de 92% (valor E 0,0) comparativamente ao plasmídeo 1 de *B. cenocepacia* cepa HI2424 (CP000461.1), isolada no solo agrícola de plantação de cebolas no norte de Nova York, EUA. Essa cepa foi classificada como representativa de *B. cenocepacia* PHDC (LIPUMA *et al.*, 2002), o que nos permite supor a ocorrência de transferência gênica através de cepas ambientais. No entanto, outros estudos revelaram a presença desse plasmídeo em outras espécies de *Burkholderia*, e sua ocorrência não parece estar associada a uma espécie, ambiente ou virulência específica (BODILIS *et al.*, 2018).

As sequências de inserção (SIs) são elementos genéticos transponíveis que desempenham um papel importante na evolução genômica, em muitos casos mobilizando genes de resistência. A conservação dos elementos de SI permite ao organismo excluir, manter e expandir esses elementos (GRAINDORGE *et al.*, 2012).

Cinco SIs relacionados ao CBc foram encontrados. No entanto, apenas ISBcen7 e ISBcen16 foram descritos para *B. cenocepacia* J2315, ambos com as mesmas estruturas de leitura aberta (ORFs) comuns - Tnp. De acordo com outros estudos, a distribuição do elemento SI entre cepas de *B. cenocepacia* revelam uma alta prevalência de famílias SI3 e SI5 (GRAINDORGE *et al.*, 2012). Sugerindo que a proliferação de SI esteja acompanhando a evolução de linhagens virulentas de *B. cenocepacia*.

As bactérias podem utilizar sistemas de defesa anti-fágicas, podendo participar na eliminação de fagos integrados. Embora poucos estudos descrevam a presença ou justifiquem a ausência de sequências CRISPR em cepas do CBc (BOLIS *et al.*, 2018; ROSZNIOWSKI *et al.*, 2018). Detectamos 4 sequências CRISPR, entretanto, com evidência de nível 1, representando

matrizes candidatas curtas contendo de um a três espaçadores podendo corresponder a CRISPR não efetivos, recebendo o nível mais baixo de classificação (COUVIN *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos no presente estudo, reiteram a importância do seguimento de pacientes colonizados cronicamente por CBc, a manutenção no processo de segregação de pacientes, ressaltando a necessidade da correta identificação das espécies, bem como, o aprimoramento de metodologias que sejam vantajosas às técnicas atuais empregadas em laboratórios de pesquisa, visando sua utilização na prática clínica.

Destacamos os perfis de sensibilidade antimicrobiana encontrados em nossos isolados e descrevemos pela primeira vez no Brasil, um ST (ST28) epidemiologicamente importante.

Nossos achados, incluindo suas limitações, são caracteristicamente importantes para futuras pesquisas e análises que envolvam as espécies pertencentes ao CBc, contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa com Fibrose Cística em nosso país e no mundo.

CONCLUSÕES

B. vietnamiensis e *B. cenocepacia* subtipos IIIA e IIIB, identificadas através do sequenciamento molecular do gene *recA*, foram as espécies com maior ocorrência no CBc encontradas nos isolados de pacientes crônicos.

A aplicação da técnica de espectrometria de massa, mostrou melhor eficácia para identificação em nível de gênero. Para identificação das espécies do CBc, a minoração dos pontos de corte, melhoraram a capacidade de identificação em espécie. Entretanto, para a validação desse achado é necessário estudos com maior número de amostras e diversidade de espécies.

Entre as espécies avaliadas, *B. vietnamiensis* apresentou o maior percentual de identificação em nível de espécie, seguido de *B. cenocepacia*, não sendo possível através do MALDI-TOF MS diferenciar em subgrupos filogenéticos.

A aplicação da espectrometria de massa atrelado a ferramenta de bioinformática como ferramenta para tipificação demonstrou limitações para espécies do CBc, possivelmente devido a similaridade genética entre as espécies.

Através do PFGE uma grande variedade de pulsotipos foram encontrados, especialmente para as espécies *B. vietnamiensis* e *B. cenocepacia* IIIA. Raros pulsotipos foram compartilhados entre os pacientes, excluindo a possibilidade de transmissão cruzada, sugerindo a eficiência das medidas de segregação nas instituições de referência estudadas. Já, a diversidade dos pulsotipos pode estar relacionadas as limitações da técnica da PFGE para estudos de longo período, necessitando a aplicação de outras metodologias para tipificação.

A análise longitudinal nos pacientes selecionados com maior número de amostras coletadas no período, considerando a tipagem por espectrometria de massa e PFGE mostrou que alguns isolados com pulsotipos idênticos foram agrupados em diferentes grupos pelo MALDI-TOF MS, demonstrando baixa correlação entre as técnicas aplicadas, sendo necessários mais estudos com a finalidade de padronização e estabelecimento de protocolos que permitam seu uso de forma segura para as espécies do CBc.

Um alto percentual de não sensibilidade foi observado para SXT, considerada como droga de escolha para tratamento de infecções por CBc. O gene *sul1*, não foi associado a essa resistência, sugerindo que possa estar relacionada a outros mecanismos.

Foi possível o sequenciamento do genoma completo do isolado MS-2140, proveniente do espécime clínico extra pulmonar (abscesso hepático) e a descrição pela primeira vez no Brasil de um novo ST, o ST-28 (ET-12), que se destaca pela sua capacidade de disseminação mundial.

REFERÊNCIAS

- Abbott, F. K., et al. Combination antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex: significance of species. *Int J Antimicrob Agents*. v. 48. p. 521-527. nov. 2016.
- Abby S. S., Néron B., Ménager H., Touchon M., Rocha E. P. C (2014) MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. *PLOS ONE* 9(10): e110726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110726>
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 2016;44(W1):W16–21
- Bach E, Sant’Anna FH, Magrich dos Passos JF, Balsanelli E, de Baura VA, Pedrosa FO, de Souza EM, Passaglia L. 2017. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. *Nov Pathog Dis* 75:ftx076. doi:10.1093/femspd/ftx076.
- Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, et al. Elucidando a epidemiologia global de *Burkholderia multivorans* em casos de fibrose cística por tipagem de sequência multilocus. *J Clin Microbiol* . 2008; 46 (1): 290-295. doi: 10.1128 / JCM.01818-07
- Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, et al. Da Teoria à Prática: Traduzindo o Sequenciamento do Genoma Completo (WGS) para a Clínica. *Trends Microbiol* . 2018; 26 (12): 1035-1048. doi: 10.1016 / j.tim.2018.08.004
- Barrado L, Martinez MT, Villa J, Orellana MÁ, Viedma E, Chaves F (2013) Clonal diversity among *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic fibrosis patients in a reference unit. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31:665–668. doi:10.1016/j.eimc.2013.04.025

BARBERIS, C., et al. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. *PLoS One*. v. 3. sep. 2014.

Bell, S. C., Mall, M. A., Gutierrez, H., Macek, M., Madge, S., Davies, J. C., Burgel, P. R., Tullis, E., Castaños, C., Castellani, C., Byrnes, C. A., Cathcart, F., Chotirmall, S. H., Cosgriff, R., Eichler, I., Fajac, I., Goss, C. H., Drevinek, P., Farrell, P. M., Gravelle, A. M., ... Ratjen, F. (2020). The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *The Lancet. Respiratory medicine*, 8(1), 65–124. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30337-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30337-6)

Bertelli C, Laird MR, Williams KP, et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W30-W35.

Biddick, R., et al. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett*. v. 7. p. 57-62. nov. 2003.

Bierlaagh, M. C., Muilwijk, D., Beekman, J. M., & van der Ent, C. K. (2021). A new era for people with cystic fibrosis. *European journal of pediatrics*, 180(9), 2731–2739. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04168-y>

Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(6):727-736. doi:10.1055/s-0039-1698464

Blanchard AC, Tang L, Tadros M, Muller M, Spilker T, Waters VJ, LiPuma JJ, Tullis E. *Burkholderia cenocepacia* ET12 transmission in adults with cystic fibrosis. *Thorax*. 2020 Jan;75(1):88-90. doi: 10.1136/thoraxjnl-2019-214098. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31732688.

Bodilis J., Denet E., Brothier E., Graindorge A., Favre-Bonté S., Nazaret S. Comparative genomics of environmental and clinical *Burkholderia cenocepacia* strains closely related to the highly transmissible epidemic ET12 lineage. *Front. Microbiol*. 2018;9:383. doi: 10.3389/fmicb.2018.00383.

Canny GJ, Roberts EA, Liu P, Reisman J, Levison H. Hepatic abscess and cystic fibrosis. *Postgrad Med J.* 1988;64(756):814-817. doi:10.1136/pgmj.64.756.814

Cescutti, P., et al. Structure of a novel exopolysaccharide produced by *Burkholderia vietnamiensis*, cystic fibrosis opportunistic pathogen. *Carbohydr Polym.* v. 15. p. 253-60. apr. 2013.

CFF. CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION PATIENT REGISTRY 2019. Annual Data Report. Cystic Fibrosis Foundation. Bethesda, Maryland. Disponível em: <<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2019-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2021.

Chen, Q., Shen, Y., & Zheng, J. (2021). A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal models and experimental medicine*, 4(3), 220–232. <https://doi.org/10.1002/ame2.12180>

Chung, H. et al. The *sul1* gene in *Stenotrophomonas maltophilia* with high-level resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole. *Ann. Lab. Med.* v. 35, p. 246 - 249, 2015.

Cipolla L, Rocca F, Martinez C, Aguerre L, Barrios R, Prieto M. Prevalence of *Burkholderia cepacia* complex species in cystic fibrosis patients in Argentina during the period 2011-2015. Prevalencia de especies del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística en Argentina durante el período 2011-2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018;36(7):431-434. doi:10.1016/j.eimc.2017.09.002

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30 th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 2015;31:587–9.

Coutinho CP, Dos Santos SC, Madeira A, Mira NP, Moreira AS, Sá-Correia I (2011) Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. *Front Cell Infect Microbiol* 1:12. doi:10.3389/fcimb.2011.00012

Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E., Vergnaud, G., Gautheret, D., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W246–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>.

da Costa Capizzani CP, Caçador NC, Torres LAGMM, Tonani L, Vandamme P, da Costa Darini AL. Clinical and microbiological profile of chronic *Burkholderia cepacia* complex infections in a cystic fibrosis reference hospital in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(11):2263-2271. doi:10.1007/s10096-017-3058-9

Dallal MM, Telefian CF, Hajia M, et al. Identificação e epidemiologia molecular de surtos nosocomiais devido a *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística do Hospital Masih Daneshvary, Irã. *J Prev Med Hyg* . 2014; 55 (1): 27-30.

De Boeck K. (2020). Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992), 109(5), 893–899. <https://doi.org/10.1111/apa.15155>

De Dios J, Martínez CL, Tato M, Morosini MI, Cobo M et al (2016) Comparison between MALDI-TOF and *recA* gene sequencing for the identification of *Burkholderia cepacia* complex species isolated in a cystic fibrosis unit. *J Cyst Fibros* 15:S75 16.

Denis JA, Mazzola A, Nguyen G, et al. Transient increase of CA 19-9 serum concentrations in a liver transplant recipient with cystic fibrosis and hepatic abscess: a case report and brief literature review. *Clin Biochem*. 2019;64:53-56. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.10.009

Dentini, P., Marson, F., Bonadia, L. C., Bertuzzo, C. S., Ribeiro, A. F., Levy, C. E., & Ribeiro, J. D. (2017). *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis in a Brazilian reference center. *Medical microbiology and immunology*, 206(6), 447–461. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0521-2>

Depoorter E, De Canck E, Peeters C, Wieme AD, Cnockaert M, Zlosnik JEA, LiPuma JJ, Coenye T, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* Complex Taxon K: Where to Split? *Front Microbiol.* 2020 Jul 14;11:1594. doi: 10.3389/fmicb.2020.01594. PMID: 32760373; PMCID: PMC7372133.

Desai AP, Stanley T, Atuan M, McKey J, Lipuma JJ, Rogers B, Jerris R (2012) Use of matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Pathol* 65:835–838 18.

Devanga Ragupathi NK, Veeraraghavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):7. Published 2019 Feb 4. doi:10.1186/s12941-019-0306-0

Díez-Aguilar, M., Ekkelenkamp, M., Morosini, M. I., Merino, I., de Dios Caballero, J., Jones, M., van Westreenen, M., Tunney, M. M., Cantón, R., & Fluit, A. C. (2019). Antimicrobial susceptibility of non-fermenting Gram-negative pathogens isolated from cystic fibrosis patients. *International journal of antimicrobial agents*, 53(1), 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.001>

Doull I. Cystic fibrosis 2019: Year in review. *Paediatr Respir Rev.* 2020;35:95-98. doi:10.1016/j.prrv.2020.04.001

Drevinek P, Mahenthalingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jul;16(7):821-30. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03237.x. PMID: 20880411.

ECFSPR Annual Report 2018, Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, Jung A, van Rens J et al, 2020.

Fehlberg, L. C., et al. Performance of MALDI-TOF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v. 77 p. 126-128. oct. 2013.

Fehlberg, L. C., Nicoletti, A. G., Ramos, A. C., Rodrigues-Costa, F., de Matos, A. P., Girardello, R., Marques, E. A., & Gales, A. C. (2016). In vitro susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates: Comparison of disk diffusion, Etest®, agar dilution, and broth microdilution methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 86(4), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.015>

Fiamanya, S., Cipolla, L., Prieto, M., & Stelling, J. (2021). Exploring the value of MALDI-TOF MS for the detection of clonal outbreaks of *Burkholderia contaminans*. *Journal of microbiological methods*, 181, 106130. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106130>

Fonseca C, Bicker J, Alves G, Falcão A, Fortuna A. Cystic fibrosis: Physiopathology and the latest pharmacological treatments. *Pharmacol Res.* 2020;162:105267. doi:10.1016/j.phrs.2020.105267

Françoise A, Héry-Arnaud G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes (Basel).* 2020;11(5):536. Published 2020 May 11. doi:10.3390/genes11050536

Frost F, Shaw M, Nazareth D. Antibiotic therapy for chronic infection with *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;12(12):CD013079. Published 2021 Dec 10. doi:10.1002/14651858.CD013079.pub3

Furlan JPR, Pitondo-Silva A, Braz VS, Gallo IFL, Stehling EG (2019) Evaluation of different molecular and phenotypic methods for identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex. *J Microbiol Biotechnol* 35(3):39. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2614-0>

García-Salguero C, Culebras E, Alvarez-Buylla A, Rodríguez-Avial I, Delgado-Iribarren A. Utilidad de MALDI-TOF e REP-PCR frente a PFGE para o estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii* [Utilidade de MALDI-TOF e REP -PCR contra PFGE para o estudo

epidemiológico de *Acinetobacter baumannii*]. *Rev Esp Quimioter* . 2021; 34 (3): 207-213. doi: 10.37201 / req / 142.2020

Graindorge A, Menard A, Monnez C, Cournoyer B. Insertion sequence evolutionary patterns highlight convergent genetic inactivations and recent genomic island acquisitions among epidemic *Burkholderia cenocepacia*. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 3):394-409.

Häfliger E, Atkinson A, Marschall J. Systematic review of healthcare-associated *Burkholderia cepacia* complex outbreaks: presentation, causes and outbreak control [published correction appears in *Infect Prev Pract*. 2021 Mar;3(1):100120]. *Infect Prev Pract*. 2020;2(3):100082. Published 2020 Aug 13. doi:10.1016/j.infpip.2020.100082

Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2014;52:3136.

Hassan, A. A., Coutinho, C. P., & Sá-Correia, I. (2019). *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*, 9, 273. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00273>

Hatziagorou, E., Orenti, A., Drevinek, P., Kashirskaya, N., Mei-Zahav, M., De Boeck, K., ECFSPR. Electronic address: ECFSPR.Patient.Registry@uz.kuleuven.ac.be, & ECFSPR (2020). Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis-data from the European cystic fibrosis society patient registry. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 19(3), 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.08.006>

Holden, M.T., Seth-Smith, H.M., Crossman, L.C., Sebahia, M., Bentley, S.D., Cerdeno-Tarraga, A.M., Thomson, N.R., Bason, N., Quail, M.A., Sharp, S., Cherevach, I., Churcher, C., Goodhead, I., Hauser, H., Holroyd, N., Mungall, K., Scott, P., Walker, D., White, B., Rose, H., Iversen, P., Mil-Homens, D., Rocha, E.P., Fialho, A.M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B.G., Govan, J.R.,

Vandamme, P., Hart, C.A., Mahenthiralingam, E., and Parkhill, J. "The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients." *J. Bacteriol.* (2009) 191:2907.

Horsley, A., et al. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database Syst. v. 20. jan. 2016.*

Huber, C. A., Reed, S. J., & Paterson, D. L. (2021). Bacterial Sub-Species Typing Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry: What Is Promising?. *Current issues in molecular biology*, 43(2), 749–757. <https://doi.org/10.3390/cimb43020054>

Hunt K, Jordan K. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol.* 2021;2220:79-88. doi: 10.1007/978-1-0716-0982-8_6. PMID: 32975767.

HUPE. Instrução para semeadura de Fibrose Cística – ITA-BAC-010 FC. Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). 2015.

Huse HK, Lee MJ, Wootton M, et al. Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 2021;59(12):e0144721. doi:10.1128/JCM.01447-21

Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E. M., Karpe, A., Beale, D. J., Sevier, D., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2015). Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of food microbiology*, 202, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023>

Jiang F, Kong Z, Cheng C, Kang H, Gu B, Ma P. Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones. *Epidemiol Infect.* 2019 Dec 17;147:e324. doi: 10.1017/S0950268819002097. Erratum in: *Epidemiol Infect.* 2020 Jan 20;148:e5. PMID: 31845635; PMCID: PMC7006016.

Jin Y, Zhou J, Zhou J, et al. A classificação baseada no genoma do complexo *Burkholderia cepacia* fornece uma nova visão sobre seu status taxonômico. *Biol Direct* . 2020; 15 (1): 6. Publicado em 4 de março de 2020. Doi: 10.1186 / s13062-020-0258-5

Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018;3:124. Published 2018 Sep 24.

Kang X, Meng C, Pan Z. Molecular Typing of *Salmonella* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2021;2182:187-196. doi: 10.1007/978-1-0716-0791-6_17. PMID: 32894497.

Karger A. Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *Proteomics Clin Appl*. V.10 p. 982-993. oct. 2016.

Kenna, D., Lilley, D., Coward, A., Martin, K., Perry, C., Pike, R., Hill, R., & Turton, J. F. (2017). Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *Journal of medical microbiology*, 66(4), 490–501. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000458>

Kristin L Fraser, Robert H Hyland, D Elizabeth Tullis, "Hepatic Abscess due to *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* in Cystic Fibrosis", *Canadian Respiratory Journal*, vol. 2, Article ID 695906, 4 pages, 1995. <https://doi.org/10.1155/1995/695906>

Kumar S. et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*.v.33. p.1870-4. jul. 2016.

Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM (2003) Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2: 29–34. doi:10.1016/S1569-1993(02)00141-8

Lewis, E. R., & Torres, A. G. (2016). The art of persistence-the secrets to Burkholderia chronic infections. *Pathogens and disease*, 74(6), ftw070. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw070>

Link SL, Nayak RP. Review of Rapid Advances in Cystic Fibrosis. *Mo Med*. 2020;117(6):548-554.

Lipuma, J. J., et al. Taxonomy and Identification of the Burkholderia cepacia Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39 p. 3427–3436 oct. 2001.

Lipuma, J. J. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. v. 23 p. 299–323. apr. 2010.

Lipuma J. J., et al. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Pandoraea Brevundimonas, Comamonas, Delftia, and Acidovorax. In: Versalovic J. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiology p. 791-812. 11th ed. 2015.

LiPuma JJ, Spilker T, Coenye T, Gonzalez CF. An epidemic Burkholderia cepacia complex strain identified in soil. *Lancet*. 2002;359(9322):2002-2003.

Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1): D687–92

Lood, C., Peeters, C., Lamy-Besnier, Q., Wagemans, J., De Vos, D., Proesmans, M., Pirnay, J. P., Echahidi, F., Piérard, D., Thimmesch, M., Boeras, A., Lagrou, K., De Canck, E., De Wachter, E., van Noort, V., Lavigne, R., & Vandamme, P. (2021). Genomics of an endemic cystic fibrosis Burkholderia multivorans strain reveals low within-patient evolution but high between-patient diversity. *PLoS pathogens*, 17(3), e1009418. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009418>

Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol*. v. 7. p. 275. sep. 2016.

Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Flores Soto E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal Biochem.* 2019;573:17-29. doi:10.1016/j.ab.2019.02.020

López-Ramos, I., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Gutiérrez, M. P., Zarzosa, P., Orduña, A., & March, G. A. (2020). Quick identification and epidemiological characterization of *Francisella tularensis* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of microbiological methods*, 177, 106055. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106055>

Lord, R., Jones, A. M., & Horsley, A. (2020). Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD009529. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009529.pub4>

Loureiro, Mm; Moraes, Ba de; Mendonça, Vlf; Quadra, Mrr; Pinheiro, Gs; Asensi, Md. *Pseudomonas aeruginosa*: study of Antibiotic Resistance and Molecular Typing in Hospital Infection Cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* ; 97(3): 387-394, Apr. 2002.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Mall MA, Mayer-Hamblett N, Rowe SM. Cystic Fibrosis: Emergence of Highly Effective Targeted Therapeutics and Potential Clinical Implications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201(10):1193-1208. doi:10.1164/rccm.201910-1943SO

Mahenthiralingam, E., et al. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. *J Clin Microbiol.* v. 38. p. 3165–3173. sep. 2000.

Marques, E. A. Perfil microbiológico na fibrose cística. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ.* v. 10 p. 23-35. dez. 2011.

Martina P. F., Leguizamon M, Prieto CI, Sousa SA, Montanaro P, Draghi WO, Stämmeler M, Bettioli M, de Carvalho C, Palau J, Figoli C, Alvarez F, Benetti S, Lejona S, Vescina C, Ferreras J, Lasch P, Lagares A, Zorreguieta A, Leitão JH, Yantorno OM, Bosch A. 2018. *Burkholderia paraquae* sp. nov., a novel species of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from hospital settings and agricultural soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:14–20. doi:10.1099/ijsem.0.002293.

Martina, P. F., Martinez, M., Rivas, S., Leguizamón, L., Von Specht, M., & Ferreras, J. (2020). *Burkholderia cepacia* complex: 11 years of surveillance in patients with Cystic Fibrosis in Posadas, Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*, 52(3), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.08.002>

Medina-Pascual, M. J., Valdezate, S., Villalón, P., Garrido, N., Rubio, V., & Saéz-Nieto, J. A. (2012). Identification, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31(12), 3385–3396. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1707-6>

Mendes, E. T., Paez, J., Ferraz, J. R., Marchi, A. P., Silva, I., Batista, M. V., Lima, A., Rossi, F., Levin, A. S., & Costa, S. F. (2020). Clinical and microbiological characteristics of patients colonized or infected by *Stenotrophomonas maltophilia* : is resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim a problem?. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 62, e96. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062096>

Neoh, H. M., Tan, X. E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 74, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>

Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1145:55-71.

Ng C, Nadig T, Smyth AR, Flume P. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2020;26(6):679-684. doi:10.1097/MCP.0000000000000730

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).

Nunvar J, Kalferstova L, Bloodworth RA, et al. Understanding the Pathogenicity of Burkholderia contaminans, an Emerging Pathogen in Cystic Fibrosis. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160975. Published 2016 Aug 11. doi:10.1371/journal.pone.0160975

Oviaño, M., & Rodríguez-Sánchez, B. (2021). MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)*, 39(4), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.027>

Peeters C, Cooper VS, Hatcher PJ, Verheyde B, Carlier A, Vandamme P. Genômica comparativa de Burkholderia multivorans, um patógeno ubíquo com uma estrutura genômica altamente conservada. *PLoS One* . 2017; 12 (4): e0176191. Publicado em 21 de abril de 2017. doi: 10.1371 / journal.pone.0176191

Podnecky, N. L., Rhodes, K. A., Mima, T., Drew, H. R., Chirakul, S., Wuthiekanun, V., Schupp, J. M., Sarovich, D. S., Currie, B. J., Keim, P., & Schweizer, H. P. (2017). Mechanisms of Resistance to Folate Pathway Inhibitors in Burkholderia pseudomallei: Deviation from the Norm. *mBio*, 8(5), e01357-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01357-17>

Poonawala H, Marrs Conner T, Peaper DR (2018) The brief case: misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol* 56:e00914-e917. <https://doi.org/10.1128/JCM.00914-17>

Pot, B., Vranckx, K., De Bruyne, K. Analysis of MALDI-TOF MS Spectra using the BioNumerics Software. John Wiley & Sons Ltd. Online Library. Chapter 21^a. April 2017. <https://doi.org/10.1002/9781118960226.ch21>

Pretto, L., de-Paris, F., Mombach Pinheiro Machado, A. B., Francisco Martins, A., & Barth, A. L. (2013). Genetic similarity of *Burkholderia cenocepacia* from cystic fibrosis patients. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 17(1), 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.002>

Rangberg A, Larsen AL, Kacelnik O, Sæther HS, Bjørland M, Ringstad J, Jonassen CM. Molecular analysis and epidemiological typing of Vancomycin-resistant *Enterococcus* outbreak strains. *Sci Rep*. 2019 Aug 15;9(1):11917. doi: 10.1038/s41598-019-48436-2. PMID: 31417140; PMCID: PMC6695431.

RELATÓRIO DO REGISTRO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA 2019. Grupo Brasileiro de Estudos em Fibrose Cística. Disponível em: <http://portalgbefc.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC_2019.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2022.

Lord R, Jones AM, Horsley A. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;4(4):CD009529. Published 2020 Apr 2. doi:10.1002/14651858.CD009529.pub4

Regan KH, Bhatt J. Eradication therapy for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;4(4):CD009876. Published 2019 Apr 18. doi:10.1002/14651858.CD009876.pub4

Ribot E. M., Fair M. A., Gautom R., Cameron D. N., Hunter S.B., Swaminathan B. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for pulsenet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3(1):59-67.

Rim, J. H., Lee, Y., Hong, S. K., Park, Y., Kim, M., D'Souza, R., Park, E. S., Yong, D., & Lee, K. (2015). Insufficient Discriminatory Power of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Dendrograms to Determine the Clonality of Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from an Intensive Care Unit. *BioMed research international*, 2015, 535027. <https://doi.org/10.1155/2015/535027>

Rhodes, K. A., Schweizer H. P. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resist Updat.* v. 28. p. 82-90. sep. 2016.

Rhodes, K. A., Somprasong, N., Podnecky, N. L., Mima, T., Chirakul, S., & Schweizer, H. P. (2018). Molecular determinants of *Burkholderia pseudomallei* BpeEF-OprC efflux pump expression. *Microbiology (Reading, England)*, 164(9), 1156–1167. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000691>

Rocca MF, Prieto M, Almuzara M, Barberis C, Vay C. Viñes MP (ed). Guide for the interpretation of MALDI-TOF (Bruker Daltonics) results: Alternatives for microorganism identification. 2da. ed. Buenos Aires: ANLIS; UBA, 2020. Disponible em: <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/1526>

Rodriguez-R L, Konstantinidis K. The enveomics collection: a toolbox for specialised analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Preprint* 2016;4: e1900v1

Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):355-360. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.001. Epub 2017 Nov 5. PMID: 29117578.

Roszniewski B, McClean S, Drulis-Kawa Z. Burkholderia cenocepacia Prophages-Prevalence, Chromosome Location and Major Genes Involved. *Viruses*. 2018;10(6):297. Published 2018 May 31. doi:10.3390/v10060297

Sader HS, Pignatari AC, Leme IL, Burattini MN, Tancredi R, Hollis RJ, Jones RN. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. V.17, Issue 1, 13-18, Jul 1993.

Salloum T, Nassour E, Araj GF, Abboud E, Tokajian S. Insights into the genome diversity and virulence of two clinical isolates of *Burkholderia cenocepacia*. *J Med Microbiol*. 2018;67(8):1157-1167.

Sambrook, J., et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. v. 545. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbor laboratory, 1982.

Sauget M. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. *J Microbiol Methods*.v. 127. p. 20-3. aug. 2016.

Sauget M., et al. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends Microbiol*. jan. 2017.

Savi D, Quattrucci S, Trancassini M, et al. Impact of clonally-related *Burkholderia* contaminans strains in two patients attending an Italian cystic fibrosis centre: a case report. *BMC Pulm Med*. 2019;19(1):164. Published 2019 Aug 29. doi:10.1186/s12890-019-0923-6

Sayers S, Li L, Ong E, et al. Victors: a web-based knowledge base of virulence factors in human and animal pathogens. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1): D693–700.

Schmidt H, Sharma G. Sweat Testing. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 10, 2021.

Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):350-354. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.016. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29309930.

Scialo F, Amato F, Cerneria G, et al. Lung Microbiome in Cystic Fibrosis. *Life (Basel).* 2021;11(2):94. Published 2021 Jan 27. doi:10.3390/life11020094

Scoffone VC, Trespidi G, Barbieri G, Irudal S, Perrin E, Buroni S. Role of RND Efflux Pumps in Drug Resistance of Cystic Fibrosis Pathogens. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(7):863. Published 2021 Jul 15. doi:10.3390/antibiotics10070863

Sethi, S., Sharma, M., Kumar, S., Singhal, L., Gautam, V., & Ray, P. (2020). Antimicrobial susceptibility pattern of *Burkholderia cepacia* complex & *Stenotrophomonas maltophilia* from North India: Trend over a decade (2007-2016). *The Indian journal of medical research*, 152(6), 656–661. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_9_19

Sfeir MM (2018) *Burkholderia cepacia* complex infections: more complex than the bacterium name suggest. *J Infect* 77:166–170 15.

Shteinberg, M., Haq, I. J., Polineni, D., & Davies, J. C. (2021). Cystic fibrosis. *Lancet (London, England)*, 397(10290), 2195–2211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3)

Silva EB, Dow SW. Development of *Burkholderia mallei* and *pseudomallei* vaccines. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:10.

Somayaji R, Yau YCW, Tullis E, LiPuma JJ, Ratjen F, Waters V. Clinical Outcomes Associated with *Burkholderia cepacia* Complex Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 2020 Dec;17(12):1542-1548. doi: 10.1513/AnnalsATS.202003-204OC. PMID: 32678679.

Sousa SA, Feliciano JR, Pita T, Guerreiro SI, Leitão JH. *Burkholderia cepacia* Complex Regulation of Virulence Gene Expression: A Review. *Genes (Basel)*. 2017;8(1):43.

Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiologia do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística, Canadá. *Emerg Infect Dis* . 2002; 8 (2): 181-187. doi: 10.3201 / eid0802.010163

Spinali, S., van Belkum, A., Goering, R. V., Girard, V., Welker, M., Van Nuenen, M., Pincus, D. H., Arsac, M., & Durand, G. (2015). Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation?. *Journal of clinical microbiology*, 53(3), 760–765. <https://doi.org/10.1128/JCM.01635-14>

Stanford, G. E., Dave, K., & Simmonds, N. J. (2021). Pulmonary Exacerbations in Adults With Cystic Fibrosis: A Grown-up Issue in a Changing Cystic Fibrosis Landscape. *Chest*, 159(1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.09.084>

Steensels D, Deplano A, Denis O, Simon A, Verroken A. MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Acta Clin Belg*. 2017 Aug;72(4):219-225. doi: 10.1080/17843286.2016.1198521. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27344933.

Syed, I., & Wooten, R. M. (2021). Interactions Between Pathogenic *Burkholderia* and the Complement System: A Review of Potential Immune Evasion Mechanisms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 701362. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.701362>

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233-9. doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995. PMID: 7494007; PMCID: PMC228385.

Teri, A., Sottotetti, S., Biffi, A., Girelli, D., D'Accico, M., Arghittu, M., Colombo, C., Corti, F., Pizzamiglio, G., & Cariani, L. (2018). Molecular typing of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients attending an Italian Cystic Fibrosis Centre. *The new microbiologica*, 41(2), 141–144.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex (BCC), 19 July 2013. Disponible en: <http://www.eucast.org>.

Thompson, J. D., et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* v. 15. p. 4876-4882. dec. 1997.

Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules*. 2020 Oct 17;25(20):4775. doi: 10.3390/molecules25204775. PMID: 33080897; PMCID: PMC7587594.

Urban TA, Griffith A, Torok AM, Smolkin ME, Burns JL, Goldberg JB. Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. *Infect Immun*. 2004;72(9):5126-5134.

Vandamme, P., et al. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol.* v. 45 p. 395-407. Dec. 1996.

Vandamme, P., Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* v. 34. p. 87-95. apr. 2011.

Vasiljevic, Z. V., Novovic, K., Kojic, M., Minic, P., Sovtic, A., Djukic, S., & Jovic, B. (2016). *Burkholderia cepacia* complex in Serbian patients with cystic fibrosis: prevalence and molecular epidemiology. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official

publication of the European Society of Clinical Microbiology, 35(8), 1277–1284.
<https://doi.org/10.1007/s10096-016-2662-4>

Vazirani J, Crowhurst T, Morrissey CO, Snell GI. Management of Multidrug Resistant Infections in Lung Transplant Recipients with Cystic Fibrosis. *Infect Drug Resist.* 2021;14:5293-5301. Published 2021 Dec 10. doi:10.2147/IDR.S301153

Vicenzi FJ, Pillonetto M, Souza HA, Palmeiro JK, Riedi CA, RosarioFilho NA, Dalla-Costa LM (2016) Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from children with cystic fbrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111:37–42. <https://doi.org/10.1590/0074-0276015031417>.

Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D535-D542.

Weber CF, King GM. 2017. Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing *Paraburkholderia* and *Burkholderia*: *Paraburkholderia hiiakae* sp. nov., *Paraburkholderia metrosideri* sp. nov., *Paraburkholderia paradisi* sp. nov., *Paraburkholderia peleae*. *Front Microbiol* 8:207. doi:10.3389/fmicb.2017.00207.

Wong, K., Dhaliwal, S., Bilawka, J., Srigley, J. A., Champagne, S., Romney, M. G., Tilley, P., Sadarangani, M., Zlosnik, J., & Chilvers, M. A. (2020). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS for the accurate identification of *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli* in the clinical microbiology laboratory. *Journal of medical microbiology*, 69(8), 1105–1113. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001223>

Wootton, M., Davies, L., Pitman, K., & Howe, R. A. (2020). Evaluation of susceptibility testing methods for *Burkholderia cepacia* complex: a comparison of broth microdilution, agar dilution, gradient strip and EUCAST disc diffusion. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, S1198-743X(20)30708-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.012>

Yakout, M. A., & Ali, G. H. (2020). Multidrug Resistance in Integron Bearing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Alexandria University Hospitals, Egypt. *Current microbiology*, 77(12), 3897–3902. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02217-7>

Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ (2006) Simultaneous coinfection by multiple strains during *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54:95–98. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.020 35.

Yu, E., & Sharma, S. (2021). *Cystic Fibrosis*. In StatPearls. StatPearls Publishing.

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2640-2644

Zemanick, E., Burgel, P. R., Taccetti, G., Holmes, A., Ratjen, F., Byrnes, C. A., Waters, V. J., Bell, S. C., VanDevanter, D. R., Stuart Elborn, J., Flume, P. A., & Antimicrobial Resistance International Working Group in Cystic Fibrosis (2020). Antimicrobial resistance in cystic fibrosis: A Delphi approach to defining best practices. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 19(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.006>

Zhou, Y., Fang, J., Davood, Z., Han, J., & Qu, D. (2021). Fitness cost and compensation mechanism of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli*. *Environmental microbiology*, 10.1111/1462-2920.15783. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15783>

Zlosnik, J. E., et al. *Burkholderia* species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada. 30 years' experience. *Ann Am Thorac Soc*. V. 12. P. 70-8. Jan. 2015.

Zulkefli, N. J., Mariappan, V., Vellasamy, K. M., Chong, C. W., Thong, K. L., Ponnampalavanar, S., Vadivelu, J., & Teh, C. S. (2016). Molecular evidence of *Burkholderia pseudomallei* genotypes based on geographical distribution. *PeerJ*, 4, e1802. <https://doi.org/10.7717/peerj.1802>

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética



IJERJ - HOSPITAL
UNIVERSITARIO PEDRO
ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência de hipermutabilidade e clonalidade em amostras de espécies do Campylobacterium jejuni em pacientes com fibrose cística cronicamente.

Pesquisador: EDG. AJRD DE FREITAS VIANNA

Área Temática:

Versão: 1

CME: 16427019.B.0000.5259

Instituição: o Próprio - Faculdade de Ciências Médicas;

Patrocinador Principal: Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.460.239

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo e dos anexos à Plataforma Brasil.

O Campylobacterium Bacteroides cepacia (CBC), compreende 20 espécies intimamente relacionadas que se destacam como patógenos oportunistas na

Fibrose Cística (FC) e estão associadas a um impacto considerável na morbimortalidade desses pacientes.

Apresenta importantes fatores de

virulência e resistência aos antimicrobianos, gerando dificuldades na sua eradicação em pacientes com fibrose cística (FC). Exibem resistência

inibida a muitos antimicrobianos e desinfetantes, frequentemente apresentadas a --laetamicos, aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas.

Algumas espécies são capazes de usar o envelope de bolhas de eflúvio, porinas restritivas, mutações no DNA bacteriano e modificação do

alvo do ramiflicol. Cepas hipermutantes tendem a apresentar modificações em genes que desempenham papel importante na colonização, imunidade e

sobrevivência de estes micro-organismos no hospedeiro. Este projeto tem como objetivo investigar a caracterização de amostras de espécies do CBC e

hipermutáveis através da presença de mutações nos genes mutY, mutM, mutD, mutH

Endereço: nm 28, de Setembro 77 - Tímaco

Bairro: Vinte e Nove de Abril

IUF: RJ

Telefone: (21) 2566-8253

Município: RIO DE JANEIRO

CIEP: 10051-000

E-mail: cep.hi.pe.nemo@ijerj.com



UERJ - HOSPITAL
UNIVERSITARIO PEDRO
ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO



Ilua oo1Pat ec 3,AJ:11.23,

e urvO pelo sequenciamento gene* co, amostroo

ESra Sobfidias de pacienles cronioos oom fibro@e cislica pruveriernes de clois oemlros cle re.ferencia na ciclacl e do Rio de Jartelro. Berti oomo ser5o

realizados l"esle cle \$11Scepfibi clade aos artfificmhiarnos (TSA) por diseo-Oifusilo (TDD) e determim, ao cla conrentra ao inibitoria minima (CIM)

para fins de avaliafilo do perfil en re popula oe;;mutanles e selvagern;;_Terndo em vista. o cariter epicle;miol6gico das infe oe.s p.elo CBc na FC, e

evidenci 1;;cleocritas na literatura de qlle 1)0.ciente;;com, FC podem.adqlilir pal6genos cl.eoutros pacientes, realizar-se-ii a analise clo polimoriismo

genetico por MultilocL1s Seqllence Typing. Proceder a investigafao cle quafa cepas circulam rnes;;e;; pacierntes pode viabiliza:r a cara.cteriza.fao dos

clorne;;mais comuns no Brasil e estabelecer relafao entre eles, e o01111 outros jii relalados ao redor do murndo.. A vigil.irtcia epidemiologica cla;;

amotrns e seus meca:riismos de resislerencia sao cruciais p:i.ra. a ooncluta rerapeutica, bem como par ao sL1ces;;o cla respocS!a do pa.ciente e

erradic0 ao da irnlecaO pulmona:r, jusliificando o uso e aprimoramerno dlas tecnicas de dete ao dos mecamismos die resisloocia do CBc na FC.

Objetivo da Pesquisa:

Transaipiio edit.lla do conieudo clo registro do protocolo e dos ..-qllivos ane:xaclos it.Plalaforma Brasil

A pmir da caraci:erizR!,aO de amostras hi;permutaveis, avaliar o perfil die susceptibilic!ade irnvi ro aos anlimicrobianos clas amostras do Comple:w

Bmikholcleria oep0.cia dbtidas cle pacieirttes cronicos com fibrose 01slica provernierntes de dois oen ros die referoocia na ciclacl e clo Rio de J.arneiro, detemiirnarnclo suas rel oes de clomalidaite.

Objefiro SecL1nclirio:

- Caracterizar as amostras do Oomplero BulAfoldetia cep0cia em hiperum.veis;
- Delem1ina:r a5 taxas de hipermut!!bi d0de das a:moslra5 de subpopllla oe;;do omplero Burtholdeilia cepa,cia;
- Pesqlisar a prese;n a cle mllla oes rnos gernes mutS, mutY, mlltM, mutD, mutT e LlrVD atrall'es die sequen ciamenlo genelic.o;
- Analisar o perfil de \$11Slepllllidad.ea.os antimicrobianos em amosirns do Com;p'.Je)o

Era-clere: A:uenm 2.fide Se1Emro TT -,;enec,

Bai1To: Via Isabd

CEF: 20,551-(j)20

IJf: RJ

1,1.iraicipio: RIODE.WE RO

Telefone: (21)2003-821:B

E It ,oep.hcpé EmO l.oom



UERJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PEDRO
ERNESTO! UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO



Continuação do Parecer: 3.460.239

Bw1 dlokreria cep:acia isoladas de pacierrtes com, Ribrose

C[stica;

e) Delerminar a Com:enlira ao Inibitoria Mini1110 (CIM) das mnoslras pa:ra ceflazidima, 111eropenem, minociclina, sulfametoxazol+trimetoprima, cloranfenicol e licarcмна+clavularui.to; e

f) Avaliar a eVdlu oo clonal peila determinai:iiio do "sequence type", através do M!.Sli (Multilocus Sequence Typing).

Avalia!a, aOdo o Risco e Beneficio:

TraooCli ao edilada do cooteudo do registro do protocolo e dos arquill'OSar11eXados it Platafomia Brasil.

Riscos: Os experimentos propostos com,oo teste de difusao em agar, determina ao da concentra ao inibil6ria mfn1110 (CIM) e MLST le111s1ido realizados

pelos la'oorat6rios do [e;partame;nto de Microl:>iologia, Imi..mdlogia e Parasitologia (DMIP) da Faculdade de Cierncias Medica,s(FCM),da UERJ, sem

o:ferer problemas dLiatnle o decurso dos mesmos.

Quanta aos equi;pamentos operacionais neress.a:rios, os labarat&Jios do DMIP, atualmente, emoontram-se eq;Llipados para o desen\1dl'i11ento dessas

praticas de Biologia Molecular.

A.Pesar das expeotativas de qlle oralm'lho seja realizado den ro do perioclo ha imprevi q;ue poderao ooomer eventualmern:e, co-.rrlO por exemplo,

a quebra de u11e1q1lli;pamento neecessilando de reparo te-chniao ou insu1110.squ:e poderao faltar no mercado possivel111ente interferindo oo cronograma.

Dada a crise financeira pela qualssa oEstado do Rio de Janeiro rneste momenta, estamos contomando essa situa ao de reel1rsos limiladoo

atrm•es de:rcerias, a exemplo da rea'lizada oorn a Dra. Ana P!i!u'la, pesqL1isadorn da FIOCRUZ, que ja oolabora com o nos.so qrtij)O em outros

IJOjeto,s, bem, estabelecida e com grande exito nas cGlaborafoes.

Beneffcios:

Dada im;prnmcia epidemidlogica, dellido a a1tas was de mortalidade relacionadli!s a pacienles com fibrose cislca oo'.lornizados por cepas do CBc e

.ipresenlarem amplo perfil de resistencia bacteria:na, o desen\1dlvirmento da resistencia tem-se

End : A,ve- 29,de Setemtro 77- Tereo

Baino: Via Isabel

IJF: RJ

Telefone: (21)2000-825:1

OEP: 20,551-ll:IO

t.IJllicipio: RIO DE ,JAlIIEIRO

E-mail : cep.hi.pe + emo@sJrail.com

..... do01



UERJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PEDRO
ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO



Continuação do Parecer: 3.460.239

relacionado como um problema potencialmente

remanescente

Durante a infecção crônica, as vias respiratórias na FIC representam um ecossistema em que os protozoários bacterianos oportunistas evoluem, em

um pool de diversidade das espécies selecionadas, como reação à imunológica, terapia antimicrobiana e limitação do oxigênio, produzindo múltiplas

variações fenotípicas (J) emergentes em linhagem clonal inicial.

Cepas hipermutantes 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 produção de alginato, entre outros.

Dessa forma, o tratamento precoce da colonização pulmonar pelo CBC em pacientes com doença respiratória de base, antes do aparecimento de

marcadores clínicos de cronicidade, como a hipermutabilidade, deve ser uma estratégia da Oncofisiologia em

esses pacientes. Amostras apresentando perfil de hipermutabilidade isoladas de pacientes com FC têm sido associadas a

presença de clones epidêmicos circulantes de pacientes com FC ou mesmo em amostras hospitalares, sendo necessário a avaliação da relação clonal

entre esses microrganismos. Este estudo justifica-se ante a necessidade de monitoramento dessas amostras, dada a possibilidade de

dispersão de mecanismos de resistência, além das taxas de resistência aos antimicrobianos, capacidade de disseminação de clones epidêmicos

entre os pacientes e sua implicação direta no aumento das taxas de morbidade e mortalidade, geralmente associados à infecção crônica por

espécies do CBC, que leva à deterioração

comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tratamento editado, do conteúdo do registro do protocolo e dos anexos à Plataforma Brasil.

O Complexo Burkholderia cepacia (CBC) compreende 20 espécies intimamente relacionadas que se

Endereço: Rua Inácia 28 de Setembro 77 - Tereza

Bairro: Via Isabel

Cidade: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2800-8253

CIE: 2,0,551-0:III

E-mail: oap.h12@uerj.br



Continuação do Parecer: 3.460.239

as informações coletadas na Plataforma Brasil e as medidas de segurança adotadas dentro das normas vigentes; e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos; de pesquisa.

Conclusões: Pendências e Lista de Medidas de Segurança:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº 466/2012, o projeto pode ser classificado na categoria A-PROVAO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em todas as reuniões com a Resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o OBP recomende ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e obter o consentimento livre e esdréxico, para análise das medidas de segurança; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; a Comissão de Ética solicita a V. S., que encaminhe relatório periódico de andamento a cada 06 (seis) meses da pesquisa; e ao término, encaminhe a este comitê um relatório dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseando nos documentos abaixo relacionados:

Título Documento	Arquivo	Data, hora, em	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFOOMAOES_BASICAS_DO_PROJETO_1333494.pdf	07/11/2019 17:33:48		Aprovação
TC/LE/ Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_ausencia_TOLE.pdf	07/11/2019 17:33:14	EDGARD DE FREITAS VIANNA	Aprovação
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_ciencia.pdf	07/11/2019 17:32:59	EDGARD DE FREITAS VIANNA	Aprovação
Fórmula de Rosto	Unliled_05032019_003543.pdf	03/11/2019 09:03:41	EDGARD DE FREITAS VIANNA	Aprovação
Projeto Detalhado e Brochura de Investidor	Projeb.doc	10/04/2019 19:19:13	EDGARD DE FREITAS VIANNA	Aprovação

Sua assinatura do Parecer:

Aprovação

Necessita Apreciação da COFPEP:

Não

Endereço: Av. Nelson Brihi 280 - Centro - UERJ

Bairro: Via Isabel

Cidade: RJ

Telefone: (21)2008-8253

CEP: 20.551-110

Cidade: RIO DE JANEIRO

E-mail: cep.hcpe.nemo@UERJ.br



UERJ -HOSPITAL
UNIVERSITARIO PEDRO
ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO



Omlnuai;:llo 00 IPnlttti: L.deD.239l

RIO DE JANEIRO, 1B, de Ju[h]o de 20 9

Assi11ado por:
WILLE OIGMA!J
[Coordenador(a)]

Bnderei,o: Alie- 2.9d' e Sekmtro 77 - Teneo
Ehi1To: Via Isabel
IJF: RJ t.luriiicípio: RIODE .JAI-E
Tel efúneç: (21)2000,-8253

CEP: 2□.551-![];jj

E-mailt cep.hu;eillemo l.oom

ANEXO C - Comprovação de submissão do 2º artigo científico



Genomic analysis of *B11rkhorderia cenocepacia* isolated from a liver abscess in a patient with cystic fibrosis

EOG RO DE FREITAS I N¹, NICOLI IZZ MIOTTO ME EZES,¹
 MILAM RARO DE ALMEIDA,¹ FLAVIA LVIM DUTRA DE FREIT S.,¹
 C JANA DA OSTA FERREIRA LEITE,¹ MO ICA CASSIA FJRMIDA,²
 DAVI RIBEIRO IGLESIAS DE MEDEJRO,¹ ROB-SON SO ZA LEAO,¹
 ROOOLPHO MATTOS LB¹ O and ELIZABETH¹ DRADE MARQ ES¹.

¹Departamento de Microbiologia, Imuologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ²Operamcento de Doenças do Torax, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and ³Deplanamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

de Freitas, S. Y. S. A. U. E. Mer, M. M. de F. Costa, F. I. N. I. Z. M. I. O. T. T. I. O. M. E. Z. E. S., M. L. A. M. R. A. R. O. D. E. A. L. M. E. I. D. A., F. L. A. V. I. A. L. V. I. M. D. U. T. R. A. D. E. F. R. E. I. T. S., C. J. A. N. A. D. A. O. S. T. A. F. E. R. R. E. I. R. A. L. E. I. T. E., M. O. I. C. A. C. A. S. S. I. A. F. J. R. M. I. D. A., D. A. V. I. R. I. B. E. I. R. O. I. G. L. E. S. I. A. S. D. E. M. E. D. E. J. R. O., R. O. B. S. O. N. S. O. Z. A. L. E. A. O., R. O. O. L. P. H. O. M. A. T. T. O. S. L. B. O. and E. L. I. Z. A. B. E. T. H. D. R. A. D. E. M. A. R. Q. E. S.

Burkholderia cenocepacia is a Gram-negative, aerobic, non-motile, non-spore-forming bacterium. It is a member of the *Burkholderia* genus, which is part of the *Alphaproteobacteria* class. The genome of *B. cenocepacia* is approximately 6.5 Mb in size and contains several plasmids. The bacterium is known for its ability to cause lung infections in patients with cystic fibrosis (CF) and for its role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The genomic analysis of *B. cenocepacia* isolated from a liver abscess in a patient with CF revealed several unique genetic features, including the presence of a large plasmid and a high degree of genetic diversity. The results of this study suggest that *B. cenocepacia* may play a role in the pathogenesis of liver abscesses in CF patients.

Key words: *Burkholderia cenocepacia*; liver abscess; cystic fibrosis; genomic analysis; antibiotic resistance.

• ual contributffons

C) tic fibrosi (CF) i n utosomal recessive: ge:Hetec disorder th.at is remmon. a soci:ucd with pulmon ry and pancre ti im[Oirme11t. Clin] I manfcstalion arc du to dysfunctional trans• membrane conducumcc r gulator protein (CFTR). a membr: or the BC transponc:r upcrfamily involved in chloride ion transport [1]. The CF is charactcrizoo by v riet) of linkal expression su h growth dc:fidl. increased SUSCC'plibiliy to

L.idney tones. liver failure:, and infertility. Prol'res: sive invol', mcnt or the lungs with intcrmitt(!)I Bar an import nt fa: tor in dlCtcrmining the [crit] of this dis . I ding 10 d ath [-I- Pse-ufomoi1a., oerugi11aja. Staphy]ocuet.J1, mirm:1. H.MrJop/ti/ru /ifitutt1:t1t!. B11rkhwiderit1 pac a rem- ple:x (. S1t!11umiphom,mas ma/11/ph1f1<. and A llrCNIJt)ba<|<r x.1.0.11.Y:ida1u arc: typ II) the mkroora:mism mosI predominantly found la CF lung iofoc'lio11. mon_g the nuria opponun tic bac- terial pu:ho11.cns. B oompwng 2. _ ditrere:nt speci

Received 6 April 2021. Accepted 12 September 2021