

PRISCILA DENTINI

**Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística
em um Centro de Referência no Brasil:
identificação, prevalência e importância clínica.**

CAMPINAS

2010

PRISCILA DENTINI

**Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística
em um Centro de Referência no Brasil:
identificação, prevalência e importância clínica.**

Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de mestre em Saúde da Criança e do Adolescente. Área de concentração: Saúde da criança e do adolescente .

CAMPINAS

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D36c Dentini, Priscila
Complexo **Burkholderia cepacia** em pacientes com fibrose cística em um Centro de Referência no Brasil: Identificação, prevalência e importância clínica / Priscila Dentini. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: José Dirceu Ribeiro

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

Título em inglês : *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis patients in a Brazilian Preference Center: Identification, prevalence and clinical relevance

Keywords: • Cystic fibrosis
• Prevalence

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro

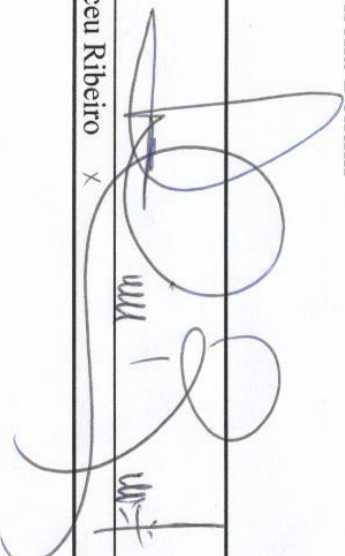
Profa. Dra. Elizabeth Andrade Marques

Prof. Dr. Paulo Augusto Moreira Camargo

Data da defesa: 13-07-2010

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluno (a) Priscila Dentini



Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Dirceu Ribeiro x

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Elizabeth de Andrade Marques x

Professor (a) Doutor (a) *Elizabeth de Andrade Marques*
Paulo Augusto Moreira Camargos x

Paulo Augusto Moreira Camargos

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/07/2010

Dedico à equipe multidisciplinar de profissionais do Ambulatório de Pediatria da UNICAMP e ao grupo de voluntários da Fibrocis, que se reúnem todas as semanas para assistir aos pacientes com fibrose cística. A dedicação de todos é a ferramenta mais efetiva no tratamento e na melhora da qualidade de vida destes pacientes. Parabéns a todos pelo trabalho!

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. JOSÉ DIRCEU RIBEIRO, professor do departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, meu orientador e amigo. Sua dedicação, demonstração de amor e envolvimento com sua profissão e seu entusiasmo como médico, professor e pesquisador são contagiantes. Agradeço pela orientação, pelos ensinamentos, paciência, confiança, apoio nas horas difíceis, e por colocar-se tão disponível como profissional.

Ao Prof. Dr. CARLOS EMÍLIO LEVY, professor do Departamento de Patologia Clínica da Unicamp, meu co-orientador e amigo, pela confiança que sempre depositou em mim, pela paciência e compreensão em muitos momentos, por todas as oportunidades que me ofereceu e por sempre me incentivar em todos os aspectos. Suas contribuições como microbiologista e amigo sempre foram muito valiosas e imprescindíveis para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

À minha mãe tão querida, por sempre me apoiar em tudo, pelo interesse por todas as minhas atividades, por todos os ensinamentos durante toda a vida, e principalmente pelo exemplo de caráter, força e dignidade, que serviram como base para a minha formação como pessoa. Sem o seu apoio e amor incondicional, nada seria possível!

Ao meu querido MÁRIO por todo seu carinho, compreensão e companhia, e principalmente por não ter desistido de mim, mesmo diante de tantos momentos de pressão e *stress*.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO FERNANDO RIBEIRO, professor do Departamento de Pediatria, coordenador e fundador do Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas da Unicamp, por suas contribuições profissionais e como amigo.

Aos demais professores da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, em especial aos professores ANDRÉ MORENO MORCILIO, ANTONIO DE AZEVEDO BARROS FILHO, SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA e ANGÉLICA MARIA BICUDO ZEFERINO, que me proporcionaram uma sólida formação.

Às equipes médica, de enfermagem, de fisioterapia e aos demais profissionais do Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da Unicamp, onde foi realizada a parte clínica deste trabalho e aos colegas de pós-graduação, pela amizade, apoio, troca de experiências e informações. Todos contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Prof.^a MARIA ANGELA GONÇALVES DE O. RIBEIRO, fisioterapeuta, professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, ao estagiário RENATO e à SILVANA DALGE SEVERINO, ambos colaboradores do Laboratório de Fisiologia Pulmonar, pela realização dos testes de Função pulmonar.

À DENISE DA SILVA ABONÍCIO, colaboradora do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp, pela amizade e por toda sua ajuda e dedicação na rotina diagnóstica, que foram importantíssimas para a realização deste trabalho.

À MARIZETE SALVADEGO, amiga e colaboradora do laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp, e à minha querida amiga SHIRLEY, ex-colaboradora do laboratório, pela amizade e por todos os ensinamentos. Ambas foram responsáveis por despertar em mim o interesse e amor pela Microbiologia, com seu exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Dra. ANGELA VON NOWAROVSKI, patologista do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp, pela amizade, por todos os ensinamentos como microbiologista.

À ELIANE PICOLLI ALVES BENSI, supervisora do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp, e minha querida amiga. Agradeço pela amizade, pelo carinho, apoio, confiança, e também por todos os ensinamentos durante o estágio no laboratório.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp: SÉRGIO, Dona FLOR, MÁRCIA, MARIA RITA, FRANCISCO, ENI, SILVIO, PAULA, REGINA, Dona JANDIRA, DALVA, CIDINHA, WAGNER, EDSON, LUZIA, pela companhia, amizade, momentos de descontração e pelos ensinamentos durante o estágio no laboratório que contribuíram muito para a minha formação profissional.

Ao Sr. CARLOS e Sra. GUILHERMINA pelo auxílio na lavagem e esterilização dos materiais no laboratório.

À Prof.^a Dr.^a CARMEM SILVIA BERTUZZO, professora do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por ceder o espaço em seu laboratório e disponibilizar muitos materiais, que foram indispensáveis para a viabilização deste trabalho.

À LUCIANA CARDOSO BONADIA, bióloga, colaboradora do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela amizade, orientação e ajuda durante os experimentos de Genética Molecular. Seus ensinamentos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Dr.^a LUCIANA MARIA HOLLANDA, bióloga, pós-doutoranda pelo Departamento de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, pela amizade, e por toda sua colaboração e ensinamentos, principalmente sobre o seqüenciamento de DNA. Suas contribuições foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelas orientações referentes às análises estatísticas deste trabalho.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa e à Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela aprovação do projeto de pesquisa referente à este trabalho.

Aos colaboradores dos Serviços de Apoio Didático, Científico e Computacional da Faculdade de Ciências Médicas, pela disponibilização de recursos de informática, softwares e suporte necessários para a organização e preparação do material de apresentação da tese.

À TATHYANE KRAHENBUHL, Secretária da Pós-Graduação do Programa Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, e colega de pós-graduação, por todos os serviços prestados aos alunos e orientações sobre as regras, normas e aspectos burocráticos da Universidade.

Ao Serviço de Arquivo Médico do Hospital de Clínicas da Unicamp, em especial à Sra. BENEDITA FERNANDA PEREIRA GALLO FERRAZ e ao colaborador RAFAEL pela ajuda na separação dos prontuários médicos utilizados neste trabalho. Sua ajuda, paciência e compreensão foram muito importantes.

Ao FAEPEX (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão) da Unicamp, pela concessão de parte do suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	xxxvii
Abstract	xli
Introdução	45
1. Fibrose cística.....	47
1.1. Epidemiologia	47
1.2. Bases genéticas da doença	48
1.3. Manifestações clínicas	50
1.3.1. Fisiopatologia da doença pulmonar	52
1.4. Aspectos microbiológicos da doença pulmonar	54
2. Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	57
2.1. Taxonomia	57
2.2. Epidemiologia	59
2.3. Mecanismos de virulência	61
2.4. Síndrome cepacia	67
2.5. Cultura e identificação	68
2.6. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	71
3. Escores clínicos e indicadores de gravidade	72
3.1. Avaliação clínica	72
3.2. Avaliação tomográfica	72
3.3. Avaliação da função pulmonar	73
3.4. Avaliação nutricional	74
Objetivos	75
Casuística e Métodos	79
1. Delineamento do estudo	81
2. População de estudo	81
2.1. Critérios de inclusão	82
2.2. Critérios de exclusão	82
3. Diagnóstico da Fibrose cística	82

3.1. Pesquisa genética	82
3.2. Teste de sódio-cloro no suor.....	82
4. Avaliação clínica e fatores de gravidade	83
4.1. Escore clínico de Shwachman e Kulczycki.....	83
4.2. Escore tomográfico de Bhalla	85
4.3. Teste de função pulmonar	86
4.4. Avaliação nutricional	90
5. Classificação dos pacientes de acordo com as características microbiológicas	91
6. Avaliação microbiológica do trato respiratório	93
6.1. Coleta de amostras	93
6.1.1. Escarro	93
6.1.2. Secreção de orofaringe	94
6.1.3. Secreção traqueal e lavado brônquio-alveolar.....	94
6.2. Bacterioscopia	94
6.3. Cultura	95
6.3.1. Escarro e secreção de orofaringe	95
6.3.2. Secreção traqueal.....	95
6.3.3. Lavado brônquio-alveolar	95
6.3.4. Incubação e avaliação do crescimento	96
6.4. Identificação dos microrganismos.....	96
6.4.1. Identificação fenotípica – Testes bioquímicos convencionais	97
6.4.2. Identificação fenotípica – Sistema automatizado Vitek®.....	104
6.4.2.1. Preparação do inóculo	104
6.4.2.2. Inoculação dos microrganismos nos cartões de identificação	107
6.4.2.3. Selagem e incubação dos cartões de identificação	107
6.4.2.4. Leitura dos cartões de identificação	108
6.4.3. Identificação genotípica	110
6.4.3.1. Extração do DNA genômico.....	110
6.4.3.2. Quantificação do DNA genômico.....	111
6.4.3.3. PCR.....	111
6.4.3.4. Nested-PCR	112
6.4.3.5. Eletroforese	113
6.4.3.6. Sequenciamento do gene <i>recA</i>	114

7. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	116
8. Análises estatísticas	118
9. Aspectos éticos.....	118
Resultados	119
Discussão	153
Conclusões	165
Referências Bibliográficas	169
Anexos	
Apêndices	

Lista de abreviaturas

16S rRNA	Subunidade 16S do RNA ribossômico
A455E	Mutação no gene da proteína CFTR
A549	Mutação no gene da proteína CFTR
ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
ACHOC	Ágar chocolate
R117C	Mutação no gene da proteína CFTR
D1152H	Mutação no gene da proteína CFTR
L227R	Mutação no gene da proteína CFTR
AS	Ágar sangue
ATP	Adenosina trifosfato
R334W	Mutação no gene da proteína CFTR
R117H	Mutação no gene da proteína CFTR
ATPase	Enzima que cataliza a hidrólise de ATP (adenosina trifosfato)
atpD	Gene que codifica a ATP-sintase de cadeia beta
ATS	American Thoracic Society
AW	Grupo de <i>Burkholderia cepacia</i> com taxonomia indefinida
BAL	Lavado brônquio-alveolar
BCAB	<i>Burkholderia Cepacia</i> Ágar Base
BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
BCESM	<i>Burkholderia cepacia</i> Epidemic Strain Marker
BCM	<i>Burkholderia cepacia</i> Medium
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective Agar
BD	Broncodilatador
BGNMF	Bacilo Gram negativo não fermentador de glicose
CAZ	Ceftazidima
MERO	Meropenem
MINO	Minociclina
SUT	Sulfametoxazol+Trimetropim
cAMP	Sinalizador celular composto de adenosina monofosfato
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
cblA	Gene que codifica o <i>cable pilli</i>
CciIR	Sistema de comunicação <i>quorum sensing</i>
ccil	Gene que codifica o <i>quorum sensing</i>
cepl	Gene que codifica a flagelina
cepR	Gene que codifica a flagelina
CFF	Cystic Fibrosis Foundation
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria

CK13	Citoqueratina 13
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
Col.	Colaboradores
CPT	Capacidade pulmonar total
CT	Tomografia computadorizada
CV	Capacidade vital
CVF	Capacidade vital forçada
D1507	Mutação no gene da proteína CFTR
DHA	Ácido docosahexanóico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dp	Desvio padrão da média
DVM	Distúrbio ventilatório misto
DVO	Distúrbio ventilatório obstrutivo
DVR	Distúrbio ventilatório restritivo
EB	Escore de Bhalla
ECSK	Escore clínico de schwachman e Kulczycki
EGFC	Escores de Gravidade na Fibrose Cística
ERS	European Respiratory Society
ESC	Escarro
<i>esmR</i>	Gene que codifica o BCESM
ET-12	Linhagem epidêmica de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
E-Test®	Epsilometer test
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose cística
FEF_{25-75%}	Fluxo expiratório entre 25% e 75% da capacidade vital forçada
fliC	Gene que codifica as flagelinas 55 kDa e 45 kDa
FTIR	<u>Fourier transform infrared spectroscopy</u>
G542X	Mutação no gene da proteína CFTR
G551X	Mutação no gene da proteína CFTR
S492F	Mutação no gene da proteína CFTR
V520F	Mutação no gene da proteína CFTR
R553G	Mutação no gene da proteína CFTR
R560T	Mutação no gene da proteína CFTR
R560S	Mutação no gene da proteína CFTR
G85E	Mutação no gene da proteína CFTR
G91R	Mutação no gene da proteína CFTR
GC	Guanina-citosina
GI	Ilha genômica (<i>Genomic island</i>)
<i>gltB</i>	Gene que codifica a subunidade maior de glutamato-redutase
<i>gyrB</i>	Gene que codifica a DNA girase
HC	Hospital de Clínicas
IL-10	Interleucina 10

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
IP	Insuficiência pancreática
IS402	Inserção genômica 402
IV	Intra venoso
J2315	Linhagem epidêmica de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
K56-2	Linhagem epidêmica de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
L1065P	Mutação da proteína CFTR
LAFIP	Laboratório de Fisiologia Pulmonar
<i>lepA</i>	Gene for leader peptidase
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF-MS	<i>Matrixassisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry</i>
MAN	Agar manitol
MC	Agar MacConkey
MIC	Concetação inibitória mínima (<i>Minimal Inibitory Concentration</i>)
MLST	Multilocus sequence typing
<i>mRNA</i>	Ácido ribonucléico mensageiro
n	Número de casos ou frequência absoluta
N1303K	Mutação da proteína CFTR
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-kB	Neutrófilo B – <i>Killer</i>
NHI	<i>National Institute of Health Score</i>
OFPBL	<i>Oxidation-fermentation Base</i>
p	Nível de significância do teste estatístico
p=NS	Teste sem diferença estatisticamente significante
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>phaC</i>	Gene que codifica a Aceto-acetil CoA reductase
PHDC	Linhagem epidêmica de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
PMN	Polimorfonucleares
recA	Gene que codifica a Recombinase A
RFLP	<i>Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i>
RSV	Vírus sincicial respiratório
S549R	Mutação no gene da proteína CFTR
SCS	<i>Simplified Cystic Fibrosis Scoring Scale</i>
SET	Secreção traqueal
SOD	Superóxido desmutase
SOF	Secreção de orofaringe
SpO ₂	Saturação de oxigênio
TLR5	<u>Toll-like receptor</u> 5
TNF-α	Fator de necrose tumoral – tipo alfa

TR	Trato respiratório
<i>trpB</i>	Gene que codifica a Triptofano-sintase
TS	Teste do suor
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo da capacidade vital forçada
VI	Via inalatória
VO	Via oral
VR	Volume residual
W1282X	Mutação no gene da proteína CFTR
<i>wbiI</i>	Gene <i>wbiI</i>
<i>wbpM</i>	Gene <i>wbpM</i>
β1	Beta 1
ΔF 508	Deleção do aminoácido fenilalanina na posição 508
UFC	Unidades formadoras de colônias
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
OF	Oxidação-fermentação
TSB	Tryptic Soy Broth
TSI	Triple Sugar Iron
BCCM	<i>Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms</i>
ONPG	<i>ortho</i> -Nitrophenyl-β-galactoside
GN	Gram negativo
pNA	ácido nucleico peptídico
APPA	Ala-Fe-pro-Arilamidase
ADO	Adonitol
PyrA	L-Pirrolidonil - Arilamidase
IARL	L-Arabitól
dCEL	D-Celobiose
BGAL	Beta-Galactosidase
H ₂ S	Produção de H ₂ S
BNAG	Beta-N-Acetil-Glucosaminidase
AGLTp	Glutamil Arilamidase pNA
dGLU	D-Glucose
GGT	Gama-Glutamil-Transferase
OFF	Fermentação / Glicose
BGLU	Beta-Glucosidase
dMAL	D-Maltose
dMAN	D-Manitol
dMNE	D-Manose
BXYL	Beta-xilosidase
BAlap	Beta-Alanina arilamidase pNA
ProA	L-Prolina Arilamidase
LIP	Lipase

PLE	Palatinose
TyrA	Tirosina Arilamidase
URE	Urease
dSOR	D-Sorbitol
SAC	Sacarose / Sucrose
dTAG	D-Tagatose
dTRE	D-Trealose
CIT	Citrato (sódio)
MNT	Malonato
5KG	5-Queto-D-Gluconato
ILATk	Alcalinização L-Lactato
AGLU	Alfa-Glucosidase
SUCT	Alcalinização Succinato
NAGA	Beta-N-Acetil-Glucosaminidase
AGAL	Alfa-Galactosidase
PHOS	Fosfatase
GlyA	Assimilação Glicina Arilamidase
ODC	Ornitina descarboxilase
LDC	Lisina descarboxilase
ODEC	Base descarboxilase
IHISa	Assimilação L-histidina
CMT	Cumarato
BGUR	Beta-Glucoronidase
O129R	Resistência O/129 (comp.vibrio)
GGAA	Glu-Gli-Arg-Arilamidase
IMLTa	Assimilação L-Malato
ELLM	ELLMAN
ILATa	Assimilação L-Lactato
NA	ácido nucleico peptídico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
rpm	Rotações por minuto
vol	Volume
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (UGent)
A260	Absorbância ao comprimento de onda 260 nanômetros
A280	Absorbância ao comprimento de onda 280 nanômetros
Taq	DNA polimerase termoestável (Taq= <i>Termus aquaticus</i>)
DMSO	<u>Dimethyl sulfoxide</u>
TBE	Tampão contendo Tris-HCL/Borato/EDTA
UV	Ultra violeta
BCR1	Primer para amplificação do gene <i>recA</i> – sequência <i>forward</i>

BCR2	Primer para amplificação do gene <i>recA</i> – sequência <i>reverse</i>
BCR3	Primer para seqüenciamento do gene <i>recA</i> – sequência <i>foward</i>
BCR4	Primer para sequenciamento do gene <i>recA</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRG11^a	Primer espécie-específico para <i>B. cepacia</i> – sequência <i>foward</i>
BCRG12^a	Primer espécie-específico para <i>B. cepacia</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRBM1^a	Primer espécie-específico para <i>B. multivorans</i> – sequência <i>foward</i>
BCRBM2^a	Primer espécie-específico para <i>B. multivorans</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRG3A1^a	Primer espécie-específico para <i>B. cenocepacia IIIA</i> – sequência <i>foward</i>
BCRG3A2^a	Primer espécie-específico para <i>B. cenocepacia IIIA</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRG3B1^a	Primer espécie-específico para <i>B. cenocepacia IIIB</i> – sequência <i>foward</i>
BCRG3B2^a	Primer espécie-específico para <i>B. cenocepacia IIIB</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRG41^a	Primer espécie-específico para <i>B. stabilis</i> – sequência <i>foward</i>
BCRG42^a	Primer espécie-específico para <i>B. stabilis</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRBV1^a	Primer espécie-específico para <i>B. vietnamiensis</i> – sequência <i>foward</i>
BCRBV2^a	Primer espécie-específico para <i>B. vietnamiensis</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRBM1^b	Primer espécie-específico para <i>B. dolosa</i> – sequência <i>foward</i>
C6-3^c	Primer espécie-específico para <i>B. dolosa</i> – sequência <i>reverse</i>
BCR1^b	Primer espécie-específico para <i>B. ambifaria</i> – sequência <i>foward</i>
CA-3^c	Primer espécie-específico para <i>B. ambifaria</i> – sequência <i>reverse</i>
BCRG81^d	Primer espécie-específico para <i>B. anthina</i> – sequência <i>foward</i>
BCRG82^d	Primer espécie-específico para <i>B. anthina</i> – sequência <i>reverse</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ddTTP	Dideoxynucleotídeo para Timina marcado com material fluorescente
ddCTP	Dideoxynucleotídeo para Citosina marcado com material fluorescente
ddGTP	Dideoxynucleotídeo para Guanina marcado com material fluorescente
ddATP	Dideoxynucleotídeo para Adenina marcado com material fluorescente
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
ANOVA	Análise de variância (Analysis of variance)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
DNTP	Dideoxynucleotídeo

Lista de notações

%	Percentual
µg	Micrograma
Cl ⁻	Íon cloro
H ₂ O	Molécula da água
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
K	Íon potássio
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
m ²	Metro elevado ao quadrado
ml	mililitro
Na ⁺	Íon sódio
°C	Graus Celsius
R\$	Reais
U	Unidades
β	Beta
µm	micrômetro

Lista de figuras

Figura 1: Localização aproximada do gene que codifica a proteína CFTR ao longo do cromossomo 7.	48
Figura 2: Estrutura da CFTR (<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>).	48
Figura 3: Categorias das mutações da CFTR.	49
Figura 4: Mecanismos normais de transporte de Cl ⁻ e mecanismos de elevação das concentrações de Cl ⁻ no suor dos pacientes com FC.	52
Figura 5: Hipóteses do “baixo volume” e “high-salt” que postulam sobre como os mecanismos transepiteliais são prejudicados pelo funcionamento inadequado da CFTR, levando à doença pulmonar nos pacientes com FC.	53
Figura 6: Mecanismos de virulência do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	66
Figura 7: Principais parâmetros de avaliação no Escore de Bhalla.....	85
Figura 8: <i>Swab</i> com Meio de Stuart, utilizado para coleta de secreção de orofaringe..	94
Figura 9: Semeadura pelos métodos (a) quantitativo e (b) qualitativo ou método do esgotamento.....	96
Figura 10: Diagrama do processamento laboratorial das amostras clínicas.....	97
Figura 11: Prova da oxidase utilizando-se a solução N-N-N-Tetrametylparaphenylenediamine dihydrochloride em papel de filtro.....	98
Figura 12: Interpretação da prova de oxidação-fermentação de Hugh e Leifson	99
Figura 13: Diagrama com as provas preliminares para identificação bioquímica dos microrganismos.....	100
Figura 14: Folha de registro de trabalho do cassete	106
Figura 15: Preparação do inóculo para identificação no sistema automatizado Vitek®2 (BioMérieux)	107

Figura 16: Selagem e incubação dos cartões de identificação do sistema automatizado Vitek®2 (BioMérieux)	107
Figura 17: Esquema do processo de extração de DNA genômico	110
Figura 18: Quantificação do DNA (NanoVue®, General Electric Company)	111
Figura 19: Alinhamento pelo ClustalW das sequências “forward” e “reverse” por meio do software Mega 4.1 (Beta3)	115
Figura 20: Comparação dos resultados com o GenBank, por meio do software BLAST no NCBI.....	115
Figura 21: Construção da árvore filogenética por meio do software Mega 4.1 (beta3) .	116
Figura 22: Distribuição de idades e curva normal	121
Figura 23: Evolução da prevalência de colonização/infecção por Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> no período de 2005 a 2009.....	122
Figura 24: Distribuição dos grupos entre a população de pacientes com fibrose cística atendidos nos Ambulatórios de Pediatria e Adultos do HC/Unicamp	123
Figura 25: Distribuição de idade entre os grupos I e II e curva normal	124
Figura 26: Distribuição dos pacientes do grupo I de acordo com o tipo de interação que o CBc mantém com o hospedeiro	126
Figura 27: Distribuição dos valores do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II	127
Figura 28: Distribuição dos valores do parâmetro Estado Nutricional do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II	128
Figura 29: Distribuição dos valores do parâmetro Atividade geral do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II	128
Figura 30: Classificação da Gravidade do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II	129.
Figura 31: Distribuição de pontos do Escore de Bhalla nos grupos I e II	132

Figura 32: Distribuição da frequência de pontos dos parâmetros avaliados no escore de Bhalla nos pacientes dos grupos I e II.....	132.
Figura 33: Comparação dos valores médios dos parâmetros avaliados no Teste de função pulmonar entre os grupos 1 e 2	133
Figura 34: Classificação dos distúrbios ventilatórios avaliados pelo Teste de função pulmonar nos os grupos I e II.....	134
Figura 35: Distribuição de peso (kg) nos grupos I e II de acordo com a faixa etária.....	135
Figura 36: Comparação da média de peso (kg) entre os grupos I e II de acordo com a faixa etária.	136
Figura 37: Distribuição de estatura (cm) nos grupos I e II de acordo com a faixa etária.	137
Figura 38: Comparação da média de estatura (cm) entre os grupos I e II de acordo com a faixa etária.	137
Figura 39: Comparação da relação entre as médias de peso (kg) e estatura (cm) entre os grupos I e II	138
Figura 40: Comparação da média de IMC de acordo com a faixa etária nos pacientes dos grupos I e II	139.
Figura 41: Classificação do estado nutricional com base no IMC ($[Kg]/m^2$) / idade nos pacientes dos grupos I e II por faixa etária. G1 = Grupo 1, G2 = Grupo 2.	140
Figura 43: Teste de especificidade dos primers BCR1 e BCR2 para caracterização do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> com cepas-padrão do <i>CBc</i>	144
Figura 44: Teste de especificidade dos primers BCR1 e BCR2 para caracterização do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> com cepas-padrão do <i>CBc</i>	145
Figura 45: Árvore filogenética construída a partir do seqüenciamento do gene <i>recA</i> de cepas-padrão dos genovares do <i>CBc</i>	146
Figura 46: Prevalência dos genovares do <i>CBc</i> em 32 pacientes	147
Figura 47: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>CBc</i>	150

Lista de quadros

Quadro 1: Manifestações Clínicas da Fibrose Cística	50
Quadro 2: Mecanismos de virulência do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	62
Quadro 3: Genes analisados pelo MLST, para a identificação do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	70
Quadro 4: Escore clínico de Shwachman & Kulczycki – Parâmetros de avaliação	84
Quadro 5: Escore tomográfico de Bhalla	86
Quadro 6: Valores de referência para o exame espirométrico dentro dos parâmetros da normalidade.	88
Quadro 7: Critérios de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios restritivos (DVR), com base nos parâmetros observados pelo exame espirométrico	88
Quadro 8: Classificação da gravidade do distúrbio ventilatório restritivo (DVR) na espirometria.	88
Quadro 9: Parâmetros de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios obstrutivos (DVO), com base no exame espirométrico.	89
Quadro 10: Classificação da gravidade do distúrbio ventilatório obstrutivo (DVO) na espirometria.	89
Quadro 11: Critérios de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios obstrutivos (DVO), avaliados somente pelos fluxos expiratórios. com base nos parâmetros observados pelo exame espirométrico	89
Quadro 12: Parâmetros de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios mistos (DVM), com base no exame espirométrico.	90
Quadro 13: Classificação do estado nutricional de pacientes entre 2 e 20 anos.	91
Quadro 14: Classificação do estado nutricional de pacientes com idade superior a 20 anos.....	91

Quadro 15: Classificação do tipo de interação entre o <i>CBc</i> e o hospedeiro.	92
Quadro 16: Sinais e sintomas de exacerbação pulmonar na fibrose cística.	92
Quadro 17: Principais testes bioquímicos utilizados na identificação fenotípica dos bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose.	101

Lista de tabelas

Tabela 1:	Frequência de isolamento de microrganismos nas vias aéreas dos pacientes com FC.....	56
Tabela 2:	Taxonomia do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	58
Tabela 3:	Prevalência dos genovares do <i>CBc</i>	61
Tabela 4:	Principais meios de cultura seletivos para o Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	68
Tabela 5:	Principais testes bioquímicos utilizados na identificação fenotípica dos genovares do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	104
Tabela 6:	Conteúdo dos cartões GN de identificação bioquímica para bacilos Gram negativos – Vitek®2 Compact (<i>bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO</i>).....	105
Tabela 7:	Cepas – padrão (<i>type strains</i>) dos genovares do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>para controle positivo</i>)	108
Tabela 8:	Cepas – padrão (<i>type strains</i>) de outros bacilos Gram negativos Não fermentadores.....	109
Tabela 9:	Primers para identificação dos genovares do Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	113
Tabela 10:	Pontos de corte e interpretação dos testes de disco difusão com os antibióticos padronizados para o <i>CBc</i>	117
Tabela 11:	Pontos de corte para MIC e interpretação dos testes com os antibióticos padronizados para o <i>CBc</i>	117
Tabela 12:	Classificação da faixa etária	121
Tabela 13:	Evolução da prevalência de colonização/infecção por Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> no período de 2005 a 2009.....	122
Tabela 14:	Distribuição das mutações da CFTR entre os pacientes dos grupos I e II	122
Tabela 15:	Total de pontos dos parâmetros avaliados no Escore de Schwachman e testes estatísticos	127

Tabela 16:	Classificação da Gravidade do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II.....	129
Tabela 17:	Distribuição da frequência de pontos dos parâmetros avaliados no escore de Bhalla nos pacientes do grupo I	127
Tabela 18:	Distribuição da frequência de pontos dos parâmetros avaliados no escore de Bhalla nos pacientes do grupo II	131
Tabela 19:	Classificação dos distúrbios ventilatórios avaliados pelo Teste de função pulmonar nos grupos I e II.....	134
Tabela 20:	Distribuição de peso (kg), estatura (cm) e IMC ([Kg]/m ²) nos grupos I e II de acordo com a faixa etária	135
Tabela 21:	Classificação do estado nutricional, com base no IMC ([Kg]/m ²) / idade nos pacientes do grupo I	140
Tabela 22:	Classificação do estado nutricional, com base no IMC ([Kg]/m ²) / idade nos pacientes do grupo II	140
Tabela 23:	Testes bioquímicos convencionais para a identificação de 154 cepas de <i>CBc</i> de 32 pacientes	142
Tabela 24:	Identificação de cepas do <i>CBc</i> pelo Vitek®2 (BioMérieux)	143
Tabela 25:	Prevalência dos genovares do <i>CBc</i> em 32 pacientes	147
Tabela 26:	Pacientes infectados por mais de um genovar do <i>CBc</i>	148
Tabela 27:	Pacientes com isolamento de mais de um genovar do <i>CBc</i> ao longo do período do estudo.....	149
Tabela 28:	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>CBc</i>	149



RESUMO

RESUMO

DENTINI P. **Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística em um Centro de Referência no Brasil: identificação, prevalência e importância clínica.** Campinas/SP, 2010. Tese (Mestrado) – Faculdade Ciências Médicas, Unicamp.

Objetivos:

Determinar a prevalência da colonização/infecção pelo Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) e os respectivos genovares em pacientes com fibrose cística (FC) e comparar os indicadores clínicos, nutricionais, tomográficos e funcionais de gravidade da lesão pulmonar em dois grupos de pacientes: GI: pacientes colonizados/infectados pelo CBc e GII: pacientes sem colonização/infecção pelo CBc, com a finalidade de avaliar o impacto deste microrganismo na deterioração pulmonar.

Métodos:

Foi realizado um estudo clínico-laboratorial, prospectivo, com 222 pacientes com FC, acompanhados nos ambulatórios pediatria e adultos da UNICAMP. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: GI (n=50) e GII (n=134). Os microrganismos foram identificados por meio de testes bioquímicos convencionais, pelo Vitek2@Compact, PCR do gene *recA*, e *nested*-PCR com primers espécie-específicos. O seqüenciamento do gene *recA* foi realizado para cepas com PCR inconclusivas. Os pacientes foram classificados pelo escore clínico de Schwachman e as medidas de peso/idade, estatura/idade e IMC/idade foram utilizadas para avaliar o estado nutricional. As alterações tomográficas foram classificadas pelo escore de Bhalla e a função pulmonar foi avaliada por espirometria. Os dados foram comparados entre os grupos com a finalidade de avaliar o impacto do CBc na lesão pulmonar.

Resultados:

A prevalência do CBc foi de 22,5% e dos genovares: *Burkholderia multivorans* (30,0%), seguido de *Burkholderia cepacia* (24,0%), *Burkholderia cenocepacia* IIIA (10,0%), *Burkholderia cenocepacia* IIIB (2%) e *Burkholderia vietnamiensis* (2,0%). No grupo I, 26,0% dos pacientes estavam infectados, 18,0% apresentaram colonização transitória e 56,0% colonização intermitente pelo CBc. Não houve diferença estatística na média de pontos do escore de Schwachman ($p=0,07$), nem na classificação da gravidade ($p=0,611$), porém houve diferença nas variáveis: estado nutricional ($p=0,020$) e atividade geral ($p=0,026$). Houve diferença estatística na média de pontos do escore de Bhalla ($p=0,04$) e

entre os parâmetros: gravidade da bronquiectasia ($p=0,007$), espessamento peribrônquico ($p=0,013$), extensão das bronquiectasias ($p=0,010$), generalidades da árvore bronquial ($p=0,020$). O teste de função pulmonar mostrou: CVF(%) ($p=0,076$), VEF₁(%) ($p=0,066$), FEF_{25-75%} no ($p=0,312$) e VEF₁/CVF ($p=0,312$). Classificação dos distúrbios ventilatórios: DVO no GI=4,8% e GII=23,8%, DVR no GI e GII=9,5%, DVM no GI=19,0% e GII=1,6% e DVM com CVF reduzida no GI=47,6% e GII=30,2%. Na avaliação nutricional houve diferença significativa entre as médias de peso(kg) e estatura(cm) ($p=0,02$).

Conclusões:

A prevalência do *CBc* em nosso centro é significativamente superior aos dados apresentados pela literatura nacional e internacional. A maior prevalência da *Burkholderia multivorans* difere da maioria dos estudos. Há a suspeita de que possa ter ocorrido infecção cruzada entre os pacientes ou que seja uma característica regional. Os escore de Shwachman, escore de Bhalla, espirometria e dados nutricionais mostraram que o *CBc* tem sério impacto na deterioração pulmonar e na piora clínica. Os métodos fenotípicos são úteis para a identificação presuntiva do *CBc*. O Vitek® apresentou boa acurácia na identificação do *CBc*, porém com alguns erros decorrentes de limitações do método/equipamento. O PCR, *nested*-PCR e seqüenciamento do gene *recA* apresentaram boa especificidade na identificação do *CBc* e dos genômicos, entretanto, ainda ocorrem algumas limitações, decorrentes da variedade genotípica, sendo necessária a utilização de métodos mais abrangentes, como o MSLT.

Palavras-chave: Fibrose cística, Complexo *Burkholderia cepacia*, prevalência

ABSTRACT

ABSTRACT

DENTINI P. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis patients in a Brazilian Reference Center: identification, prevalence and clinical relevance. Campinas/SP, 2010. Tese (Mestrado) – Faculdade Ciências Médicas, Unicamp.

Objectives:

Determine the *Burkholderia cepacia* complex (*BCC*) colonization/infection and genomovar prevalence in cystic fibrosis patients and compare the clinical, tomographic and functional severity indicators of lung injury in two groups of patients: GI – patients colonized or infected with *BCC* and GII – patients without *BCC* colonization or infection, with the aim of assessing the impact of this microorganism in pulmonary deterioration.

Methods:

A clinical-laboratory and prospective study was conducted with 222 CF patients seen in the CF outpatient (pediatrics and adults) in UNICAMP. Patients were divided into two groups: GI (n = 50) and GII (n = 134). Microorganisms were identified by conventional biochemical tests, Vitek2®Compact, *recA*-PCR and *recA*-nested-PCR with species-specific primers. The *recA* gene sequencing was performed for strains with inconclusive PCR reactions. Patients were classified by Schwachman's clinical score and measures of weight/age, height/age and BMI/age were used to assess nutritional status. The tomography changes were classified by Bhalla's score and lung function was assessed by spirometry. Data were compared between groups with the aim of assessing the CBC impact in lung injury.

Results:

The *BCC* prevalence was 22.5% and the most prevalent genomovars was: *Burkholderia multivorans* (30.0%), followed by *Burkholderia cepacia* (24.0%), *Burkholderia cenocepacia* IIIA (10.0%), *Burkholderia cenocepacia* IIIB (2%) and *Burkholderia vietnamiensis* (2.0%). In group I, 26.0% of patients were infected, 18.0% had transient colonization and 56.0% intermittent colonization by *BCC*. There was no statistical difference in the average point of Schwachman's score ($p = 0.07$) or in the severity classification ($p = 0.611$) but had differences in variables: nutritional status ($p = 0.020$) and general activity ($p = 0.026$). In the average point Bhalla's score was statistical difference ($p = 0.04$) and between the parameters: severity of bronchiectasis ($p = 0.007$), peribronchial thickening ($p = 0.013$), extent of bronchiectasis ($p = 0.010$), general the bronchial tree ($p = 0.020$). The pulmonary

function test showed: FVC (%) ($p = 0.076$), FEV1 (%) ($p = 0.066$), FEF25-75% ($p = 0.312$) and FEV1/FVC ($p = 0.312$). Respiratory disorders classification: DVO in GI and GII = 4.8% = 23.8%, DVR in GI and GII = 9.5%, DVM in GI and GII = 19.0% = 1.6% and with DVM FVC decreased in GI and GII = 47.6% = 30.2%. Nutritional assessment was significant difference between the mean weight (kg) and height (cm) ($p = 0.02$.)

Conclusions:

The BCC prevalence in our center is significantly higher than the dates provided by national and international literature. The increased *Burkholderia multivorans* prevalence differs from the most studies. It is suspected that may have been cross-infection between patients or is a regional characteristic. The Shwachman's and Bhalla score, spirometry and nutritional data showed that the BCC has serious impact on the deterioration and worsening pulmonary clinic. The phenotypic methods are useful for the presumptive BCC identification. The Vitek2®Compact showed good accuracy in BCC identification of, but with some errors due to limitations of the method/equipment. PCR, nested-PCR and *recA* sequencing showed good specificity in BCC genomovars identifying, however, there are still some limitations, stemming from different genotype, being necessary to use more comprehensive methods, such as the MSLT.

Key words: Cystic Fibrosis, *Burkholderia cepacia* complex, prevalence

A large, stylized sunburst graphic in the background, composed of many triangular segments radiating from a central white circle. The segments are in various shades of green and yellow. A small grey circle is positioned at the top of the sunburst.

INTRODUÇÃO

1. Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é uma exocrinopatia hereditária, comumente letal, mais comum em caucasianos. Caracteriza-se pelo defeito no transporte iônico através da membrana celular nas células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, glândulas salivares, sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor, resultando em secreções mucosas muito espessas e viscosas, que causam obstrução ao nível de ductos e canalículos glandulares. A doença tem uma tríade clínica característica, que inclui: (I) doença pulmonar obstrutiva supurativa crônica, com evolução progressiva para *cor pulmonale*; (II) insuficiência pancreática com má digestão e má absorção e desnutrição secundária e (III) níveis anormalmente elevados de Cl^- no suor ⁽¹⁾.

1.1. Epidemiologia

A prevalência da doença varia de acordo com a localização geográfica. Estima-se que cerca de 70.000 a 100.000 pessoas são acometidas pela FC no mundo ^(2,3), sendo mais comum no norte da Europa, onde a FC ocorre em cerca de 1 em cada 3.000 nascimentos. Nos países americanos, a doença ocorre em cerca de 1/3.000 entre os americanos brancos (norte-americanos), 1/4.000 a 1/10.000 entre os latino-americanos e 1/15.000 a 1/20.000 entre os afro-americanos ⁽⁴⁾. A FC é pouco comum na África e Ásia, sendo reportada a frequência de 1/350.000 no Japão ⁽⁵⁾. Na Índia, estima-se que a frequência seja de cerca de 1/14000 ⁽³⁾.

No sul do Brasil, a população de fibrocísticos é semelhante ao descrito na região central da Europa. Em outras regiões, a incidência diminui para cerca de 1 em cada 10.000 nascidos vivos ^(6,7,8).

Segundo a *Cystic Fibrosis Foundation (CFF)* ⁽²⁾, na década de 1950, poucas crianças sobreviviam até a idade escolar. Atualmente, os avanços em pesquisas, o diagnóstico cada vez mais precoce e o acesso aos tratamentos médicos permitiram o aumento da longevidade dos pacientes, com expectativa de vida média entre 30 e 40 anos de idade, sendo estimado que cerca de 1/3 da população fibrocística possa sobreviver por mais de meia década de vida.

1.2. Bases genéticas da doença:

A transmissão da FC é do tipo autossômico recessivo, cujo gene está localizado no *locus* q31 do braço longo do cromossomo 7, composto por aproximadamente 250 Kb de DNA com 27 *éxons*. Este gene transcreve um *mRNA* de 6,4 Kb, que codifica uma proteína denominada de CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), composta de 1480 aminoácidos, responsável, principalmente, pela regulação do transporte iônico do Cl^- , Na^+ e da H_2O através da membrana celular, e consequentemente, pela manutenção do equilíbrio iônico e osmótico das células ⁽⁹⁾. Além dessas funções, a CFTR também promove a regulação dos canais de ATP, regulação do transporte intracelular de vesículas, acidificação intracelular das organelas, inibição da ativação endógena dos canais de cloro pelo cálcio ativado, e troca iônica entre bicarbonato (HCO_3^-) e cloro (Cl^-), sendo que a deficiência de bicarbonato pode levar a baixa solubilidade e agregação de muco luminal ^(10,11,12,13,14,15).

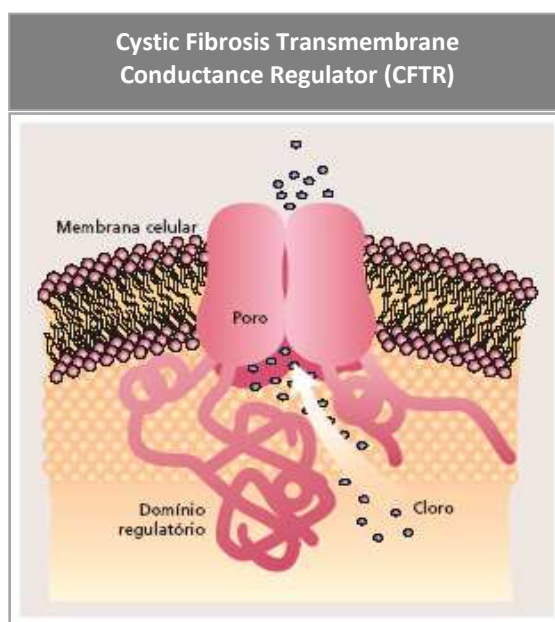
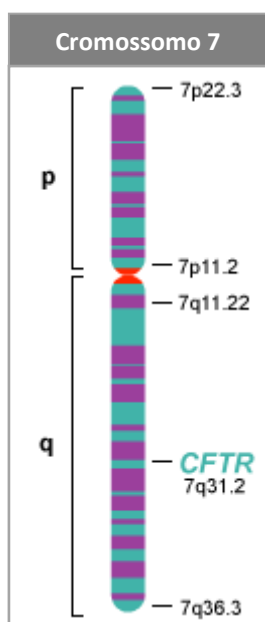


Figura 1: Localização aproximada do gene que codifica a proteína CFTR ao longo do cromossomo 7. (Ilustração baseada no mapa do cromossomo 7 publicado pelo *National Center for Biotechnology Information – NCBI*) ⁽¹⁶⁾

Figura 2: Estrutura da CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) ⁽¹⁷⁾

A proteína é sintetizada no núcleo celular, sofre maturação no citoplasma e é expressa, geralmente, na superfície das células epiteliais e sanguíneas, onde exerce sua atividade funcional. A doença ocorre, justamente, pela deficiência ou ausência da atividade funcional da CFTR, decorrente da mutação de pelo menos 2 alelos no gene da FC ^(4,18).

Cerca de mais de 1500 mutações foram descritas, porém, a mais frequente é a $\Delta F 508$, presente em cerca de 70% das mutações, na qual ocorre uma deleção de três pares de bases (adenina – timina – timina), acarretando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. Zielenski & Tsui (1995) ⁽¹⁹⁾, classificaram os defeitos das mutações da CFTR em 6 classes distintas (figura 3), de acordo com o mecanismo de cada defeito. A $\Delta F 508$ é uma mutação de classe II, na qual a CFTR sofre defeito na maturação durante sua passagem pelo Complexo de Golgi.

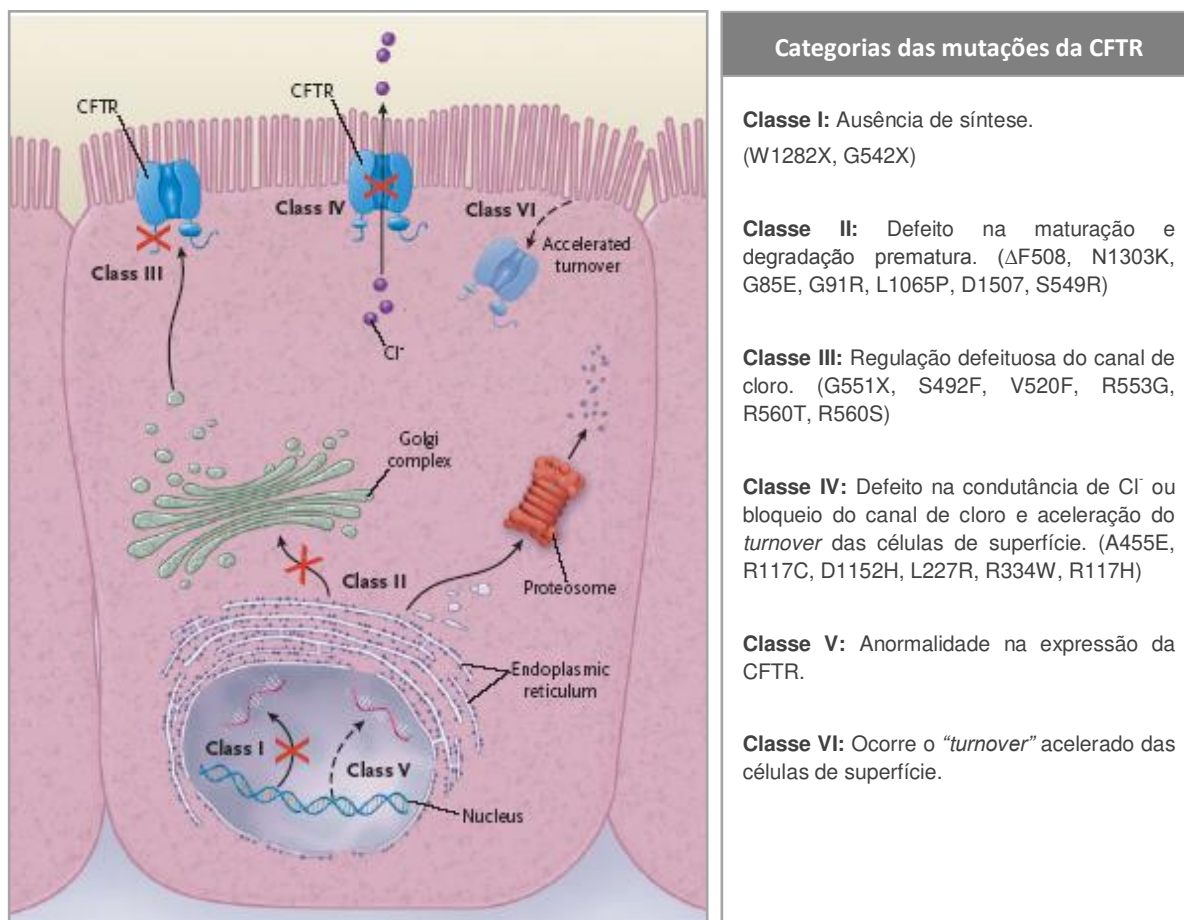


Figura 3: Categorias das mutações da CFTR. ^(4,19)

1.3. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas se apresentam de maneira e intensidade diferentes em cada indivíduo (quadro 1), mesmo entre irmãos que apresentam as mesmas mutações no gene da CFTR, podendo ocorrer de maneira multissistêmica e multivariada, desde o período intra-uterino e persistir durante toda a vida, sendo que algumas manifestações estão relacionadas com a idade ^(4,8). Essa variabilidade clínica entre os indivíduos provavelmente está relacionada com o polimorfismo em outros genes ⁽⁴⁾.

O defeito básico da proteína CFTR promove a desidratação da secreções mucosas e conseqüente aumento da viscosidade, causando a obstrução dos ductos, que induz a resposta inflamatória e posterior processo de fibrose. A tubulopatia obstrutiva, pode atingir os pulmões, pâncreas, intestinos, fígado e os testículos, acarretando em uma série de complicações com a evolução da doença ⁽⁸⁾.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS / COMPLICAÇÕES	
RESPIRATÓRIAS	▪ Sinusite ▪ Infecção pulmonar crônica ▪ Obstrução das vias aéreas ▪ Bronquiectasias ▪ Hemoptise ▪ Pneumotórax ▪ Falência respiratória
PANCREÁTICAS	▪ Insuficiência pancreática (exócrina) ▪ Pancreatite crônica
HEPATOBILIARES	▪ Cirrose biliar focal ▪ Esteatose hepática ▪ Colelitíase
GASTRINTESTINAIS	▪ Íleo meconial ▪ Síndrome de obstrução intestinal distal ▪ Má absorção ▪ Refluxo gastroesofágico ▪ Prolapso retal
RENAIS	▪ Neurolitíase
ENDÓCRINAS	▪ Diabetes mellitus ▪ Osteoporose ▪ Maturação sexual tardia ▪ Hipogonadismo
GENITO-URINÁRIO	▪ Azoospermia obstrutiva (homens)

Quadro 1: Manifestações Clínicas da Fibrose Cística ⁽²⁰⁾

Cerca de 15% dos pacientes com FC nascem com íleo meconial, sendo necessária a intervenção cirúrgica para a desobstrução ⁽⁴⁾. Acredita-se que alguns genes modificadores também possam estar associados com a obstrução intestinal em recém-nascidos ⁽²¹⁾.

A insuficiência pancreática (IP) está relacionada com as mutações de classes I, II e III, sendo raramente observada em pacientes que apresentam mutações dos tipos IV, V e VI. Cerca de 85 – 90% dos indivíduos com FC nascem com IP ou desenvolvem no decorrer da vida. Os sintomas incluem: flatulência, baixo ganho pondero-estatural, esteatorréia, deficiência na absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), que podem gerar outras patologias (acrodermatite, anemia, neuropatia, cegueira noturna, osteoporose, entre outras) ⁽²²⁾. Diante deste quadro, a desnutrição progressiva é inevitável. A diabetes mellitus está presente em cerca de 35% dos pacientes, e quando comparada com pacientes não fibrocísticos, apresenta-se de maneira atípica, devido às outras manifestações características da FC ^(4,8,20,23).

O acometimento hepatobiliar está presente em cerca de 50% dos pacientes, sendo que aproximadamente 5% deles desenvolvem cirrose biliar focal na adolescência, como consequência da obstrução dos ductos intra-hepáticos e da reação inflamatória, e cerca de 2% morrem por doença hepatobiliar ^(4,8,20,24).

O potencial sexual e a espermatogênese dos pacientes com FC são normais, entretanto, cerca de 98% dos homens com FC são inférteis, com azoospermia secundária em consequência da obstrução ou ausência dos canais deferentes ^(4,8,20). As mulheres com FC são férteis, embora haja controvérsias sobre os efeitos da gravidez na FC, em decorrência da desnutrição e insuficiência pulmonar ^(2,8,20,25).

A doença pulmonar acomete cerca de 80 – 95% dos pacientes com FC, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade. O acometimento do trato respiratório é progressivo e de intensidade variável, caracterizado por inflamação e infecções persistentes, sinusite, bronquite, pneumonia, obstrução progressiva das vias aéreas. Com a piora da doença pulmonar, podem ocorrer atelectasias, bronquiectasias, pneumotórax, hemoptises, insuficiência respiratória, fibrose e falência respiratória ^(4,8,20). Como consequência da insuficiência respiratória, os pacientes podem apresentar ainda baqueteamento digital e osteopatia hipertrófica pulmonar ^(2,8).

1.3.1. Fisiopatologia da doença pulmonar

As vias aéreas são revestidas por células ciliadas, um líquido periciliar (superficial e epitelial) e uma camada de muco. O líquido periciliar possui baixa viscosidade, envolve os cílios, mede cerca de 7 μm e tem como finalidade facilitar os movimentos ciliares e umedecer o gel de mucina secretado pelas células superficiais. A camada de muco é composta por mucinas de alto peso molecular e é facilmente modificada pela ação da água, íons e pH. O *clearance* mucociliar é uma das principais barreiras do trato respiratório frente aos microrganismos e outros agentes estranhos, por meio do transporte e expulsão das secreções e partículas de qualquer natureza pela árvore traqueobrônquica. Para que o mecanismo seja efetivo é necessário que o muco deslize sobre os cílios das células do epitélio bronquial ^(1,26,27). Em condições normais, a CFTR regula o transporte iônico, promovendo o fluxo de Na^+ do líquido de superfície das vias aéreas em direção ao meio intracelular e, em seguida, para o espaço intersticial. Simultaneamente ocorre o influxo de Cl^- e de K^+ do interstício para o meio intracelular, pela ação da ATPase (cAMP). Ocorre o acúmulo de Cl^- no meio intracelular, e o gradiente eletroquímico gerado proporciona a saída do íon através dos canais de cloro, para o líquido de superfície das vias aéreas. O fluxo da água através do epitélio acompanha o balanço do transporte iônico ^(1,27).

Na fibrose cística, o funcionamento inadequado da CFTR provoca um aumento na reabsorção de Na^+ e Cl^- para o meio intracelular, que é acompanhado da reabsorção passiva de H_2O , que é carregada para dentro da célula com a finalidade de preservar o equilíbrio osmótico, provocando assim, a desidratação do líquido periciliar e consequentemente impedindo o deslizamento adequado do muco pela árvore traqueobrônquica ^(1,27).

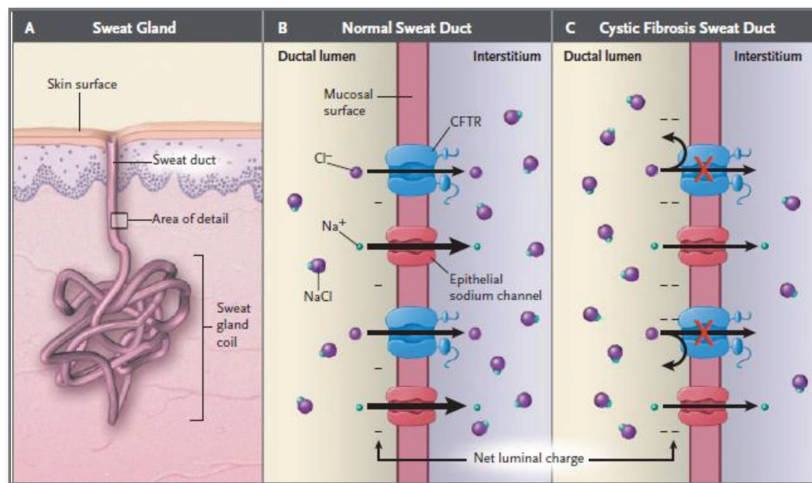


Figura 4: Mecanismos normais de transporte de Cl^- e mecanismos de elevação das concentrações de Cl^- no suor dos pacientes com FC ⁽⁹⁾.

Existem diversas hipóteses sobre como os defeitos da CFTR levam ao fenótipo da doença pulmonar. A hipótese do “*baixo volume*” postula que o defeito na CFTR acarreta em redução do efluxo de Cl^- pelas células, aumentando a eletronegatividade intracelular, o que resulta na perda da inibição dos canais Na^+ e aumento do fluxo para o interior da célula, com a finalidade de preservar o equilíbrio eletroquímico interno, e da H_2O do líquido de superfície das vias aéreas, que é carregada pelos canais de sódio, juntamente com os íons. Este mecanismo resulta na diminuição do líquido de superfície das vias aéreas, levando à desidratação das secreções respiratórias, ao aumento da viscosidade, com consequente diminuição do *clearance* mucociliar, favorecendo a obstrução dos ductos, e formação de “nichos de hipóxia”, pelo acúmulo de muco, desencadeando um processo inflamatório crônico que, por sua vez, predispõe à instalação de agentes infecciosos nas vias aéreas ^(4,28,29,30). O acometimento pulmonar é progressivo e, com a evolução, pode ocorrer o envolvimento parenquimatoso, com a formação de bronquiectasias, levando à fibrose e falência respiratória.

Na hipótese do “*high-salt*”, acredita-se que a ausência de CFTR funcional acarreta no acúmulo de Na^+ e Cl^- na superfície das vias aéreas. O aumento da concentração de Cl^- na camada periciliar perturba a função de algumas moléculas importantes da resposta inata, como por exemplo a defensina humana $\beta 1$, permitindo a instalação dos microrganismos nas vias aéreas ^(8,31,32,33).

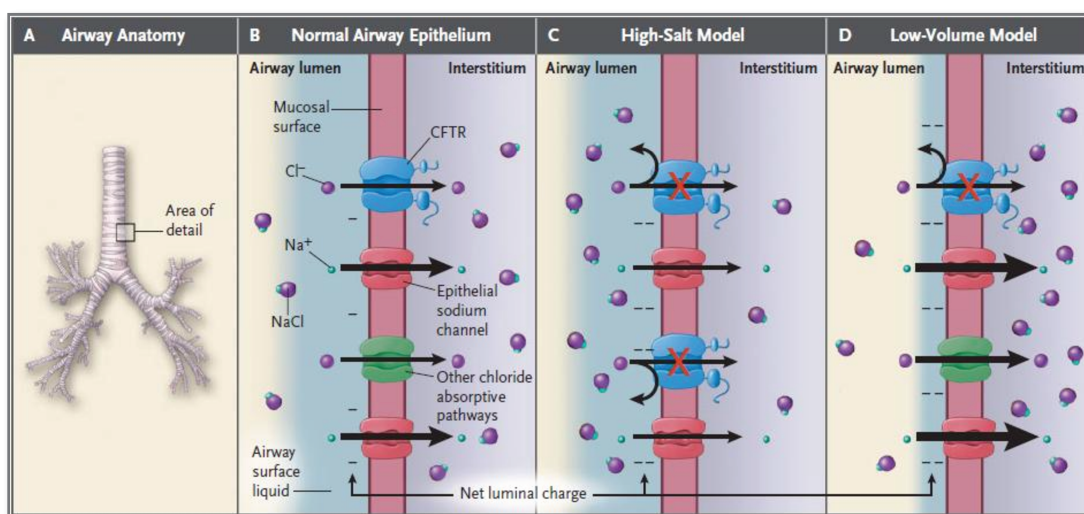


Figura 5: Hipóteses do “*baixo volume*” e “*high-salt*” que postulam sobre como os mecanismos transepiteliais são prejudicados pelo funcionamento inadequado da CFTR, levando à doença pulmonar nos pacientes com FC ⁽⁹⁾.

Acredita-se também que possa haver a “*Desregulação da resposta inflamatória do hospedeiro*”, pois um estudo revelou que moléculas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, TNF- α e metabólitos do ácido aracdônico foram encontrados em elevadas concentrações mesmo antes da infecção pulmonar ^(8,34,35). Também foram observados a apoptose anormal de neutrófilos, a hiper-reatividade de trombócitos e a concentração reduzida de substâncias anti-inflamatórias, tais como IL-10, lipoxina e ácido docosahexanóico (DHA), levando ao desbalanceamento entre as moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, favorecendo a inflamação ^(36,37).

1.4. Aspectos microbiológicos da infecção pulmonar

O trato respiratório saudável é colonizado por uma grande variedade de microrganismos que compreendem a flora normal, entretanto, o trato respiratório baixo é mantido estéril devido a diversos mecanismos de defesa do hospedeiro, que incluem as barreiras físicas, endocíticas e fagocíticas. A falha de uma dessas barreiras torna o indivíduo suscetível às infecções pulmonares.

Os pulmões dos indivíduos com fibrose cística são aparentemente normais ao nascimento, entretanto, o desenvolvimento de infecções crônicas e recorrentes pode ser observado logo nos primeiros anos de vida, refletindo possíveis problemas com o mecanismo de defesa inata dos pulmões ⁽³⁸⁾. O aparecimento de tosse e o acúmulo de secreção pulmonar podem ocorrer precocemente, geralmente desencadeados por infecções virais, sendo o vírus sincicial respiratório (RSV) e o influenza A considerados os de maior impacto. Acredita-se que a inflamação e os danos provocados pela infecção viral precoce sejam alguns dos fatores que predis põem a colonização/infecção por outros agentes. A relação entre inflamação e infecção se torna um ciclo vicioso, causando um dano pulmonar progressivo e irreversível ⁽⁸⁾.

Os pacientes com FC são colonizados e/ou infectados por uma variedade limitada de microrganismos, cujas prevalências variam de acordo com a idade e/ou gravidade da doença e diligência da procura. A colonização ocorre quando o microrganismo é encontrado nas vias aéreas, porém, sem que o paciente tenha evidências diretas (inflamação, febre, etc) ou indiretas (resposta de anticorpos específicos) de infecção e dano tissular. A colonização pode ser aguda ou crônica, sendo esta última considerada quando o mesmo microrganismo é encontrado em mais de três amostras consecutivas, com, no mínimo um mês de intervalo entre elas. Quando ocorrem os primeiros sinais de

exacerbação pulmonar diretos (inflamação, febre, aumento da tosse e da secreção, perda de peso, etc), ou indiretos (resposta de anticorpos específicos), e o microrganismo é encontrado nas vias aéreas, o paciente é considerado infectado ⁽³⁸⁾. A infecção também pode ser definida como aguda ou crônica, sendo que, nos casos de infecção crônica, o paciente pode apresentar períodos de agudização intermitentes. Fatores do indivíduo associados com a patogenicidade dos agentes infecciosos determinam a gravidade da infecção.

Na infância, geralmente os pacientes se infectam primariamente por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e, ocasionalmente, por *Pseudomonas aeruginosa*, considerada o principal agente infeccioso envolvido na pneumopatia crônica em pacientes com FC. Os agentes podem aparecer concomitantemente. Embora seja crescente o número de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* na infância, a prevalência é mais representativa em adultos jovens (cerca de 80%). A colonização inicial geralmente ocorre com cepas móveis, “não mucóides”, ou “planctônicas” que, com a evolução da doença, tornam-se mais virulentas, alteram sua morfologia, perdem os flagelos, tornam-se imóveis e passam a produzir uma cápsula de um polissacarídeo denominado alginato, que lhes confere a capacidade de crescer formando “biofilmes” e a característica “mucóide” ⁽³⁹⁾. Na maioria dos indivíduos, as infecções se tornam crônicas.

O muco espesso e viscoso dificulta a erradicação dos microrganismos do trato respiratório dos pacientes, em especial da *Pseudomonas aeruginosa*, que uma vez instalada, não pode ser erradicada pela antibioticoterapia, o paciente se torna crônico, muitas vezes sem evidências diretas de doença pulmonar, mas podendo apresentar fases de agudização intermitentes e, nestes casos, o objetivo da terapia acaba sendo apenas de reduzir o número de colônias e contribuir para uma melhora na qualidade de vida do paciente. Diante disso, o uso prolongado de antibióticos é inevitável e contribui para a seleção natural de microrganismos com perfil de resistência adquirido, tais como as cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa*, além de favorecer a colonização e infecção por outros agentes com resistência intrínseca à uma série de antibióticos, tais como Complexo *Burkholderia cepacia* e outros microrganismos oportunistas, considerados como “patógenos emergentes”, porém, com importância clínica ainda pouco conhecida: *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Pandoraea* spp., *Inquilinus* spp. e *Mycobacterium* spp. “não tuberculosis”. Membros da família *Enterobacteriaceae*, e dos gêneros *Chryseobacterium*, *Comamonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Bordetella* também tem sido isolados do trato respiratório (TR) de

pacientes com FC ^(39,40,41,42), porém sem evidências de danos tissulares ou funcionais. Entre os fungos filamentosos, o *Aspergillus fumigatus* apresenta-se com maior frequência nos pacientes com FC, podendo provocar um quadro alérgico denominado de Aspergilose Bronco-pulmonar alérgica (ABPA), entretanto, os aspergilomas são raros em pacientes com FC. O *Scedosporium apiospermum* pode provocar um quadro pulmonar semelhante, entretanto, é encontrado com baixa frequência, assim como outros fungos filamentosos. Espécies de *Candida* spp. são muito comuns, porém trata-se de um microrganismo presente na microbiota oral normal, e sua importância clínica na FC é pouco conhecida.

MICROORGANISMO	FREQUENCIA DE ISOLAMENTO (%)	PREDOMINÂNCIA NA POPULAÇÃO DE FC	PAPEL PATOGENICO NA DOENÇA PULMONAR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59 – 80	Todos	Comprovado
<i>Staphylococcus aureus</i>	48 – 52	Crianças e adolescentes	Comprovado
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	3 – 11	Adolescentes e adultos	Comprovado
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	Adolescentes e adultos	Não comprovado
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9	Adolescentes e adultos	Pouco provável
<i>Burkholderia gladioli</i>	<1	Adolescentes e adultos	Pouco provável
<i>Inquilinus</i> spp.	<1	Adolescentes e adultos	Desconhecido
<i>Ralstonia</i> spp.	<1	Adolescentes e adultos	Pouco provável
<i>Pandoraea</i> spp.	<1	Adolescentes e adultos	Possível
<i>Mycobacterium</i> spp.	2 – 28	Adolescentes e adultos	Comprovado
<i>Haemophilus influenzae</i>	15 – 30	Crianças	Provável
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	Crianças	Desconhecido
<i>Enterobacteriaceae</i>	<5	Crianças	Desconhecido
<i>Aspergillus fumigatus</i> ^a	6 – 57	Todos	Comprovado
Vírus sincicial respiratório	Desconhecido	Crianças	Comprovado
Vírus influenza	Desconhecido	Todos	Comprovado

Tabela 1: Frequência de isolamento de microrganismos nas vias aéreas dos pacientes com FC. ^(39,43,44,45,46,47,48,49).

^a variação significativa da frequência de acordo com a idade

2. Complexo *Burkholderia cepacia*

Microrganismos do Complexo *Burkholderia* são bacilos Gram negativos, aeróbios, não fermentadores de glicose, da ordem *Proteobacteria* beta, família *Burkholderiaceae*, encontrados na natureza em reservatórios de águas, solos, na rizosfera e em plantas. Embora a maioria das espécies deste gênero tenha sido descrita inicialmente como “fitopatógenos”, estes microrganismos têm sido apontados como importantes patógenos oportunistas em hospitais e unidades de tratamento de saúde, devido à capacidade que possuem de sobreviverem em condições ambientais “inóspitas”⁽⁴⁸⁾.

2.1. Taxonomia

Burkholderia cepacia foi descrita originalmente em 1950 como *Pseudomonas cepacia*, por William Burkholder, como agente causador do apodrecimento bacteriano de bulbos de cebola⁽⁴⁹⁾. Mais tarde foi descoberto que, além de apresentar propriedades de interesse na indústria e agricultura, incluindo a habilidade de degradar compostos aromáticos poluentes complexos⁽⁵⁰⁾ e de proteger e promover o crescimento de plantas⁽⁵¹⁾, o microrganismo era um agente causador de infecções em seres humanos e animais, além de causar doenças em plantas⁽⁵²⁾. Em meados de 1980, foi descrito como um importante patógeno pulmonar oportunista em pacientes com fibrose cística e apontado como causador de um quadro séptico denominado de “Síndrome cepacia”, caracterizado por declínio de função pulmonar, bacteremia e óbito⁽⁵³⁾.

Após alguns estudos de análise taxonômica molecular, o microrganismo foi reclassificado para o gênero *Burkholderia*⁽⁵⁴⁾. Em 1997, Vandamme e col.^(55, 56) demonstraram que algumas cepas de *Burkholderia cepacia*, fenotipicamente similares, apresentavam algumas variações genéticas e que havia, pelo menos, cinco espécies geneticamente diferentes, que foram denominadas de genomovares, incluindo: *Burkholderia cepacia* (genomovar I), *Burkholderia multivorans* (genomovar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III), *Burkholderia stabilis* (genomovar IV) e *Burkholderia vietnamiensis* (genomovar V), cujo conjunto foi denominado de Complexo *Burkholderia cepacia* (tabela 2).

Desde então, diversos estudos têm sido realizados, baseados na análise das seqüências dos genes *16SrRNA* e *recA*, experimentos de hibridização de DNA-DNA, análise de proteínas de parede celular, ácidos graxos e caracterização bioquímica, e, baseando-se na heterogeneidade observada, foram descritos mais quatro genômovares: *Burkholderia dolosa* (genômovar VI), *Burkholderia ambifaria* (genômovar VII), *Burkholderia anthina* (genômovar VIII) e *Burkholderia pyrrocinia* (genômovar IX) (Tabela 1) ^(54, 55, 56, 57, 58, 59).

Em 2002, foi proposto por Vermis e col. ⁽⁶⁰⁾, o genômovar X (*Burkholderia ubonensis*), entretanto, ainda não houve a publicação oficial deste novo genômovar, pois alguns estudos ainda estão sendo realizados. Em 2003, Vandamme e col. ⁽²⁰⁾ descreveram 4 subgrupos do genômovar III, através da análise do gene *recA*, que foram denominados de III-A, III-B, III-C e III-D. Payne e col. 2005, ⁽⁶¹⁾, após análises na seqüência do gene *recA*, demonstraram a presença de quatro novos filotipos, que foram denominados de *B. cepacia* grupo K, *B. cepacia* grupo AW, BCC1 e BCC2. Diversos estudos, incluindo o Multilocus Sequence Typing (MLST) ^(62,63,64,65), detectaram sete novos grupos: Bcc grupo K, BCC1, BCC2, BCC3, BCC4, BCC5 e BCC6 (Tabela 1) ^(60,61,62,63,64). Após estudos de taxonomia polifásica, Vanlaere e col. (2008) (ref) identificaram cinco destas espécies como *Burkholderia latens*, *Burkholderia difusa*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia seminalis* e *Burkholderia metalica*, porém os nomes foram oficialmente incluídos no CBc apenas dois anos mais tarde.

Em 2009, Vanlaere e col. ⁽⁶⁶⁾, analisaram o taxon K por meio de experimentos de hibridização de DNA-DNA, análise do gene *recA*, MLST, e da seqüência inteira do genoma disponível, e propuseram que o taxon K fosse reclassificado como duas novas espécies: *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia lata*. Foram estudadas cepas isoladas de diversas amostras: sangue e escarro de pacientes com FC, reservatórios de água, águas de rios e sedimentos, solo, raízes, animais, produtos industriais e farmacêuticos contaminados e produtos de cuidados domésticos ^(26, 58). A inclusão destas novas espécies no Complexo *Burkholderia cepacia* foi proposta na ocasião da identificação, entretanto, somente em 2010, os nomes foram oficialmente publicados ^(60,61,62,63,64).

GENOMOVAR	ESPÉCIE	FREQUÊNCIA (%)	PATOGENICIDADE PACIENTES C/ CF
I	<i>Burkholderia cepacia</i>	< 5	Desconhecida
II	<i>Burkholderia multivorans</i>	20 – 40	Patogênico
III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	50 – 83	Muito Patogênico
III-A	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	83	Muito patogênico
III-B	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	-	Pouco conhecida
III-C	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	-	Desconhecida
III-D	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	12	Desconhecida
IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	< 1	Desconhecida
V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	≤ 5	Desconhecida
VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	< 5	Desconhecida
VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	< 1	Desconhecida
VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	Relatos de casos	Desconhecida
IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Relatos de casos	Desconhecida
X	<i>Burkholderia ubonensis</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia latens</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia diffusa</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia arboris</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia seminalis</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia metallica</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia contaminans</i>	-	Desconhecida
-	<i>Burkholderia lata</i>	-	Desconhecida

Tabela 2: Taxonomia do Complexo *Burkholderia cepacia* ⁽²⁶⁾

2.2. Epidemiologia

Na natureza, os diferentes genomovares do *CBc* estão distribuídos em diversos nichos ecológicos, incluindo solo, rizosfera, plantas e água. Na rizosfera têm sido encontradas associações de *Burkholderia vietnamiensis* em arroz, *Burkholderia cepacia* em milho, trigo e cebola, *Burkholderia ambifaria* em milho e em raízes de ervilha e *Burkholderia cenocepacia* em trigo ^(6,20,26,65,67,68). A relação existente entre o habitat natural do microrganismo no meio ambiente e as infecções em seres humanos não estão bem esclarecidas, entretanto, cepas idênticas têm sido encontradas no meio ambiente e em pacientes com FC ^(26,68). Baldwin e col. (2007) em estudo com MLST, mostraram que mais de 20% das cepas isoladas de fontes clínicas não podem ser distinguidas de cepas

obtidas de fontes ambientais e industriais diversas, incluindo solo, água, plantas, equipamentos hospitalares, soluções de uso farmacêutico, etc ⁽⁶²⁾.

Em pacientes com FC, as espécies *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III) e *Burkholderia multivorans* (genomovar II) representam a maioria dos isolados de *CBC* nos EUA, Canadá e em diversos países na Europa, sendo que em alguns desses países a *Burkholderia cenocepacia* tem prevalência de mais de 90% ^(69,70,71,72). A *Burkholderia cepacia* (genomovar I) também apresenta grande prevalência na Austrália ⁽⁷³⁾ e em Portugal ⁽⁷⁴⁾, com mais de 25% dos isolados de *CBC*, entretanto, na maioria dos outros países a prevalência é baixa, variando entre 0 – 8,0%. A prevalência dos demais genomovares é muito baixa, cuja soma varia entre 0 – 10,0% na maioria dos centros, exceto em um estudo na Eslováquia que mostrou 54% de prevalência *Burkholderia stabilis* ⁽⁷¹⁾ (tabela 3).

O subgrupo IIIA é o mais prevalente entre os isolados de *Burkholderia cenocepacia* no Canadá, Reino Unido e alguns países da Europa, e a elevada prevalência refere-se, na maioria dos casos, à propagação clonal do clone epidêmico ET-12. Nos EUA, o há o predomínio do subgrupo IIIB (72,8%) em relação ao IIIA (27,2%). O subgrupo IIID foi relatado em um estudo epidemiológico realizado na Itália, porém com baixa prevalência ⁽⁷²⁾. Não há relatos de isolamento do subgrupo IIIC em amostras clínicas ^(26,75). Os clones epidêmicos ET-12 geralmente expressam mecanismos de virulência importantes como o “*cable pili*”, codificado pelo gene *cbIA*, que permite a adesão do microrganismo na mucina produzida pelas células epiteliais do TR dos pacientes com FC, e o fator de transmissibilidade, denominado de BCESM (*Burkholderia cepacia* Epidemic Strain Marker), codificado pelo gene *esmR* e que está envolvido com o “*quorum sensing*”. Estas duas características podem estar presentes concomitantemente ou isoladamente nos clones de *Burkholderia cenocepacia* ET-12. O clone epidêmico PHDC também têm sido encontrado nos EUA e em diversos países da Europa ^(72,75,76,77).

Thomassen e col. (1986) descreveram o primeiro relato de transmissão interpessoal de cepas de *CBC* em Cleveland, nos EUA ⁽⁷⁸⁾, e a seguir este fato passou a ser observado em outros Centros ^(75,79). Embora a *Burkholderia cenocepacia* seja o genomovar mais envolvido na transmissão entre pacientes, também há relatos de infecção cruzada pelos genomovares *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia dolosa* ⁽⁶⁸⁾, *Burkholderia stabilis* ⁽⁷¹⁾, *Burkholderia cepacia* ⁽⁸⁰⁾ e *Burkholderia pyrrocinia* ⁽⁸¹⁾, sendo que a *Burkholderia multivorans* foi encontrada em diversos países norte americanos, no Reino Unido, Escócia, Nova Zelândia e França ^(26,82,83,84,85). Permanece a orientação para a

segregação de atendimento e tratamento de pacientes colonizados/infectados pelo *CBC* (independente do genótipo), nos Centros de tratamento de FC, com a finalidade de controlar a infecção cruzada, embora alguns raros estudos tenham relatado falhas nesta prática ^(75,82,86,87).

PAÍS	GI (%)	GII (%)	GIII (%)	GIV (%)	GV (%)	GVI (%)	GVII (%)	Outros (%)	REFERÊNCIA
Austrália	28,6	21,4	39,3	0,0	3,6	0,0	7,1	0,0	(73)
Austrália	11,2	29,3	45,7	0,0	5,2	0,8	5,2	2,6	(88)
Brasil	3,1	37,5	53,1	0,0	6,2	0,0	0,0	0,0	(89)
Brasil	0,0	10,0	67,0	0,0	15,0	0,0	7,0	0,0	(90)
Canadá	0,2	9,3	80,0	3,8	1,6	0,0	0,0	5,3	(91)
Canadá	0,0	30,0	74,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	(92)
República Tcheca	0,0	5,0	92,0	1,6	0,0	0,0	0,0	1,6	(71)
Eslováquia	0,0	0,0	41,0	54,0	0,0	0,0	0,0	5,0	(71)
França	0,0	53,0	45,0	1,3	0,7	0,0	0,0	1,3	(93)
Itália	0,0	0,0	70,8	0,0	0,0	0,0	6,3	22,9	(94)
Itália	3,0	0,0	90,3	3,0	3,0	0,0	0,0	0,0	(70)
Itália	8,3	5,0	90,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	(69)
Itália	0,0	0,0	90,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	(72)
Itália	7,7	6,3	61,1	6,3	1,0	0,0	0,5	17,3	(81)
Portugal	36,4	9,0	52,2	18,3	0,0	0,0	0,0	0,0	(95)
Portugal	24,5	9,5	50,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	(74)
Reino Unido	0,0	32,0	66,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	(96)
Reino Unido	0,8	17,6	78,6	0,8	3,0	0,0	0,0	0,0	(82)
EUA	3,1	38,7	45,6	0,3	5,9	3,8	0,8	1,8	(59)
EUA	2,6	37,8	50,0	0,2	5,1	2,0	0,7	1,8	(97)

Tabela 3: Prevalência dos genótipos do *CBC*. (Reproduzida da referência (75)).

2.3. Mecanismos de virulência

Acredita-se que a patogenicidade do Complexo *Burkholderia cepacia* esteja atribuída à sua capacidade de crescer formando biofilmes, presença de fímbrias, como o “*cable pilli*” (*cbIA*), adesinas, produção de siderófilos, melanina, hemolisinas, lipopolissacarídeos (endotoxinas), proteases, lipases, fosfolipase C, exopolissacarídeos, à

sua capacidade de invadir e sobreviver no interior de células epiteliais e macrófagos, entre outros mecanismos de virulência (tabela 4) ^(52,78).

MECANISMO DE VIRULÊNCIA	PREVALÊNCIA ENTRE OS MEMBROS DO <i>CBC</i>
Formação de biofilme	Todos os genomovares ▪ <i>Burkholderia cenocepacia</i> e <i>Burkholderia multivorans</i> produzem de forma mais abundante ▪ A formação depende da biogênese da membrana e da presença do “quorum sensing” ▪ Promovem maior resistência aos antimicrobianos
Resistência aos antimicrobianos	Todos os genomovares ▪ Apresentam resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos e desinfetantes.
<i>Cable pilli</i> e Adesina 22-Kda	<i>Burkholderia cenocepacia</i> ▪ Conferem capacidade de adesão à mucina produzida pelos pacientes com FC e às células epiteliais do trato respiratório.
Produção de catalase e Superóxido-desmutase (SOD)	Todos os genomovares ▪ Confere resistência ao oxigênio reativo, permitindo a sobrevivência das espécies no interior das células.
Cenocepacia "island"	<i>Burkholderia cenocepacia</i> ▪ Ilha genômica, envolvida com a patogênese e mecanismos de adaptação do microrganismo
Exopolissacarídeo	<i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Burkholderia cenocepacia</i> ▪ Estão envolvidos principalmente na formação dos biofilmes e adesão na mucina
Proteases extracelulares	Genomovares I, III, IV, VII, IX ▪ Zinco metaloprotease – <i>Burkholderia cenocepacia</i>
Flagelos	Todos os genomovares ▪ Confere a capacidade de invasão ▪ Sinalização do TLR5 (<i>Toll-like receptor 5</i>)
Hemolisinas	<i>Burkholderia cenocepacia</i> ▪ Induzem a degranulação de morte celular de fagócitos humanos ▪ Apresenta atividade hemolítica, observada nos genomovares I, III, IV, VII e IX
Capacidade de invasão e sobrevivência no interior das células	Variável nas espécies testadas ▪ <i>Burkholderia cenocepacia</i> são altamente invasivas em células respiratórias A549 ▪ <i>Burkholderia cenocepacia</i>, <i>Burkholderia multivorans</i> e <i>Burkholderia stabilis</i> penetram nas células epiteliais do trato respiratório ▪ <i>Burkholderia dolosa</i> e <i>Burkholderia vietnamiensis</i> são capazes de sobreviver no interior de macrófagos por cerca de 5 dias.
LPS	Todos os genomovares

	Estão envolvidos com a resistência aos antimicrobianos e indução da produção de neutrófilos
Melanina	Genomovares I, II e III Estão envolvidos principalmente com a captação de radicais livres
Quorum sensing	Provavelmente todas os genomovares. Estudado sistematicamente nos genomovares I, II, III, IV, V Estão envolvidos com a “comunicação” entre as bactérias.
Produção de sideróforos	Todos os genomovares - Compostos orgânicos que atuam na captação do ferro - São produzidos 4 tipos: ácido salicílico, ornibactina, cepabactina e pyoquelina - A biosíntese de ornibactina e absorção mostraram ser mecanismos de virulência essencialmente produzidos pela <i>Burkholderia cenocepacia</i>, em modelos de infecção pulmonar em ratos.
Secreção tipo III	Genomovares II a VII
Secreção tipo VI	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>Burholderia vietnamiensis</i>

Quadro 2: Mecanismos de virulência do Complexo *Burkholderia cepacia*. Adaptado da referência 52.

A habilidade de formar de biofilmes pelos microrganismos do *CBc* está determinada por três classes principais de genes: genes que codificam proteínas de superfície, genes que estão envolvidos com a biogênese e manutenção da integridade da membrana externa e genes que codificam fatores que estão envolvidos com a produção de acyl-homoserine-lactones (AHLs), que são sinalizadores de moléculas que estão envolvidas com a produção de biofilmes ^(52,96). No pulmão do paciente com fibrose cística, o ambiente favorece a produção de biofilmes, pois os microrganismos estão protegidos contra a ação dos antimicrobianos e mecanismos de defesa do hospedeiro. As cepas do *CBc* que produzem biofilmes mostraram crescente resistência a Ceftazidima e Ciprofloxacina, quando comparadas com cepas planctônicas, que não produzem o mesmo perfil de resistência ⁽⁹⁷⁾.

O lipopolissacarídeo (LPS) é um importante mecanismo de virulência, presente na maioria das bactérias Gram negativas. Na maioria das espécies é composto por lipídeo A, oligossacarídeo e antígeno O. No *CBc*, o LPS é diferente, pois o núcleo oligossacarídico não contém tanto fosfato ou ácido 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosônico quanto as demais bactérias Gram negativas. Além disso, há moléculas de 4-amino-4-deoxyarabinose associadas aos resíduos de fosfato no lipídeo A, que tem implicações na resistência dos

efeitos de antibióticos peptídicos catiônicos e polimixina-B^(54,98,99). Assim como nas demais bactérias Gram negativas, o antígeno O é um componente proeminente e imunogênico da superfície da célula bacteriana e pode formar a base para a sorotipagem. Pelo menos 16 sorotipos foram identificados no *CBc*^(54,100). Um método de determinação dos sorotipos do *CBc* foi descrito com base no RFPL do gene *wbl*, que é homólogo ao gene conservado *wbpM*, encontrado em *P. aeruginosa* que codifica o antígeno O de membrana. Nas cepas J2315 de *B. cenocepacia* o LPS é áspero devido à presença do elemento de inserção IS402. Os genes que codificam os antígenos O de membrana estão presentes no cromossomo 1 e são parte de uma ilha genômica com baixa quantidade de GC, indicando que possam ter sido adquiridos por transferência horizontal, como tem sido sugerido para os *clusters* de genes de antígeno O de membrana outras bactérias^(54,101).

O LPS produzido pela *CBc* (*CBc*-LPS) é 4 a 5 vezes mais endotóxico que o LPS produzido por *P. aeruginosa*. Além disso, o *CBc*-LPS produz a indução crescente da produção de neutrófilos, assim como a produção crescente de IL-8 pelas células epiteliais. Essas características provavelmente possam esclarecer algumas diferenças na fisiopatologia das infecções por *CBc* ou *P. aeruginosa* mesmo quando ocorrem no mesmo sítio^(54,100,102,103,104).

O gene que codifica o *quorum sensing* foi identificado pela primeira vez no *CBc* em cepas de *Burkholderia cenocepacia* K56-2, e foi designado de *cepl* e *cepR*. A expressão fenotípica de diversos fatores de virulência são reguladas pelo *quorum sensing*, incluindo a produção de proteases, lipases e sideróforos, motilidade “em grupos” e formação de biofilme^(54,105,106). Recentemente foi descrito que a *B. cenocepacia* apresenta dois sistemas de comunicação, sendo que um deles, o *BCESM* codifica a patogenicidade de outro mecanismo de virulência, conhecido como “*Cenocepacia island*”^(54,107,108). Além disso, foi observada a diminuição da intensidade da inflamação em modelos de infecção pulmonar quando houve a ruptura do gene *ccil* que codifica o sistema de patogenicidade “*Cenocepacia island*” (*CciIR*), indicando que o mecanismo está diretamente envolvido com a virulência. A interação entre os dois sistemas de comunicação na *B. cenocepacia* na regulação da expressão dos genes de virulência, somados à capacidade de resposta do *CBc* às moléculas de *quorum sensing* da *P. aeruginosa* mostram o quanto é complexo o fenômeno de *quorum sensing*. Sistemas homólogos tem sido observados em outras espécies do *CBc*⁽⁵⁴⁾.

O *BCESM* (*Burkholderia cepacia* epidemic strain marker), é um fragmento de DNA conservado, de 1,4 Kb, codificado pelo gene *esmR*, que está presente em linhagens

epidêmicas de *Burkholderia cenocepacia* ET-12, está ausente em outras cepas não epidêmicas e raramente é encontrado em isolados de fontes ambientais. Além de fazer parte da “*Cenocepacia island*”, com todas as características de patogenicidade atribuídas às ilhas genômicas em bactérias, o BCESM codifica diversos genes que estão envolvidos com o metabolismo bacteriano. Os produtos codificados pelos genes *ccI* incluem aqueles que são requeridos pelo *quorum sensing*, biosíntese de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos, inserção de sequências, diversos reguladores transcricionais (incluindo o *esmR*) e um conjunto de genes conservados com função desconhecida ^(54,108).

A resistência intrínseca e/ou adquirida à uma grande quantidade de antimicrobianos é outro fator de virulência importante encontrado no *CBc*. Os microrganismos do *CBc* apresentam resistência intrínseca aos aminoglicosídeos e apresentam diversos mecanismos de resistência aos demais antimicrobianos, como bombas de efluxos específicas ao cloranfenicol, quinolonas e sulfametoxazol+trimetopim produção de β -lactamases induzíveis em algumas cepas, além da produção de enzimas específicas que degradam os antimicrobianos, como por exemplo a dihidrofolato redutase que confere resistência ao sulfametoxazol+trimetopim. A diminuição da permeabilidade de membrana e a estrutura peculiar do LPS conferem resistência à outras classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, assim como antibióticos peptídicos catiônicos ^(54,100,109,110,111,112,113).

As fímbrias presentes na superfície da célula conferem à bactéria a capacidade de aderência às células do hospedeiro. No *CBc* são encontrados cinco tipos de fímbrias, identificadas por microscopia eletrônica, entretanto, o único tipo presente em cepas epidêmicas é a *cable pili*, que tem habilidade para a adesão na mucina ⁽¹¹⁴⁾. A *cable pilli* e a adesina 22-kDa são encontradas na *Burkholderia cenocepacia* e, em conjunto, tem a habilidade de aderir a citoqueratina 13 (CK13) e proteínas de filamento intermediário por meio de receptor nas células do hospedeiro. O epitélio do trato respiratório de pacientes com FC tem mostrado crescente expressão de CK13, indicando que a *Burkholderia cenocepacia* possa apresentar um maior potencial de infecção pelo fato de conter receptores específicos no hospedeiro. As estruturas em conjunto conferem a capacidade de invasão ao *CBc* ^(54,115,116,117,118,119).

Os membros do *CBc* expressam um dos dois tipos de flagelina (55 kDa e 45 kDa), codificadas pelo gene *flhC*. Alguns estudos mostraram que os flagelos da *Burkholderia cenocepacia* J2315 contribuem na invasão de células do epitélio pulmonar. Além disso, a flagelina da *B. cenocepacia* mostrou capacidade de sinalizar os receptores TLR5 (*Toll-like*

receptor 5), desencadeando a ativação da cascata de NF- κ B e secreção de IL-8, mostrando que a indução de IL-8 na resposta imune celular causada pela *B. cenocepacia* ocorre, pelo menos em parte, devido à mediação da sinalização de TLR5 pela flagelina expressa pela bactéria^(54, 120, 121).

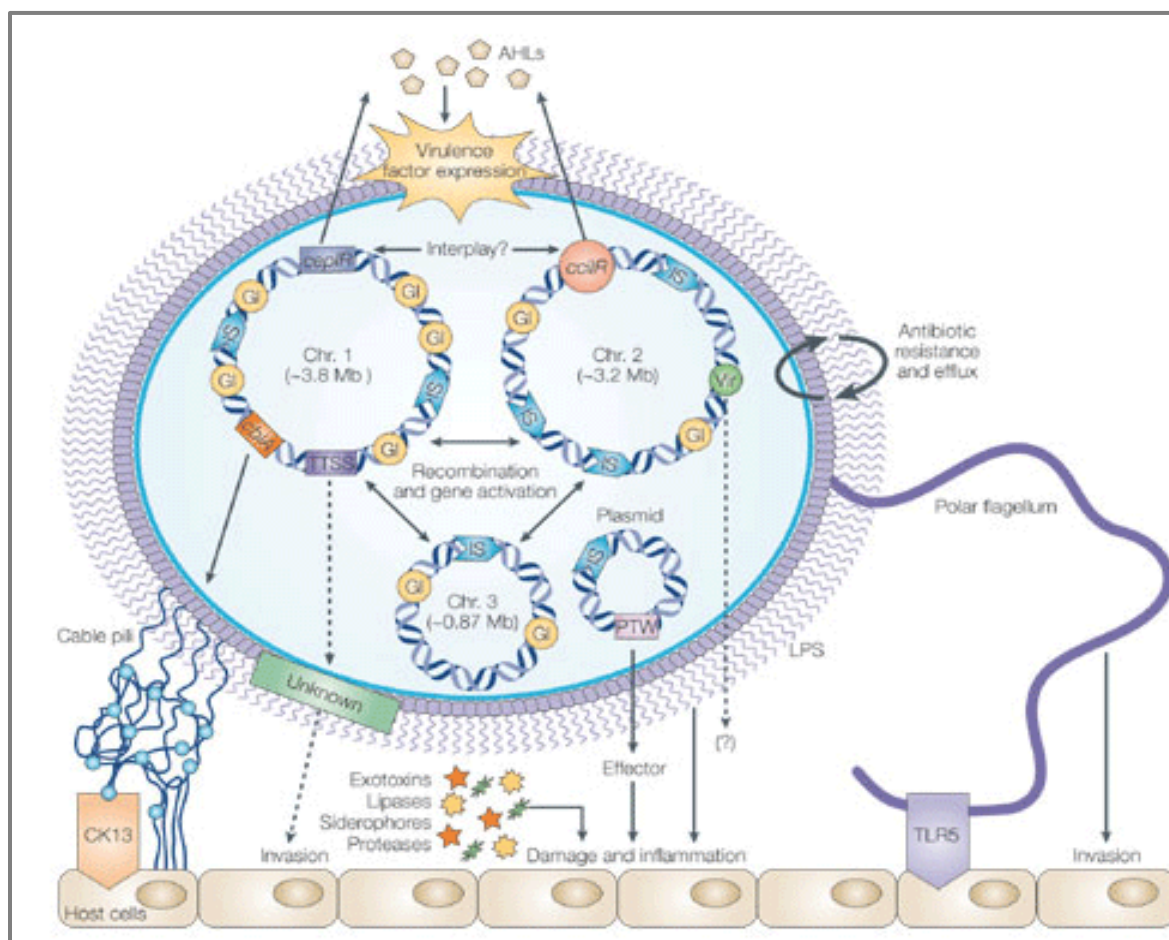


Figura 6: Mecanismos de virulência do Complexo *Burkholderia cepacia*. A figura ilustra a estrutura genômica e os principais fatores de virulência da *Burkholderia cenocepacia* ET-12. As características do genoma incluem: os 3 cromossomos (Chr.1, Chr. 2, Chr. 3) e o plasmídeo, a presença de ilhas genômicas (GI) em cada um dos 3 cromossomos e o potencial de contribuição de inserção de sequências (IS). Os principais fatores de virulência e algumas de suas interações com as células do hospedeiro também são representados na figura. (Reproduzido da referência 54).

2.4. Síndrome cepacia

A evolução clínica dos pacientes com FC infectados por microrganismos do *CBc* é imprevisível. São observadas, pelo menos, três situações em relação as infecções provocadas pelo *CBc*: (1) colonização e infecção pelo *CBc* sem mudança de status pulmonar; (2) infecção pulmonar com declínio acelerado e (3) quadro séptico, denominado “*Síndrome cepacia*”, caracterizado por febre, deterioração pulmonar aguda com insuficiência respiratória, com declínio acelerado do VEF₁, bacteremia, pneumonia necrotizante, leucocitose e morte dentro de semanas à meses. Fatores do indivíduo associados com a virulência do microrganismo e o tempo de infecção são determinantes no desenrolar do quadro clínico ^(122,123,124,125).

O impacto dos genômovares do *CBc* em cada uma destas situações é ainda motivo de muitas controvérsias. Sabe-se que o genômovar III – *Burkholderia cenocepacia*, em especial o clone epidêmico ET-12 é o mais virulento quando comparado com os demais genômovares do *CBc*, e capaz de provocar maiores danos na função pulmonar, com evolução para *cor pulmonale* e morte ^(75,124). Durante muitos anos acreditou-se que somente a *Burkholderia cenocepacia* fosse capaz de provocar a *Síndrome Cepacia* e, até hoje, muitos estudos reafirmam esta hipótese e subdividem os pacientes infectados pelo *CBc* em 2 grupos: aqueles infectados pelo genômovar III e os que são infectados por outros genômovares, principalmente como condição de segregação para transplante ^(75,126,127), entretanto, alguns estudos mostram casos de Síndrome cepacia e morte provocados pelo genômovar II – *Burkholderia multivorans* ^(85,95,124,128,129), e mais raramente pelos genômovares IV – *Burkholderia stabilis* ⁽¹³⁰⁾ e VI – *Burkholderia dolosa* ⁽¹³¹⁾.

A presença de *CBc* no TR de pacientes com FC como condição para segregação para transplante pulmonar já ocorre há anos, até mesmo antes da descoberta dos genômovares, pois os primeiros relatos de síndrome cepacia culminavam com a morte em poucos dias ou semanas, e o microrganismo antes denominado de *Pseudomonas cepacia* já era considerado como um “marcador de morte”. Atualmente, embora a maioria dos estudos aponte para essa realidade, alguns relatos de casos revelam tratamentos bem sucedidos de síndrome cepacia e sobrevivência no pós-transplante, inclusive de casos de infecções provocados por *Burkholderia cenocepacia*. Estes dados ainda são motivos de muitos estudos ^(75,122,123).

2.5. Cultura e Identificação

Microrganismos do *CBc* e outros *Burkholderiaceae* apresentam crescimento lento, e seu isolamento a partir de secreções do trato respiratório muitas vezes é impedido e/ou dificultado pela presença de outros microrganismos de crescimento mais rápido, que competem por nutrientes, como por exemplo, as cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* que crescem ocupando todo o ágar. Embora sejam capazes de crescer em meios de cultura convencionais utilizados nos laboratórios clínicos, como o Agar Sangue, Agar MacConkey e Agar Chocolate, o fazem de forma muito lenta. Além disso, a identificação laboratorial, por meio de provas bioquímicas convencionais ou através de kits bioquímicos comerciais apresenta muitas dificuldades e falhas (39,42,132,133,134,135,136,137,138,139).

Diante dessa dificuldade de isolamento e identificação correta do *CBc*, e devido à importância do microrganismo na doença pulmonar de pacientes com FC, foram descritos alguns meios de cultura seletivos, disponíveis comercialmente, contendo corantes bacteriostáticos, antibióticos e baixo pH, entre eles o BCSA (*Burkholderia Cepacia Selective Ágar*), OFPBL (*Oxidation-fermentation Base supplemented with ágar, lactose, Polimixina B sulfate and bacitracin media*) e BCAB – OXOID (*Burkholderia Cepacia Ágar Base*), BCM (*Burkholderia cepacia* Medium, Mast Diagnostics), que aumentam a recuperação dos isolados de *CBc*, pois inibem o crescimento de outros microrganismos. Entretanto, é importante ressaltar que os meios seletivos não selecionam somente o *CBc*, uma vez que outros microrganismos da família *Burkholderiaceae*, incluindo *Burkholderia gladioli*, espécies de *Ralstonia* e *Pandoraea*, além de enterobactérias tais como a *Serratia marcescens*, entre outras, também são resistentes à polimixina B. Portanto, os meios seletivos não garantem o isolamento e tampouco a identificação correta do *CBc*, apenas facilitam a recuperação do agente (39,42,48,137).

MEIO	COMPOSIÇÃO	UTILIZAÇÃO
PCM	Cristal violeta, Polimixina B (300 U/ml) e Ticarcilina (100µg/ml)	Europa
OFPBL	Polimixina B (300 U/ml), Bacitracina (0,2 U/ml) e Lactose	Diversos países
BCSA	Lactose (1%), Sacarose (1%), Polimixina B (600U/ml),	EUA

Tabela 4: Principais meios de cultura seletivos para o Complexo *Burkholderia cepacia* ^(39,42,48,137).

Na rotina dos laboratórios clínicos, geralmente a identificação fenotípica de isolados de *C. B. cepacia* é feita combinando-se a utilização de meios seletivos, análises bioquímicas convencionais e sistemas comerciais de identificação. Alguns testes bioquímicos foram descritos para diferenciar os microrganismos do Complexo *B. cepacia* ^(39,42,48,137). Coenye e col. (2001) ⁽⁴²⁾ demonstraram que o uso combinado de meios seletivos, com kits comerciais de identificação bioquímica e alguns testes adicionais, tais como descarboxilação da lisina e ornitina, oxidação da sacarose e adonitol, oxidase, hemólise e crescimento à 42°C podem facilitar a identificação correta do CBc. Entretanto, erros na identificação são muito comuns. Muitos microrganismos, incluindo *B. gladioli*, *R. picketti*, *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia*, *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Pandoraea* sp., entre outros, podem ser identificados erroneamente como CBc e muitas cepas de CBc são identificadas como uma diversidade de outros bacilos Gram-negativos não-fermentadores (BGNNF) ^(39,42,132,133,134,135,136,137,138,139).

Para confirmar a identificação fenotípica, diversas técnicas de biologia molecular foram descritas, para garantir a eficiência do diagnóstico microbiológico. Coenye e Vandamme (2003) ⁽¹⁴⁰⁾ mostraram que a comparação filogenética da extensão inteira da sequência do gene 16SrRNA é eficiente para a diferenciação dos 9 genovares descritos do CBc; entretanto, as análises da sequência de apenas um fragmento do gene ou através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) não são suficientemente discriminatórias ^(141,142).

A análise do polimorfismo da sequência do gene *recA* se mostrou muito mais eficiente para diferenciar o Complexo *Burkholderia cepacia* de outros microrganismos do que a análise do gene 16SrRNA; entretanto, o RFLP do gene *recA* e o PCR para as espécies-específicas têm se mostrado pouco eficientes, pois não permite a diferenciação de todos os genovares do CBc ^(60,141,142).

O Multilocus Sequence Typing (MLST) permite a análise de polimorfismo dos nucleotídeos em 7 genes do Complexo *B. cepacia* localizados no primeiro e no segundo cromossomos: *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e *trpB* (Tabela 3) ⁽¹⁴³⁾. A análise desses genes permite a diferenciação de todos os membros do Complexo *Burkholderia cepacia*, e é considerado o “*Gold Standard*” para a identificação destes microrganismos ⁽¹⁴¹⁾. Apesar da grande variabilidade genética entre as espécies de *C. B. cepacia*, Wayne e col.

(2007) ⁽¹⁴⁴⁾ estudaram a probabilidade de mutações e as taxas de recombinação nos genes-alvo do MLST, e os resultados encontrados demonstraram que essas alterações ocorrem em índices muito baixos e que não interferem na eficácia da técnica.

GENE	
<i>atpD</i>	ATP sintase de cadeia β
<i>gltB</i>	Subunidade maior de glutamato-sintase
<i>gyrB</i>	DNA girase B
<i>recA</i>	Recombinase A
<i>lepA</i>	GTP-binding proteína
<i>phaC</i>	Aceto-acetil CoA redutase
<i>trpB</i>	Triptofano-sintase

Quadro 3: Genes analisados pelo MLST, para a identificação do Complexo *Burkholderia cepacia* ⁽¹⁴³⁾.

Métodos fenotípicos baseados em espectrometria de massas para a caracterização dos genótipos do Complexo *Burkholderia cepacia* e outros BGNNF de interesse na FC, tem sido empregados recentemente, com resultados promissores ^(145,146). O método já vem sendo utilizado há algum tempo com aplicações em diversos campos da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas, e vem se consolidando como uma ferramenta extremamente versátil e útil. As técnicas de ionização utilizadas nesta metodologia permitem uma análise de alta precisão de macromoléculas, possibilitando que seja feita a análise dos lipídeos presentes na parede celular das bactérias, e determinação dos padrões lipídicos da membrana, denominados de “*Fingerprints*”, característicos de cada espécie bacteriana, para a determinação rápida e eficiente de sua taxonomia.

Na França, em um estudo baseou-se na aplicação da metodologia de análise iônica por espectrometria de massas, denominada de “*Matrixassisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry*” (MALDI-TOF-MS), para a identificação rápida de bacilos Gram negativos não fermentadores (BGNNF) isolados em amostras do TR de pacientes com FC. Foram testadas 559 cepas de 59 espécies diferentes, entre elas, 52 cepas dos genótipos do CBc. 549 cepas foram identificadas corretamente e 9 cepas do Complexo *Burkholderia cepacia* e 1 cepa de *Ralstonia mannitolilytica* foram

identificadas como pertencentes ao gênero adequado, mas não a espécie correta. Outros testes permitiram alterar a positividade para 100%, mostrando que a MALDI-TOF-MS pode ser uma ferramenta para identificação rápida de bacilos Gram negativos não-fermentadores, inclusive de membros do *CBC*, e facilitar o manejo clínico dos pacientes com FC. O baixo custo deste método (cerca de R\$ 2,30 / 50 amostras) e a rapidez com que os resultados podem ser obtidos, sugerem que esta técnica possa vir a substituir a rotina de identificação fenotípica ⁽¹⁴⁵⁾.

Em outro estudo, realizado na Argentina, um método baseado em espectroscopia de infravermelho, denominado de "*Fourier transform infrared spectroscopy*" (FTIR), foi utilizado para a identificação de BGNNF de importância clínica na FC. O estudo foi realizado com 169 cepas de 15 espécies diferentes de microrganismos. O método permitiu a identificação bem sucedida da maioria dos microrganismos e, entre os membros do *CBC*, a taxa de sucesso na identificação foi de 98,1%. A caracterização dos genótipos do *CBC* foi feita somente para diferenciar as quatro espécies clinicamente mais relevantes: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* e *B. stabilis* (genótipos I a IV, respectivamente), com uma taxa de identificação correta de 93,8%. Os resultados do estudo demonstraram elevado grau de confiabilidade e o forte potencial da metodologia proposta ⁽¹⁴⁶⁾.

2.6. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) padroniza os pontos de corte para os testes de disco-difusão (método de Kirby Bauer) e o MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) para Ceftazidima, Meropenem, Minociclina e Sulfametoxazol + trimetoprim ⁽¹⁴⁷⁾. Entretanto, outros antibióticos podem ser testados através de métodos de determinação do MIC, como o E-Test®, porém, os valores devem ser reportados sem interpretação ^(39,147).

Mais de 90% das cepas de *C. Burkholderia cepacia* isoladas de amostras de pacientes com FC são resistentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, colistina, polimixina B, imipenem e cefalosporinas e apresentam resistência variável ao Meropenem. Geralmente, apresentam sensibilidade ao Piperacilina+Tazobactam, Sulfametoxazol+Trimetoprim, Ceftazidima e Minociclina ^(39,148,149,150).

Testes de sinergismo, utilizados para testar a atividade combinada de antimicrobianos, como *double e-Test*, *checkerboard synergy testing* e MCBT demonstraram que há pouca eficácia para o uso combinado de duas drogas, porém, o uso combinado de três drogas mostrou boa atividade *“in vitro”* ^(39,148,150,151).

As opções de tratamento para as infecções pelo *CBc* são limitadas. Embora sejam recomendados os testes *“in vitro”* para a otimização da antibioticoterapia, sabe-se que a suscetibilidade *“in vitro”* pode não apresentar boa correlação *“in vivo”* ^(75,152,153).

3. Escores clínicos e indicadores de gravidade

A intensidade da lesão pulmonar pode ser avaliada sob os aspectos clínicos, morfológicos, pela análise de tomografia computadorizada de tórax, ou funcionais, por meio de testes de avaliação da função pulmonar, como a espirometria.

3.1. Avaliação clínica

Devido à variabilidade clínica, à importância da fibrose cística e à sua frequência na clínica médica, alguns escores de avaliação da gravidade da FC (EGFC) foram desenvolvidos com a finalidade de caracterizar e avaliar o curso da doença, retratando seu histórico e as particularidades de cada população ⁽¹⁵⁴⁾.

O escore clínico mais utilizado mundialmente é o Escore de Schwachman & Kulczycki (1958), que avalia a gravidade por quatro critérios maiores: a atividade geral, nutrição, exame radiológico e avaliação física ⁽¹⁵⁵⁾. Outros escores clínicos muito utilizados são os Escores de Doershuck (1964) ^(154,156), de Cooperman (1971) conhecido como *“Simplified Cystic Fibrosis Scoring Scale”* (SCS) ^(154,157), de Taussig (1973), denominado de *“National Institute of Health Score”* (NHI) ^(154,158), de Huang (1981) ^(154,159) e o de Kanga (1999), que é o escore mais recente e que avalia a exacerbação pulmonar aguda ^(154,160). Alguns estudos citam o escore de Huang (1981) como o mais completo, entretanto, não há um consenso sobre qual o escore clínico mais adequado ⁽¹⁵⁴⁾.

3.2. Avaliação tomográfica

A morfologia da lesão pulmonar pode ser analisada por meio da avaliação tomográfica, pois embora os demais procedimentos diagnósticos (cultura das secreções, exame radiológico, testes de função pulmonar e escores clínicos) possam refletir, sensivelmente, a progressão da doença pulmonar, nenhum destes exames avalia precisamente o aspecto morfológico da lesão pulmonar. Diversos estudos sugerem que a tomografia computadorizada (CT) seja incluída no acompanhamento de rotina dos pacientes com FC ^(161,162).

O escore mais frequentemente utilizado é o de Bhalla (1991), que avalia a presença das anormalidades mais encontradas: espessamento peribrônquico, bronquiectasias, bolhas, pluggs de secreções, colapsos/consolidações, enfisema, entre outros ⁽¹⁶³⁾. Outros escores como o de Santamaría *et al* (1998) ⁽¹⁶⁴⁾, Helbich *et al* (1999) ⁽¹⁶⁵⁾, Brody *et al* (1999) ⁽¹⁶⁶⁾, Castile *et al* (199) ⁽¹⁶⁷⁾, Dorlöchter *et al* (2003) ⁽¹⁶⁸⁾, Nathanson *et al* (1991) ⁽¹⁶⁹⁾, também são utilizados, porém com menor frequência ^(154,162).

3.3. Avaliação da função pulmonar

A deterioração pulmonar leva à ao declínio progressivo e irreversível da função pulmonar, que é evidenciado pelas mudanças nos volumes pulmonares e na capacidade pulmonar total (CPT). Ocorre a redução da capacidade vital (CV) e o aumento do volume residual (VR). O aumento da relação VR/CPT promove a perda do recolhimento elástico e aprisionamento aéreo ^(26,162).

As medidas da capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo da CFV (VEF₁) e o fluxo expiratório entre 25% e 75% da CVF (FEF₂₅₋₇₅) podem estar normais no início da doença pulmonar. A alteração mais precoce é a diminuição do FEF₂₅₋₇₅, que ocorre com o comprometimento das pequenas vias aéreas. Com a evolução da doença ocorre o acometimento das grandes vias aéreas, diminuição do VEF₁ e da relação entre VEF₁/CVF (Índice de Tiffenau), predominando um distúrbio ventilatório obstrutivo. Nos quadros mais graves, ocorre a diminuição da CVF e o defeito ventilatório torna-se obstrutivo e restritivo ^(26,162,170,171,172,173,174).

O parâmetro mais utilizado para avaliar o declínio da função pulmonar é o VEF₁, que é utilizado em muitos estudos como marcador da progressão da doença e da sobrevivência, e também é utilizado como um dos parâmetros para indicação do transplante pulmonar ^(26,162,175,176,177,178,179).

3.4. Avaliação nutricional

A maioria dos pacientes com FC apresenta insuficiência pancreática, síndrome de má-absorção e outras manifestações digestivas e metabólicas desde os primeiros anos de vida, comprometendo o seu crescimento e desenvolvimento. Quando estas manifestações clínicas não são tratadas adequadamente, com a suplementação com enzimas pancreáticas, pode ocorrer o agravamento do estado nutricional, culminando com desnutrição grave. As deficiências de ácidos graxos, deficiência de vitaminas A, D, E, K, vitaminas hidrossolúveis e carências de minerais e oligoelementos também podem contribuir para a complicação do estado nutricional na FC ^(20,162,180).

Na FC, a desnutrição pode ser avaliada por meio de percentis e pelo Z escore ou desvio padrão da média populacional ⁽¹⁸⁰⁾. Em crianças, as medidas que melhor avaliam o estado nutricional são as relações peso/altura, peso/idade, altura/idade. O índice de massa corporal (IMC) ($\text{Peso [Kg]} / \text{altura [m]}^2$) é a medida mais adequada para a avaliação nutricional de pacientes adultos e adolescentes ^(181,182,183).

Embora o *CBc* seja reconhecido como um patógeno importante em pacientes com FC, o número de estudos que relacionam a colonização/infecção pelo *CBc* com a evolução clínica dos pacientes é muito reduzido. Acredita-se que fatores do indivíduo associados com a virulência do microrganismo e a presença concomitante de outros patógenos determinam a intensidade da lesão pulmonar e a evolução da doença. A utilização de métodos adequados para o cultivo, isolamento e identificação do *CBc* e seus genovares e a correlação com indicadores clínicos, tomográficos e de função pulmonar são ferramentas que melhoram a qualidade do diagnóstico, permitem uma melhor compreensão sobre a participação do patógeno na deterioração pulmonar e, conseqüentemente auxiliam na melhoria da terapêutica. Além disso, a idéia generalizada de que *Burkholderia cenocepacia* está associada ao pior prognóstico e as evidências apresentadas em diversos trabalhos de que outros genovares também têm impacto clínico relevante, reforçam sobre a importância na determinação do genovar como caráter preditivo da evolução clínica do paciente, além de orientar na segregação para o transplante, quando necessário.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS:

Determinar a prevalência do Complexo *Burkholderia cepacia* e seus respectivos genovares em pacientes com fibrose cística atendidos nos ambulatórios de pediatria e adultos do Hospital de Clínicas da Unicamp e correlacionar com as manifestações clínicas, comparando as variáveis entre dois grupos: (I) pacientes colonizados/infectados pelo CBc e (II) pacientes sem colonização/infecção pelo CBc.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar a prevalência de microrganismos do Complexo *Burkholderia cepacia* e os respectivos genovares.
2. Classificar os pacientes em dois grupos: (I) pacientes colonizados/infectados pelo CBc e (II) pacientes sem colonização/infecção pelo CBc e comparar entre os grupos:
 - 2.1. As características clínicas dos pacientes segundo faixa etária, sexo e etnia e determinar a frequência das principais mutações da proteína CFTR: $\Delta F508$, G542X, N1303K, G551D, R553X e R1162X.
 - 2.2. O estado nutricional dos pacientes através da média do peso, estatura e índice de massa corporal (IMC).
 - 2.3. Os valores do Escore clínico de Schwachman.
 - 2.4. A morfologia da lesão pulmonar por meio da avaliação tomográfica dos pacientes e classificação das alterações pelo Escore de Bhalla.
 - 2.5. A função pulmonar dos pacientes através das seguintes medidas: CVF, VEF₁, FEF₂₅₋₇₅ e VEF₁/CVF (Índice de Tiffenau).

A large, stylized sunburst or fan-like graphic composed of numerous triangular segments in various shades of green, yellow, and grey, radiating from a central white circle. It is positioned in the lower-left to center area of the page.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Delineamento do Estudo:

Foi realizado um estudo clínico-laboratorial, prospectivo, de corte transversal, com todos os pacientes acompanhados nos ambulatórios de Fibrose Cística (Pediatria e Adultos) do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de qualquer faixa etária, sexo ou raça, que foram atendidos no período de 01/01/2005 à 31/08/2009. Foram avaliados dados clínicos, radiológicos e tomográficos e a microbiota patogênica do trato respiratório dos pacientes.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: (I) Pacientes colonizados/infectados pelo *CBc* e (II) Pacientes não colonizados/infectados pelo *CBc*, porém com colonização/infecção por outros microrganismos. O segundo grupo foi utilizado para a comparação das variáveis estudadas, com a finalidade de avaliar o impacto do *CBc* em cada parâmetro.

Os testes de função pulmonar foram realizados durante todo o período do estudo, em pacientes com idade superior a 7 anos.

O Escore de Schwachman foi realizado durante e após o período do estudo, com base nas informações registradas nos prontuários médicos dos pacientes. As tomografias de tórax foram realizadas durante o período do estudo e o Escore de Bhalla foi realizado após o término da coleta de dados por um único avaliador treinado.

As medidas de peso/idade, altura/idade foram obtidas com base nos registros nos prontuários médicos dos pacientes. Foram utilizadas as medidas atuais.

As amostras do trato respiratório foram obtidas em cada consulta ao ambulatório e as culturas e identificação fenotípica foram realizadas durante todo o período do estudo. As cepas do Complexo *Burkholderia cepacia* foram congeladas e a identificação dos genótipos por meio de PCR e seqüenciamento do DNA foi realizada após o encerramento da coleta das amostras clínicas.

2. População de estudo:

Foram avaliados pacientes que freqüentaram os ambulatórios de Fibrose Cística (Pediatria e Adultos) do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de qualquer faixa etária, sexo ou raça, que foram atendidos no período de 01/01/2005 à 31/08/2009.

2.1. Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo todos os pacientes com diagnóstico de Fibrose Cística comprovado por meio da identificação de duas mutações para o gene que codifica a proteína CFTR, e/ou com, no mínimo, dois testes de sódio-cloro no suor positivos (Cloro $\geq$ 60 mEq/l).

2.2. Critérios de exclusão:

Foram excluídos do estudo os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, mas que não apresentavam dados suficientes para a avaliação. Os pacientes com idade superior a 35 anos foram incluídos somente para o cálculo de prevalência, porém, para as comparações entre os grupos, estes pacientes foram excluídos das análises.

3. Diagnóstico da Fibrose Cística:

3.1. Pesquisa Genética:

O Diagnóstico genético da FC foi realizado pelo Laboratório de Genética Molecular, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Foram pesquisadas as seis mutações mais comuns: Δ F508, G542X, N1303K, G551D, R553X e R1162X. A detecção da mutação Δ F508 foi realizada por meio da técnica de PCR e análise em gel de poliacrilamida 8%, modificada por Rommens e col. (1990) ⁽¹⁸⁴⁾. As demais mutações foram analisadas pela técnica de PCR associada à digestão enzimático-específica. ⁽¹⁷⁴⁾.

3.2. Teste de sódio-cloro no suor:

O teste do suor (TS) foi realizado pelo Laboratório de Gastropediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo método da análise iônica quantitativa do suor (iontoforese) estimulado pela pilocarpina ⁽¹⁸⁵⁾, com posterior análise da concentração dos íons sódio (Na^+) por fotometria de chama, e do cloro (Cl^-) por titulometria ⁽¹⁸⁶⁾. O resultado foi considerado positivo quando a concentração de cloro apresentou-se maior do que 60 mEq/l. Os valores entre 45 – 60 mEq/l foram considerados duvidosos e inferiores à 45 mEq/l foram considerados normais. Foi esperado que a

diferença entre a concentração de Cl^- e Na^+ não ultrapassasse 20 mEq/l, e a relação $\text{Cl}/\text{Na}^+ > 1$. Foram necessários, no mínimo, dois testes positivos para que o diagnóstico fosse confirmado.

4. Avaliação clínica e fatores de Gravidade:

Em cada visita do paciente ao ambulatório, foi realizado pelo médico, o exame físico e foram medidos regularmente os valores de saturação de oxigênio (SaO_2), peso e estatura. Todos os dados clínicos obtidos na anamnese e os resultados dos exames laboratoriais foram registrados no prontuário médico do paciente durante todo o período de estudo.

As informações sobre atividades em geral e outros dados como aspectos nutricionais, utilização de enzimas pancreáticas e outros medicamentos, número de internações, número de cursos de antimicrobianos pelas vias intravenosa (IV), oral (VO) e inalatória (VI), e dados laboratoriais (aspectos radiológicos, tomográficos, exames microbiológicos, bioquímicos, hemograma, esteatócrito, etc) foram obtidos por meio de revisão dos prontuários médicos durante e após o período do estudo.

A partir dessas informações, a gravidade do quadro clínico foi avaliada por meio de 4 critérios: (1) Escore clínico de Shwachman & Kulczycki (ECSK) ⁽¹⁵⁵⁾, (2) Escore tomográfico de Bhalla ⁽¹⁶³⁾; (3) Teste de função pulmonar – Espirometria e (4) Avaliação nutricional.

4.1. Escore Clínico de Shwachman & Kulczycki (ECSK):

O Escore Clínico de Shwachman & Kulczycki (ECSK) ⁽¹⁵⁵⁾ foi realizado com a finalidade de avaliar a gravidade do quadro clínico dos pacientes. Foram avaliados 4 critérios: (1) exame físico, (2) atividade física, (3) estado nutricional e (4) aspectos radiológicos. O escore foi graduado de 0 a 100, de acordo com a gravidade do quadro clínico, sendo que cada um dos critérios avaliados tiveram pontuação mínima de 5 pontos e máxima de 25 pontos. A gravidade foi classificada em: (1) Excelente, (2) Bom, (3) Leve, (4) Moderada, (5) Grave. Quanto maior o escore, menor a gravidade da doença (quadro 4).

Escore Clínico de Shwachman & Kulczycki

PONTUAÇÃO	ATIVIDADE GERAL
25	- Atividade normal plena, Joga bola - Vai à escola normalmente
20	- Falta Resistência e cansa ao final do dia - Boa frequência escolar
15	- Descansa voluntariamente durante o dia - Cansa facilmente após o exercício
10	- Repousa muito - Dispneia após caminhada curta
5	- Ortopnéia - Confinado á cama ou cadeira

PONTUAÇÃO	NUTRIÇÃO
25	- Mantém peso e altura próximo do percentil 25 - Bom tônus e massa muscular - Fezes bem formadas (quase normais)
20	- Peso e altura aproximadamente no percentil de 15 a 20 - Fezes levemente anormais - Tônus e massa muscular satisfatórios
15	- Peso e altura acima do percentil 3 - Fezes usualmente anormais, volumosas e pobremente formadas - Tônus pobre e massa muscular reduzida - Pouca distensão abdominal (se tiver)
10	- Peso e Altura abaixo do percentil 3 - Fezes pouco formadas, volumosas, ofensivamente gordurosas - Músculo fraco e massa reduzida - Distensão abdominal suave ou moderada
5	- Marcada má-nutrição, protuberância abdominal abundante - Fezes frequentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas - Prolapso retal frequente

CLASSIFICAÇÃO
Grave
Moderado
Leve
Bom
Excelente

PONTUAÇÃO	ACHADOS RADIOLÓGICOS
25	Campos Pulmonares limpos
20	- Mínimas Marcas de acentuação broncovascular - Enfisema primário.
15	- Enfisema leve, Sinais de atelectasias - Marcas de aumento broncovascular
10	- Enfisema moderado - Áreas de atelectasias difusas com áreas de infecção sobrepostas
5	- Extensivas alterações com fenômeno pulmonar obstrutivo e infecção - Atelectasias lobares e bronquiectasias

PONTUAÇÃO	EXAME FÍSICO
25	- Normal: sem tosse - FC e FR normais - Pulmões limpos - Boa postura
20	- Tosse rara ou "pigarro" - FC e FR normais no repouso - Mínimo enfisema - Pulmões limpos - Sem baqueteamento.
15	- Tosse ocasional (ao levantar pela manhã) - FR levemente elevada - Enfisema suave - MV rude - Roncos localizados raramente - Baqueteamento precoce
10	- Tosse frequente, usualmente produtiva - Retração torácica - Enfisema moderado - Deformidade torácica - Roncos usualmente presentes - Baqueteamento 2/3
5	- Tosse grave paroxística - Taquipnéia e taquicardia - Alteração pulmonar extensa - Sinais de falência cardíaca direita - Baqueteamento 3/4

PONTOS
< 40
55 - 41
70 - 56
85 - 71
100 - 86

Quadro 4: Escore clínico de Shwachman & Kulczycki – Parâmetros de avaliação ^(1bb).

4.2. Escore Tomográfico de Bhalla

O escore tomográfico de Bhalla ⁽¹⁶³⁾ foi realizado após o término da coleta de dados, com base em análise dos prontuários médicos dos pacientes e tomografias computadorizadas de tórax (CT), com laudo emitido pelo Serviço de Tomografia do Departamento de Radiologia, do Hospital de Clínicas da Unicamp, com o auxílio do pneumologista responsável pelo Ambulatório de Pediatria.

Foram avaliados 9 critérios tomográficos: (1) gravidade da bronquiectasia, (2) espessamento peribrônquico, (3) extensão da bronquiectasia, (4) extensão dos plugs de secreções (rolhas de muco), (5) presença de abscessos ou saculações, (6) gerações de divisões brônquicas envolvidas, (7) número de bolhas, (8) presença de enfisema, (9) presença de colapsos e/ou consolidações. Cada um dos critérios avaliados tiveram pontuação mínima de 0 e máxima de 3 e a soma de todos os pontos foi subtraída de 25. Quanto menor a pontuação, menor a gravidade da alteração tomográfica (quadro 5).

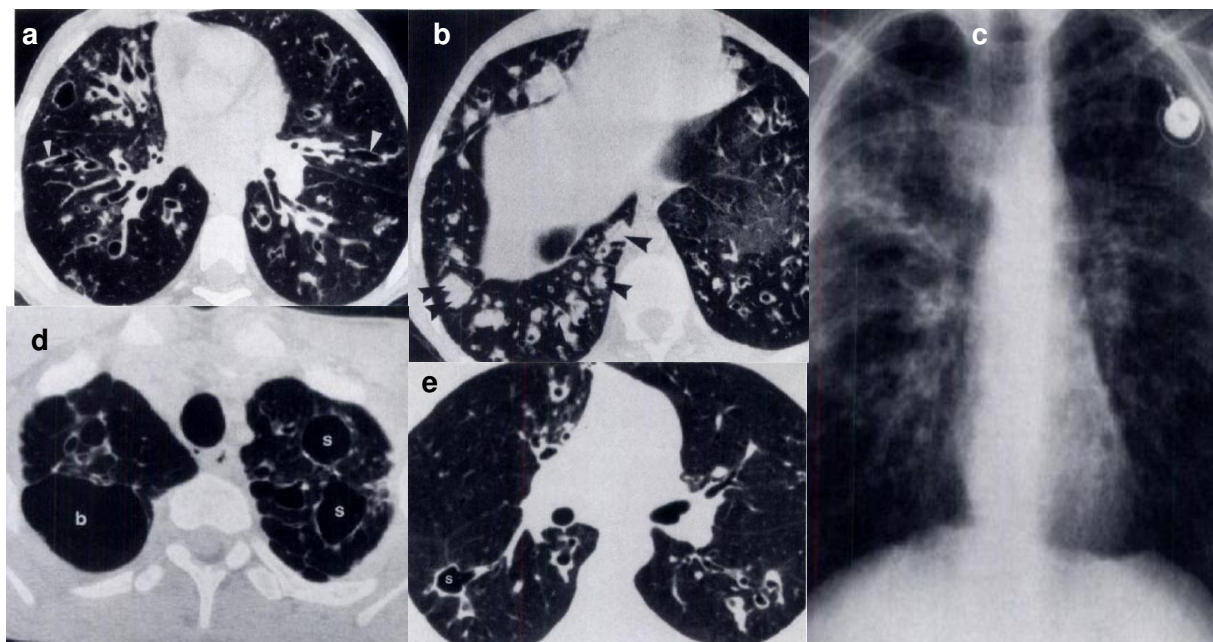


Figura 7: Principais parâmetros de avaliação no Escore de Bhalla. (a) Bronquiectasia severa (escore 3) com espessamento peribrônquico leve (escore 1), brônquios-distal no terço periférico envolvidos – setas brancas (escore 3); (b) Plugs de muco nos segmentos medial, posterior e lateral basal do lobo inferior direito. (c) Radiografia postero-anterior mostrando plugs de muco no segmento basal. (d) Bolhas e saculações (e) saculações ⁽¹⁶³⁾.

Escore tomográfico de Bhalla				
CATEGORIA	0	1 LEVE	2 MODERADA	3 GRAVE
GRAVIDADE DA BRONQUIECTASIA	Ausente	Luz sutilmente maior que vaso adjacente	Luz 2/3 x maior que vaso adjacente	Luz 3 x maior que vaso adjacente
ESPESSAMENTO PERIBRÔNQUICO	Ausente	Espessamento da parede igual vaso	Espessamento maior / dobro do vaso	Espessamento 2x maior que o vaso
EXTENSÃO DA BRONQUIECTASIA (N.º DE SEGMENTOS BRONCOPULMONARES)	Ausente	01 a 05	06 a 09	Maior que 9
EXTENSÃO DE ROLHAS DE MUCO (N.º DE SEGMENTOS BRONCOPULMONARES)	Ausente	01 a 05	06 a 09	Maior que 9
ABCESSOS OU SACULAÇÕES (N.º DE SEGMENTOS BRONCOPULMONARES)	Ausente	01 a 05	06 a 09	Maior que 9
GENERALIDADES DA DIVISÃO BRONQUIAL ENVOLVIDA (BRONQUIECTASIA / ROLHA)	Ausente	Acima 4ª geração	Acima 5ª geração	Acima 6ª geração e distal
NÚMERO DE BOLHAS	Ausente	Unilateral (não > 4)	Bilateral (não > 4)	> 4
ENFISEMA (N.º SEGMENTOS BRONCOPULMONARES)	Ausente	01 a 05	> 5	
COLAPSO / CONSOLIDAÇÃO	Ausente	Subsegmental	Segmental lobar	

Quadro 5: Escore tomográfico de Bhalla ⁽¹⁶³⁾

4.3. Teste de Função Pulmonar (TFP):

A função pulmonar foi avaliada por espirometria, em pacientes com idade superior a 7 anos. Os exames foram realizados pelo Laboratório de Fisiologia Pulmonar (LAFIP), no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), da Faculdade de Ciências Médicas, na Unicamp, utilizando-se o espirômetro modelo CPFS/D (MedGraphics, Saint Paul, Minnesota, EUA). Os dados foram registrados pelo software BREEZE PF Versão 3.8 B for Windows 95/98/NT.

O teste foi realizado com o paciente em pé, utilizando um clipe nasal. Inicialmente o paciente realizou uma inspiração máxima, até atingir a capacidade pulmonar total (CPT). O bocal do espirômetro foi colocado sobre a língua, entre os dentes e com os lábios cerrados, evitando o vazamento de ar. Após uma pausa pós-inspiratória (cerca de 3 segundos), o paciente realizou uma manobra expiratória vigorosa e prolongada, de maneira a atingir o critério de reprodutibilidade da manobra de capacidade vital forçada (CVF). Durante o teste, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- **Capacidade vital forçada (CVF):** Diferença de volume entre a inspiração máxima e a expiração completa, medidas ao nível da boca, realizada rapidamente e com esforço máximo, medida em litros. Obtida solicitando-se que a criança realize uma inspiração máxima, até o nível da CPT, seguida por uma expiração rápida e intensa, mas prolongando sua duração, até que todo o ar seja expirado.
- **Volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF (VEF₁):** Volume de ar expirado, em litros, durante o primeiro segundo da CVF, sendo obtido a partir da manobra para obtenção da CVF.
- **Índice de Tiffenau (TIFF):** Relação entre o VEF₁ e a CVF (VEF₁/CVF), expresso em porcentagem.
- **Fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da CVF (FEF_{25-75%}):** Fluxo de ar eliminado durante a parte central da CVF (entre 25 – 75% da curva da CVF). medido em litros por segundo (l/seg).

Todos os parâmetros avaliados foram comparados com o valor predito, baseado na CPT de cada indivíduo, e a partir destes dados foram obtidos os percentuais (%) de cada parâmetro com relação aos valores preditos. Os resultados obedeceram as recomendações da European Respiratory Society (ERS) ⁽¹⁸⁷⁾ e American Thoracic Society (ATS) ⁽¹⁸⁸⁾.

PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	
CVF	≥ 80%
VEF ₁	≥ 80%
TIFF (VEF ₁ /CVF)	≥ 80%
FEF _{25-75%}	≥ 70%

Quadro 6: Valores de referência para o exame espirométrico dentro dos parâmetros da normalidade.

Os distúrbios ventilatórios foram classificados como (a) restritivo, (b) obstrutivo ou (c) misto e a gravidade como normal, leve, moderado ou grave.

- a. Distúrbio ventilatório restritivo (DVR):** Caracterizado pela redução da capacidade pulmonar total (CPT). Ocorre quando a CVF está reduzida e as relações entre VEF₁/CVF e o FEF_{25-75%} / CVF estão dentro dos parâmetros normais.

DISTÚRBIO VENTILATÓRIO RESTRITIVO (DVR)	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	
	CVF	< 80%
	VEF ₁ / CVF	≥ 80%
	FEF _{25-75%} / CVF	≥ 80%

Quadro 7: Critérios de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios restritivos (DVR), com base nos parâmetros observados pelo exame espirométrico

CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE – CVF	
Normal	> 80%
Leve	60 – 79%
Moderado	51 – 59%
Grave	≤ 50%

Quadro 8: Classificação da gravidade do distúrbio ventilatório restritivo (DVR) na espirometria.

- b. Distúrbio ventilatório obstrutivo (DVO):** Caracterizado pela redução do fluxo aéreo. Quando a CVF se apresentava dentro dos parâmetros normais, o DVO foi identificado pelas seguintes características: (1) Redução do VEF_1 e da relação entre VEF_1/CVF , (2) Redução da relação VEF_1/CVF em sintomáticos respiratórios, mesmo com o VEF_1 normal.

DISTÚRBIO VENTILATÓRIO OBSTRUTIVO (DVO)	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	
	CVF	$\geq 80\%$
	VEF_1	$< 80\%$
	VEF_1 / CVF	$< 80\%$

Quadro 9: Parâmetros de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios obstrutivos (DVO), com base no exame espirométrico.

CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE - VEF_1	
Normal	$> 80\%$
Leve*	60 – 79%
Moderado	41 – 59%
Grave	$\leq 40\%$

Quadro 10: Classificação da gravidade do distúrbio ventilatório obstrutivo (DVO) na espirometria.

O distúrbio ventilatório obstrutivo também foi avaliado somente pelos fluxos, quando os valores da CVF e VEF_1 estavam dentro dos parâmetros de normalidade (Quadro 11), sendo classificado como DVO leve.

DISTÚRBIO VENTILATÓRIO OBSTRUTIVO (DVO) Avaliado somente pelos fluxos respiratórios	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	
	CVF	$\geq 80\%$
	VEF_1	$\geq 80\%$
	VEF_1 / CVF	$\geq 80\%$
	$FEF_{25-75\%}$	$< 70\%$

Quadro 11: Critérios de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios obstrutivos (DVO), avaliados somente pelos fluxos expiratórios. com base nos parâmetros observados pelo exame espirométrico

- c. **Distúrbio ventilatório misto (DVM):** Caracterizado pela redução da CVF e da relação entre VEF_1/CVF . Neste caso foram utilizados os valores % da CVF e do VEF_1 . Quando $CVF\% - VEF_1\% \geq 12$, e os achados radiológicos demonstraram doença restrita significativa, foi caracterizado DVM. Se a relação entre $CVF\% - VEF_1\% \geq 25$, foi caracterizado DVO com CVF reduzida. A gravidade do DVM foi avaliada seguindo os mesmos parâmetros das classificações individuais do VEF_1 e CVF.

DISTÚRPIO VENTILATÓRIO MISTO (DVM)	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	
	CVF	< 80%
	VEF_1 / CVF	< 80%
	$CVF\% - VEF_1\%^{**}$	$\leq 12\%$

Quadro 12: Parâmetros de avaliação/classificação dos distúrbios ventilatórios mistos (DVM), com base no exame espirométrico.

Como o uso do broncodilatador não foi realizado de forma sistemática para todos os pacientes, os resultados Pós-BD não foram considerados no estudo.

4.4. Avaliação nutricional

A avaliação nutricional foi realizada pelas medidas atuais de peso/idade, altura/idade e índice de massa corporal (IMC) ($\text{Peso [Kg]} / \text{altura [m]}^2$). Em pacientes com idade entre 0 e 20 anos, o estado nutricional foi classificado de acordo com a curva antropométrica para percentil (quadro 13) (anexo 3). Em pacientes com idade superior a 20 anos, a avaliação do estado nutricional foi realizada pelo IMC (quadro 14). Não foi possível incluir na avaliação nutricional o percentil de peso/idade e estatura/idade de pacientes acima de 20 anos, e pelo IMC, pacientes menores de 2 anos de idade, por falta de curva de referência.

CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	PERCENTIL DO IMC
Desnutrição	< 5%
Ideal	5% - 85%
Pré-obesidade	85% - 95%
Obesidade	> 95%

Quadro 13: Classificação do estado nutricional de pacientes entre 2 e 20 anos.

CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	IMC
Desnutrição	< 18,5
Ideal	18,5 – 24,9
Pré-obesidade	25,0 – 29,9
Obesidade	≥ 30

Quadro 14: Classificação do estado nutricional de pacientes com idade superior a 20 anos

5. Classificação dos pacientes de acordo com as características clínicas e microbiológicas

Os pacientes do grupo I foram classificados de acordo com o tipo de interação mantida entre o *CBc* e o hospedeiro, baseado-se nas evidências clínicas e laboratoriais que caracterizam infecção ou colonização, e baseando-se no número de culturas positivas para o agente em relação ao total de amostras coletadas que caracterizam a colonização/infecção como aguda (ou inicial), esporádica (ou intermitente) e crônica ⁽⁴³⁾.

A colonização foi definida pela presença do *CBc* nas vias aéreas, evidenciada por culturas de amostras do trato respiratório positivas, porém sem evidências clínicas diretas (quadro 16) ou indiretas (resposta imune específica). A colonização foi definida como: (1) aguda (ou inicial) quando houve um único isolamento do microrganismo; (2) esporádica (ou intermitente) quando houve a presença de culturas intermitentemente positivas ou negativas para o microrganismo, sem que houvesse a repetição de isolamento em três culturas consecutivas; (3) crônica quando houve o isolamento consecutivo do agente, com intervalo inferior a três meses entre as coletas.

A infecção foi definida pela presença do *CBC* nas vias aéreas, evidenciada por culturas de amostras do trato respiratório positivas, com evidências clínicas diretas (quadro 16) ou indiretas (resposta imune específica). A infecção foi definida como: (1) aguda quando houve o primeiro isolamento do microrganismo, com sinais de infecção; (2) crônica quando houve o isolamento consecutivo do agente, com sinais de infecção, e com intervalo inferior a três meses entre as coletas (quadro 15).

ESTÁGIO DE COLONIZAÇÃO / INFECÇÃO	CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS	CRITÉRIOS CLÍNICOS
Colonização inicial (ou aguda)	Deteção da primeira cultura positiva para o <i>CBC</i> no trato respiratório	Sem evidências clínicas diretas ou indiretas de infecção
Colonização esporádica (ou intermitente)	Culturas intermitentemente positivas ou negativas para o <i>CBC</i>	Sem evidências clínicas diretas ou indiretas de infecção
Colonização crônica	Culturas positivas para o <i>CBC</i> persistentes, com intervalo <3 meses entre as coletas	Sem evidências clínicas diretas ou indiretas de infecção
Infecção aguda	Deteção da primeira cultura positiva para o <i>CBC</i> no trato respiratório	Com evidências clínicas diretas ou indiretas de infecção
Infecção crônica	Culturas positivas para o <i>CBC</i> persistentes, com intervalo <3 meses entre as coletas	Com evidências clínicas diretas ou indiretas de infecção

Quadro 15: Classificação do tipo de interação entre o *CBC* e o hospedeiro. ⁽⁴³⁾

SINAIS E SINTOMAS DE EXACERBAÇÃO PULMONAR NA FIBROSE CÍSTICA
Aumento da tosse
Aumento da produção de escarro
Febre
Anorexia e perda de peso
Absenteísmo na escola ou no trabalho
Diminuição da tolerância aos exercícios
Diminuição da SaO ₂
Novos achados à ausculta pulmonar
Novos achados ao raio-X de tórax
Redução de mais de 10% no VEF ₁

Quadro 16: Sinais e sintomas de exacerbação pulmonar na fibrose cística. ⁽⁸⁾

6. Avaliação microbiológica do trato respiratório

A avaliação microbiológica do trato respiratório (TR) foi realizada por meio da cultura de diversos tipos de amostras, variando de acordo com as condições clínicas do paciente e/ou necessidades diagnósticas: escarro (ESC), secreção de orofaringe (SOF) e, eventualmente, secreção traqueal (SET) e lavado brônquico-alveolar (BAL). Foram obtidas, preferencialmente, o mínimo de três (03) amostras de secreções do TR dos pacientes / ano.

6.1. Coleta das amostras:

As amostras foram coletadas no Ambulatório de Pediatria do HC – UNICAMP, por profissionais especializados, preferencialmente por fisioterapeutas, ou eventualmente por enfermeiros e clínicos. Eventualmente, as amostras foram obtidas na Enfermaria do HC, quando o paciente esteve hospitalizado, ou no Pronto-Socorro.

6.1.1. Escarro

Em pacientes jovens e adultos, foram obtidas amostras de escarro (ESC). Para os pacientes que apresentavam habilidade para expectorar voluntariamente a secreção, foram utilizados recursos de fisioterapia respiratória e inalação com solução salina hipertônica (NaCl 3,0 – 5,0%), com a finalidade de induzir o escarro e facilitar a coleta de uma amostra representativa. Em ambas as situações a amostra foi coletada após a higienização da boca, em frasco seco, estéril e com tampa de rosca. Após a coleta, as amostras foram mantidas refrigeradas até o seu processamento no laboratório.

6.1.2. Secreção de orofaringe

Em crianças e outros pacientes que apresentaram incapacidade de emissão espontânea ou induzida de escarro, foram utilizados recursos de fisioterapia respiratória para induzir a tosse e, em seguida, com o auxílio de um abaixador de língua, as amostras de secreção da orofaringe foram coletadas com a utilização de um *swab* estéril para “pescar” a secreção. Após a coleta, o *swab* foi colocado em um frasco contendo o meio de transporte *Stuart*, com a finalidade de preservar a amostra e garantir a viabilidade dos

microrganismos. Após a coleta, os frascos foram mantidos refrigerados por, no máximo, 2 horas até o seu processamento no laboratório.



Figura 8: Swab com Meio de Stuart, utilizado para coleta de secreção de orofaringe

6.1.3. Secreção Traqueal e lavado brônquio-alveolar

Eventualmente foram obtidas amostras de Secreção Traqueal (SET) e Lavado Brônquico Alveolar (BAL), quando os pacientes estiveram hospitalizados. Nestes casos, o material foi colhido, respectivamente, por meio de aspiração e broncoscopia, por equipe médica especializada, na enfermaria do Hospital das Clínicas. As amostras de BAL foram colhidas em 3 a 4 frascos estéreis e diluídas em salina estéril, com volume total variando entre 20 a 100 ml. O aspirado de secreção traqueal com sonda, foi diluído no ato da coleta, em cerca de 10 ml de solução salina.

6.2. Bacterioscopia

Os critérios de triagem variaram de acordo com as amostras. A bacterioscopia foi feita por meio de esfregaço em lâmina de vidro com coloração de Gram, com a finalidade de realizar uma triagem e avaliação da qualidade das amostras. Foi desejável que o número de células epiteliais fosse inferior à 10 e o número de polimorfonucleares (PMN) superior a 25, em aumento de 100x nas amostras de escarro e secreção traqueal. As lâminas para bacterioscopia das amostras de lavado brônquio-alveolar foram feitas em citocentrífuga. Todas as amostras foram processadas, independente da contagem de células. Não foi realizada a triagem para as amostras de secreção de orofaringe, pela falta de um protocolo adequado e devido à pequena quantidade de material que pode ser coletado por esta técnica.

6.3. Cultura:

6.3.1. Escarro e Secreção de orofaringe:

Com o auxílio de uma alça calibrada de níquel-cromo, foi semeada uma alçada (10 µl) de escarro, por método semi-quantitativo (técnica do esgotamento), nos meios de cultura Ágar Sangue (AS), Ágar Chocolate (ACHOC), Ágar MacConkey (MC), *Burkholderia Cepacia Selective Agar* (BCSA) e Ágar Manitol (MAN) (*Oxoid® Ltd., Cambridge, UK*). A semeadura das amostras de secreção de orofaringe foi realizada rolando-se o “swab” em um dos quadrantes da placa e, em seguida, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, as amostras foram semeadas por método semi-quantitativo (técnica do esgotamento).

6.3.2. Secreção traqueal:

Com o auxílio de uma alça descartável calibrada de 1 e 10 µL ou com uma pipeta automática do tipo Eppendorff®, foram semeados 1 e 10 µL, por método semi-quantitativo (técnica do esgotamento), nos meios de cultura Ágar Sangue (AS), Ágar Chocolate (ACHOC), Ágar MacConkey (MC), *Burkholderia Cepacia Selective Agar* (BCSA) e Ágar Manitol (MAN) da amostra previamente diluída e homogeneizada em cerca de 10 mL de salina 0,9% esteril. A diluição final foi respectivamente 1:1000 e 1:10.000.

6.3.3. Lavado brônquio-alveolar:

Inicialmente, foram feitas as diluições da amostra em 1:100 e 1:1000. Para obter a diluição 1:100, foi diluído 1ml da amostra em 9 ml de solução salina 0,9%. A diluição 1:1000 foi obtida diluindo-se 1 ml da amostra anterior (1:100) em 9 mL de salina. Em seguida, foram semeados, por método quantitativo, 100 µl de cada diluição nos meios de cultura Ágar Sangue (AS), Ágar Chocolate (ACHOC), Ágar Mac Conkey (MC), *Burkholderia Cepacia Selective Agar* (BCSA) e Ágar Manitol (MAN).

6.3.4. Incubação e avaliação do crescimento:

As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, com CO_2 (AS e ACHOC) e sem CO_2 (MC, MAN e BCSA), por um período de 24 – 72 horas, com avaliação do crescimento microbiano a cada 24 horas. Quando não houve crescimento bacteriano neste período, as placas de BCSA e MC foram mantidas em estufa bacteriológica por até 7 dias. A avaliação das amostras de SET e BAL foi quantitativa e o resultado expresso em n.º UFC/ml (Unidades formadoras de colônias por ml), entretanto, ao contrário do que ocorre com pacientes não fibrocísticos, foram consideradas positivas quaisquer contagens de bactérias do grupo dos “bacilos não fermentadores de glicose” e outras de interesse. O ponto de corte para caracterizar infecção será de 10^6 UFC/ml. A avaliação de crescimento nas demais amostras foi semi-quantitativa.

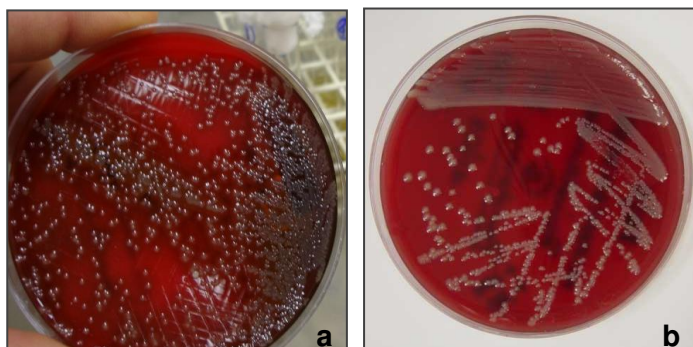


Figura 9: Semeadura pelos métodos (a) quantitativo e (b) qualitativo ou método do esgotamento

6.4. Identificação dos microrganismos:

A identificação dos microrganismos foi realizada por 4 métodos: (1) identificação fenotípica por meio de testes bioquímicos convencionais, (2) identificação fenotípica por meio de equipamento de automação em microbiologia – Vitek®2 Compact (*bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO*), (3a) identificação genotípica do Complexo *Burkholderia cepacia* – PCR do gene *recA*, (3b) identificação genotípica dos genovares do Complexo *Burkholderia cepacia* – PCR espécie-específica e (4) sequenciamento do gene *recA* das cepas com PCR inconclusivo.

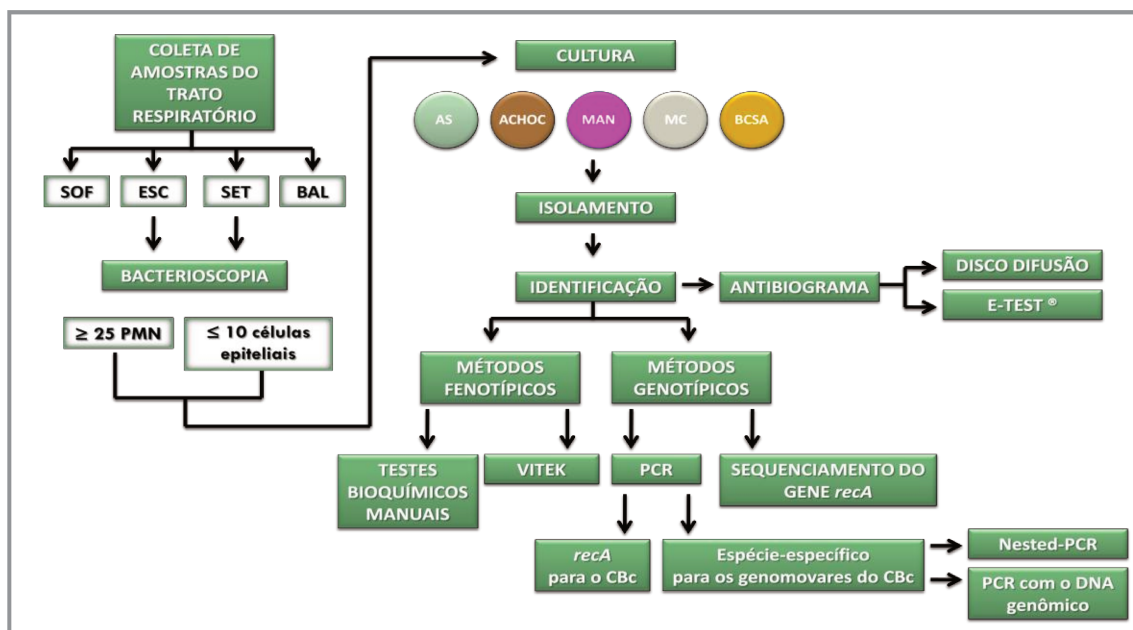


Figura 10: Diagrama do processamento laboratorial das amostras clínicas. SOF = secreção de orofaringe, ESC = escarro, SET = secreção traqueal, BAL = Lavado brônquio-alveolar. AS=Agar sangue, ACHOC=Agar chocolate, MAN=ágar manitol, MC=Agar MacConkey, BCSA=*Burkholderia cepacia* selective Agar.

6.4.1. Identificação fenotípica – Testes bioquímicos convencionais

Na identificação preliminar, foram avaliadas as características macroscópicas das colônias isoladas a partir de uma cultura pura, com 24 – 48 horas de incubação ($36 \pm 1^\circ\text{C}$). As características microscópicas foram avaliadas por meio do esfregaço com coloração de Gram, no qual foram visualizadas as características morfológicas e tintoriais. Os meios de cultura e reagentes utilizados nas provas bioquímicas foram preparados conforme descrito anteriormente ^(47,137,189). Algumas características do metabolismo bacteriano que auxiliaram na identificação preliminar, tais como: proteólise, metabolização de carboidratos, aminoácidos e outros nutrientes do meio de cultura, com modificação de pH, entre outras alterações também foram observadas.

Todos os bacilos Gram negativos foram submetidos à prova para avaliação da produção de citocromo-oxidase, com o objetivo de fazer uma triagem inicial dos microrganismos isolados. A maioria das bactérias do *CBc* é produtora de citocromo-oxidase, entretanto, alguns genomovares podem ser oxidase-negativos ^(42,47,137,189). Os citocromos são hemoproteínas que contêm ferro e atuam como último elemento de ligação na cadeia respiratória aeróbia, transferindo elétrons (hidrogênio) ao oxigênio, com

formação de água. O sistema citocromo é geralmente encontrado em microrganismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios facultativos, mas nunca em microrganismos anaeróbios estritos. A prova de citocromo-oxidase utiliza certos corantes, como o que substitui o oxigênio como aceptor artificial de elétrons. No estado reduzido, o corante é incolor; entretanto, em presença de citocromo oxidase e de oxigênio atmosférico, a p-fenilenodiamina é oxidada e forma azul-de-indofenol. A atividade da oxidase foi testada utilizando-se a solução N-N-N-Tetrametylparaphenylenediamine dihydrochloride em papel de filtro. Como controle positivo, foi utilizada a cepa ATCC 27853 – *Pseudomonas aeruginosa*. As reações foram consideradas positivas, quando ocorreram após 10 segundos, fracamente positivas, se ocorrerem entre 10 a 30 segundos, ou negativas quando não ocorreu reação após 30 segundos ^(42,47,137,189).

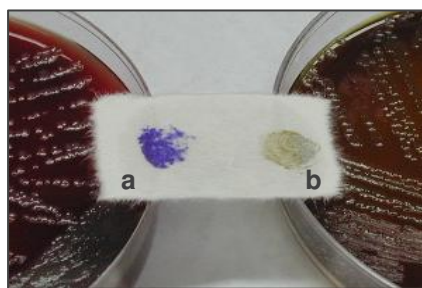


Figura 11: Prova da oxidase utilizando-se a solução N-N-N-Tetrametylparaphenylenediamine dihydrochloride em papel de filtro. (a) Prova positiva, (b) Prova negativa.

Em seguida os bacilos Gram negativos, foram submetidos à prova de oxidação-fermentação de Hugh e Leifson ⁽¹⁹⁰⁾, com o objetivo de selecionar os microrganismos não fermentadores de glicose. Os microrganismos sacarolíticos degradam a glicose por via oxidativa ou fermentativa. Os produtos finais da fermentação são ácidos mistos relativamente fortes, que podem ser detectados por provas de fermentação convencionais. Entretanto, os ácidos formados na degradação oxidativa da glicose são muito fracos, e para detectá-los é necessário um meio mais sensível, como o de oxidação-fermentação de Hugh e Leifson (meio OF), que difere dos utilizados para fermentação nos seguintes aspectos: (1) a concentração de peptona está reduzida de 1% para 0,2%; (2) a concentração de carboidrato está aumentada de 0,5% para 1%; (3) a concentração de ágar está reduzida de 1,5% para 0,3%, tornando o meio semi-sólido.

A baixa relação proteína/carboidrato diminui a formação de aminas alcalinas que neutralizam as pequenas quantidades de ácidos fracos que podem ser formados a partir

do metabolismo oxidativo. A quantidade relativamente elevada de carboidratos serve para aumentar a quantidade de ácido que pode ser formado. A consistência semi-sólida do ágar permite que os ácidos formados na superfície difundam-se através do meio, o que facilita a visualização da viragem do indicador de pH (Azul de bromotimol), que em meio alcalino fica com coloração azul e em meio ácido com coloração amarela.

Para a realização do teste, as colônias foram selecionadas com o auxílio de uma agulha bacteriológica, e inoculadas, por meio de uma picada em profundidade, nos tubos de OF glicose, com e sem vaselina. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, sem CO₂, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 24 – 72 horas. A leitura foi realizada a cada 24 horas e, as culturas que apresentaram resultados negativos no período de 72 horas foram mantidas na estufa por até 7 dias. O microrganismo foi considerado um não-fermentador de glicose, quando não houve reação no tubo contendo vaselina. Neste caso, foram considerados OF-Glicose positivos, quando houver reação no tubo sem vaselina, com alteração do pH e conseqüente alteração da coloração do meio para amarelo. Foram considerados negativos, quando, após 7 dias de incubação, não houve reação (inerte) tubo sem vaselina, ou alcalinização do meio, com conseqüente mudança da coloração para azul (alcalino) ^(42,47,137,189,190). Como controles positivo, foram utilizadas cepas ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* e, como controle negativo, foram utilizadas cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli*.

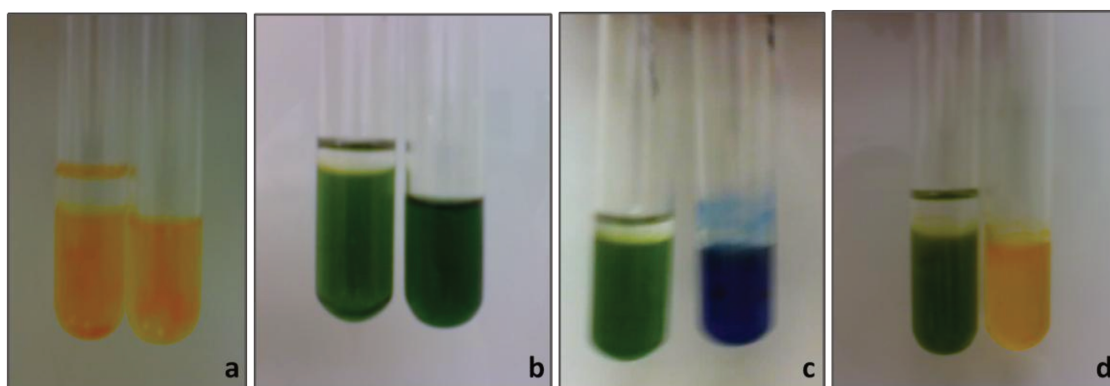


Figura 12: Interpretação da prova de oxidação-fermentação de Hugh e Leifson. (a) Fermentador, (b) Não fermentador – inerte, (c) Não fermentador – alcalino, (d) Não fermentador oxidativo.

A avaliação da motilidade foi realizada por meio do exame direto sem coloração. Eventualmente foi utilizado o caldo TSB para cultura, com a finalidade de assegurar a obtenção de bactérias viáveis. Neste caso, 1 – 2 gotas do caldo com crescimento

bacteriano (16 - 24 hs a 30°C) foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e cobertas com uma lamínula, e os microrganismos foram visualizados ao microscópio. Foram considerados com motilidade positiva, quando houve a presença de bactérias cruzando o campo em diferentes direções ou girando em torno dela mesma. Foram considerados com motilidade negativa, quando houve a presença de movimentos vibratórios fracos, ou movimento browniano (movimento em uma única direção, devido ao movimento do líquido entre a lâmina e lamínula) ^(42,47,137,189). Como controle positivo, foram utilizadas cepas ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* e, como controle negativo, foram utilizadas cepas ATCC 17978 de *Acinetobacter baumannii*.

A prova de sensibilidade à polimixina B ou Colistina foi fundamental para a triagem inicial. As suspensões foram preparadas na escala 0,50 do padrão de McFarland, em cerca de 3,0 ml de solução salina estéril, à 0,85%. Os inóculos foram semeados em ágar Muller Hinton, e foi colocado o disco de Polimixina B (300 u) ou e-Test®. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, sem CO_2 , por um período de 24 horas. Após este período foi realizada a leitura e medição dos halos de inibição de crescimento e os resultados foram comparados com os padrões estabelecidos pelo CSLI vigente. Como controle de qualidade foi utilizada cepa ATCC 25416 de *Burkholderia cepacia*.

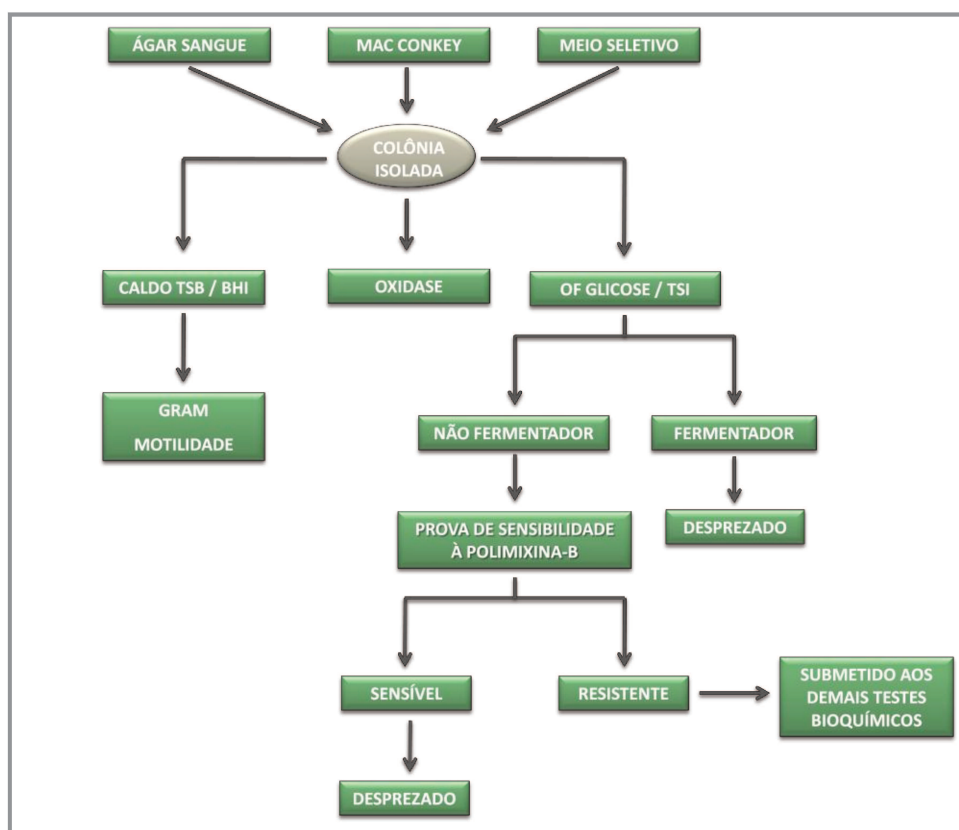


Figura 13: Diagrama com as provas preliminares para identificação bioquímica dos microrganismos

A partir dos resultados preliminares, os bacilos Gram negativos, não fermentadores de glicose e resistentes à polimixina foram submetidos aos demais testes, conforme o quadro 17. As técnicas foram realizadas e os resultados interpretados conforme descrito anteriormente ^(42,47,137,189). Foram utilizadas cepas ATCC para controles positivos e negativos de todos os testes.

TESTES BIOQUÍMICOS	
1. Utilização de carboidratos – Meio OF de Hugh e Leifson para metabolismo de:	- Os procedimentos de semeadura, incubação e leitura dos testes para todos os carboidratos foram realizados de maneira idêntica à descrita para a avaliação do metabolismo de glicose. - Controles positivos: OF Maltose (ATCC 13883 <i>Klebsiella pneumoniae</i>), OF Sacarose (ATCC 13048 <i>Enterobacter aerogenes</i>), OF Lactose (ATCC 13047 <i>Enterobacter cloacae</i>), OF Xilose (ATCC 13048 <i>Enterobacter aerogenes</i>)
a. OF Glicose	
b. OF Maltose	
c. OF Sacarose	
d. OF Lactose	
e. OF Xilose	
2. Utilização de aminoácidos – Meio de Möeller para a descarboxilação de:	- Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram semeadas nos meios cerca de 8 – 10 colônias de bactérias, com a finalidade de se obter um inóculo denso. - As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 7 dias, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. - Os tubos de aminoácidos foram comparados com o tubo de controle (Base de Möeller). As provas foram consideradas positivas quando os meios se apresentaram com coloração púrpura. - Controles positivos: Lisina (LMG 958 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>), Arginina (ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), Ornitina (ATCC 13047 <i>Enterobacter cloacae</i>)
a. Lisina	
b. Ornitina	
c. Arginina	
d. Controle – Base de Möeller	
3. Utilização de ágar Citrato de Simmons	- Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram semeadas na superfície do meio de 2 – 3 colônias de bactérias. - As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 7 dias, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. - As provas foram consideradas positivas quando a coloração do meio foi modificada para azul no pico, se estendendo para todo o meio. - Controle positivo: (ATCC 13048 <i>Enterobacter aerogenes</i>). Controle negativo (ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>)
4. Hidrólise de esculina	- Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram semeadas na superfície do meio de 2 – 3 colônias de bactérias. - As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 7 dias, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. - As provas foram consideradas positivas quando ocorreu a formação de um precipitado negro no tubo, a partir de 6 horas de incubação. A prova negativa foi evidenciada pela

	coloração castanho escuro do meio. ▪ Controle positivo: (ATCC 7965 <i>Aeromonas hydrophila</i>). Controle negativo: ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
5. Caldo para teste de produção de Indol	▪ Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram semeadas cerca de 2 – 3 colônias de bactérias em caldo TSB ou BHI. E acrescidos de 5 gotas de xilol. O tubo foi agitado em vórtex e, em seguida, foram adicionadas 5 gotas de reativo de Erlich. ▪ As provas foram consideradas positivas quando houve a formação de um anel violeta na superfície do tubo. ▪ Controle positivo: LMG 8337 <i>C. indologenes</i>
6. Tubo com caldo NaCl 6,5%	▪ Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram cerca de 2 – 3 colônias de bactérias no caldo de NaCl 6,5%. ▪ As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 7 dias, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. ▪ As provas foram consideradas positivas quando foi observada a turbidez ou mudança de coloração do meio para violeta. ▪ Controle positivo: (ATCC 29200 <i>Enterococcus faecalis</i>)
7. Meio de Nitrato (redução de NO_3 a NO_2) e NO_2 – gás	▪ Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram semeadas cerca de 2 – 3 colônias no meio líquido com tubo de Duhran. ▪ As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 7 dias, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. ▪ Foi adicionado 1,0 ml do reagente A (α-naftilamina) e 1,0 ml do reagente B (ácido sulfanílico). ▪ A formação de coloração vermelha 30 segundos após a adição dos reagentes indica a presença de nitritos e a reação positiva para a redução de nitratos. A formação de bolhas no tubo de Duhran indica a formação de gás. ▪ Controle positivo: (ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>)
8. Tubo com gelatina	▪ Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram semeadas cerca de 2 – 3 colônias de bactérias na solução salina 0,85% e foi adicionado um pedaço de filme de gelatina. ▪ As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 7 dias, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. ▪ As provas foram consideradas positivas pela formação de um precipitado cinza no fundo do tubo. ▪ Controle positivo: (ATCC 27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
9. Disco de Polimixina-B	A prova foi realizada e interpretada como descrito no texto
10. Disco de Imipenem	▪ Com o auxílio de um swab foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de Mac farland, em cerca de 3,0 ml de solução salina estéril, 0,85%. ▪ Os inóculos foram semeados em ágar Müller Hinton e foi colocado o disco de Imipenem (10 μg) ou e-Test®. ▪ As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por 24 horas. ▪ A interpretação do teste foi feita de acordo com o CLSI vigente. ▪ Controle positivo (Resistente): (LMG 958 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)

11. Ágar de DNase	- Com o auxílio de uma agulha bacteriológica, foram semeadas em “spot” (círculo de cerca de 1 cm de diâmetro), cerca de 2 – 3 colônias de bactérias. - As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por até 72 horas, com avaliação de crescimento a cada 24 horas. - Foram adicionadas algumas gotas de HCl e a leitura foi realizada após 5 minutos. - As provas foram consideradas positivas pela formação de um halo transparente ao redor das colônias. - Controle positivo: (LMG 958 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)
12. Discos de PYR	- Com o auxílio de pinça, os discos de PYR foram colocados sobre a cultura de bactérias. - O disco impregnado de bactérias foi retirado e incubado em uma placa vazia, com umidade, por 4 horas. O disco foi colocado sobre uma lâmina e foi depositada 1 gota da solução reagente que acompanha o teste. - As provas foram consideradas positivas pela presença de coloração rosa. Na prova negativa, a coloração permanece amarela (cor do reagente). - Controle positivo: (ATCC <i>Enterococcus faecalis</i>)
13. Discos de ONPG	- Com o auxílio de um swab foi preparada uma suspensão bacteriana densa em 1,0 ml de solução salina estéril, 0,85%. Em seguida foi adicionado 1 disco de ONPG. - As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de CO_2, por 6 horas, com avaliação a cada 1 hora. Quando o resultado apresentou-se negativo em 6 horas, o tubo foi mantido em estufa por até 24 horas e a leitura foi repetida. - A prova foi considerada positiva quando a suspensão mudou de coloração para amarelo. - Controle positivo (Resistente): (LMG 958 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)
14. Teste de oxidase	A prova foi realizada e interpretada como descrito no texto
15. Teste de motilidade	A prova foi realizada e interpretada como descrito no texto

Quadro 17: Principais testes bioquímicos utilizados na identificação fenotípica dos bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose.

Para a caracterização do Complexo *Burkholderia cepacia* foram considerados os bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose oxidativos, resistentes à polimixina-B, arginina negativos, motilidade-positivos. A produção de ácidos a partir dos demais carboidratos – sacarose, maltose, lactose, xilose foi variável, assim como as demais provas. A tabela 5 mostra a variedade de provas entre os genomovares.

GENOMOVAR		MOTILIDADE	OXIDASE	Pigmento amarelo	Pigmento marrom	OF Glucose	OF Maltose	OF Lactose	OF Sacarose	OF Xilose	Lisina	Arginina	Ornitina	ONPG	Liquefação de Gelatina	Hidrólise de Esculina	Redução de NO ₂ - NO ₃	Crescimento em MC	Crescimento em BCSA	Crescimento à 42°C
I	<i>Burkholderia cepacia</i>	1	1	2	2	1	2	1	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	2
II	<i>Burkholderia multivorans</i>	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	3	3	1	2	2	1	1	1	1
III	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	2
IV	<i>Burkholderia stabilis</i>	1	1	3	3	1	1	2	2	2	1	3	1	2	1	3	2	1	1	3
V	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	1	1	3	3	1	1	1	1	2	1	3	3	1	3	3	2	2	1	1
VI	<i>Burkholderia dolosa</i>	1	1	3	3	1	1	1	3	1	3	3	3	1	3	3	1	1	1	1
VII	<i>Burkholderia ambifaria</i>	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	2	2	1	1	2
VIII	<i>Burkholderia anthina</i>	1	1	3	3	1	1	1	2	1	2	3	3	1	3	2	2	1	1	2
IX	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	1	2	2	3	1	1	1	2	1	1	3	2	1	2	2	3	1	1	2

Tabela 5: Principais testes bioquímicos utilizados na identificação fenotípica dos genômavars do Complexo *Burkholderia cepacia*.

(1)= Positivo >90% cepas positivas, (2)=Variável < 90% das cepas positivas, (3)=Negativo – Nenhuma cepa positiva. (48)

6.4.2. Identificação fenotípica – Sistema Automatizado Vitek2®

A identificação de microrganismos pelo sistema Vitek®2 (*BioMérieux*) é efetuada com base nas características bioquímicas dos microrganismos, que permitem a diferenciação entre as espécies, previamente armazenadas no banco de dados do software. Quando não é reconhecido um padrão único de identificação, o sistema fornece uma lista de possíveis microrganismos e sugestões quanto a testes suplementares necessários para completar a identificação. Quando é conhecido um padrão único de identificação, o equipamento emite um laudo com os resultados dos testes realizados e o nome do microrganismo.

6.4.2.1. Preparação do inóculo:

Inicialmente foram transferidos, assepticamente, 3,0 ml de solução salina estéril (NaCl – 0,45% – 0,50%, pH 4,5 – 7,0) para um tubo de ensaio de plástico (poliestireno), transparente (12 mm x 75 mm). Com o auxílio de um “swab” estéril, foram transferidas cerca de 2 – 3 colônias, a partir de uma cultura pura, com menos de 24 horas, para o tubo com solução salina preparado na etapa anterior, com o objetivo de preparar uma

suspensão de microrganismo homogênea, com densidade de 0,50 – 0,63 no padrão de McFarland, que foi confirmada através do calibrador Densicheck™ - Vitek2, BioMeriëux.

Em seguida, os tubos contendo as suspensões foram colocados em um suporte denominado de cassete (figura 3). Em cada uma das suspensões foram acoplados os cartões GN de identificação (figura 4), que contém as provas bioquímicas listadas na Tabela 5, em poços, numerados de 1 – 64.

POÇO	TESTE	MNEMÔNICA	QUANTIDADE/POÇO
2	Ala-Fe-pro-Arilamidase	APPA	0,0384 mg
3	Adonitol	ADO	0,1875 mg
4	L-Pirrolidonil - Arilamidase	PyrA	0,0,18 mg
5	L-Arabitól	IARL	0,3 mg
7	D-Celobiose	dCEL	0,3 mg
9	Beta-Galactosidase	BGAL	0,036 mg
10	Produção de H ₂ S	H ₂ S	0,0024 mg
11	Beta-N-Acetil-Glucosaminidase	BNAG	0,0408 mg
12	Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	0,0324 mg
13	D-Glucose	dGLU	0,3 mg
14	Gama-Glutamil-Transferase	GGT	0,0228 mg
15	Fermentação / Glicose	OFF	0,45 mg
17	Beta-Glucosidase	BGLU	0,036 mg
18	D-Maltose	dMAL	0,3 mg
19	D-Manitol	dMAN	0,1875 mg
20	D-Manose	dMNE	0,3 mg
21	Beta-xilosidase	BXYL	0,0324 mg
22	Beta-Alanina arilamidase pNA	BAlap	0,0174 mg
23	L-Prolina Arilamidase	ProA	0,0234 mg
26	Lipase	LIP	0,0192 mg
27	Palatinose	PLE	0,3 mg
29	Tirosina Arilamidase	TyrA	0,0276 mg
31	Urease	URE	0,15 mg
32	D-Sorbitol	dSOR	0,1875 mg
33	Sacarose / Sucrose	SAC	0,3 mg
34	D-Tagatose	dTAG	0,3 mg
35	D-Trealose	dTRE	0,3 mg
36	Citrato (sódio)	CIT	0,054 mg
37	Malonato	MNT	0,15 mg
39	5-Queto-D-Gluconato	5KG	0,3 mg

40	Alcalinização L-Lactato	ILATk	0,15 mg
41	Alfa-Glucosidase	AGLU	0,036 mg
42	Alcalinização Succinato	SUCT	0,15 mg
43	Beta-N-Acetil-Glucosaminidase	NAGA	0,0306 mg
44	Alfa-Galactosidase	AGAL	0,036 mg
45	Fosfatase	PHOS	0,0504 mg
46	Assimilação Glicina Arilamidase	GlyA	0,012 mg
47	Ornitina descarboxilase	ODC	0,3 mg
48	Lisina descarboxilase	LDC	0,15 mg
52	Base descarboxilase	ODEC	NA
53	Assimilação L-histidina	IHISa	0,087 mg
56	Cumarato	CMT	0,126 mg
57	Beta-Glucoronidase	BGUR	0,0378 mg
58	Resistência O/129 (comp.vibrio)	O129R	0,0105 mg
59	Glu-Gli-Arg-Arilamidase	GGAA	0,0576 mg
61	Assimilação L-Malato	IMLTa	0,042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
64	Assimilação L-Lactato	ILATa	0,186 mg

Tabela 6: Conteúdo dos cartões GN de identificação bioquímica para bacilos Gram negativos – Vitek®2 Compact (*bioMérieux Vitek Inc., St. Louis, MO*)

Cada cartão de identificação contém um condutor que fica imerso na suspensão bacteriana e permite sua transferência para o interior dos poços. Os cassetes contêm espaços numerados de 1 – 10, que permitem a manipulação de 10 amostras / análise. Um pré-registro das informações referentes as amostras x cassetes foi realizado em uma planilha de trabalho, que serviu como base para a inserção de dados no software do equipamento.

Informações Gerais							
Nome Aparelho: _____							
Data/Hora da Config: _____							
Informações da Cassete							
ID da Cassete: _____							
Nome Bancada: _____							
Nome Técnico Config: _____							
Modo de Diluição: _____							
Posição	Tipo Carta	C Bar	ID do Lab	Número Isolamento	Microrgani	Testes Orient.	Quantif. Mor g.
1							
2							
3							

Figura 14: Folha de registro de trabalho do cassete

6.4.2.2. Inoculação dos microrganismos nos cartões de identificação:

Após a preparação do inóculo, o cassete contendo as amostras foi colocado na estação de enchimento do equipamento (câmara de vácuo). Esta câmara evacua e retira o ar de dentro dos cartões de teste, em seguida o vácuo é liberado e a pressão do ar que repõe o vácuo força as amostras a fluírem para dentro dos cartões, passando através da porta de entrada para o interior dos canais e os poços dos cartões.

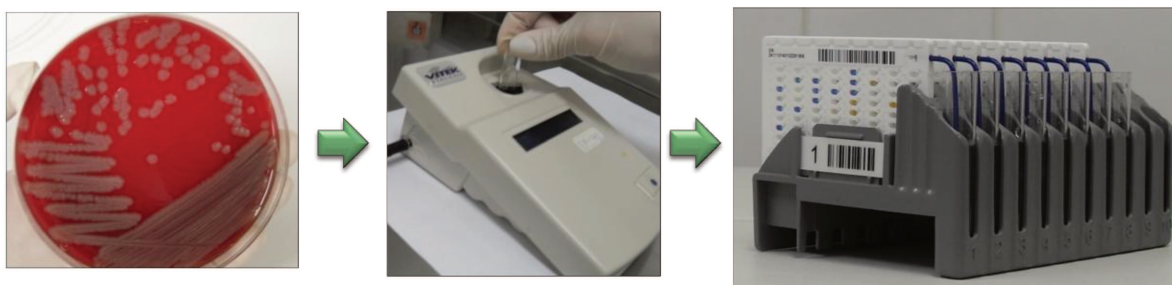


Figura 15: Preparação do inóculo para identificação no sistema automatizado Vitek®2 (BioMérieux)

6.4.2.3. Selagem e Incubação cartões de identificação:

Após a inoculação dos microrganismos nos cartões, o cassete contendo as amostras foi colocado na estação de selagem e incubação. O mecanismo de selagem da câmara consiste em uma lâmina quente e afiada para cortar os tubos de transferência, selando a porta de entrada do cartão e impedindo a fuga das amostras. Na mesma câmara é realizada a leitura ótica do código de barras de cada um dos cartões de identificação, cujas informações são enviadas para o software do aparelho e servirão para o registro das informações das amostras e gerenciamento dos testes. Em seguida, o mecanismo de incubação do aparelho retira cada cartão do cassete e desloca para um carrossel, onde os cartões ficam incubados por até 24 horas em temperatura controlada à 35°C.



Figura 16: Selagem e incubação dos cartões de identificação do sistema automatizado Vitek®2 (BioMérieux)

6.4.2.4. Leitura dos cartões de identificação:

A cada 15 minutos, o leitor do equipamento retira um cartão e devolve à posição original. Durante este processo, um feixe luminoso passa pelos poços dos cartões, verificando a turbidez, e alterações de coloração que caracterizam reações positivas ou negativas, de acordo com as alterações dos indicadores de pH, e as informações são registradas no sistema. Após 24 horas, o equipamento emite um laudo para cada cartão, onde registra os resultados das provas de identificação executadas, o nome do microrganismo identificado e o nível de qualidade da identificação.

Como controle de qualidade foram utilizadas as cepas-padrão, adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) ⁽¹⁹¹⁾ e *Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms* (BCCM / LMG) ⁽¹⁹²⁾ (Tabelas 6 e 7). Todos os microrganismos identificados como Complexo *Burkholderia cepacia* e demais bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose, resistentes à Polimixina-B, com identificação duvidosa foram catalogadas e armazenados em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 15% de glicerol, à temperatura de -80°C para posterior identificação molecular.

CEPA	MICRORGANISMO
LMG 19182	<i>Burkholderia ambifaria</i>
LMG 16670	<i>Burkholderia anthina</i>
LMG 16654	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
LMG 16656	<i>Burkholderia cenocepacia</i> – IIIA
LMG 18829	<i>Burkholderia cenocepacia</i> – IIIB
LMG 19230	<i>Burkholderia cenocepacia</i> – IIIC
LMG 21462	<i>Burkholderia cenocepacia</i> – IIID
LMG 1222	<i>Burkholderia cepacia</i>
LMG 17997	<i>Burkholderia cepacia</i>
LMG 18943	<i>Burkholderia dolosa</i>
LMG 13010	<i>Burkholderia multivorans</i>
LMG 18822	<i>Burkholderia multivorans</i>
LMG 14191	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
LMG 14291	<i>Burkholderia stabilis</i>
LMG 14294	<i>Burkholderia stabilis</i>
LMG 10929	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
LMG 18836	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>

Tabela 7: Cepas – padrão (*type strains*) dos genovares do Complexo *Burkholderia cepacia* (para controle positivo)

CEPA	MICROORGANISMO
LMG 1041	<i>Acinetobacter baumannii</i>
LMG 1231	<i>Achromobacter denitrificans</i>
LMG 1873	<i>Achromobacter piechaudii</i>
LMG 1863	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
LMG 22680	<i>Alcaligenes faecalis parafaecalis</i>
LMG 1131	<i>Alcaligenes odorans</i>
LMG 2216	<i>Burkholderia gladioli</i>
LMG 8337	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
LMG 5886	<i>Cupriavidus gilardii</i>
LMG 1195	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
LMG 3244	<i>Cupriavidus pauculus</i>
LMG 12279	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
LMG 20952	<i>Inquillinus limosus</i>
LMG 16407	<i>Pandoraea apista</i>
LMG 18379	<i>Pandoraea norimbergensis</i>
LMG 18087	<i>Pandoraea pnomenusa</i>
LMG 18106	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
LMG 18819	<i>Pandoraea sputorum</i>
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LMG 1224	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
LMG 7041	<i>Pseudomonas luteola</i>
LMG 1223	<i>Pseudomonas mendocina</i>
LMG 21609	<i>Pseudomonas monteilli</i>
LMG 7040	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
LMG 2257	<i>Pseudomonas putida</i>
LMG 21421	<i>Ralstonia insidiosa</i>
LMG 6866	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>
LMG 5942	<i>Ralstonia picketti</i>
LMG 958	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
LMG 1229	<i>Alcaligenes faecalis faecalis</i>
LMG 1232	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
LMG 21510	<i>Cupriavidus respiraculi</i>
LMG 1225	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
LMG 11199	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
LMG 17761	<i>Pseudomonas veronii</i>
LMG 140	<i>Rhizobium radiobacter</i>

Tabela 8: Cepas – padrão (*type strains*) de outros bacilos Gram negativos
Não fermentadores (*para controle negativo*)

6.4.3. Identificação genotípica:

6.4.3.1. Extração do DNA genômico:

Cerca de 2 a 3 colônias de bactérias previamente isoladas foram cultivadas *overnight* em meio BHI. Em seguida as suspensões bacterianas foram centrifugadas e os sedimentos foram ressuspensos em 500 µl da solução (200 µg/ml Proteinase-K + Tris 50mM, pH 8.0 + SDS 0,5%) e as suspensões foram incubadas por 1h à temperatura de 56°C e, em seguida, aquecidas até a fervura (100°C), por 10 minutos. As suspensões foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e, em seguida foram precipitadas com solução de fenol / clorofórmio (1:1). Estas duas últimas etapas foram repetidas, porém a precipitação foi feita com solução de clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1) e, em seguida, as suspensões foram precipitadas com 2,5 do vol. de etanol gelado e 0,1 vol de acetato de sódio (3M, pH 5.2). As suspensões foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida os sedimentos foram ressuspensos em 200 µl H₂O Milli-Q esterilizada, (com volume variável conforme o tamanho do *pellet*) (modificado da referência 136).

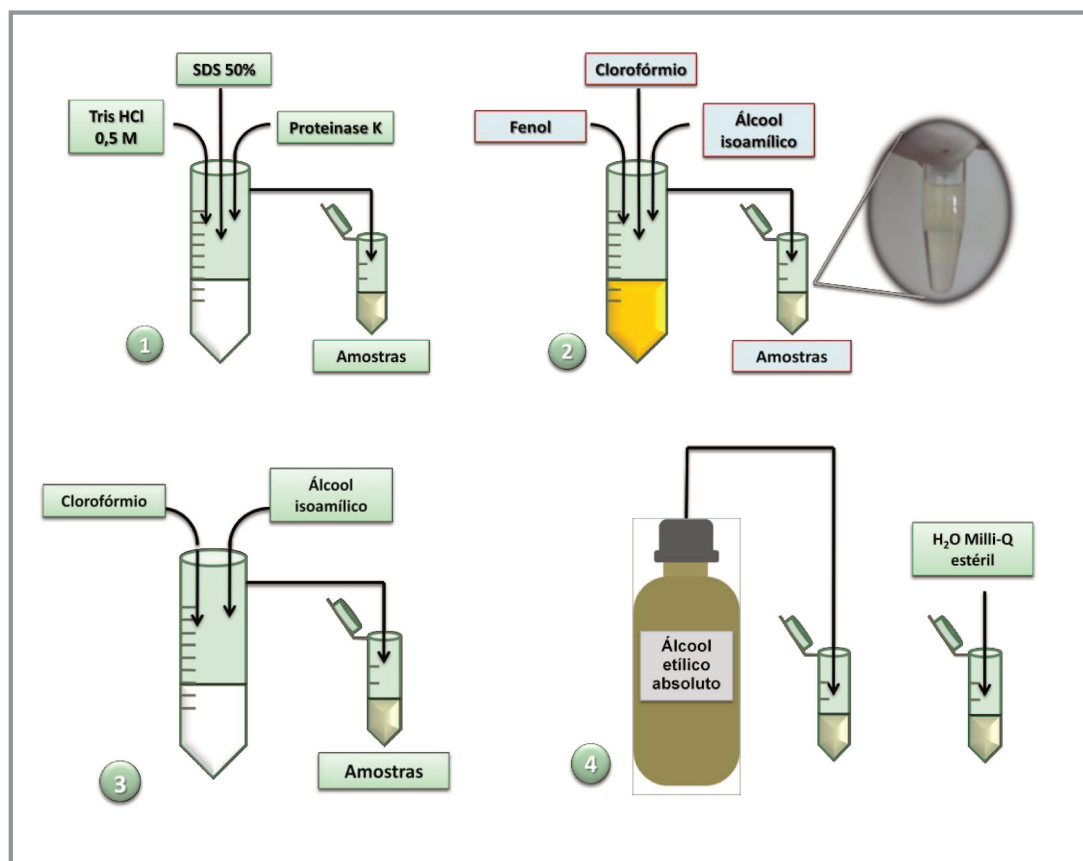


Figura 17: Esquema do processo de extração de DNA genômico.

6.4.3.2. Quantificação do DNA:

O DNA genômico foi quantificado por espectrofotometria, pelo NanoVue®, General Electric Company. Foram pipetados 2,0 µl de H₂O Milli-Q esterilizada para fazer a calibração do equipamento e, em seguida, 2,0 µl de DNA previamente ressuspenso em H₂O (1:10). Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão entre as absorbâncias A260/A280 entre 1,7 – 1,9 ⁽¹⁹³⁾. Variações fora deste intervalo indicam presença de impurezas na amostra, neste caso, foi realizada a purificação da amostra e, quando necessário, repetida a extração do DNA até que fosse obtida uma amostra adequada. As amostras com boa qualidade de pureza foram diluídas em H₂O Milli-Q esterilizada para a concentração final de 50 ng/µl para posterior amplificação no termociclador.



Figura 18: Quantificação do DNA (NanoVue®, General Electric Company)

6.4.3.3. PCR

Inicialmente foi realizada a amplificação do gene *recA* com os primers BCR1 (TGACCGCCGAGAAGAGCAA) e BCR2 (CTCTTCTTCGTCCATCGCCC), que são específicos para o Complexo *Burkholderia cepacia* e geram um produto de 1040 pb. Para testar a especificidade dos primers, foram utilizadas cepas-padrão dos 9 genótipos do Complexo *Burkholderia cepacia* (tabela 6) como controle positivo e, como controle negativo, foram utilizadas outros 35 bacilos Gram negativos não fermentadores (tabela 7).

As PCRs foram preparadas com um volume total de 21 µl, contendo: 2,0 µl Tampão (10x Taq Buffer with KCl – 100mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C + 500mM KCl + 0,8% Nonidet P40), 1,5 µl de MgCl₂ 25mM, 1,5 µl de dNTP 2mM, 0,5 µl de cada primer (BCR1 e BCR2)

100pmol/μl, 0,3 μl da enzima Taq Polimerase (1,25u/50 μl), 1,0 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,0 μl do DNA genômico diluído (50ng/μl). O volume de cada reação foi completado com 12,7 μl de H₂O Milli-Q esterilizada.

Os genes foram amplificados no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, pela técnica de “*Touch down*”, com o objetivo de melhorar a qualidade do anelamento do primers. Foram realizados 2 ciclos na seguinte seqüência: (1) desnaturação à 94°C, por 5 minutos; (2) anelamento à 69°C por 45 segundos, e (3) extensão à 72°C, por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, foram repetidos os passos (1) por 30 segundos e (2) com redução de 1°C a cada 2 ciclos até chegar à temperatura de 64,0°C, considerada ideal para o anelamento dos primers, (3) extensão à 72°C, por 1 minuto e 30 segundos, condições nas quais foram realizados 35 ciclos. Em seguida a reação permaneceu em *Hold* à 10°C (modificado da referência 142).

6.4.3.4. Nested PCR:

Os produtos da amplificação com os primers BCR1 e BCR2, foram submetidos à uma segunda amplificação com os primers específicos para cada um dos 9 genomovares do Complexo *Burkholderia cepacia* (tabela 5). Todas as reações foram feitas em duplicata, sendo que no primeiro teste foi utilizado produto da primeira amplificação (PCR do gene *recA*) e no segundo foi utilizado o DNA genômico diluído (50 ng/μl). As reações de PCR foram preparadas nas mesmas condições já citadas, porém, com variação da temperatura de anelamento para cada primer (tabela 8). As cepas-padrão citadas anteriormente foram utilizadas com a finalidade de testar a especificidade dos primers. Todas as reações incluíram, pelo menos, um controle positivo (cepa conhecida de cada um dos genomovares do *C. B. cepacia*) e um controle negativo (amostra sem adição de DNA).

GENOMOVAR	PRIMER	SEQUÊNCIA (5' - 3')	TEMPERATURA ANELAMENTO	TAMANHO DO PRODUTO (PB)
<i>B. cepacia</i>	BCRG11 ^a BCRG12 ^a	CAGGTCGTCTCCACGGGT CACGCCGATCTTCATACGA	66,1°C	492
<i>B. multivorans</i>	BCRBM1 ^a BCRBM2 ^a	CGGCGTTCAACGTGCCGGAT TCCATCGCCTCGGCTTCGT	66,1°C	714
<i>B. cenocepacia</i> III-A	BCRG3A1 ^a BCRG3A2 ^a	GCTCGACGTTCAATATGCC TCGAGACGCACCGACGAG	64,8°C	378
<i>B. cenocepacia</i> III-B	BCRG3B1 ^a BCRG3B2 ^a	GCTGCAAGTCATCGCTGAA TACGCCATCGGGCATGCT	67,0°C	781
<i>B. stabilis</i>	BCRG41 ^a BCRG42 ^a	ACCGGCGAGCAGGCGCTT ACGCCATCGGGCATGGCA	62,0°C	647
<i>B. vietnamiensis</i>	BCRBV1 ^a BCRBV2 ^a	GGGCGACGGCGACGTGAA TCGGCCTTCGGCACCAGT	64,6°C	378
<i>B. dolosa</i>	BCRBM1 ^b C6-3 ^c	CGGCGTCAACGTGCCGGAT TGATGAAGATCACGAGGCAA	57,8°C	135
<i>B. ambifaria</i>	BCR1 ^b CA-3 ^c	TGACCGCCGAGAAGAGCAA CCTCGGCTTCGTCTGGA	61,7°C	810
<i>B. anthina</i>	BCRG81 ^d BCRG82 ^d	TACGGTCCGGAATCGTCG CGCACCGACGCATAGAAT	61°C	473

Tabela 9: Primers para identificação dos genomovares do Complexo *Burkholderia cepacia*

6.4.3.5. Eletroforese:

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5g de agarose + 100 ml de TBE 1x). Foram aplicados em cada poço 5,0 µl de PCR com 2,0 µl de Azul de Bromofenol. Foi utilizado 2,0 µl de marcador de peso molecular *Ledder 1 Kb Plus* (Fermentas Life Science, USA). A voltagem da fonte foi ajustada para 100V. Após a corrida, o gel foi imerso em solução de Brometo de etídio (10mg/ml) por cerca de 30 minutos, seguido de visualização por trans-iluminação sob radiação de ultravioleta. As imagens foram capturadas pelo MacroVue® UV-20 Transiluminator, Hoefer Inc., e armazenadas no disco rígido do computador, onde foram, posteriormente, analisadas.

6.4.3.6. Sequenciamento do gene *recA*

Para o seqüenciamento do gene *recA* foram utilizados os primers BCR3 (GTCGCAGGCGCTGCGCAA) e BCR4 (GCGCAGCGCCTGCGACAT) que, em associação com os anteriores (BCR1 e BCR2), produzem amplicómeros de 532 e 527 pb, respectivamente. A reação foi preparada com volume total de 10 µl, utilizando-se o Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare UK Limited). Foram adicionados 4,0 µl do reagente premix MegaBace (DYEnamic ET terminator reagent premix), 0,5 µl de cada primer BCR3 e BCR4, 1,0 µl do PCR do gene *recA* (obtido com os primers BCR1 e BCR2) e o volume foi completado com 4,5 µl de H₂O Milli-Q esterilizada. As reações foram realizadas individualmente para cada primer (BCR3 e BCR4). Os fragmentos de DNA foram amplificados no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, onde foi realizado inicialmente 1 ciclo de desnaturação à 94°C, por 2 minutos e 95°C por 20 segundos. Em seguida foram realizados 35 ciclos da seguinte seqüência: (1) anelamento à 60°C por 15 segundos, e (2) extensão à 60°C, por 2 minutos. Após os 35 ciclos a reação permaneceu em *Hold* à 10°C.

Os amplicómeros foram purificados, utilizando-se o Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare UK Limited). Foram adicionados 1 µl de acetato de amônio (7,5M), 27,5 µl de álcool etílico 90% (Merck). As suspensões foram homogeneizadas por inversão por 10x e, em seguida, centrifugadas a 4000 rpm (G*2254) por 30 minutos, em centrífuga Eppendorf (ver modelo). Foram adicionados 100 µl de álcool etílico 70%, seguida de homogeneização por inversão e centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi realizado um “spin” invertido e a placa secou por 1 hora na ausência de luz. Em seguida foram adicionados 10 µl de Loading (70% Formamida + 1 mM EDTA). As reações foram colocadas no seqüenciador MegaBACE 1000, General Electric por 180 minutos. Os dideoxinucleotídeos com marcadores fluorescentes para cada um deles (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), permitem a leitura concomitante em um mesmo sensor do aparelho.

Para a leitura das seqüências obtidas com os primers BCR3 e BCR4 foi utilizado o software Chromas Pro v. 1.5 (Technelysium Pty Ltd) e os resultados obtidos foram comparados com os dados do GenBank, por meio do software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no Centro Nacional para Informação Biotecnológica

(16,194). A identificação ao nível de espécie foi definida pela similaridade $\geq 97\%$ quando comparada com a sequência das cepas no GenBank.

O software Mega 4.1 foi utilizado para a construção da árvore filogenética (195) após o alinhamento das sequências *forward* e *reverse* pelo Clustal X (196).

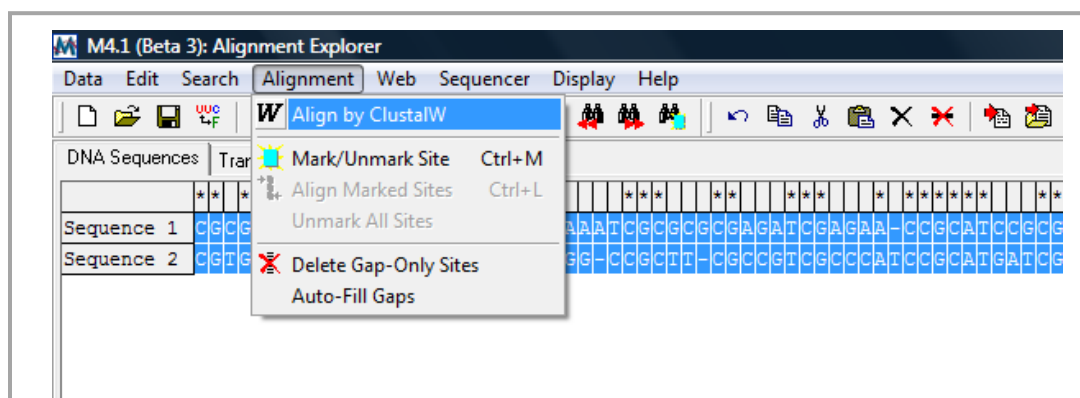


Figura 19: Alinhamento pelo ClustalW das sequências “forward” e “reverse” por meio do software Mega 4.1 (Beta3). (195,196)



Figura 20: Comparação dos resultados com o GenBank, por meio do software BLAST no NCBI (16,194).

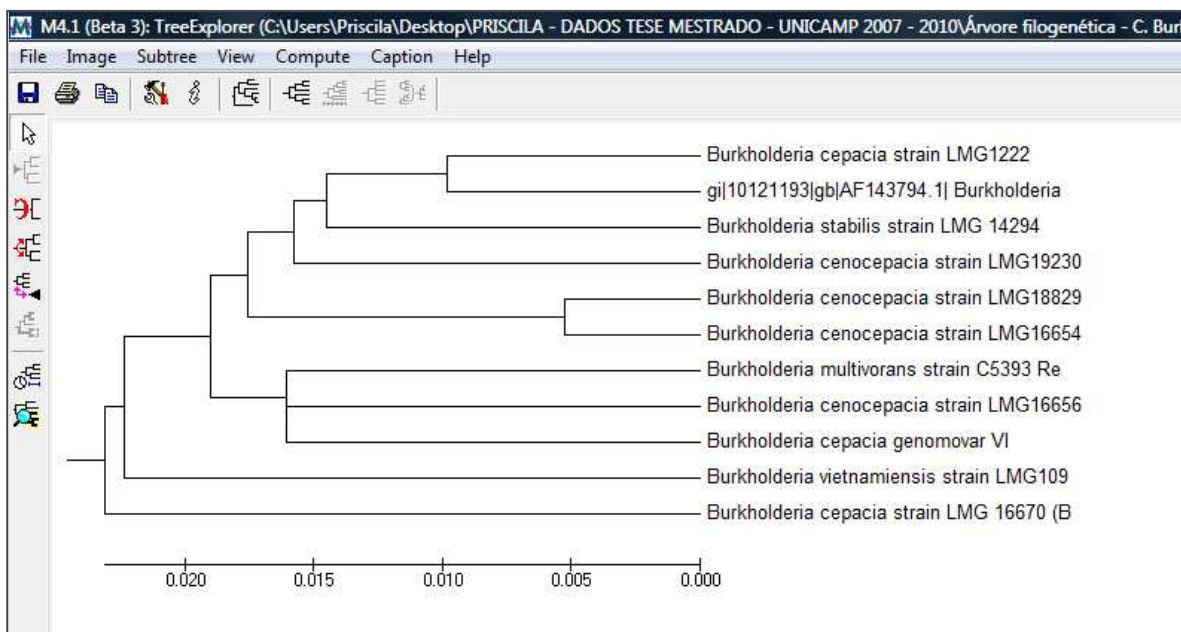


Figura 21: Construção da árvore filogenética por meio do software Mega 4.1 (beta3) ^(19b,19c).

7. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelos métodos de Kirby Bauer (disco-difusão) e/ou E-Test®. Inicialmente foram transferidos, assepticamente, cerca de 2,0 ml de solução salina estéril (NaCl – 0,85%) para um tubo de ensaio de plástico (poliestireno). Com o auxílio de um *swab* estéril, foram transferidas cerca de 2 – 3 colônias, a partir de uma cultura pura, com menos de 24 horas, para o tubo com solução salina com a finalidade de preparar uma suspensão bacteriana, com densidade de 0,50 no padrão de McFarland, que foi confirmada através do calibrador Densichek™ (BioMérieux). Com outro *swab* a suspensão foi semeada em uma placa de Agar Müeller Hinton e os discos de antibióticos a serem testados (tabela 10) foram colocados sobre o inóculo, com o auxílio de uma pinça estéril.

As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica, à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, sem CO_2 , por um período de 24 horas. Após este período foi realizada a leitura e medição dos halos de inibição de crescimento e os resultados foram comparados com os padrões estabelecidos pelo CSLI (tabela 10). Como controle de qualidade foi utilizada cepa ATCC 25416 de *Burkholderia cepacia*.

Eventualmente, em casos de dúvidas na interpretação dos resultados, o teste foi repetido, utilizando-se a tira de e-Test® do antibiótico correspondente. Os resultados foram analisados de acordo com os pontos de corte para MIC padronizados pelo CLSI (tabela 11).

ANTIBIÓTICO	CONTEÚDO DO DISCO	INTERPRETAÇÃO DA ZONA DE DIÂMETRO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO (mm)		
		SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
Ceftazidima	30 µg	≤17	18 – 20	≥ 21
Meropenem	10 µg	≤15	16 – 19	≥ 20
Minociclina	30 µg	≤14	15 – 18	≥ 19
Sulfametoxazol+trimetoprim	1.25/23.75 µg	≤10	11 – 15	≥ 16

Tabela 10: Pontos de corte e interpretação dos testes de disco difusão com os antibióticos padronizados para o *CBC*.⁽¹⁴⁷⁾

ANTIBIÓTICO	EQUIVALENTE MIC (µg/mL)	
	SENSÍVEL	RESISTENTE
Ceftazidima	≥ 32	≤ 8
Meropenem	≥ 16	≤ 8
Minociclina	≥ 16	≤ 4
Sulfametoxazol+trimetoprim	≥ 8/152	≤ 2/38

Tabela 11: Pontos de corte para MIC e interpretação dos testes com os antibióticos padronizados para o *CBC*.⁽¹⁴⁷⁾

8. Análises estatísticas

Nas análises descritivas do estudo foram utilizadas médias, medianas, desvios padrões para as variáveis contínuas e frequências absolutas e relativas (porcentagens) para variáveis discretas. Para comparar proporções entre duas ou mais variáveis categóricas foram utilizados os testes de qui-quadrado e o teste exato de Fisher. Para analisar as médias entre variáveis contínuas independentes sem distribuição normal foram utilizados os testes de Mann-Whitney para variáveis com até 2 categorias e Kruskal-Wallis para variáveis com 3 ou mais categorias. Para verificar as correlações entre os fatores de gravidade foi utilizado o teste de Pearson para variáveis contínuas e o teste de Spearman para correlacionar variáveis categóricas.

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e o programa utilizado para as análises estatísticas foi o SPSS versão 18.0.

O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

9. Aspectos éticos:

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da FCM/UNICAMP sob o n.º 791/2007 (anexo 1) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início do estudo (anexo 2).

RESULTADOS

RESULTADOS

A análise dos prontuários médicos de 313 pacientes acompanhados nos ambulatórios de Fibrose Cística (Pediatria e Adultos) do Hospital de Clínicas da Unicamp revelou que apenas 222 pacientes atendiam aos critérios de inclusão. Entre estes pacientes, ocorreram 11 óbitos durante o período de estudo (4,95%). A faixa etária dos pacientes variou entre recém-nascidos e 78 anos (média=20,6, dp=18,34, mediana=14 anos), com ligeiro predomínio de pacientes do sexo feminino, 53,6% (n=119) em relação ao sexo masculino, 43,4% (n=103). A tabela 10 mostra a distribuição dos pacientes de acordo com as categorias de faixa etária. Em relação à etnia, houve o predomínio de pacientes caucasóides (92,9%) em relação às outras etnias (7,1%).

FAIXA ETÁRIA	NÚMERO DE PACIENTES	%
Até 6 anos	40	18,0%
7 a 12 anos	53	23,9%
13 a 20 anos	55	24,8%
21 a 35 anos	36	16,2%
Acima de 35 anos	38	17,1%
TOTAL	222	100%

Tabela 12: Classificação da faixa etária

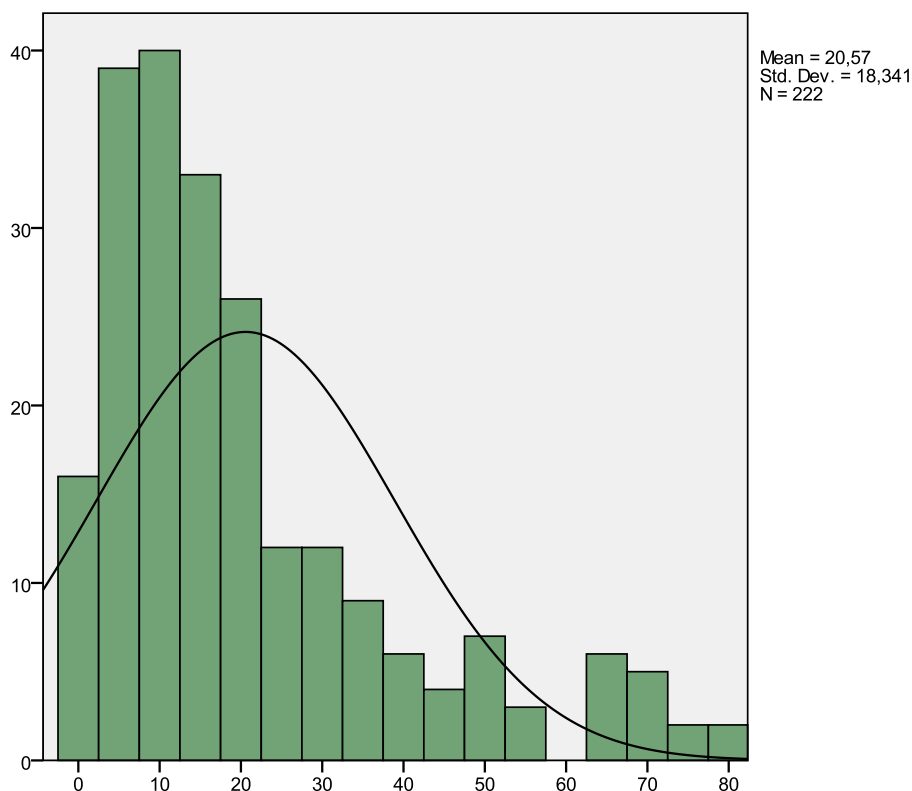


Figura 22: Distribuição de idades e curva normal

Entre os 222 pacientes incluídos no estudo, foi observado que 50 deles tiveram amostras positivas para o *CBc* antes e durante o período do estudo, com prevalência de 22,5%. A prevalência mostrou evolução progressiva ao decorrer do período, passando de 10,5% antes do ano de 2005 para 22,5% em 2009 (Tabela 13).

PERÍODO	TOTAL DE PACIENTES COM FC EM ACOMPANHAMENTO	TOTAL DE PACIENTES COM AMOSTRAS POSITIVAS PARA CBC	PREVALÊNCIA
Antes 2005	162	17	10,5%
2005	177	20	11,3%
2006	188	21	11,2%
2007	203	29	14,3%
2008	216	41	19,0%
2009	222	50	22,5%

Tabela 13: Evolução da prevalência de colonização/infecção por Complexo *Burkholderia cepacia* no período de 2005 a 2009.

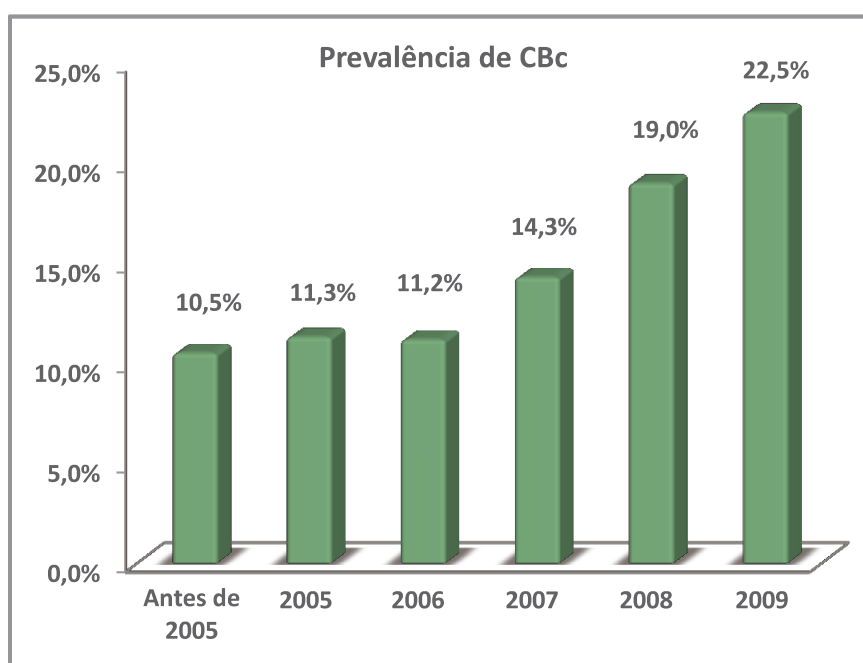


Figura 23: Evolução da prevalência de colonização/infecção por Complexo *Burkholderia cepacia* no período de 2005 a 2009.

Os pacientes com amostras positivas para o *CBc* foram classificados como pertencentes ao Grupo I (n=50) e os demais pacientes foram classificados como Grupo II (n=172), entretanto, para fins de comparação das variáveis, foram excluídos os pacientes com faixa etária acima de 35 anos (n=38), totalizando em 134 pacientes no Grupo II.

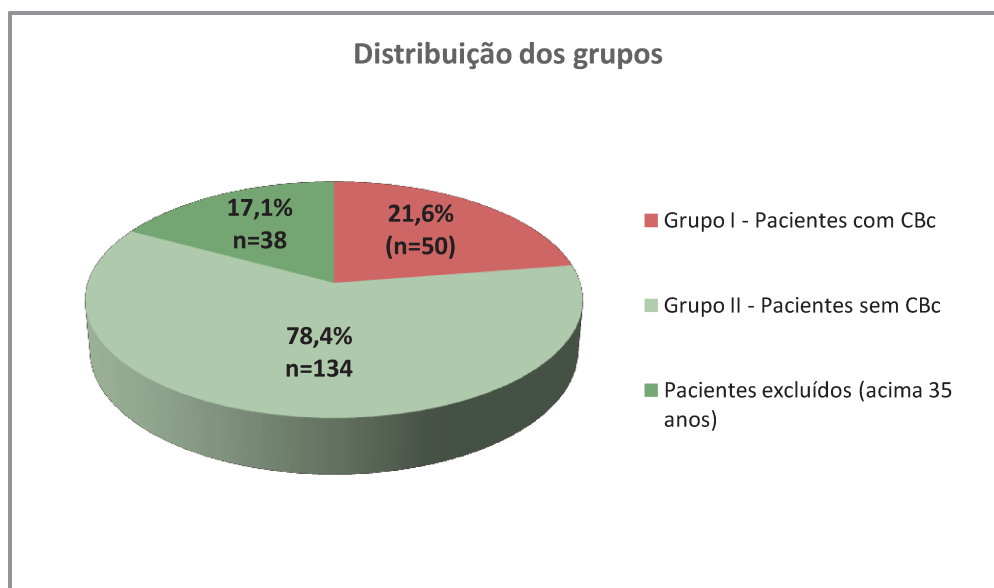


Figura 24: Distribuição dos grupos entre a população de pacientes com fibrose cística atendidos nos Ambulatórios de Pediatria e Adultos do HC/Unicamp.

A faixa etária dos pacientes do grupo I variou entre 1 e 32 anos de idade (média=12,18, dp=8,96, mediana=9,5), com predomínio de pré-escolares, escolares e adolescentes. Houve equilíbrio na distribuição de gêneros, com 50,0% dos pacientes do sexo feminino (n=25) e 50,0% do sexo masculino (n=25). No grupo II a faixa etária variou entre 1 e 35 anos (média= 14,4, dp=8,69, mediana=13,0), com ligeiro predomínio do sexo feminino (51,5%) em relação ao masculino (48,5%).

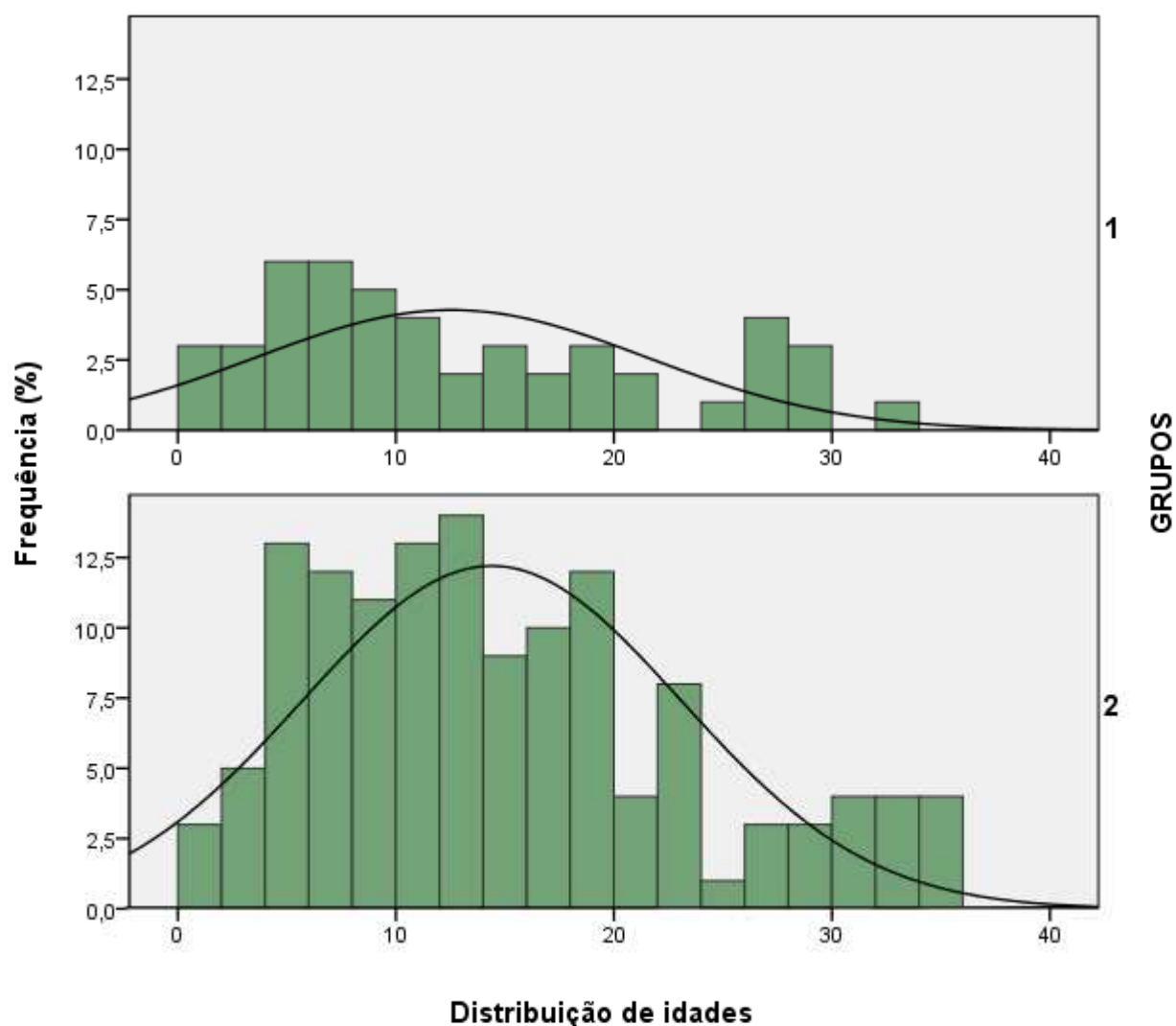


Figura 25: Distribuição de idade entre os grupos I e II e curva normal.

No grupo I, foi possível avaliar as manifestações clínicas apresentadas em 45/50 pacientes (88,0%) e no grupo II em 109/134 pacientes (81,3%). Em ambos os grupos, 100% dos pacientes avaliados apresentaram manifestações respiratórias. No grupo I, 43/45 pacientes (95,6%) apresentaram insuficiência pancreática. No grupo II isso ocorreu em 93/109 pacientes (85,3%). Apresentam diabetes mellitus 5/45 (11,1%) e 11/109 (10,1%) dos pacientes dos grupos I e II, respectivamente.

A mutação $\Delta F508$ esteve presente, em pelo menos um dos alelos, em 70,0% e 56,7% dos pacientes dos grupos I e II, respectivamente, sendo no grupo I 28,0% homozigotos (n=14) e 42,0% heterozigotos (n=21), e no grupo II, 21,6% homozigotos (n=29) e 35,1% heterozigotos (n= 47) (Tabela 14).

Mutação da CFTR (2 alelos)	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Número de casos	%	Número de casos	%
dF508/dF508	14	28,0%	29	21,6%
dF508/G542X	5	10,0%	9	6,7%
dF508/R1162X	1	2,0%	2	1,5%
dF508/R553X	1	2,0%	1	0,7%
dF508/N1303X	0	0,0%	3	2,2%
dF508/Outra	14	28,0%	32	23,9%
G542X/R1162X	0	0,0%	1	0,7%
G542X/G551D	0	0,0%	1	0,7%
G542X/Outra	4	8,0%	3	2,2%
N1303K/Outra	0	0,0%	1	0,7%
R1162X/R1162X	0	0,0%	1	0,7%
R1162X/Outra	0	0,0%	1	0,7%
Outra/Outra	11	22,0%	50	37,3%
TOTAL	50	100,0%	134	100,0%

Tabela 14: Distribuição das mutações da CFTR entre os pacientes dos grupos I e II.

A classificação de acordo com o tipo de interação que o Complexo *Burkholderia cepacia* mantém com o hospedeiro, baseada em evidências clínicas e na presença do patógeno no trato respiratório, mostrou que 13/50 pacientes (26,0%) são infectados crônicos pelo *CBc* e que 37/50 pacientes (74,0%) apresentam apenas colonização, sem evidências clínicas diretas ou indiretas de infecção / exacerbação, sendo que em 9/50 pacientes (18,0%) foi observada a colonização transitória e em 28/50 pacientes (56,0%) foi observada a colonização aguda (ou inicial). A colonização crônica não foi observada em nenhum dos pacientes. Todos os pacientes crônicos apresentaram evidências de infecção.

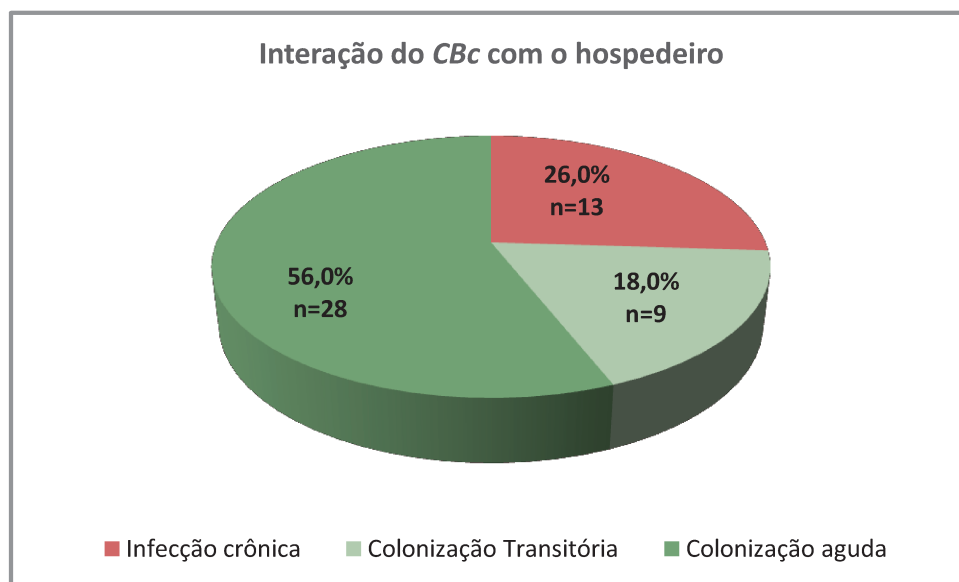


Figura 26: Distribuição dos pacientes do grupo I de acordo com o tipo de interação que o CBc mantém com o hospedeiro.

Escore de Schwachman

No Grupo I, foi possível realizar o escore de Schwachman em 38/50 (76%) pacientes e no grupo II em 102/134 (76,1%). O ES foi classificado como leve em 28% e 23,9% dos pacientes nos grupos I e II, respectivamente. A média de pontos do escore no grupo I foi de 59,9 ($\pm 18,25$, mediana = 60) e no grupo II, foi de 66,4 ($\pm 18,44$, mediana = 65). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o total de pontos do escore nos dois grupos ($p = \text{NS}$) (figura 27). Entretanto, quando avaliadas separadamente as variáveis que compõem o escore, o teste de Mann-Whitney mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a média de pontos das variáveis estado nutricional e atividade geral ($p < 0,05$), e nas outras variáveis, $p = \text{NS}$ (figuras 28 e 29).

ESCORE DE SCHWACHMAN	MÉDIA DE PONTOS		Teste de Mann-Whitney
	GRUPO 1	GRUPO 1	
Atividade geral	14,47 (dp=5,17)	15,44 (dp=5,36)	p=0,026
Exame físico	14,73 (dp=5,19)	16,81 (dp=4,76)	p=0,269
Estado nutricional	14,86 (dp=4,73)	15,88 (dp=5,05)	p=0,020
Achados radiológicos	15,79 (dp=5,27)	18,28 (dp=5,86)	p=0,358
Total de pontos do escore	59,86 (dp=18,25)	66,42 (dp=18,44)	p=0,070

Tabela 15: Total de pontos dos parâmetros avaliados no Escore de Schwachman e teste estatístico

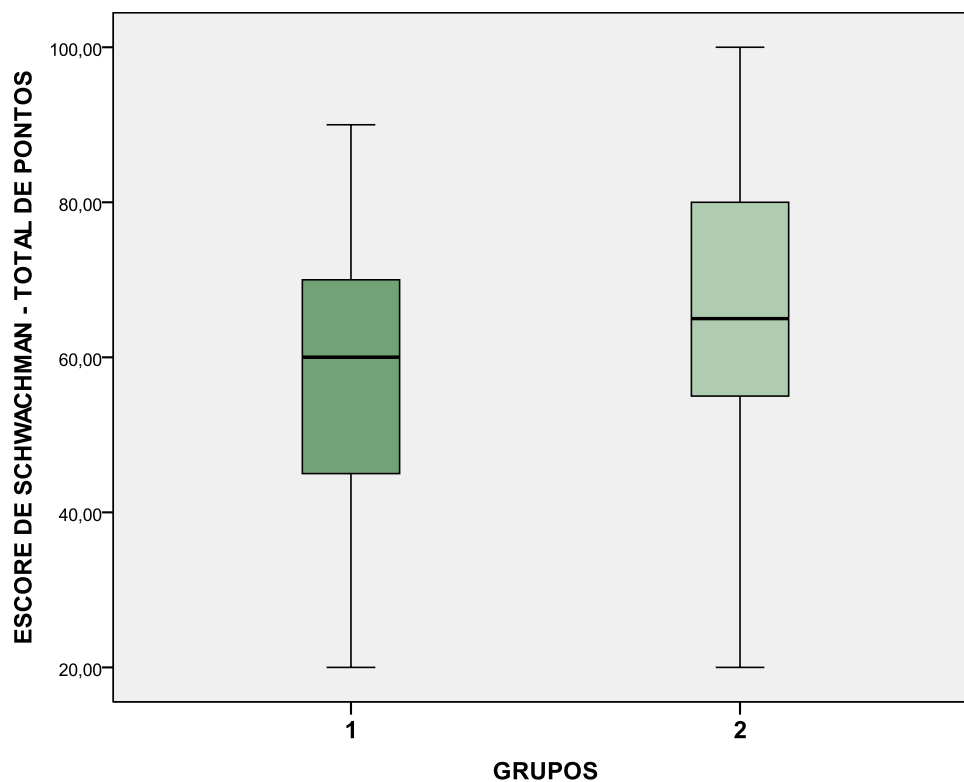


Figura 27: Distribuição dos valores do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II. Teste de Mann-Whitney – sem diferença estatisticamente significante entre os grupos I e II (p=0,611).

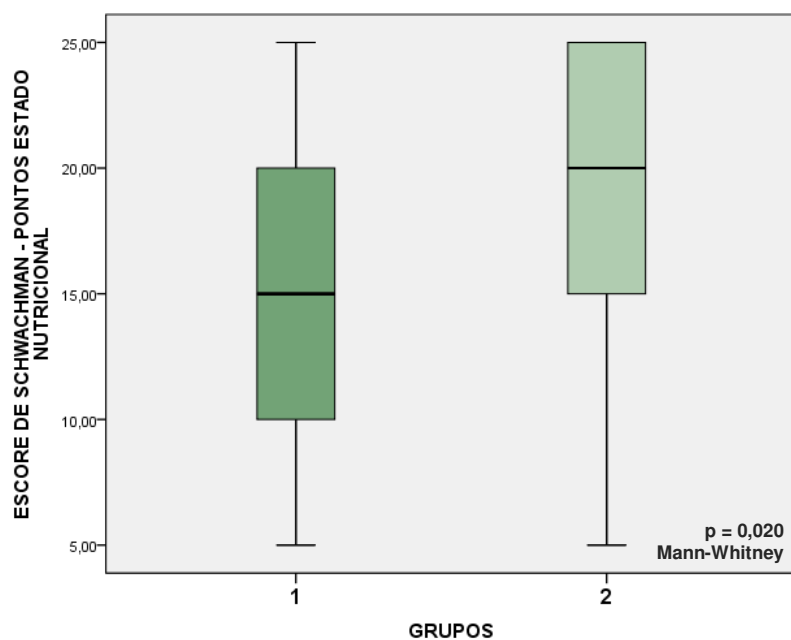


Figura 28: Distribuição dos valores do parâmetro Estado Nutricional do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II. Teste de Mann-Whitney –Diferença estatisticamente significante entre os grupos I e II ($p=0,020$).

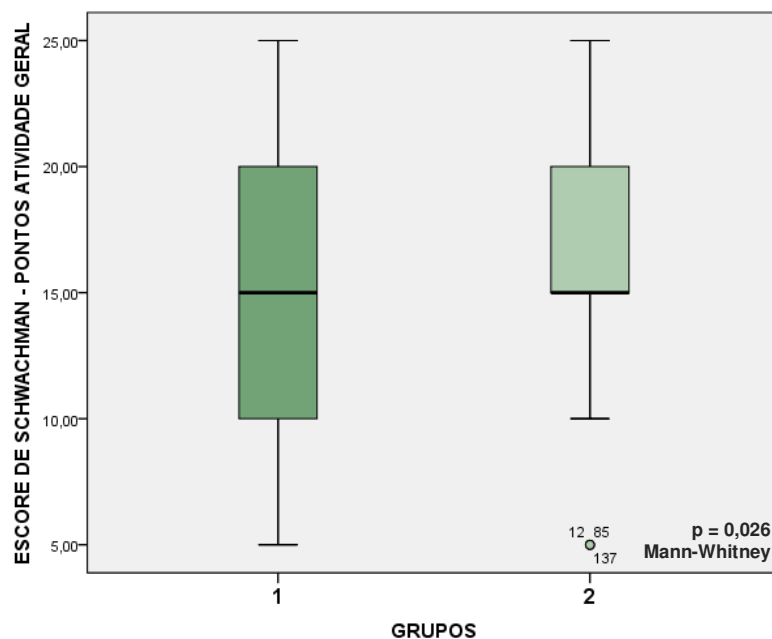


Figura 29: Distribuição dos valores do parâmetro Atividade geral do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II. Teste de Mann-Whitney –Diferença estatisticamente significante entre os grupos I e II ($p=0,026$).

No que se refere à Gravidade, 18,4% e 21,1% dos pacientes do grupo I tiveram, respectivamente, escores Grave e Moderado, comparando com 13,7% e 14,7% do grupo II. Quanto pior o escore, maior foi a participação do grupo I, e quanto melhor o escore, maior foi a participação do grupo II (tabela 15), entretanto, o teste de qui-quadrado não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=NS$), mesmo quando comparados os dados dos escores grave/moderado com bom/excelente.

ESCORE DE SCHWACHMAN	GRUPO 1		GRUPO 2	
	n	%	n	%
GRAVE	7	18,4%	14	13,7%
MODERADO	8	21,1%	15	14,7%
LEVE	14	36,8%	32	31,4%
BOM	7	18,4%	29	28,4%
EXCELENTE	2	5,3%	12	11,8%
TOTAL	38	100%	102	100%

Tabela 16: Classificação da Gravidade do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II. Teste de qui-quadrado – sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II ($p=0,611$). O cruzamento de dados entre os escores moderado/grave com leve e bom/excelente, mostrou $p=0,311$. A comparação entre os grupos cruzando os dados dos escores moderado/grave com bom/excelente, mostrou $p=0,06$.

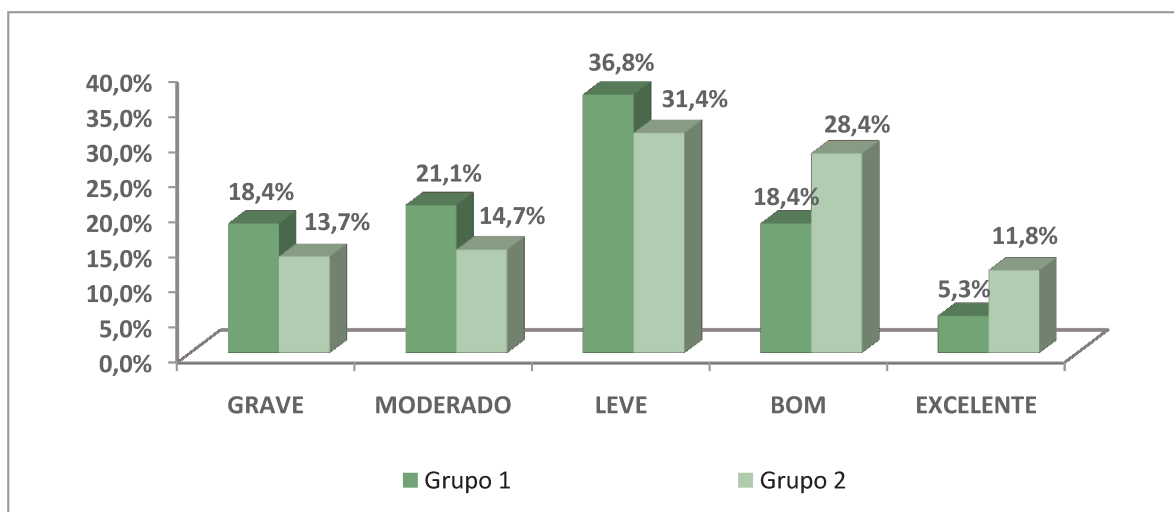


Figura 30: Classificação da Gravidade do Escore de Schwachman dos pacientes dos grupos I e II. (Grupo I – calculado para 38/50 pacientes. Grupo II – calculado para 102/134 pacientes).

Escore de Bhalla

No Grupo I, foi possível realizar o escore de Bhalla em 35/50 (70,0%) pacientes e no grupo II em 102/134 (76,1%). O total de pontos do escore variou entre 0 e 23, e 0 e 25 nos grupos I e II, respectivamente. A média de pontos grupo I foi de 9,9 ($\pm 5,729$, mediana=9,0). No grupo II, a média de pontos foi de 7,9 ($\pm 5,826$, mediana=7,0). A avaliação entre as médias do total de pontos do escore de Bhalla mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II ($p < 0,05$), pelo teste de Mann –Whitney.

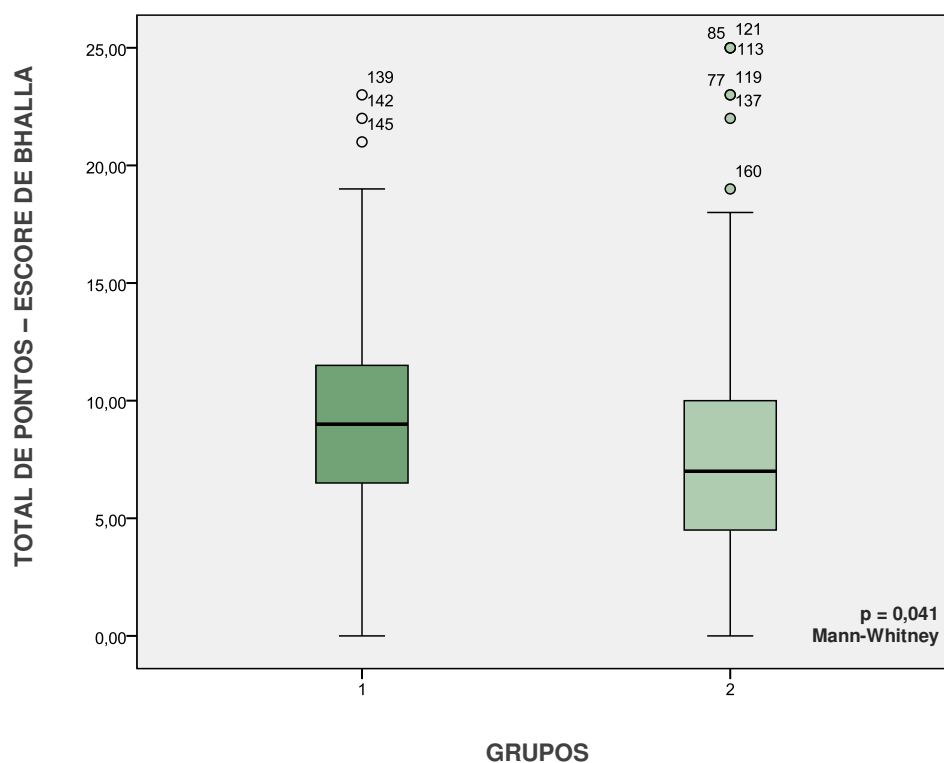


Figura 31: Distribuição de pontos do Escore de Bhalla nos grupos I e II.
Teste de Mann-Whitney: $p=0,041$

Alguns parâmetros analisados apresentaram o dobro ou maior frequência no grupo I em relação ao grupo II, no que se refere à gravidade. A Gravidade da bronquiectasia teve pontuação 2 ou 3 (moderada ou grave), em 65,7% dos pacientes do grupo I e em 36,45% dos pacientes do grupo II. O espessamento peribrônquico teve pontuação 2 ou 3 em 60,0% dos pacientes do grupo I e em 35,51% dos pacientes do grupo II. A extensão das bronquietasias apresentou pontuação 2 ou 3 em 42,86% e 21,5% nos grupos I e II, respectivamente. No que se refere às generalidades da árvore bronquial envolvida, o grupo I apresentou pontuação 2 ou 3 em 22,86% dos pacientes, e o grupo II, em 14,02%.

O teste de Mann-Whitney revelou diferença estatisticamente significativa para esses 4 parâmetros ($p < 0,05$) e para os demais $p = \text{NS}$ (tabelas 16 e 17).

ESCORE DE BHALLA	GRUPO 1									
	0		1		2		3		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Gravidade da bronquiectasia	3	8,57%	9	25,71%	19	54,29%	4	11,43%	35	100,00%
Espessamento peribrônquico	3	8,57%	11	31,43%	17	48,57%	4	11,43%	35	100,00%
Extensão da bronquiectasia (Nº segmentos BP)	3	8,57%	17	48,57%	12	34,29%	3	8,57%	35	100,00%
Extensão das rolhas de muco (Nº segmentos BP)	12	34,29%	15	42,86%	6	17,14%	2	5,71%	35	100,00%
Abscessos / saculações (Nº segmentos BP)	21	60,00%	10	28,57%	4	11,43%	0	0,00%	35	100,00%
Gen. da div. Bronq. envolvida (bronquiectasias/rolhas)	5	14,29%	22	62,86%	4	11,43%	4	11,43%	35	100,00%
Número de bolhas	28	80,00%	3	8,57%	4	11,43%	0	0,00%	35	100,00%
Enfisema (Nº segmentos BP)	4	11,43%	25	71,43%	6	17,14%	0	0,00%	35	100,00%
Colapso / Consolidação	4	11,43%	24	68,57%	7	20,00%	0	0,00%	35	100,00%

Tabela 17: Distribuição da frequência de pontos dos parâmetros avaliados no escore de Bhalla nos pacientes do grupo I.

ESCORE DE BHALLA	GRUPO 2									
	0		1		2		3		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Gravidade da bronquiectasia	20	18,69%	48	44,86%	30	28,04%	9	8,41%	107	100,00%
Espessamento peribrônquico	19	17,76%	50	46,73%	31	28,97%	7	6,54%	107	100,00%
Extensão da bronquiectasia (Nº segmentos BP)	23	21,50%	61	57,01%	17	15,89%	6	5,61%	107	100,00%
Extensão das rolhas de muco (Nº segmentos BP)	48	44,86%	46	42,99%	7	6,54%	6	5,61%	107	100,00%
Abscessos / saculações (Nº segmentos BP)	72	67,29%	23	21,50%	9	8,41%	3	2,80%	107	100,00%
Gen. da div. Bronq. envolvida (bronquiectasias/rolhas)	37	34,58%	55	51,40%	10	9,35%	5	4,67%	107	100,00%
Número de bolhas	82	76,64%	16	14,95%	5	4,67%	4	3,74%	107	100,00%
Enfisema (Nº segmentos BP)	20	18,69%	70	65,42%	17	15,89%	0	0,00%	107	100,00%
Colapso / Consolidação	22	20,56%	69	64,49%	16	14,95%	0	0,00%	107	100,00%

Tabela 18: Distribuição da frequência de pontos dos parâmetros avaliados no escore de Bhalla nos pacientes do grupo II.

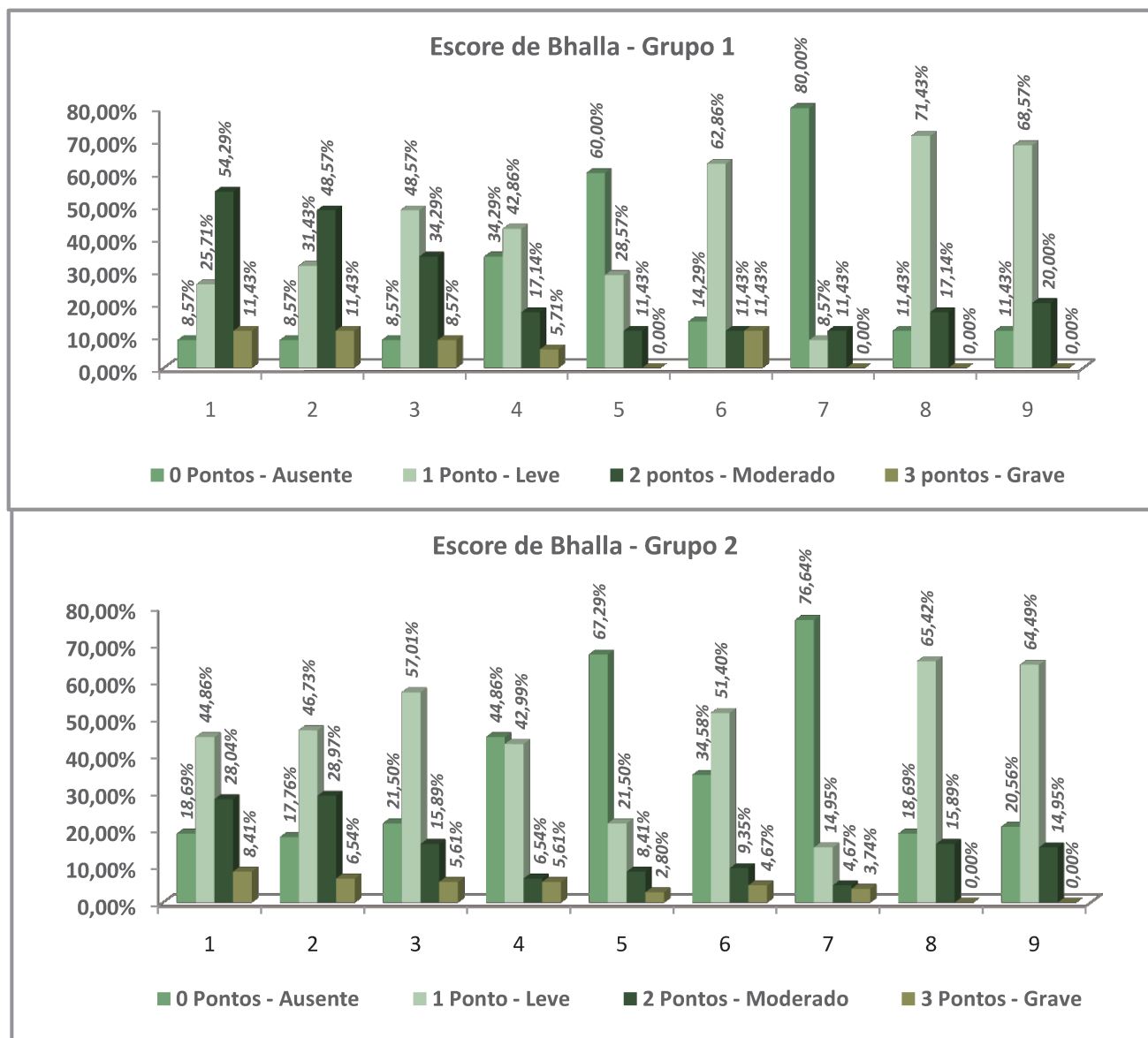


Figura 32: Distribuição da frequência de pontos dos parâmetros avaliados no escore de Bhalla nos pacientes dos grupos I e II. (1) Gravidade da bronquiectasia, (2) Espessamento peribronquico, (3) Extensão das bronquiectasias, (4) Extensão das rolas de muco, (5) Abscessos ou saculações, (6) Generalidades da árvore bronquial envolvida, (7) Número de bolhas, (8) Enfisema, (9) Colapso/Consolidações.

Teste de Mann-Whitney: (1) $p=0,007$, (2) $p=0,013$, (3) $p=0,010$, (4) $p=0,159$, (5) $p=0,512$, (6) $p=0,020$, (7) $p=0,733$, (8) $p=0,447$, (9) $p=0,215$.

Teste de função pulmonar

O teste de função pulmonar foi realizado em 21/50 (42,0%) pacientes do grupo I e 63/134 (47,0%) pacientes do grupo II, com idade superior a 7 anos. A média da CVF(%) foi de 68,76 (dp = 22,96, mediana=67,0) e 79,27 (dp = 23,63, mediana= 84,0) nos grupos I e II, respectivamente. A média do VEF₁(%) no grupo I foi de 59,76 (dp = 25,81, mediana = 58,0) e no grupo II 71,50 (dp = 25,85, mediana = 78,0). O FEF_{25-75%} teve valor médio de 13,13 (dp = 38,08, mediana 0,9) no grupo I e 2,90 (dp = 10,55, mediana = 1,5) no grupo II. A média da relação entre VEF₁/CVF (Índice de Tiffenau) no grupo I foi de 79,45 (dp = 15,73, mediana = 81,5) e no grupo II 84,50 (dp = 13,89, mediana = 87). Os testes de Mann-Whitney entre os parâmetros avaliados e os grupos não mostraram diferenças estatisticamente significativas (p=NS).

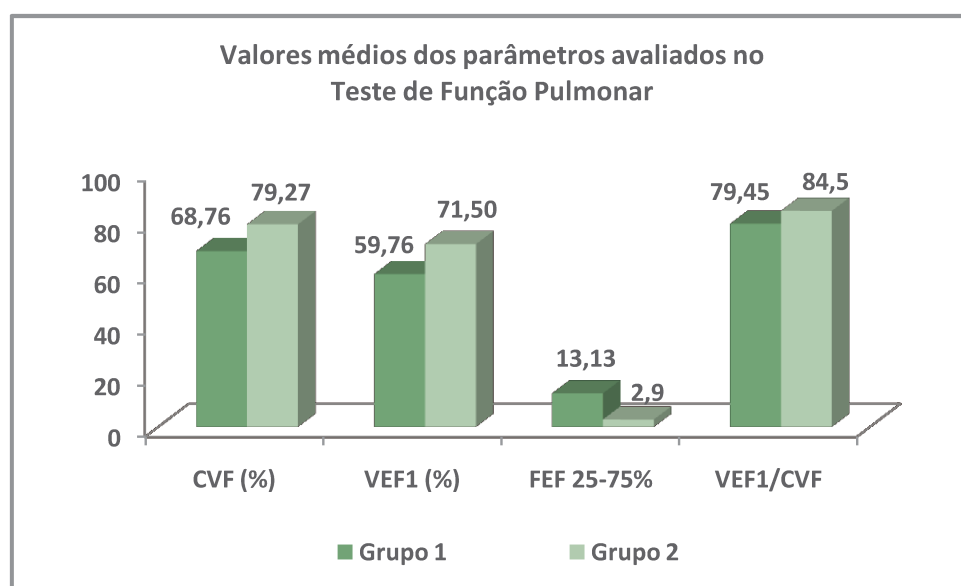


Figura 33: Comparação dos valores médios dos parâmetros avaliados no Teste de função pulmonar entre os grupos 1 e 2. Teste de Mann-Whitney – Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos: CVF (p=0,076), VEF₁ (p=0,066), FEF_{25-75%} (p=0,312), VEF₁/CVF (p=0,312).

A classificação dos tipos de distúrbios ventilatórios mostrou que em ambos os grupos, a maioria dos pacientes apresentou distúrbio ventilatório misto (DVM) com CVF reduzida, com frequência relativa de 47,6% e 30,2% nos grupos I e II, respectivamente. No grupo II, a função pulmonar apresentou-se normal para 34,9% dos pacientes quando

comparados com 19,0% no grupo I. O teste exato de Fisher mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II ($p < 0,05$).

DISTÚRBIO VENTILATÓRIO	GRUPO 1		GRUPO 2	
	n	%	n	%
Distúrbio Ventilatório Obstrutivo (DVO)	1	4,8%	15	23,8%
Distúrbio Ventilatório Restritivo (DVR)	2	9,5%	6	9,5%
Distúrbio Ventilatório Misto (DVM)	4	19,0%	1	1,6%
DVM com CVF reduzida	10	47,6%	19	30,2%
Função Pulmonar Normal	4	19,0%	22	34,9%
TOTAL	21	100%	63	100%

Tabela 19: Classificação dos distúrbios ventilatórios avaliados pelo Teste de função pulmonar nos os grupos I e II. Teste Exato de Fisher: $p = 0,02$

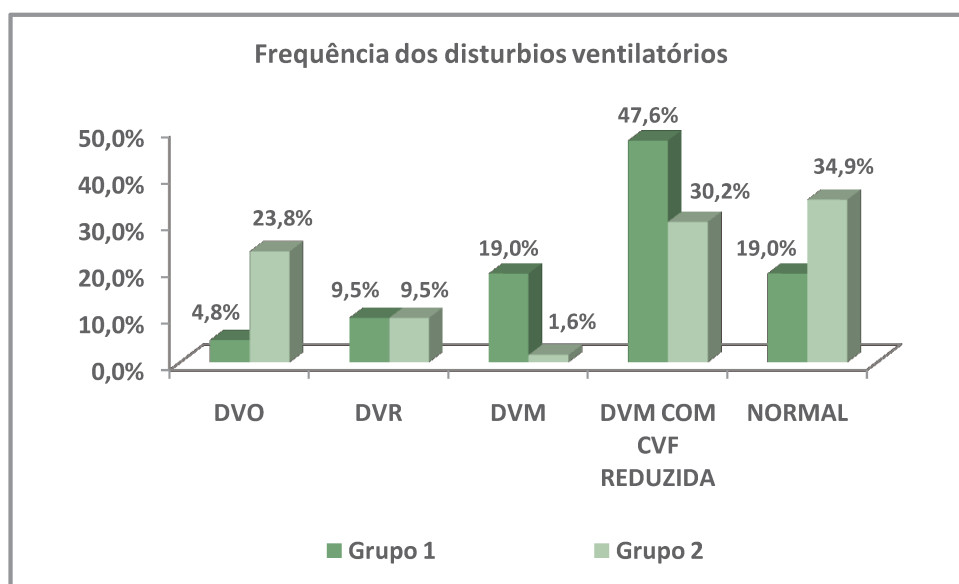


Figura 34: Classificação dos distúrbios ventilatórios avaliados pelo Teste de função pulmonar nos os grupos I e II. DVO = Distúrbio ventilatório obstrutivo, DVR = Distúrbio ventilatório restritivo, DVM = Distúrbio ventilatório misto, CVF = Capacidade vital forçada.

Avaliação Nutricional

A avaliação nutricional de peso/idade e estatura/idade (Z) foi realizada em 44/50 (88,0%) pacientes do grupo I e 106/134 (79,1%) pacientes do grupo II. O IMC foi realizado em 40/50 (80,0%) pacientes do grupo I e em 103/134 (76,9%) pacientes do grupo II. No grupo I, a média de peso (kg) foi de 29,4 (dp =16,78, mediana= 24,6), no grupo II, a média de peso (kg) foi de 37,0 (dp = 19,60, mediana = 32,95). A estatura média no grupo I foi de 128,79 (dp = 30,11, mediana=130,5) e no grupo II foi de 139,79 (dp = 29,41, mediana =140,55). O IMC médio no grupo I foi de 16,19 (dp = 2,7399, mediana = 15,85) e no grupo II 17,35 (dp = 4,075, mediana=15,9).

FAIXA ETÁRIA	PESO (Kg)				ESTATURA (cm)				IMC			
	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 1		GRUPO 2	
	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
0 a 6 anos	13,55	16	16,76	21	95,38	16	97,91	21	14,63	12	15,28	18
7 a 12 anos	22,96	7	28,54	36	122,64	7	132,44	36	15,03	7	15,83	36
13 a 20 anos	40,68	13	50,05	30	152,48	13	160,7	30	17	13	18,85	30
21 a 35 anos	48,43	8	54,85	19	162,5	8	166,98	19	18,25	8	20,04	19
TOTAL	29,4	44	37,0	106	128,79	44	139,79	106	16,19	40	17,35	103

Tabela 20: Distribuição de peso (kg), estatura (cm) e IMC ($[Kg]/m^2$) nos grupos I e II de acordo com a faixa etária.

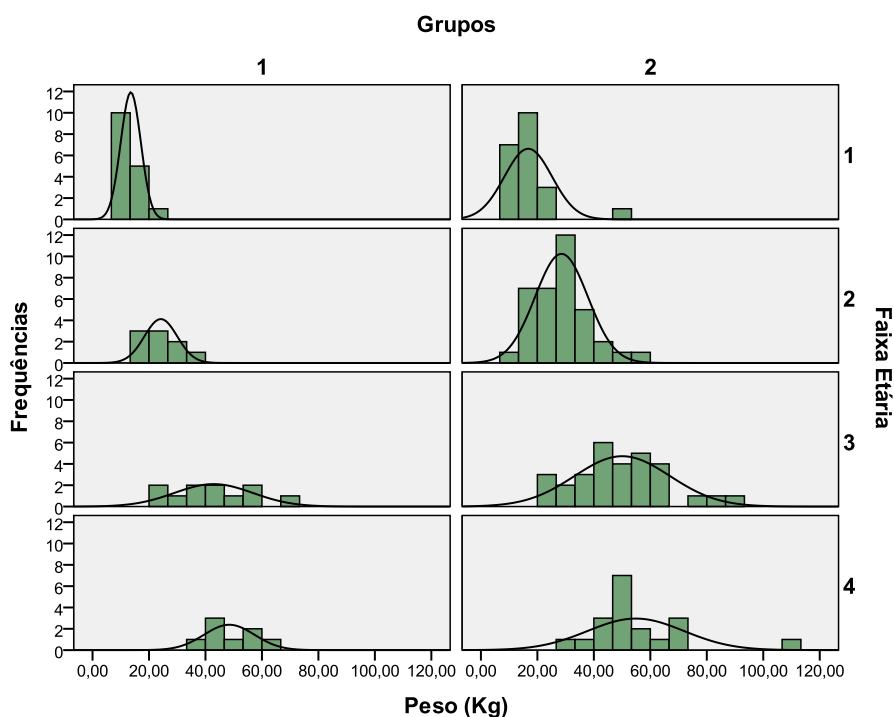


Figura 35: Distribuição de peso (kg) nos grupos I e II de acordo com a faixa etária.

Faixa etária: (1) = 0 a 6 anos, (2) = 7 a 12 anos, (3) = 13 a 20 anos, (4) 21 a 35 anos.

Em todas as faixas etárias os pacientes do grupo I apresentaram média de peso menor que os pacientes do grupo II (figura 36). O teste de Mann-Whitney mostrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de pesos dos grupos I e II ($p < 0,05$).

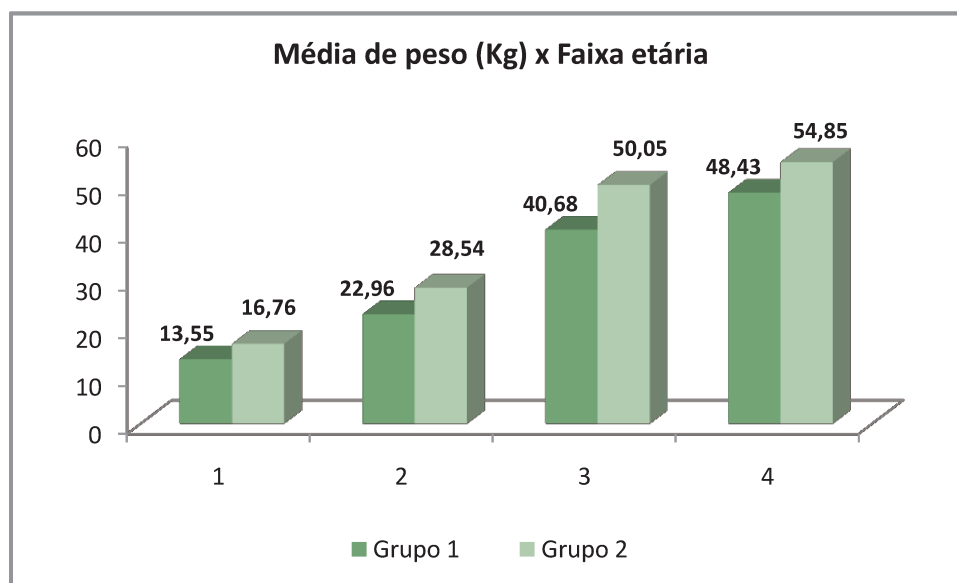


Figura 36: Comparação da média de peso (kg) entre os grupos I e II de acordo com a faixa etária. Faixa etária: (1) = 0 a 6 anos, (2) = 7 a 12 anos, (3) = 13 a 20 anos, (4) 21 a 35 anos. Diferença entre as médias de peso dos grupos I e II - Mann-Whitney ($p = 0,02$)

Em todas as faixas etárias os pacientes do grupo I apresentaram média de estatura menor que os pacientes do grupo II (figura 37). O teste de Mann-Whitney mostrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de estatura dos grupos I e II ($p < 0,05$).

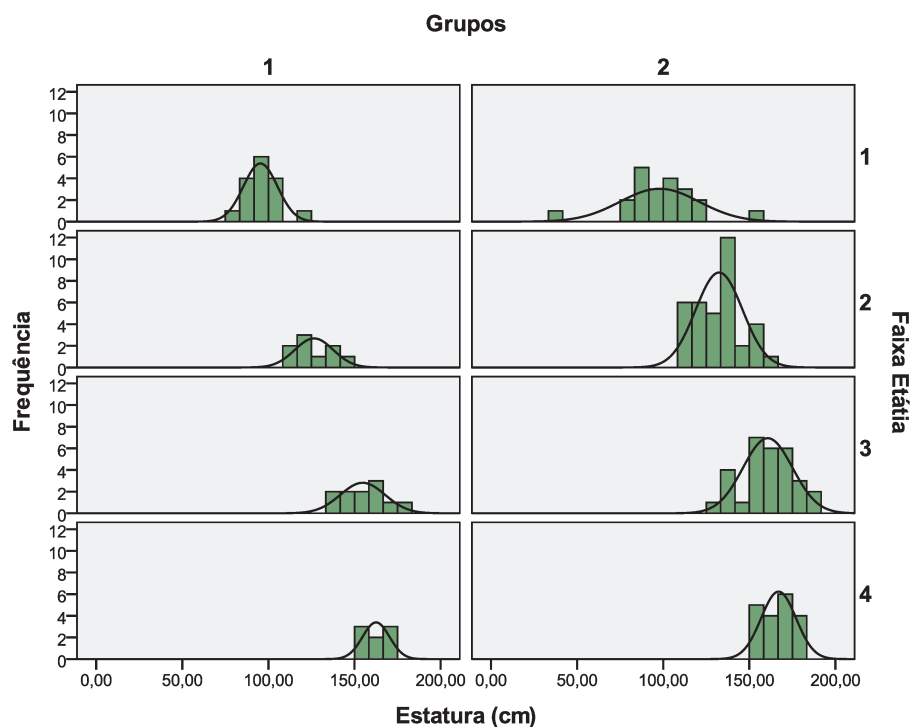


Figura 37: Distribuição de estatura (cm) nos grupos I e II de acordo com a faixa etária. Faixa etária: (1) = 0 a 6 anos, (2) = 7 a 12 anos, (3) = 13 a 20 anos, (4) 21 a 35 anos.

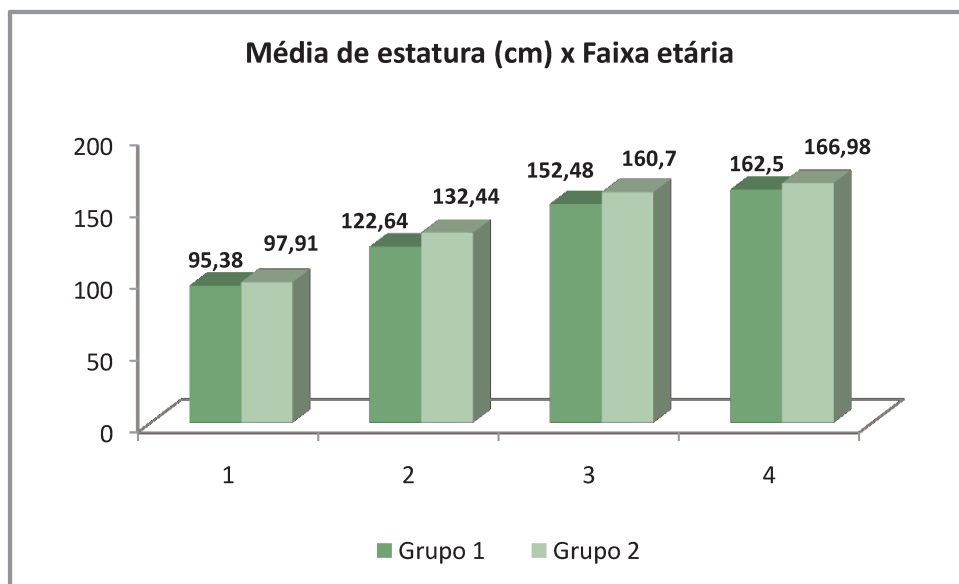


Figura 38: Comparação da média de estatura (cm) entre os grupos I e II de acordo com a faixa etária. Faixa etária: (1) = 0 a 6 anos, (2) = 7 a 12 anos, (3) = 13 a 20 anos, (4) 21 a 35 anos. Diferença entre as médias de estatura dos grupos I e II - Mann-Whitney ($p=0,02$)

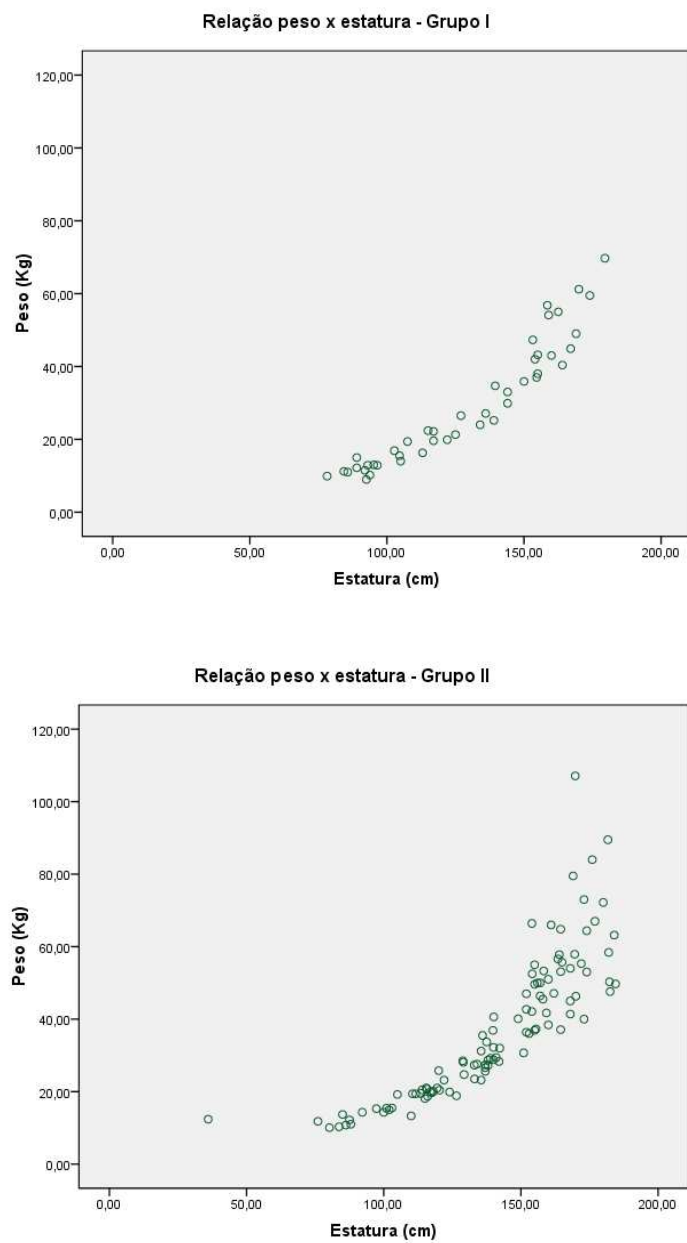


Figura 39: Comparação da relação entre as médias de peso (kg) e estatura (cm) entre os grupos I e II.

Em todas as faixas etárias os pacientes do grupo I apresentaram média de IMC menor que os pacientes do grupo II (figura 40), entretanto, o teste de Mann-Whitney mostrou não diferença estatisticamente significativa entre as médias de IMC entre os grupos I e II ($p = \text{NS}$).

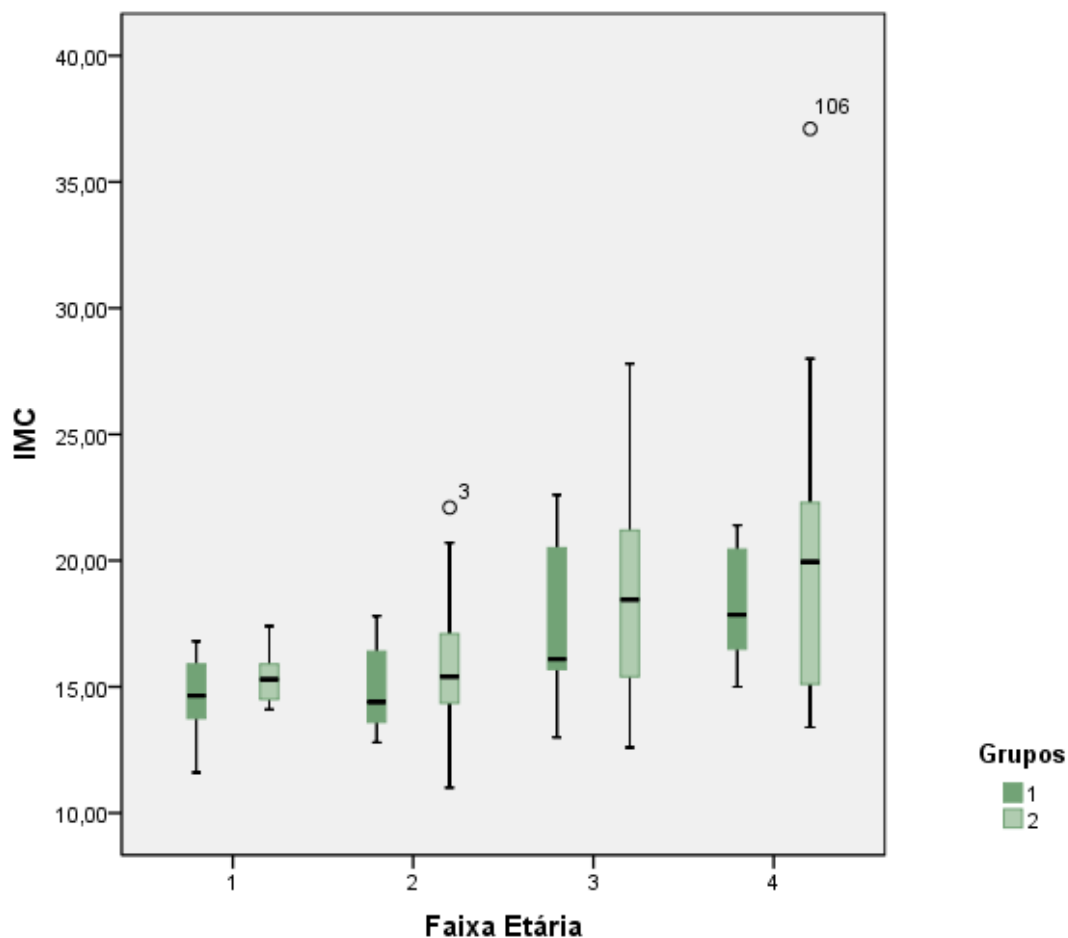


Figura 40: Comparação da média de IMC de acordo com a faixa etária nos pacientes dos grupos I e II. Faixa etária: (1) = 0 a 6 anos, (2) = 7 a 12 anos, (3) = 13 a 20 anos, (4) 21 a 35 anos.

No que se refere à gravidade do estado nutricional, foi possível realizar a avaliação pelo IMC/idade em 40/50 (80,0%) pacientes do grupo I e em 103/134 (76,9%) pacientes do grupo II. Em todas as faixas etárias, o grupo I apresentou maior frequência relativa (%) de pacientes desnutridos, quando comparado com o grupo II, entretanto, o teste exato de Fischer não mostrou diferença estatisticamente significativa (P=NS).

GRUPO 1										
FAIXA ETÁRIA	PACIENTES		DESNUTRIÇÃO		IDEAL		PRÉ-OBESIDADE		OBESIDADE	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2 a 6 anos	12	30,0%	3	7,5%	8	20,0%	1	2,5%	0	0,0%
7 a 12 anos	9	22,5%	3	7,5%	6	15,0%	0	0,0%	0	0,0%
13 a 20 anos	11	27,5%	5	12,5%	6	15,0%	0	0,0%	0	0,0%
Acima de 20 anos	8	20,0%	5	12,5%	3	7,5%	0	0,0%	0	0,0%
TOTAL	40	100,0%	16	40,0%	23	57,5%	1	2,5%	0	0,0%

Tabela 21: Classificação do estado nutricional, com base no IMC ($[Kg]/m^2$) / idade nos pacientes do grupo I.

GRUPO 2										
FAIXA ETÁRIA	PACIENTES		DESNUTRIÇÃO		IDEAL		PRÉ-OBESIDADE		OBESIDADE	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2 a 6 anos	18	17,8%	3	3,0%	15	14,9%	0	0,0%	0	0,0%
7 a 12 anos	36	35,6%	6	5,9%	25	24,8%	4	4,0%	0	0,0%
13 a 20 anos	30	29,7%	12	11,9%	14	13,9%	1	1,0%	3	3,0%
Acima de 20 anos	19	18,8%	8	7,9%	8	7,9%	1	1,0%	1	1,0%
TOTAL	103	102,0%	29	28,7%	62	61,4%	6	5,9%	4	4,0%

Tabela 22: Classificação do estado nutricional, com base no IMC ($[Kg]/m^2$) / idade nos pacientes do grupo II.

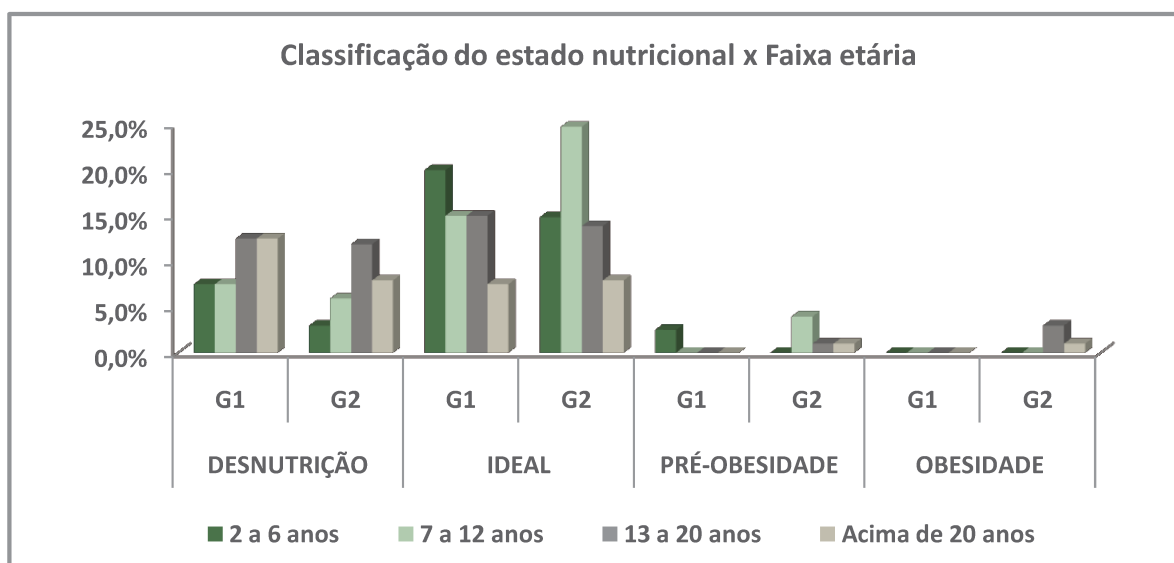


Figura 41: Classificação do estado nutricional com base no IMC ($[Kg]/m^2$) / idade nos pacientes dos grupos I e II por faixa etária. G1 = Grupo 1, G2 = Grupo 2. Teste exato de Fischer: $p=0,466$.

Identificação dos microrganismos

Entre os pacientes do grupo I, foi possível recuperar cepas isoladas de amostras do trato respiratório de 32/50 (64,0%) para a realização dos testes bioquímicos convencionais padronizados no estudo, identificação sistemática pelo Vitek e determinação do genótipo por PCR ou sequenciamento do gene *recA*. A quantidade de amostras/paciente variou entre 1 e 41. A identificação das cepas de *CBc* isoladas dos 18 pacientes para os quais não foi possível resgatar as cepas, foi realizada pelo laboratório de rotina do hospital, por meio de testes bioquímicos convencionais ou pelo Vitek®1, porém os resultados não foram utilizados para fins de comparação, por apresentarem heterogeneidade de métodos. Entre estes 18 pacientes, 2 casos foram de infecção crônica pelo *CBc*. Ocorreu o óbito de um dos pacientes (*com quadro clínico de Síndrome cepacia*) antes do início da coleta de amostras e o outro paciente deixou de ser acompanhado no HC da Unicamp. Os outros 16 pacientes apresentaram colonização aguda (com uma única cepa isolada) ou intermitente, porém as cepas não foram recuperadas no período do estudo.

Foram obtidas 157 cepas de *CBc* dos 32 pacientes. A identificação fenotípica padronizada neste estudo, utilizando testes bioquímicos convencionais, foi realizada para 154/157 cepas (98,1%). As outras 3 cepas não foram testadas por não apresentarem crescimento após o descongelamento. Todas as cepas apresentaram motilidade positiva e habilidade em crescer nos meios BCSA e MacConkey. Apenas 46,1% das cepas apresentaram capacidade de crescimento em meio BHI à temperatura de 42°C e nenhuma cepa cresceu em meio BHI com 6,5% de NaCl. Todas as cepas analisadas apresentaram incapacidade de descarboxilar a arginina. A habilidade de descarboxilar os aminoácidos lisina e ornitina apresentou resultados variáveis entre as cepas, sendo que, na maioria dos casos, o microrganismo foi capaz de descarboxilar somente um dos dois aminoácidos, entretanto, em 33/154 (21,4%) dos casos as provas apresentaram resultados positivos para ambos os testes. Com relação à utilização de carboidratos, 100% das cepas foram capazes de utilizar a glicose pela via oxidativa, com produção de ácidos, entretanto, o resultado das demais provas de utilização dos carboidratos maltose, lactose, sacarose e xilose foi variável entre as cepas. O teste de produção de oxidase foi positivo para a maioria das cepas (87,0%). O PYR foi positivo somente para 3,9% das cepas. 47,4% das cepas apresentaram capacidade de reduzir o nitrato à nitrito e nenhuma foi capaz de reduzir o nitrito à gás (tabela 22).

TESTES BIOQUÍMICOS	NÚMERO DE CEPAS COM RESULTADO POSITIVO	%
Motilidade	154	100,0%
Crescimento em BCSA	154	100,0%
Crescimento em MC	154	100,0%
OF Glicose – oxidativo	154	100,0%
Lisina	145	94,2%
Oxidase	134	87,0%
ONPG	127	82,5%
Liquefação de Gelatina	118	76,6%
OF Maltose – oxidativo	110	71,4%
OF Lactose – oxidativo	101	65,6%
Sem pigmento	97	62,9%
OF Sacarose – oxidativo	93	60,4%
Hidrólise de Esculina	78	50,6%
Redução de NO ₂ - NO ₃	73	47,4%
Crescimento à 42°C	71	46,1%
OF Xilose – oxidativo	70	45,5%
Ornitina	63	40,9%
Pigmento amarelo	41	26,6%
Pigmento marrom	16	10,4%
PYR	6	3,9%
Arginina	0	0,0%
NO ₃ – gás	0	0,0%
Crescimento em NaCl 6,5%	0	0,0%

Tabela 23: Testes bioquímicos convencionais para a identificação de 154 cepas de *CBC* de 32 pacientes. MC = MacConkey, BCSA=*Burkholderia cepacia selective Agar*. ONPG= Orto-2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, OF=oxidação-fermentação, PYR= pyrrolidonil arilamidase

O Vitek2® Compact (BioMérieux) identificou corretamente 112/157 das cepas testadas (71,3%). Entre as cepas identificadas incorretamente, houve o predomínio de *Sphingomonas paucimobilis*, 12/157 cepas (7,6%). O equipamento não identificou 16/157 cepas (10,2%) (Tabela 23).

Identificação Vitek® 2	n	%
<i>Complexo Burkholderia cepacia</i>	112	71,3%
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	12	7,6%
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2	1,3%
Grupo <i>Moraxella</i>	2	1,3%
Complexo <i>B. cepacia</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>P.putida</i>	1	0,6%
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	0,6%
<i>Acinetobacter</i> / <i>Aeromonas</i>	1	0,6%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0,6%
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	0,6%
<i>Alcaligenes f. faecalis</i>	1	0,6%
<i>B. pseudomallei</i> / <i>P. aeruginosa</i> / <i>P. putida</i>	1	0,6%
<i>Escherichia coli</i>	1	0,6%
<i>Oligella ureolytica</i>	1	0,6%
<i>P. luteola</i> / <i>Cupriavidus pauculus</i>	1	0,6%
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0,6%
<i>Serratia odorifera</i>	1	0,6%
<i>S. paucimobilis</i> / <i>Aeromonas sobria</i>	1	0,6%
Não identificou	16	10,2%
TOTAL	157	100,0%

Tabela 24: Identificação de cepas do *CBc* pelo Vitek®2 (BioMérieux)

O teste de identificação molecular por meio de PCR e seqüenciamento de DNA foram realizados para as 157 cepas. A amplificação do gene *recA* com os primers BCR1 e BCR2, para a caracterização do Complexo *Burkholderia cepacia* ocorreu para 116/157 cepas (73,8%), que foram utilizadas para a reação de *nested*-PCR, realizada com primers específicos para cada um dos genômeros do *CBc*. A amplificação direta com o DNA genômico, com os primers espécie-específicos ocorreu para as 129/157 cepas (82,1%). O número é superior ao obtido na amplificação do gene *recA* para a caracterização do *CBc*, pois 13 cepas apresentaram resultado negativo para o *recA*, mas quando submetidas ao PCR espécie-específico apresentaram resultado positivo, permitindo a identificação do genômero.

Na determinação do genômero, quando comparados os métodos PCR direto com o DNA genômico e *nested*-PCR, o resultado foi concordante entre os dois métodos utilizados para a determinação do genômero em 93/116 (80,1%), e divergente em 18/116 (15,5%), onde em 13/116 cepas (11,2%) o *nested*-PCR apresentou resultado positivo e o PCR com o DNA genômico apresentou resultado negativo, e em 5/116 cepas (4,3%)

ocorreu o contrário. Em 5/116 cepas (4,3%) os resultados foram negativos para ambos os métodos.

O seqüenciamento de DNA, com os primers BCR3 e BCR4 foi realizado para 38/157 cepas (24,2%) com reações de PCR inconclusivas, e permitiu a identificação do genômico de 22/157 cepas (14,0%). O resultado do seqüenciamento foi inconclusivo para 16/157 cepas (10,2%).

Teste de especificidade dos primers BCR1 e BCR2

O teste de especificidade dos Primers com 17 cepas-padrão do *CBc* e outros 35 bacilos Gram negativos não fermentadores mais comumente isolados em amostras de pacientes com FC, e apontados como os mais envolvidos em identificações errôneas, mostrou 100% de especificidade. A amplificação ocorreu somente entre os membros do *CBc*, e a reação foi negativa para os demais microrganismos, mostrando que os primers BCR1 e BCR2 são específicos para a caracterização do Complexo *Burkholderia cepacia*, e não apresentam reação cruzada com outros microrganismos (figura 43).

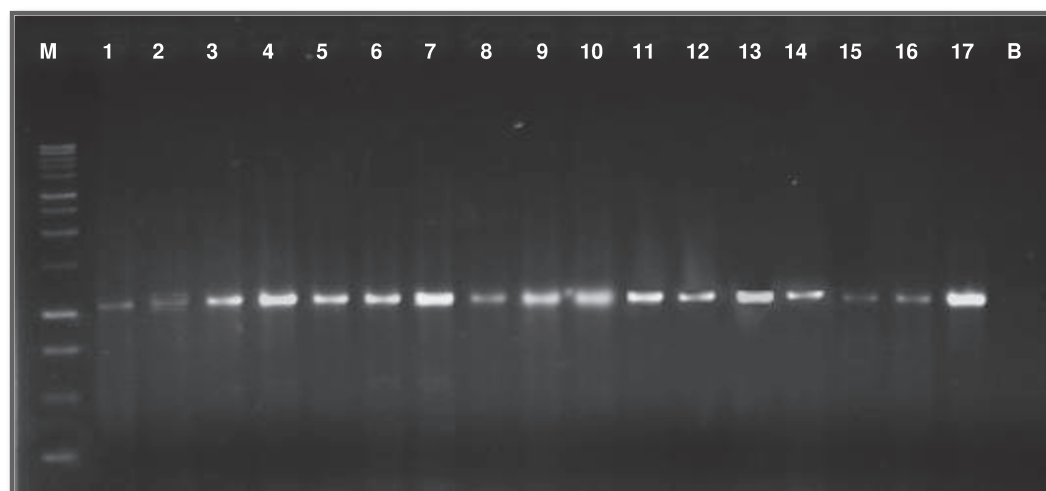


Figura 43: Teste de especificidade dos primers BCR1 e BCR2 para caracterização do Complexo *Burkholderia cepacia* com cepas-padrão do *CBc* (1040 pb). M – Ladder 1 Kb, Fermentas, 1 – *Burkholderia cepacia* (LMG 1222), 2 – *Burkholderia cepacia* (LMG 17997), 3 – *Burkholderia multivorans* (LMG 13010), 4 – *Burkholderia multivorans* (LMG 18822), 5 – *Burkholderia cenocepacia* (LMG 16654), 6 – *Burkholderia cenocepacia* - IIIA (LMG 16656), 7 – *Burkholderia cenocepacia* - IIIB (LMG 18829), 8 – *Burkholderia cenocepacia* - IIIC (LMG 19230), 9 – *Burkholderia cenocepacia* - IIID (LMG 21462), 10 – *Burkholderia stabilis* (LMG 14291), 11 – *Burkholderia stabilis* (LMG 14294), 12 – *Burkholderia vietnamiensis* (LMG 10929), 13 – *Burkholderia vietnamiensis* (LMG 18836), 14 – *Burkholderia dolosa* (LMG 18943), 15 – *Burkholderia ambifaria* (LMG 19182), 16 – *Burkholderia anthina* (LMG 16670), 17 – *Burkholderia pyrrocinia* (LMG 14191), B = Branco.

Os testes de especificidade dos primers, realizados individualmente para cada um dos genômovares mostraram 100% de especificidade, ou seja, cada primer é específico para o respectivo genômovar para o qual foi desenhado. As reações de PCR produziram fragmentos de acordo com os tamanhos esperados para cada uma das combinações de primers empregados (figura 44). Na maioria dos casos, foi observada a presença de produtos de amplificações inespecíficas, de tamanhos diversos. Testes com variação da temperatura de anelamento, realizados individualmente com cada um dos primers e com as cepas-padrão dos genômovares, permitiram verificar qual a temperatura mais adequada para o pareamento dos primers, minimizando o problema. Não foram realizados os testes com os primers para os genômovares IIIC, IIID e IX por falta de primers.

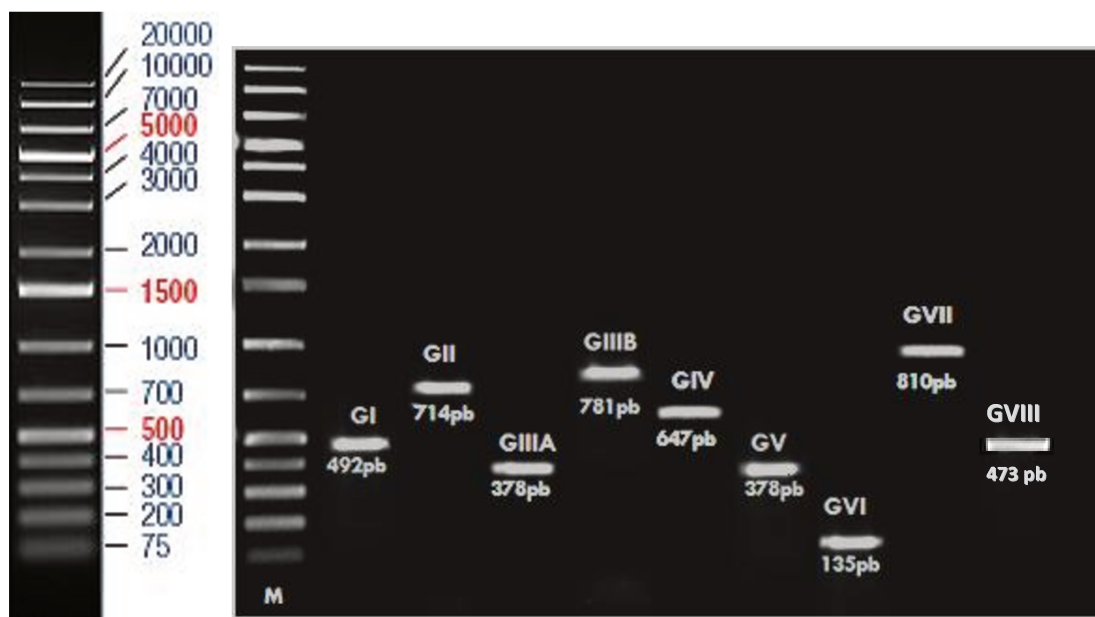


Figura 44: Teste de especificidade dos primers BCR1 e BCR2 para caracterização do Complexo *Burkholderia cepacia* com cepas-padrão do CBc. M – Ladder 1 Kb plus, Fermentas.

Genômovar I – *Burkholderia cepacia* (LMG 1222), Genômovar II – *Burkholderia multivorans* (LMG 18822), Genômovar IIIA – *Burkholderia cenocepacia* (LMG 16654), Genômovar IIIB – *Burkholderia cenocepacia* (LMG 18829), Genômovar IV – *Burkholderia stabilis* (LMG 14294), Genômovar V – *Burkholderia vietnamiensis* (LMG 10929), Genômovar VI – *Burkholderia dolosa* (LMG 18943), Genômovar VII – *Burkholderia ambifaria* (LMG 19182), Genômovar VIII – *Burkholderia anthina* (LMG16670).

A análise das sequências do gene *recA* com as cepas-padrão de cada um dos genomovares mostrou 100% de confiabilidade no método e equipamentos (figura 45).

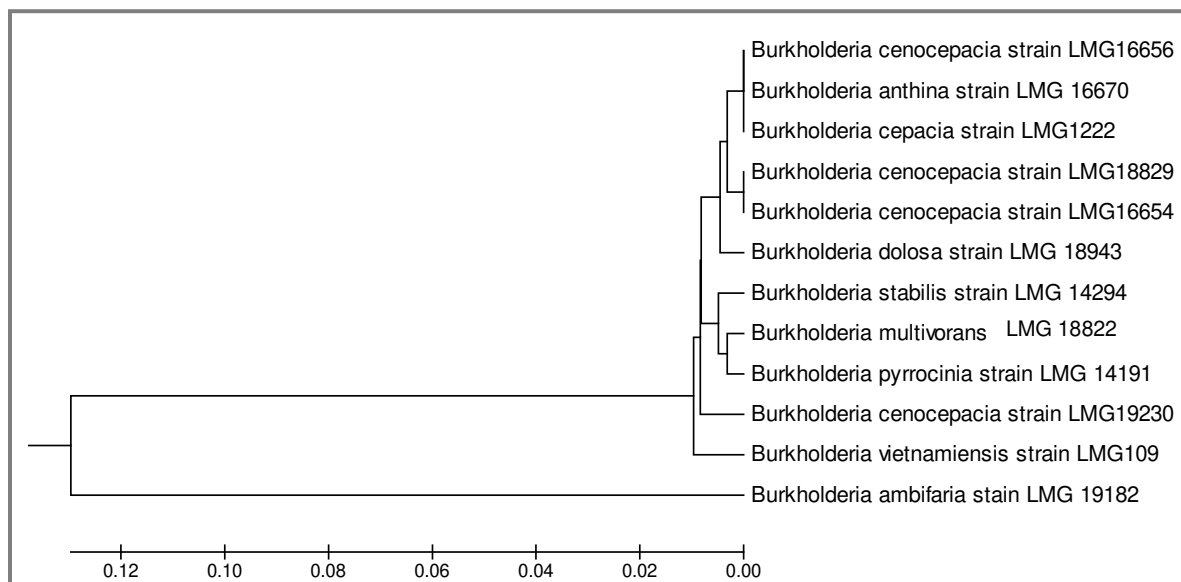


Figura 45: Árvore filogenética construída a partir do sequenciamento do gene *recA* de cepas-padrão dos genomovares do *CBc*

Prevalência dos genômovares do Complexo *Burkholderia cepacia*

Os genômovares mais prevalentes foram a *Burkholderia multivorans* (30,0%), seguido de *Burkholderia cepacia* (24,0%), *Burkholderia cenocepacia* IIIA (10,0%), *Burkholderia cenocepacia* IIIB (2%) e *Burkholderia vietnamiensis* (2,0%). Os genômovares IV, VII, VIII e IX não foram identificados em nenhuma amostra. Não foi possível determinar o genômovar de cepas de 6/32 pacientes, por apresentarem PCR ou seqüenciamento de DNA com resultados inconclusivos.

GENOMOVAR		N.º PACIENTES	%
I	<i>B. cepacia</i>	12	24,00%
II	<i>B. multivorans</i>	15	30,00%
IIIA	<i>B. cenocepacia</i>	5	10,00%
IIIB	<i>B. cenocepacia</i>	1	2,00%
IV	<i>B. stabilis</i>	ND	0,00%
V	<i>B. vietnamiensis</i>	1	2,00%
VI	<i>B. dolosa</i>	ND	0,00%
VII	<i>B. ambifaria</i>	ND	0,00%
VIII	<i>B. anthina</i>	ND	0,00%
IX	<i>B. pyrrocinia</i>	ND	0,00%

Tabela 25: Prevalência dos genômovares do CBc em 32 pacientes.

OBS: Em alguns pacientes foi observada a presença de 2 ou mais genômovares.

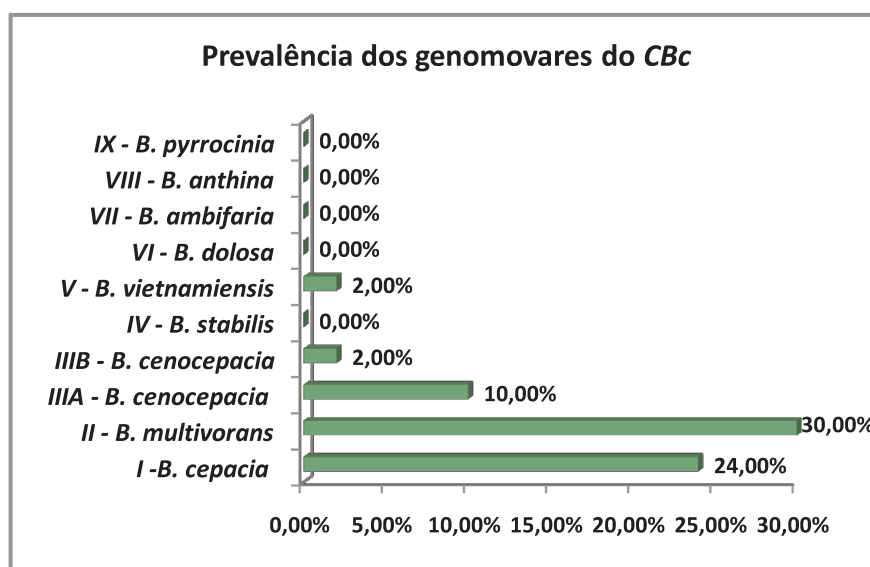


Figura 46: Prevalência dos genômovares do CBc em 32 pacientes.

OBS: Em alguns pacientes foi observada a presença de 2 ou mais genômovares.

Foi observada a presença de mais de um genômovar em 7/50 pacientes (14,0%), sendo que em 2/7 foi identificada a presença dos genômovares I e II (EAG e NRP), em 2/7 foi identificada a presença dos genômovares II e IIIA (HDCN e LOD), em 1/7 foi identificada a presença dos genômovares I e IIIB (RC), em 1/7 foi identificada a presença dos genômovares I e V e em 1/7 foi identificada a presença dos genômovares I, II e IIIA (LFSA). (tabela 25). Todos os pacientes que apresentaram mais de um genômovar apresentam infecção crônica pelo *CBc*.

PACIENTE	IDADE	SEXO	MUTAÇÕES DA CFTR	GENÔMOVARES DO <i>CBc</i>	OUTROS PATÓGENOS
EAG	4	F	dF508/dF508	<i>I - Bc / II - Bm</i>	AX+HI+LEV+PANM+SA
HDCN	1	M	G542X/Outra	<i>II - Bm / IIIA - Bcenocep</i>	LEV+PAM+PANM+SA
LFSA	11	F	dF508/dF508	<i>I - Bc / II - Bm / IIIA - Bcenocep</i>	PAM+PANM+SA
LOD	19	M	dF508/dF508	<i>II - Bm / IIIA - Bcenocep</i>	ASP+LEV+PAM+PANM
NRP	14	F	dF508/Outra	<i>I - Bc / II - Bm</i>	AX+ASP+HI+LEV+PAM+SA
RC	27	M	dF508/Outra	<i>I - Bc / IIIB - Bcenocep</i>	ASP+PAM+PANM+SA
TVP	26	M	dF508/dF508	<i>I - Bc / V - Bv</i>	AX+ASP+PAMc+PANMc+SA+SM

Tabela 26: Pacientes infectados por mais de um genômovar do *CBc*. AX = *Achromobacter xylosoxidans*, HI = *Haemophilus influenzae*, LEV = Leveduras, PANM = *Pseudomonas aeruginosa* (não mucóide), PAM = *Pseudomonas aeruginosa* (mucóide), SA= *Staphylococcus aureus*, SM = *Stenotrophomonas maltophilia*, ASP = *Aspergillus* spp.

Nos pacientes HDCN, LOD, EAG e RC, os genômovares foram isolados em amostras distintas, com intervalo médio de 3 meses entre as coletas, sendo que não é possível afirmar se houve substituição de um genômovar pelo outro ou se a presença dos genômovares é intermitente devido ao pequeno número de cepas recuperadas destes pacientes. Na paciente NRP foi observado que em alguns casos ocorre a presença de 2 genômovares na mesma amostra, porém, na maioria das amostras há a presença de apenas um genômovar ou o outro, que apresentam aparecimentos intermitentes ou alternados, com predomínio do genômovar II – *Burkholderia multivorans*. No paciente TVP há o predomínio do genômovar I – *Burkholderia cepacia*, entretanto, em amostras interminetes há o aparecimento concomitante do genômovar V – *Burkholderia vietnamiensis*. Na paciente LFSA foi observada a presença de dois ou três genômovares na mesma amostra.

PACIENTE		2006	2007	2008	2009
1	EAG	-	-	-	<i>Burkholderia multivorans</i>
		-	-	-	<i>Burkholderia cepacia</i>
2	HDCN	-	-	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA	<i>Burkholderia multivorans</i>
		-	-		<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA
3	LFSA	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA	<i>Burkholderia cepacia</i>
			<i>Burkholderia multivorans</i>		<i>Burkholderia multivorans</i>
			<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA		<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA
4	LOD	-	-	<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>
		-	-	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIA	
5	NRP	<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
			<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>
6	RC	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i> IIIB	-	-
7	TVP	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
			<i>Burkholderia vietnamiensis</i>		

Tabela 27: Pacientes com isolamento de mais de um genótipo do *CBC* ao longo do período do estudo.

Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Os testes de sensibilidade por disco difusão foram realizados para as 157 cepas dos 32 pacientes. A droga mais ativa *in vitro* foi o Meropenem, com 92% das cepas sensíveis (145/157), seguida da Ceftazidima, com 83% das cepas sensíveis (130/157), Minociclina com 65% das cepas sensíveis (102/157) e Sulfametoxazol+trimetoprim, com 46% das cepas sensíveis (73/157).

ANTIBIÓTICO	S		I		R		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ceftazidima	130	83%	2	1%	25	16%	157	100%
Meropenem	145	92%	2	1%	10	6%	157	100%
Minociclina	102	65%	6	4%	49	31%	157	100%
Sulfametoxazol+Trimetoprim	73	46%	0	0%	84	54%	157	100%

Tabela 28: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *CBC*.

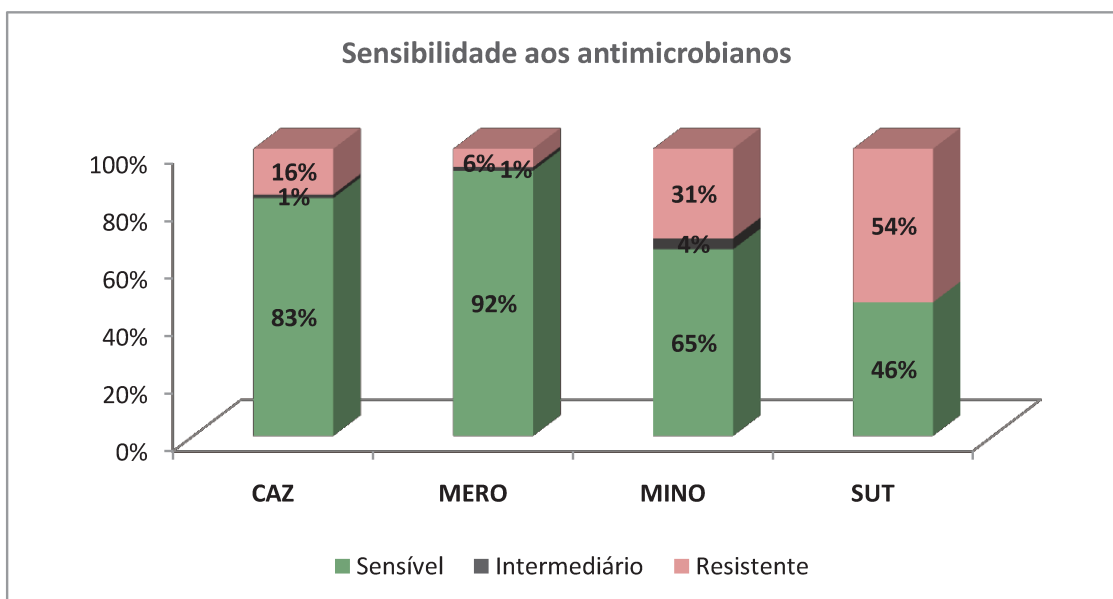


Figura 47: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *CBc*. CAZ=Ceftazidima, MERO=Meropenem, MINO=Minociclina, SUT=Sulfametoxazol+Trimetoprim.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a prevalência de colonização/infecção por microrganismos do Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com FC neste Centro de referência, de 22,5% (50/222 pacientes), é significativamente superior a prevalência descrita em outros Centros. Dois outros estudos foram realizados em período anterior em nosso Centro. Em um deles, realizado no período de 1990 – 2000, sem o uso de meio seletivo, foi evidenciada a prevalência de 5,2% ⁽¹⁷⁴⁾. Em outro estudo, realizado no período de 2001 – 2004, foi detectada a prevalência de 3,9% nos 2 primeiros anos de estudo, em que não houve a utilização do meio seletivo, que triplicou, passando para 12,0% nos 2 anos finais, quando foi introduzido o BCSA ⁽¹⁶²⁾. Entre os poucos estudos brasileiros, em um trabalho recente, realizado na cidade de São Paulo (SP), foi verificada a prevalência de 11,4% (16/140 pacientes) ⁽⁸⁹⁾. Em Porto Alegre (RS), um estudo realizado no período de 09/2004 à 12/2005, detectou a prevalência de 25% ⁽¹⁹⁸⁾, entretanto, em outro estudo, realizado no período de 2007 – 2009, foi detectada a prevalência de 10,6% (26/244 pacientes) ⁽¹⁹⁹⁾, mostrando informações divergentes. No Recife, foi detectada a prevalência de 29,2% ⁽²⁰⁰⁾.

Estudos realizados em outros países mostraram uma prevalência de 2,9% em pacientes americanos ⁽²⁾, variando entre 7,0 % - 10,8% em pacientes italianos ^(70,72,197,201), 7,1 – 10,4% em pacientes portugueses ⁽⁵⁸⁾. Estudos no Canadá mostraram uma prevalência variando entre 5,0 – 25,0%, dependendo da região, com maior prevalência no leste do país e menor prevalência em Quebec ^(91,202).

A evolução progressiva na prevalência do Complexo *Burkholderia cepacia*, apresentada neste estudo, passando de 10,5% antes do ano de 2005 para 22,5% no ano de 2009 pode estar relacionada com a introdução do meio de cultura seletivo para o Complexo *Burkholderia cepacia* (BCSA) no início do ano de 2007, melhoria na qualidade dos métodos de identificação e diligência da procura. Outros estudos encontraram aumentos semelhantes quando foi utilizado o meio seletivo. Em outro estudo realizado em nosso Centro, foi detectada a prevalência de 3,9% sem a utilização do meio seletivo, que triplicou, passando para 12,0%, quando foi introduzido o BCSA ⁽¹⁶²⁾. Um estudo realizado na cidade de São Paulo, Silva Filho e col. (2002) ⁽¹³⁶⁾, encontraram um aumento da prevalência após a cultura com meio seletivo (4,2%), comparando com o período anterior em que o cultivo era realizado em meio não seletivo (0,8%) ⁽¹³⁶⁾.

Há uma grande variabilidade na distribuição dos genovares do Complexo *Burkholderia cepacia* ao redor do mundo. Sabe-se que todos os genovares são capazes de provocar infecções em pacientes com FC, mas existem muitas diferenças

com relação a prevalência de acordo com cada região. Neste estudo, foi possível determinar o genômico de cepas do CBc de 26/50 pacientes. Os resultados mostram a maior prevalência do genômico II – *Burkholderia multivorans* (30,0%), seguido do genômico I – *Burkholderia cepacia* (24,0%), genômico IIIA – *Burkholderia cenocepacia* (10,0%), genômico IIIB – *Burkholderia cenocepacia* (3,0%) e genômico V – *Burkholderia vietnamiensis* (2,0%). Os demais membros do Complexo *Burkholderia cepacia* não foram encontrados nesta casuística e não foi possível determinar o genômico de cepas do CBc de 12,0% dos pacientes (6/50), em decorrência de limitações da metodologia (discutido adiante).

A distribuição dos genômicos em nosso Centro mostrou-se semelhante ao que pode ser observado em outros centros, entretanto, na maioria deles, há o predomínio dos genômicos III – *Burkholderia cenocepacia*, seguido do genômico II – *Burkholderia multivorans*, representando cerca de 39 – 94% e 0 – 53% dos isolados de CBc, respectivamente, em pacientes com fibrose cística ^(59,69-71,73,74,81,82,88-97).

Um estudo realizado na Bélgica mostrou uma prevalência de 57,8% de *Burkholderia multivorans* e 27,3% de *Burkholderia cenocepacia* ⁽²⁰³⁾. Na França, também foi observado o predomínio do genômico II – *Burkholderia multivorans* (53,0%) seguido do genômico III – *Burkholderia cenocepacia* (45,0%) ⁽⁹³⁾. Já em países como Austrália ^(73,88), Canadá ^(91,92), Estados Unidos ^(59,97,204), República Tcheca ⁽⁷¹⁾, Reino Unido ^(82,96), Portugal ^(74,95), Itália ^(69,70,72,81,94), e outros países da Europa ⁽⁸²⁾, a *Burkholderia cenocepacia* é o genômico mais comumente encontrado entre os pacientes com FC, sendo que a prevalência é variável entre 39,0% e 94,0% dependendo da região ^(59,69-71,73,74,81,82,88-97).

No Brasil, há poucos estudos sobre a distribuição dos genômicos do CBc, sendo que um estudo realizado na cidade de São Paulo apresentou o predomínio de 53% de *Burkholderia cenocepacia*, 37,5% de *Burkholderia multivorans*, 6,2% de *Burkholderia vietnamiensis* e apenas 3,1% de *Burkholderia cepacia* (G-I) ⁽⁸⁹⁾. No Rio de Janeiro, foi observado o predomínio de 67,0% de *Burkholderia cenocepacia*, 15% de *Burkholderia vietnamiensis* e 10% de *Burkholderia multivorans* ⁽⁹⁰⁾.

Observa-se uma prevalência muito baixa dos genômicos IV, V, VI, VII, VIII e IX (<10%) na maioria dos centros, exceto na Eslováquia, onde o genômico mais prevalente é o IV - *Burkholderia stabilis* (54%) ⁽⁷¹⁾. Em Portugal, dois estudos também mostram uma prevalência grande deste genômico, variando entre 16 – 18,2% ^(74,95). Entretanto, na maioria dos países da América, Europa e Ásia, a prevalência do genômico IV varia entre

0 e 6,7% ^(59,69,70,71,72,81,82,91,92,93,97). O genômovar V – *Burkholderia vietnamiensis* também apresenta baixa prevalência, variando entre 0 e 5,9% na maioria dos centros ^(59,70,73,81,82,88,91,92,93,97). No Brasil, estudos realizados nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo, são os que relatam uma prevalência maior deste genômovar, 6,2% ⁽⁸⁹⁾ e 15,0% ⁽⁹⁰⁾, respectivamente. Um estudo realizado na cidade de Recife, em Pernambuco também apresentou uma prevalência alta do genômovar V (18,2%), entretanto, somente 5 das 11 cepas caracterizadas como pertencentes ao CBc foram identificadas por meio de reações de PCR ⁽²⁰⁵⁾.

A prevalência do genômovar VI – *Burkholderia dolosa* também é relativamente baixa, variando entre 0 e 3,8%, descrito na Austrália (0,8%) ⁽⁸⁸⁾ e nos Estados Unidos (2,0 – 3,8%) ^(59,97). O genômovar VII – *Burkholderia ambifaria* tem sido encontrado com maior prevalência na Austrália (5,2 – 7,1%) ^(73,88), no Brasil (7,0%) ⁽⁹⁰⁾ e em um estudo na Itália (6,3%) ⁽⁹⁴⁾. Nos demais países, a prevalência é muito baixa, variando entre 0 e 1% ^(59,81,97). *Burkholderia anthina* – genômovar VIII, é muito raramente isolado em amostras de pacientes com FC ^(65,75,141). Um estudo na Itália demonstrou a prevalência de 4,3% do genômovar IX – *Burkholderia pyrrocinia* ⁽⁶⁶⁾, porém, não tem sido relatado o isolamento deste genômovar em outros centros. A prevalência de outros genômovares, na maioria dos casos não determinados, tem sido relatada em diversos centros, com prevalência entre 0 e 22,6% ^(59,71,81,88,91,92,93,94,96,97).

A presença de mais de um genômovar foi observada em 7 pacientes (14,0%). Sendo que em 2/7 foi identificada a presença dos genômovares I e II, em 2/7 foi identificada a presença dos genômovares II e IIIA, em 1/7 foi identificada a presença dos genômovares I e IIIB, em 1/7 foi identificada a presença dos genômovares I e V e em 1/7 foi identificada a presença dos genômovares I, II e IIIA. Em 4 pacientes os genômovares diferentes foram isolados em amostras distintas e em outros 3 pacientes o isolamento de mais de um genômovar ocorreu de maneira concomitante, o que pode caracterizar “co-infecção”.

Existem poucos estudos publicados acerca de co-infecção ou presença concomitante de mais de um genômovar do CBc em pacientes com FC, uma vez que esta situação é pouco comum. Entre os poucos trabalhos, um estudo na Alemanha relatou co-infecção por 2 cepas distintas do genômovar II – *Burkholderia multivorans* em um mesmo paciente que apresentava infecção crônica por este genômovar ⁽¹²⁹⁾. Em Portugal, um estudo detectou a presença de mais de um genômovar em 5 pacientes, destacando-se um caso interessante de duas irmãs conviventes em que uma apresentou a *B. cepacia* e

a outra a *B. cenocepacia* por mais de 4 anos e somente após este período a *B. cepacia* foi isolada juntamente com a *B. cenocepacia* na outra irmã, o que contrasta a idéia estabelecida de que o risco de infecção cruzada entre os doentes seja grande, entretanto, trata-se de um caso isolado ⁽²⁰⁶⁾.

No Brasil, um estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, onde foram analisadas 50 amostras de *CBc* de um único paciente no período de 4 anos consecutivos, revelou a presença dos genovares V - *Burkholderia vietnamiensis*, III - *Burkholderia cenocepacia* e II - *Burkholderia multivorans*. A *Burkholderia vietnamiensis* persistiu nas vias aéreas do paciente durante os 4 anos, exceto em três ocasiões, onde foram isolados os genovares III - *Burkholderia cenocepacia* ou II - *Burkholderia multivorans*. Análises por meio de RAPD permitiram observar que na colonização crônica pelo genovar V, tratava-se da mesma cepa ⁽²⁰⁷⁾.

Infecções ou colonizações pelo Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com FC no pré operatório estão relacionadas a piores prognósticos após o transplante pulmonar, sendo que as infecções por este agente são consideradas como contra-indicação relativa para a realização de transplantes em alguns centros, devido as altas taxas de mortalidade no pós operatório provocadas pela presença de alguns genovares do *CBc*. Um estudo em Toronto mostrou uma taxa de mortalidade de 54% de pacientes colonizados/infectados pelo *CBc* comparando-se com uma taxa de 16% em pacientes que não estavam infectados, sendo que em 67% dos casos, as mortes associadas a infecção pelo *CBc* ocorreram nos 3 primeiros meses após o transplante ⁽²⁰⁸⁾. Na Carolina do Norte, EUA, as mortes associadas a infecção pelo *CBc* ocorreram nos 6 primeiros meses após o transplante, e as taxas de mortalidade dos pacientes infectados pelo *CBc* em comparação aos não infectados foi de 33% vs 12%, respectivamente ⁽²⁰⁸⁾. Um outro estudo, também realizado na Carolina do Norte mostrou uma taxa de mortalidade de 81% vs 59% quando comparados os grupos de pacientes infectados pelo *CBc* e não infectados, respectivamente e revelou, inclusive, que em todos os casos com infecção pelo *CBc* em que houve morte no pós operatório estavam associados com a presença do Genovar III - *Burkholderia cenocepacia* ⁽²⁰⁹⁾. A maioria dos estudos relacionados com morte após transplante pulmonar aponta a *Burkholderia cenocepacia* - genovar III como grande vilão ^(210,211,212). Foi observado no Reino Unido e na França que o genovar II - *Burkholderia multivorans* não está associado a morte no pós-transplante e que a infecção por certas cepas do genovar III - *Burkholderia cenocepacia* e a *Burkholderia gladioli*, estão associadas ao mal prognóstico ^(212,213).

Entretanto, o impacto provocado por cada um dos genótipos do *CBc* ainda tem gerado muitas discussões.

A curva de distribuição de idades dos pacientes com *CBc* mostrou colonização/infecção precoces pelo *CBc* em nosso Centro, com predomínio de pacientes adolescentes, com média de idade de 12,2 anos (mediana 9,5 anos). Um estudo na Itália⁽¹⁹⁷⁾ e outro estudo em Portugal⁽²⁰⁶⁾ relataram colonização/infecção crônica nesta mesma faixa etária, entretanto, a maioria dos trabalhos nacionais e internacionais mostram colonização/infecção mais tardia, com maior predomínio de adultos jovens. Acredita-se que a colonização precoce em nossa casuística possa estar associada à infecção cruzada, pois os pacientes são atendidos sem segregação adequada nos ambulatórios clínicos, de fisioterapia respiratória e na unidade de urgência. Estudos epidemiológicos futuros, com RAPD poderão evidenciar se houve infecção cruzada entre os pacientes.

O estudo revelou que 56,0% dos pacientes apresentaram colonização aguda (ou inicial), sendo que em alguns casos o patógeno foi isolado uma única vez nas vias aéreas ao longo do período do estudo e, em outros casos, o patógeno foi isolado somente no final do estudo, e, como coleta de amostras se encerrou, não foi possível determinar se o *CBc* persistiu ou não nas vias aéreas destes pacientes. A colonização transitória (ou intermitente) foi observada em 18% dos pacientes e, em 26,0% dos pacientes foi observada a infecção crônica pelo *CBc*. Todos os pacientes crônicos foram considerados infectados, por apresentarem evidências diretas ou indiretas. Os fatores do indivíduo somados à virulência do microrganismo podem explicar tal fato. Entretanto, a presença concomitante de outros patógenos impedem que se afirme se os sinais e sintomas clínicos são provocados pelo *CBc*, pelos outros patógenos, ou por ambos. Um estudo futuro com titulação de anticorpos específicos para o *CBc*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e outros patógenos importantes na FC associado com o isolamento dos microrganismos poderá ser esclarecedor.

A média de pontos do escore de Shwachman-Kulczycki (ECSK) foi ligeiramente menor no grupo I em relação ao grupo II, entretanto, só foi observada diferença estatisticamente significativa quando foram comparados individualmente cada um dos parâmetros do escore entre os grupos e, embora todos tenham mostrado valores menores no grupo I em relação ao grupo II, a diferença estatística só foi observada em dois parâmetros: estado nutricional e atividade geral. Em outro estudo realizado em nosso centro, Alvarez e col.⁽¹⁷⁴⁾ não encontraram diferença estatística entre o ECSK e a presença de *CBc*, porém o número de casos de colonização/infecção pelo *CBc* no estudo

foi muito reduzido (n=5), o que pode ter interferido no resultado do teste. Em um estudo realizado em Porto Alegre (RS) ⁽¹⁹⁸⁾, a média de pontos de escore apresentou resultado semelhante ao observado em nossa casuística. No que se refere à classificação da gravidade do escore, também não foi observada diferença estatística, entretanto os resultados mostram que o grupo I mais grave que o grupo II.

O escore clínico de Shwachman-Kulczycki é mais antigo, porém o mais utilizado e respeitado em todo o mundo até os dias atuais. Entretanto, é muito criticado, principalmente no que se refere à sua subjetividade e globalidade de seus critérios. Outras críticas apontam para a falta de sistematização para sua aplicação, por não ressaltar a avaliação do sistema respiratório, por desconsiderar o teste de função pulmonar, complicações decorrentes da progressão da doença e por ter sido estruturado a partir de evidências clínicas em crianças ^(154,156,157,158,160,214). O escore já foi modificado por Doershuk *e col.* ⁽¹⁵⁶⁾ devido às suas limitações e subjetividade, que adaptou os parâmetros para a avaliação mais adequada de adolescentes e adultos, entretanto, mesmo modificado, o escore é ainda muito subjetivo ^(154,157,158). As limitações poderiam ser reduzidas se o escore fosse dividido em 3 novos escores: clínico, radiológico e nutricional, com as devidas adaptações em cada um deles.

A Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) tem sensibilidade e especificidade maiores que outros recursos para avaliar o dano precoce e a evolução patológica das estruturas pulmonares dos pacientes com fibrose cística. O escore de Bhalla foi criado para a avaliação minuciosa de entidades patologicamente distintas e de importante valor prognóstico, direcionado à condução da terapêutica, indicação para intervenção cirúrgica e seleção de pacientes para transplante ^(154,163) e, assim como o escore de Nathanson *e col.* ⁽¹⁶⁹⁾ é um dos escores tomográficos mais utilizados e respeitados em todo o mundo. Neste estudo, o grupo de pacientes colonizados/infectados pelo *CBc* apresentou média de pontos do escore de Bhalla significativamente superior ao grupo de pacientes sem *CBc*. Os 9 parâmetros avaliados no escore apresentaram-se mais graves no grupo de pacientes com *CBc* e, em 4 deles (gravidade da bronquiectasia, espessamento peribrônquico, extensão das bronquiectasias e generalidades da árvore bronquial envolvida), foi observado o dobro da frequência relativa do grupo I, com pontuações moderadas/graves em relação ao grupo II, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, evidenciando uma relação direta do *CBc* com a maior deterioração das estruturas pulmonares.

A comparação dos valores médios dos parâmetros avaliados no teste de função pulmonar mostrou todos os valores mais baixos em relação aos valores preditos no grupo I quando comparado com o grupo II, exceto para os fluxos expiratórios ($FEF_{25-75\%}$). A CVF no grupo I foi de 68,76% e no grupo II de 79,27%. O VEF_1 foi consideravelmente mais baixo no grupo I (59,76%) em relação ao grupo II e o índice de Tiffenau (VEF_1/CVF) no grupo I foi de 79,45% e no grupo II de 84,5%, entretanto, os testes estatísticos não mostraram diferença significativa. Outros estudos mostraram resultados semelhantes (198,202).

Lambiase e col. (2006) ⁽¹⁹⁷⁾, em um estudo de caso-controle realizado na Itália, mostraram diferença significativa nos valores do VEF_1 entre os grupos de pacientes colonizados/infectados pelo *CBc* (46,0%), pacientes com *CBc* e *P. aeruginosa* (46,6%) e os pacientes colonizados/infectados somente por *P. aeruginosa* (66,1%), mostrando que a presença do *CBc* nas vias aéreas reduz consideravelmente o VEF_1 em relação ao valor predito.

No Brasil, um estudo em Porto Alegre (RS), mostrou VEF_1 significativamente menor em pacientes com *CBc* (37,8%) em relação aos pacientes sem *CBc* (61,1%), ($p=0,011$) ou com *P. aeruginosa* (53,7%) ⁽¹⁹⁸⁾. Neste mesmo estudo, a CVF também mostrou-se significativamente reduzida em pacientes com *CBc* (51,5%) em relação aos pacientes sem *CBc* (72,4%) ($p=0,008$) ou com *P. aeruginosa* (68,1%).

No distúrbio ventilatório restritivo ocorre a diminuição da elasticidade pulmonar ou da caixa torácica e, conseqüentemente, a redução do volume de gás que pode ser mobilizado a cada respiração. No distúrbio ventilatório obstrutivo ocorre uma maior resistência das vias aéreas, o que leva a uma redução do fluxo expiratório por obstrução difusa. Em nossa casuística, a classificação dos distúrbios ventilatórios mostrou que no grupo I, 19,6% e 47,6% dos pacientes apresentaram, respectivamente, distúrbio ventilatório misto (DVM) e DVM com CVF reduzida, e no grupo II, a frequência foi de 1,6% e 30,2%, respectivamente. No grupo I, apenas 4,8% dos pacientes apresentaram distúrbio ventilatório obstrutivo (DVO), e no grupo II, 23,8%. A frequência de pacientes do grupo II com função pulmonar normal (34,9%) foi significativamente superior ao grupo I (19,0%).

Não há outros estudos publicados que relacionam a presença do *CBc* com o tipo de distúrbio ventilatório, entretanto, os resultados desta casuística permitem sugerir que o *CBc* possa provocar maior agressão de epitélio pulmonar, pois a maioria dos pacientes do grupo I tem os dois tipos de distúrbios ventilatórios, possivelmente em decorrência de alguns fatores de virulência, que agredem mais, ou no mínimo de maneira diferente do que

os expressos pelos outros microrganismos. Entretanto, outros estudos mais específicos são necessários para esclarecer estes resultados.

A avaliação nutricional mostrou que as médias de peso/faixa etária e estatura/faixa etária do grupo I foram significativamente menores que o grupo II ($p=0,02$). Entretanto, a avaliação do IMC/faixa etária por grupo não mostrou diferença estatística ($p=NS$), apesar das médias do grupo I sempre se apresentarem inferiores ao grupo II.

Os indicadores clínicos, tomográficos, de função pulmonar e nutricionais mostram que os pacientes colonizados/infectados pelo *CBc* sempre apresentam condições mais graves quando comparados com o grupo sem colonização/infecção.

Em nosso estudo, a caracterização bioquímica das cepas do *CBc* foi realizada com o intuito de padronizar uma série de testes para auxiliar no isolamento e identificação adequados do *CBc*, com base nos recursos disponíveis no laboratório de rotina diagnóstica. Os testes bioquímicos convencionais se mostraram eficientes para a identificação presuntiva do *CBc*, mas não são suficientemente discriminatórios para a identificação dos genômavars. Diversos estudos apontam dificuldades na identificação dos genômavars do *CBc* por meio de métodos fenotípicos, ressaltando sobre grande possibilidade de identificação incorreta ^(132,133,134,135,138,139) e muitos apontam sobre a necessidade da utilização de um conjunto de métodos para a identificação correta dos genômavars do *CBc*, entre eles, os métodos bioquímicos ^(48,65,137). Alguns estudos mostram ainda, que é possível diferenciar somente alguns dos genômavars por meio de testes bioquímicos ⁽¹³⁴⁾.

O Vitek2® Compact (BioMérieux) identificou corretamente 71,3% das cepas testadas (112/157) como pertencentes ao *CBc*. 28,7% das cepas foram identificadas incorretamente como: *Sphingomonas paucimobilis* (7,6%), *Ochrobactrum anthrhopi* e grupo *Moraxella* (1,3%) *Acinetobacter spp*, *Oligella ureolytica*, *Pseudomonas spp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia spp.* (0,6%). O equipamento não foi capaz de identificar 10,2% das cepas. Entre as cepas identificadas corretamente como *CBc*, o equipamento sugere alguns testes complementares que podem ser realizados para a caracterização de 4 genômavars: *B. cepacia* (genômovar I), *B. multivorans* (genômovar II), *B. stabilis* (genômovar IV) e *B. vietnamiensis* (genômovar V). As informações referentes aos demais genômavars não constam no banco de dados do equipamento. O tempo de incubação do equipamento, de no máximo 24 horas, é insuficiente para a identificação de BGNNF, pois alguns destes

microrganismos, inclusive o *CBc*, geralmente apresentam crescimento lento, sendo necessários até 7 dias de incubação em alguns casos. Então é provável que, baseando-se na positividade de somente algumas provas bioquímicas, o software encontre em seu banco de dados microrganismos incorretos. Outra limitação do aparelho é o número limitado de provas bioquímicas e a utilização de provas não convencionais.

A acurácia do Vitek2® foi verificada em outros estudos, sendo que em um deles, realizado na Bélgica, foi observada uma taxa de identificação correta de 53% para o *CBc*, quando são analisados o total de cepas testadas, entretanto, quando a análise é feita separadamente para cada um dos genomovares, embora o equipamento não caracterize o genomovar, a identificação correta como *CBc* para cepas do genomovar III – *Burkholderia cenocepacia* foi de 38%, genomovar II – *Burkholderia multivorans* de 89%. As taxas de erros foram de 17% para o genomovar III, 7% para o genomovar II e 13% para os demais membros do *CBc*. Mais da metade dos isolados foram identificados incorretamente como: *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia paucula* (atualmente denominada de *Cupriavidus pauculus*), *Alcaligenes faecalis* e *Achromobacter* spp⁽⁹³⁾. A baixa positividade entre membros do genomovar III pode ser explicada pela grande heterogeneidade genotípica e, conseqüentemente fenotípica, existente entre os membros deste genomovar. Diversos estudos comparando os sistemas comerciais de identificação apontam sobre dificuldades e possibilidade de resultados incorretos^(39,48,132,133,134,135,137).

Foi possível identificar por meio de reação de PCR utilizando os primers BCR1 e BCR2, 73,9% das cepas (116/157) que haviam sido identificadas fenotipicamente como *CBc* e estas cepas foram submetidas ao *nested*-PCR, com primers espécie-específicos. Em paralelo, a amplificação com primers espécie-específicos, partindo-se do DNA genômico, permitiu a caracterização do genomovar de 82,2% das cepas (129/157). 13 cepas, cujos genes *recA* não foram amplificados com os primers BCR1 e BCR2, tiveram amplificação positiva para o genomovar quando submetidas à reação de PCR com primers espécie-específicos, partindo-se do DNA genômico. Os resultados obtidos de 26,2% de amplificação negativa para o gene *recA* com os primers BCR1 e BCR2 pode refletir possíveis erros ou limitações na identificação fenotípica, falhas no método de extração do DNA genômico para estas cepas ou falhas durante a reação de PCR, apesar de terem sido realizadas em duplicata e, em alguns casos duvidosos, em triplicata.

Na determinação do genomovar, quando comparados os métodos de PCR direto com o DNA genômico e *nested*-PCR, o resultado foi concordante entre os dois métodos utilizados para a determinação do genomovar em 98/116 (84,4%), e divergente em 18/116

(15,5%), onde em 8/116 cepas (6,9%) o *nested*-PCR apresentou resultado positivo e o PCR com o DNA genômico apresentou resultado negativo, e em 5/116 cepas (4,3%) ocorreu o contrário. Em 5/116 cepas (4,3%) os resultados foram negativos para ambos os métodos. Era esperada uma maior especificidade no método de *nested*-PCR, entretanto a diferença apresentada não foi significativa, e os casos em que o PCR direto com o DNA genômico foram positivos e o *nested*-PCR negativos podem ser explicados pela amplificação de má qualidade do gene *recA* quando utilizados os primers BCR1 e BCR2.

Mahentiralingam e col. (2000)^(141,142) mostraram que os primers BCR1 e BCR2 são 100% confiáveis para a caracterização do Complexo *Burkholderia cepacia*, com 100% de sensibilidade e especificidade, concordando com o observado em nosso estudo, quando os testes de especificidade foram realizados com cepas-padrão dos genomovares do CBc e com outros 35 BGNNF.

Em nosso estudo, os testes de especificidade dos primers espécie-específicos mostraram boa especificidade (100%) quando testados com as cepas-padrão dos 9 genomovares do CBc. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado quando foram analisadas cepas obtidas de amostras do TR de pacientes, onde em alguns casos, ocorreu a presença de amplificações inespecíficas e, nestes casos os resultados foram considerados duvidosos e submetidos ao seqüenciamento do gene *recA*. Alguns trabalhos mostraram que as reações de PCR espécie-específicas com alvo no gene *recA* para a caracterização dos genomovares do Complexo *Burkholderia cepacia* não apresentaram boa acurácia para todos os genomovares^(60,141). Vermis e col (2002)⁽⁶⁰⁾ mostraram que há boa sensibilidade e especificidade para os genomovares II – *Burkholderia multivorans* e VII – *Burkholderia ambifaria*, porém, não se pode afirmar o mesmo para os demais genomovares⁽⁶⁰⁾, principalmente pelo fato de que houve um grande aumento na diversidade das espécies dentro do Complexo *Burkholderia cepacia*, desde que os primers originais foram descritos no ano 2000 por Mahentiralingam e col⁽¹⁴²⁾. Em decorrência destas dificuldades, outros genes-alvo tem sido utilizados para a caracterização dos genomovares, como por exemplo o *gyrB* e o *opcL* por meio de PCR.

O seqüenciamento do gene *recA* foi realizado para 24,2% das cepas que apresentaram reações de PCR inconclusivas, e permitiu a identificação do genomovar de 22/157 cepas (14,0%). O resultado do seqüenciamento foi inconclusivo para 16/157 cepas (10,2%).

Comparações filogenéticas da sequência inteira do gene 16SrRNA foram utilizadas por muito tempo com boa eficiência para a diferenciação entre os membros do

Cbc, porém, estudos mostram que só há boa especificidade quando é realizada a análise da sequência inteira do gene, pois a análise de parte do gene ou por meio de RFLP não são suficientemente discriminatórias ^(62,140,142,216). Entretanto, a análise da sequência inteira do gene *recA* mostrou-se muito mais eficiente do que as outras metodologias descritas e, quando se trata da caracterização dos genovares, tem sido utilizada por quase todos os centros em todo o mundo em substituição ao método de PCR espécie-específica com alvo no gene *recA*.

Embora o seqüenciamento do gene *recA* seja suficientemente discriminatório entre os membros do *CBC*, em decorrência da grande heterogeneidade observada entre algumas espécies, que permitiram inclusive a reclassificação da taxonomia entre os membros do *CBC* e inclusão de novos genovares, outras metodologias tem sido empregadas em estudos mais recentes, como o Multilocus Sequence Typing (MLST), (considerado o padrão “ouro”), onde são analisadas as sequências de 7 genes (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* e *trpB*), com a finalidade de garantir a identificação correta e permitir a identificação e caracterização de novas espécies dentro do *CBC* ^(65,144,213). A margem de erro é praticamente nula com a utilização desta metodologia, porém, entre as limitações do método estão o custo elevado e a demanda do tempo para a realização do seqüenciamento e análise dos 7 genes.

Outras técnicas tem sido empregadas para a caracterização dos genovares do *CBC*, como o MLST e a Espectrometria de massas (discutida adiante), entretanto, os laboratórios de microbiologia clínica, que realizam diagnóstico de rotina, ainda não estão preparados para a utilização destes métodos e, em sua maioria, utilizam testes bioquímicos convencionais e métodos automatizados ou semi-automatizados para a identificação dos microrganismos, tais como o Vitek® (*BioMérieux*), MicroScan® WalkAway® plus (*Siemens Health Diagnostics Inc*), Crystal (*Becton Dickinson*), Phoenix BD® (*Becton Dickinson*), Sherlock® (*MIDI Inc.*), RapID NF Plus ® (*Remel Inc.*), API 20 NE, entre outros. A caracterização genotípica do *CBC* e dos genovares, por meio de PCR, seqüenciamento do gene *recA*, MLST e outras técnicas de biologia molecular, tem sido utilizadas somente em pesquisas, pois, embora algumas destas técnicas já tenham sido descritas há mais de uma década, o elevado custo torna inviável a sua aplicação na rotina dos laboratórios clínicos, mesmo em Centros de referência.

No que se refere ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e opções terapêuticas, os microrganismos do *CBC* são, em sua maioria, intrinsecamente resistentes a maioria dos antimicrobianos. Todas as cepas são resistentes a Polimixina e Colistina,

que são antimicrobianos utilizados, inclusive, para auxiliar na triagem para identificação de microrganismos deste grupo. Diversos mecanismos lhes conferem este padrão de resistência a uma série de antimicrobianos, como por exemplo a bomba de efluxo, redução da permeabilidade da membrana celular, produção de beta lactamases induzíveis (BLIND), entre outros. O perfil de resistência apresentado pelos microrganismos do *CBC* limita as opções terapêuticas. E, embora testes de sensibilidade “*in vitro*” sejam recomendados para avaliar a atividade das drogas frente ao microrganismo, a suscetibilidade “*in vitro*” pode não estar correlacionada com boa atividade “*in vivo*”⁽¹⁵²⁾. Os “*breakpoints*” dos testes de disco-difusão foram padronizados somente para quatro antimicrobianos (Ceftazidima, Meropenem, Minociclina e Sulfametoxazol+Trimetoprim) e os testes de suscetibilidade das demais drogas são realizados por meio da determinação do MIC.

Entre as cepas testadas, por meio de disco-difusão, a droga mais ativa *in vitro* foi o Meropenem (92,0% de suscetibilidade), seguido da Ceftazidima (83,0%), Minociclina (65,0%) e Sulfametoxazol+trimetoprim (46,0%). Os resultados mostram que a maioria das cepas apresentou resistência ao Sulfametoxazol+trimetoprim (54,0%), que é, geralmente, a 1ª droga de escolha para o tratamento das infecções por microrganismos do Complexo *Burkholderia cepacia*, limitando ainda mais as opções terapêuticas. Um estudo realizado na Itália mostrou que a Piperacilina, ceftazidima e piperacilina-tazobactam foram as drogas mais ativas, com 43,3%, 31,1% e 35,5% de resistência, respectivamente⁽⁶⁹⁾.

Alguns estudos mostram que mais de 90% das cepas de CBC isoladas de amostras pacientes com FC são resistentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, colistina, polimixina B, imipenem e cefalosporinas e apresentam resistência variável ao Meropenem. Geralmente, apresentam sensibilidade ao Piperacilina+Tazobactam, Sulfametoxazol+Trimetoprim, Ceftazidima e Minociclina. Testes de sinergismo mostraram que há pouca eficácia para o uso combinado de duas drogas, porém, o uso combinado de três drogas mostrou boa atividade “*in vitro*”^(39,48,137).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A prevalência de colonização/infecção por microrganismos do Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com FC neste Centro de referência, de 22,5%, é significativamente superior a prevalência descrita em outros Centros.

Houve uma evolução progressiva na prevalência do Complexo *Burkholderia cepacia* no decorrer do período do estudo, passando de 10,5% antes do ano de 2005 para 22,5% no ano de 2009. A introdução do meio de cultura seletivo para o Complexo *Burkholderia cepacia* (BCSA) no início do ano de 2007 facilitou a recuperação do microrganismo e as melhorias na qualidade dos métodos de identificação e diligência da procura foram úteis para evidenciar a presença do microrganismo nas amostras.

Os genovares mais prevalentes foram: II – *Burkholderia multivorans* (30,0%), seguido do I – *Burkholderia cepacia* (24,0%), IIIA – *Burkholderia cenocepacia* (10,0%), IIIB – *Burkholderia cenocepacia* (3,0%) e V – *Burkholderia vietnamiensis* (2,0%). Os demais membros do Complexo *Burkholderia cepacia* não foram encontrados nesta casuística. A maior prevalência da *Burkholderia multivorans* difere da maioria dos estudos. Há a suspeita de que possa ter ocorrido infecção cruzada entre os pacientes ou que seja uma característica regional.

Os indicadores de gravidade clínicos (escore de Shwachman), tomográficos (escore de Bhalla), nutricionais e de função pulmonar (espirometria) apresentaram resultados mais graves no grupo I em relação ao grupo II, mostraram que o CBc tem sério impacto na deterioração pulmonar e na piora clínica.

Os testes bioquímicos convencionais são úteis para a identificação presuntiva do CBc, que deve ser confirmada por outros métodos, porém não permitem a diferenciação dos genovares. O Vitek® apresentou boa acurácia na identificação do CBc, porém com alguns erros decorrentes de limitações do método/equipamento. O PCR, *nested*-PCR e seqüenciamento do gene *recA* apresentaram boa especificidade na identificação do CBc e dos genovares, entretanto, ainda ocorrem algumas limitações, decorrentes da variedade genotípica, sendo necessária a utilização de métodos mais abrangentes, como o MSLT, onde é realizado o seqüenciamento de 7 genes.



REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosov T. Doenças Pulmonares em pediatria: diagnóstico e tratamento. 1ª Ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 1999.
2. Cystic Fibrosis Foundation. Disponível em: <http://www.cff.org/>. Acessado em: 09/2009
3. Cystic Fibrosis Wordwide. Disponível em: <http://www.cfww.org/>. Acessado em: 08/2009
4. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. The Lancet 2009; 373:1891-1904.
5. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of Cystic Fibrosis in Japan. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997; 24: 544-47.
6. Reis FC, Damaceno N. Cystic Fibrosis. J Pediatr (Rio J), 1988; 74 (supl.1):S76-S94.
7. Raskin S, Philips III JA, Krishnamani MRS, Jones C, Parker RA, Rosov T. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. Am J Med Gen. 1993; 46: 665-9.
8. Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – dopediatria ao especialista. J Pediatr (Rio J). 2002; 78 (Supl. 2): S171-S185.
9. Steven M, Rowe MD, Stanley MBS, Sorscher MD. Cystic Fibrosis – Mechanism of diseases. The New England Journal of Medicine, 2005. 352: 1992 – 2001.
10. Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. J Biol. Chem, 1994; 269:20584-91.
11. Scwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, et al. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. Cell 1995; 81: 1063-73
12. Shutts MJ, Canessa CM, Olsen JC et al. CFTR as a c-AMP-dependent regulator of sodium channels. Science 1995; 269: 847-50.
13. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. J Cystic Fibrosis 2002; 1: 13-29.
14. Metha A. CFTR: more than just a chloride channel. Pediatr. Pulmonol. 2005; 39: 292-98.
15. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. Lancet 2008; 372: 415 – 17.
16. National Center for Biotechnology Information – NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessado em: 08/009.
17. Ribeiro AF, Ribeiro JD, Ribeiro MAGO. Fibrose Cística. Tratado de Clínica Médica. Capítulo 224. Editora Roca. São Paulo, SP, 2005.
18. ITO, S. Is CFTR dysfunction in cystic fibrosis compensated by MRPs? Pediatr Res. 2003;54(5): 625-626.

19. Zielenski T, Tsui LC. Cystic Fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annual Review of Genetics. 1997, 29:777 – 807
20. Flume PA. Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. Respiratory care, 2009, 54(5):619-627.
21. Blackman Sm, Deering-Bros R, McWilliams R, et al. Relative contribution of the genetic and non-genetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. Gastroenterology 2006; 131:1030-39.
22. Borowitz D, backer R, Stallings V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. J Pediaatric Gastroenterol Nutr. 2002; 35: 246 – 259.
23. Marshall BC, Butler SM, Stoddard M, Moran AM, Liou TG, Morgan WJ. Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. J Pediatric 2005; 146:681-87.
24. Wilshanski M, Durie PR. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. Gut 2007; 56; 1153-63.
25. McMullen AH, Pasta DJ, Frederick PD, et al. Impact of pregnancy on women with cystic fibrosis. Chest 2006; 129:706-11.
26. Gibson LR, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and Management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 168: 918-951.
27. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung Infections associated with cystic fibrosis. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(2): 194-222.
28. Matsui H, Grubb BR, Tarran R. et al. Evidence for periciliary pathogenesis of cystic fibrosis airway disease. Cell, 1998.; 95:1005-15.
29. Matsui H, Wagner VE, Hill DB et al. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Proc natl Acad Sci USA 2006; 103: 18131-36
30. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. Annu Rev Med; 58:157-70.
31. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid.
32. Zabner J, Smith JJ, karp PH, Widdicombe JH, Welsh MJ. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. Mol Cell 1998; 2:397-403.
33. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell 1997; 88:553-60.
34. Colombo C, Constantine D, Rocchi A, et al. Cytokine levels in sputum of cystic fibrosis patients before and after antibiotic therapy. Pediatr Pulmonol. 2005; 40:15-21.

35. Carrabino S, Carpani D, Livraghi A, et al. Dysregulated interleukin-8 secretion and N-APP activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J Cystic Fibrosis*, 2006;5:113-119.
36. Karp CL, Flic LM, Park KW, et al. Defective lipoxin-mediated antiinflammatory activity in cystic fibrosis airway. *Nat Immunol*, 2004;5:388-92.
37. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:72-78.
38. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, 2004;23:146-58.
39. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Laboratory (Cumitech)*, Cystic Fibrosis Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, 2006.
40. Atkinson RM, LiPuma JJ, Rosenbluth DB, Dunne WMJ. Chronic Colonization with *Pandora* *apista* in Cystic Fibrosis Patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44 (03): 833-836.
41. Coenye T, Spilker T, Reik R, Vandamme P, LiPuma JJ. Use of PCR to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43 (07): 3463-3466.
42. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. Minireview. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39 (10): 3427 – 3436.
43. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar em El paciente com fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 2009;27(2):89-104.
44. Foweraker J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *British Medical Bulletin* 2009;89:93-110.
45. Millar FA, Simmonds NJ, Hodson ME. Trends in pathogens colonizing the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 8 (2009) 386-391.
46. Mearns MB, Hunt GH, Rushworth R. Bacterial flora of respiratory tract in patients with cystic fibrosis, 1950-71. *Arch Dis Child* 1972;47:902-7.
47. Hart CA, Winstanley C. Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children. *Br Med Bull*, 61,81-96.
48. LiPuma JJ, Currie BJ, Lum GD, Vandamme PAR. *Burkholderia*, *Stenotropomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandora*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delfia* and *Acidovorax*. In: Murray PM, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed, ASM Press Washington DC 2007, P. 749 – 769.
49. Burkholder, W. H. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*. 40:115–117.

50. O'Sullivan, L.A. and Mahenthiralingam, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. Lett Appl Microbiol 2005, 41: 8–11.
51. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annu Rev Phytopathol 2001, 39: 225–258.
52. Mahenthiralingam, E., Urban, T.A. and Goldberg, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nat Rev Microbiol 2005, 3: 144–156.
53. Tablan,OC, Chorba,TL, Schilow, DV, White, JW, Hardy, KA, Gilligan, PH, Morgan, WM, Carson, LA, Martone, WJ, Jason, JM, Jarvis, WR. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. J Pediatr 1985; 107:382-87
54. Yabuuchi E, Kkosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. Microbiol. Immunol. 2002, 36:1251 – 1275.
55. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology 1997, 47: 1188 – 1200
56. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, Henry D, Speert DP. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). Journal of Clinical Microbiology 2000, 38, 1042 – 47.
57. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* complex. Journal of Clinical Microbiology 2001, 39(10): 3427-3436.
58. Cunha MV, Leitão JH, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, Salgado MJ, Correia IS. Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a portuguese Cystic Fibrosis Center: a 7-Year study. Journal of Clinical Microbiology 2003. 41 (9): 4113-4120.
59. Reik R, Spilker T, LiPuma JJ. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. Journal of Clinical Microbiology 2005. 43 (6): 2926-2928.
60. Vermis K, Coenye T, Mahenthiralingam E, Nelis HJ, Vandamme P. Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. J. Med. Microbiol 2002. 51: 937 – 941
61. Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, LiPuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthiralingam E. Development of recA Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. Applied and Environmental Microbiology 2005, 71 (7): 3917-3927.

62. Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Vandamme, P., Govan, J.R.W., Waine, D.J., Lipuma, J.J., Chiarini, L. et al. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infection. *Emerging Infection Diseases* 2007, 13:458–461.
63. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MC, Govan JR, Speert DP, LiPuma JJ. et al. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 4665–4673.
64. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Drevinek P, Vanlaere E, Vandamme P, Lipuma JJ, Dowson CG. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *Plos One* 2006: 1-17.
65. Dalmastri, C., Baldwin, A., Tabacchioni, S., Bevivino, A., Mahenthiralingam, E., Chiarini, L. and Dowson, C. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environmental Microbiology* 2007, 9: 1632–1639.
66. Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, Brandt ED, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. Nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009, 59, 102-111.
67. Ramette A, LiPuma JJ, Tiedje JM. Species abundance in diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:1193-1201
68. LiPuma JJ, Spilker T, Coenye T, Gonzalez CF. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 2002; 359:2002-2003.
69. Golini G, Cazzola G, Fontana R. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:175-180.
70. Lambiase A, Raia V, Stefani S. et al. *Burkholderia cepacia* complex infection in a cohort of Italian patients with cystic fibrosis. *J Microbiol* 2007; 45:275-279.
71. Drevinek P, Cinek O, Melter J, Langsadt L, Navesnakova Y, Vavrora V. Genomovar distribution of the *Burkholderia cepacia* complex differs significantly between Czech and Slovak patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiology* 2003;52:603-604,
72. Manno D, Dalmastri C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, et al. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1491-7.
73. Kidd TJ, Bell SC, Coulter C. Genomovar diversity amongst *Burkholderia cepacia* complex isolates from Australian adult cystic fibrosis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:434-437.

74. Leitão JH, Sousa AS, Cunha MV, ET AL. Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese cystic fibrosis center. J Clin Microbiol 2007;45:1628-1633.
75. Lynch JP. *Burkholderia cepacia* complex: impact on the cystic fibrosis Lung Lesion. 2009.
76. Liu L, Spilker T, Coenye T, LiPuma JJ. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread *Burkholderia cepacia* genomovar III strains. J Clin Microbiol 2003, 41:2471-2476.
77. Coenye T, Spilker T, Van Schoor A, LiPuma JJ, Vandamme P. Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. Thorax 2004;59:952-954.
78. Thomassen MJ, Demko CA, Doershuk CF, Stern RC, Klinger JD. Pseudomonas cepacia: decrease in colonization in patients with cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1986;134:669-671.
79. LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. Lancet 1990, 336 (8723): 1094-1096.
80. Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Evidence of transmission of Burkholderia cepacia, Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis. FEMS Microbiol Lett 2003;228:57-62.
81. Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Sciacca A, Savoia D, et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* Complex: Evidence for New Epidemic Clones Infecting Cystic Fibrosis Patients in Italy. Journal of Clinical Microbiology 2005, 43 (10): 5136-5142.
82. McDowell A, Mahenthiralingan E, Dunbar KE, Moore JE, Cowe M, Elborn JS. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. J Med Microbiol 2004;53:663-668.
83. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, et al. Outcome of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia colonization in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. Thorax 199;50:1194-1198.
84. Millar-Jones L, Ryley HC, Paull A, Goohchild MC. Transmission and prevalence of Burkholderia cepacia in Welsh cystic fibrosis patients. Respir Med 1998;92:178-183.
85. Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. J Clin Microbiol 1999;37:2201-2208.
86. Saiman L, Macdonald N, Burns JL, Hoiby N, Speert DP, Weber D. Infection control in cystic fibrosis: practical recommendations for the hospital, clinic and social settings. Am J Infect Control 2000;28:381-385.

87. Conway S. Segregation is good for patients with cystic fibrosis. *J R Soc Med* 2008;101:S31-S35.
88. Kidd TJ, Douglas JM, Bergh HÁ, Coulter C, Bell SC. *Burkholderia cepacia* complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. *Res Microbiol Infect Dis* 2008;159:194-199.
89. Martins KM, Fongaro GF, Dutra Rodrigues AB, et al. Genomovar status, virulence markers and genotyping of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from Brazilian cystic fibrosis patients. *J Cystic Fibrosis* 2008; 7:336-339.
90. Carvalho AP, Ventura GM, Pereira CB, et al. *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. *APPMIS* 2007;115:311-318.
91. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Mary C, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8(2):181-7.
92. Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar II can be replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* 2001; 33:169-1475
93. Brisse S, Cordevant C, Vandamme P, et al. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:4824-4827.
94. Alice T, Scutera S, Chirillo MG, Savoia D. *Burkholderia* respiratory tract infections in Italian patients with cystic fibrosis: molecular characterization. *J Infect* 2006;53:159-165.
95. Cunha MV, Pinto-de-Oliveira A, Meirinhos-Soares L. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese Cystic Fibrosis Center. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1628-1633.
96. Conway BA, Venu V & Speert DP. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriology* 2002;184:5678-5685.
97. Desai, M., Buhler, T., Weller, P. H. & Brown, M. R. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998;42:153-160.
98. Cox AD & Wilkinson SG. Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol.* 1991;5(3):641-6.

99. Shimomura H et al. Unusual interaction of a lipopolysaccharide isolated from *Burkholderia cepacia* with polymixin B. *Infect. Immunol* 2003;71:5225 – 5230.
100. Vinion-Dubiel, A. D. & Goldberg, J. B. Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *J. Endotoxin Res* 2003 (9): 201–213.
101. Reeves, P. P. & Wang, L. Genomic organization of LPSspecific loci. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002;264:109–135.
102. Shaw, D., Poxton, I. R. & Govan, J. R. Biological activity of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* lipopolysaccharide. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 1995;11:99–106.
103. Hughes, J. E., Stewart, J., Barclay, G. R. & Govan, J. R. Priming of neutrophil respiratory burst activity by lipopolysaccharide from *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun.* 1997; 65:4281–4287.
104. Reddi, K., Phagoo, S. B., Anderson, K. D. & Warburton, D. *Burkholderia cepacia*-induced IL-8 gene expression in an alveolar epithelial cell line: signaling through D14 and mitogen-activated protein kinase. *Pediatr. Res.* 2003;54:297–305.
105. Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. & Sokol, P. A. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J. Bacteriol.* 1999;181:748–756.
106. Kothe, M. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the *cep* quorumsensing system. *Cell. Microbiol.* 2002;5:343–351.
107. Riedel, K. et al. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 2001;147:3249–3262.
108. Baldwin, A., Sokol, P. A., Parkhill, J. & Mahenthiralingam, E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect. Immun.* 2004;72:1537–1547.
109. LiPuma, J. J. *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. *Clin. Chest Med.* 1998;19:473–486.
110. Burns, J. L., Lien, D. M. & Hedin, L. A. Isolation and characterization of dihydrofolate reductase from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33:1247–1251.
111. Burns, J. L., Wadsworth, C. D., Barry, J. J. & Goodall, C. P. Nucleotide sequence analysis of a gene from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40:307–313.

112. Aronoff, S. C. Outer membrane permeability in *Pseudomonas cepacia*: diminished porin content in a β -lactam-resistant mutant and in resistant cystic fibrosis isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* 1988;32:1636–1639.
113. Burns, J. L., Hedin, L. A. & Lien, D. M. Chloramphenicol resistance in *Pseudomonas cepacia* because of decreased permeability. *Antimicrob. Agents Chemother* 1989;33:136–141.
114. Sun, L. *et al.* The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nature Med.*1995;1: 661–666.
115. Goldstein, R. *et al.* Structurally variant classes of pilus appendage fibers coexpressed from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *J. Bacteriol.* 1995;177:1039–1052.
116. Sajjan, U., Wu, Y., Kent, G. & Forstner, J. Preferential adherence of cable-piliated *Burkholderia cepacia* to respiratory epithelia of CF knockout mice and human cystic fibrosis lung explants. *J. Med. Microbiol.* 2000;49:875–885.
117. Sajjan US, Xie, H., Lefebvre, M. D., Valvano, M. A. & Forstner, J. F. Identification and molecular analysis of cable pilus biosynthesis genes in *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* 2003;149: 961–971.
118. Sajjan US, Corey, M., Karmali, M. A. & Forstner, J. F. Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2002;89:648–656.
119. Sajjan US. & Forstner, JF. Role of a 22-kilodalton pilin protein in binding of *Pseudomonas cepacia* to buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1993;61:3157–3163.
120. Hayashi F. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099–1103.
121. Tomich, M., Herfst, C. A., Golden, J. W. & Mohr, C. D. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infect. Immun.*2002;70:1799–1806.
122. Isles A, Maclusky I, Corey M, *et al.* *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J pediatric* 1984; 104, 206-10.
123. Huang CH, Jang TN, Liu CY, Fung CP, Yu KW, Wong WW. Characteristics of patients with *Burkholderia cepacia* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infec* 2001; 34:215-219.

124. Jones AM, Dadd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* 2004. 59: 948-951
125. Zahariadis G, Levy MH, Burns JL. Cepacia-like syndrome caused by *Burkholderia multivorans*. *Can J Infect Dis.*, 2003;14(2):123-125.
126. LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1990;3336:1094-6.
127. LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis? *Transpl Infect Dis* 2001;3:149-160.
128. Blackburn L, Brownlee K, Conway S, Denton M. 'Cepacia syndrome' with *Burkholderia multivorans*, 9 years after initial colonization. *J Cyst Fibros.* 2004 ; 3(2):133-4.
129. Wellinghausen N, Köthe J. Evidence of coinfection with distinct strains of *Burkholderia multivorans* in a cystic fibrosis patient. *Infection.* 2006; 34(5):289-91.
130. Cunha MV, Leitão JH, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, Salgado MJ, Correia IS. Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a portuguese Cystic Fibrosis Center: a 7-Year study. *Journal of Clinical Microbiology* 2003. 41 (9): 4113-4120.
131. Kalish LA, Waltz DA, Dovey M, Potter-Bynoe G, McAdam AJ, Lipuma JJ, Gerard C, Goldmann D. Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Feb 15;173(4):421-5. Epub 2005 Nov 4.
132. Pelt CV, Verduin CM, Goessens WHF, Margreet CV, Tümmler B, Segonds C, Reubsaet, F, Verbrugh H, Belkum EV. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *Journal of Clinical Microbiology* 1999. 37 (7): 2158 – 2164.
133. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *Journal of Clinical Microbiology* 2000. 38 (8): 3112-3115.
134. Henry DA, MAhenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T and Speert DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001;39:1073-1078.
135. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *Journal of Clinical Microbiology* 1997. 35 (3): 614 – 619.

136. Silva Filho LVF, Velloso LF, Bento CNO. Uso de meio seletivo para identificação de cepas de *Burkholderia cepacia* em amostras de trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2002, 44 (4): 203-208.
137. Koneman, EW, Alen, SD., Janda, WM; Schrenkenberger, PC.; Winn Jr., WC. Nonfermentative gram-negative bacilli, chapter 5. In: Diagnostic Microbiology -- Color atlas and textbook. 6th ed. Lippincott, 2006.
138. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, *et al.* Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1996. 34:886-891
139. McMenamim JD, Zacccone TM, Coenye t, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US Cystic Fibrosis Treatment Centers. *Chest* 2000. 117: 1661 – 1665.
140. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 2003, 5 (9), 719 – 729.
141. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 104(6):1539-51.
142. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne K, Radomski C, Davies E, Gay YA, Vandamme P. DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*; *Burkholderia cepacia* genomovares I and III. *Journal of Clinical Microbiology* 2000. 38: 3165 – 3173.
143. Baldwin A, Downson C, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cepacia* complex MLST Databases. Disponível em: <http://www.pubmlst.org/bcc>. Acesso em: 20/03/2009.
144. Waine DJ, Henry DA, Baldwin A, Speert DP, Honey-bourne D, Mahenthiralingam E, Dowson CG. Reliability of multilocus sequence typing of the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2007, 6: 215 - 219.
145. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti JL, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, p. 3361–3367 Vol. 46, No. 10
146. Bosch A, Minan A, Vescina C, Degrossi J, Gatti B, Montanaro P, Messina M, Franco M, Vay C, Schmitt J, Naumann D and Yantorno O. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative

Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology 2008;46(8):2535–2546.

147. Clinical Laboratory Standards Institute (2010).
148. Aaron SD, Ferris W, Henry DP, Speert DP, MacDonald NE. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. Am. J. respire. Crit. Care Med. 161;1206-1212.
149. Moore JE, Crowe M, Shaw A, McCaughan J, Redmand AOB and Elborn JS. Antibiotic resistance in *Burkholderia cepacia* at two regional cystic fibrosis centers in Northern Ireland: is there a need for synergy testing? J Antimicrob. Chemother; 48:315-329.
150. Saiman L, Chen Y, Gabriel PS, Knirsch C. Synergistic activities of macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob. Agents Chemother 2002;46:1105-1107.
151. Manno GE, Uglotti M, Belli L, Fenu L, Romano L, Cruciani M. Use of the E-test to assess synergy of antibiotic combinations against isolate of *Burkholderia cepacia*-complex from patients with cystic fibrosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 2003;22:2-34.
152. Lu DC, Chang SC, Chen YC, Luh KT, Hsieh WC. In vitro activities of antimicrobial agents, alone and in combinations, against *Burkholderia cepacia* isolated from blood. Diag Microbiol Infect Dis 1997;28:187-191.
153. Zhou J, Chen Y, Tabibi S, Alba L, Garber E, Staiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 2006;51:1085-1088.
154. Santos CIS, Ribeiro JD, Ribeiro AF, HesselG. Análise crítica dos escores de avaliação da gravidade da fibrose cística: estado da arte. J Bras Pneumol 2004;30(3):286-298.
155. Shwachmann H, Kulczycki LL. Long term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. Am. J. Dis. Child, 1958. 96: 06-15.
156. Doershuk CF, Matthews LW, Tucker AS, Nudelman H, Eddy G, Wise M, et al. A 5 year clinical evaluation of a therapeutic program for patients with cystic fibrosis. J Pediatr. 1964;65:677-93.
157. Cooperman EM, Park M, McKee J, Assad JP. A simplified cystic fibrosis scoring system (a preliminary report). CMAJ. 1971;105:580-1.
158. Taussig LM, Kattwinkel J, Friedewald WT, di Sant'Agnese PA. A new prognostic score and clinical evaluation system for cystic fibrosis. J Pediatr. 1973;82:380-90.

159. Huang NN, Keith HH, Palmer J, Hsuan F. A scoring system for short-term evaluation of patients with cystic fibrosis: a possible means for assessment of antibiotic efficacy. In: Warwick WJ, editor. 1,000 years of cystic fibrosis collected papers. Minnesota: University Dept of Pediatrics Medical School in cooperation with International Cystic Fibrosis Association, National Heart, Lung and Blood Institute and Fogarty International Center; 1981. p.207-16.
160. Kanga J, Wilson J, Posson A. The efficacy of reported symptoms and physical findings in indentifying children with clinically significant deterioration of pulmonary function: a longitudinal study. *Pediatr Pulmonol*. 1990;(Supl 5):258.
161. Helbich TH, Heins-Perr G, Eichler I, Wunderbaldinger P, Wojnarowski C, Brach RC, Herold JC. Cystic fibrosis: CT assessment of lung involvement in children and adults. *Radiol*. 1999; 213: 537-544.
162. Barth L. Perfil Microbiológico e indicadores de Gravidade em pacientes com fibrose cística. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP (2005),
163. Bhalla M, Turcios N, Aponte V, Jenkins M, Leitman BS, McCauley DI, et al. Cystic fibrosis: scoring system with thin-section CT. *Radiology*. 1991;179:783-8.
164. Santamaria F, Grillo G, Guidi G, Rotondo A, Raia V, Ritis G, Sarnelli P, Caterino M, Greco L. Cystic fibrosis: when shold high-resolution computed tomography of the chest be obtained? *Pediatrics* 101(5): 908-913.
165. Helbich TH, Heins-Perr G, Eichler I, Wunderbaldinger P, Wojnarowski C, Brach RC, Herold JC. Cystic fibrosis: CT assessment of lung involvement in children and adults. *Radiol*. 1999; 213: 537-544.
166. Brody AS. Scoring system for CT in cystic fibrosis: Who cares? *Radiol* 2004;231:296-298.
167. Castile RG, Hayes JR, Flucke RL, Long FR, McCoy KS. Correlation of structural abnormalities in the lungs of infants with cystic fibrosis. *Pediatr pulmonol* 2000;20:A427
168. Dörlöchter L, Helgheim V, Roskund OD, Rosendahl K, Fluge G. Shwachman-Kulczycki score and resting energy expenditure in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2003; 2: 148-151.
169. Nathanson I, Conboy K, Murphy S, Afshani E, Kuhn JP. Ultrafast computadorized tomography of the chest in cystic fibrosis: a new scoring system *Pediatr Pneumol*.1991;11:81-86.
170. Nickerson BG, Lemen RJ, Gerdes CB, Wegmann MJ, Robertson G. Within-subject variability and percent change for significance of spirometry in normal subjects and in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122:859-866.

171. Cooper C, Robertson C, Hudson I, Phelan, P. Variability of pulmonary function tests in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1990; 8:16-22.
172. Maróstica PJC. Avaliação pneumológica de pacientes portadores de fibrose cística: sua relação com grupos genéticos [tese]. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995.
173. WANG *et al.*, 2002.
174. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Pediatr (Rio J)*. 2004; 80:371-9. MILLA & WARWICK, 1998
175. Robinson W, Waltz DA. FEV1 as a guide to lung transplant referral in young patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2000; 30:198-202. WOOD, 2001
176. Liou TG, Adler FR, Fitzsimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *Am JEpidemiol* 2001; 153:345-52.
177. Schaedel C, Monestrol I, Hjelte L, Johannesson M, Kornfält R, Strandvik B, Wahlgren L, Holmberg L. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002; 33:483-491.
178. Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, Wohe S, Stemkamp J, Heijeiman HGM, Robberecht E, Döring G. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a european consensus. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2002; 1: 51-75.
179. World Health Organization Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. *Child nutrition disorders – therapy 2. Nutrition disorders - therapy 3. Manuals 4 guidelines* World Health Organization. 1999;1-65
180. Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/>. Acessado em: 12/2009.
181. National Center for Health Statistics. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchs/>. Acessado em: 20/2010.
182. Adde FD, Rodrigues JC, Cardoso AL. Nutricional follow-up of cystic fibrosis patients: the role of nutrition education. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(6):475-482
183. Lai HC, Kosorok MR, Sondel AS, Chen ST, Fitzsimmons SC, Green, CG, *et al.* Growth status in children with cystic fibrosis based on the National Cystic Fibrosis Patient Registry data: evolution of various criteria used to identify malnutrition. *J Pediatr*. 1998;132:478-485.

184. Rommens JM, Kerem B, Greer W, Chang P, Tsui LC, Ray P. Rapid non radioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. *Am J Hum Genet.* 1990;46:395-6.
185. Gibson, L.E., & Cooke, R.E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics,* 1959, 23, 545-549.
186. Schales, O. & Schales, S. - A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. *J. Biol. Chem.* 140:879-884, 1941.
187. European Respiratory Society (ERS). Disponível em: <http://dev.ersnet.org/>. Acessado em: 02/2010.
188. American Thoracic Society (ATS). Disponível em: <http://www.thoracic.org/>. Acessado em: 02/2010.
189. MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins. 2000
190. HUGH, R., a. LEIFSON, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria - *J. Bact.*, 66; 24-26 (1953).
191. American Type Culture Collection. Disponível em: <http://www.atcc.org>
192. Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM™) . Disponível em: <http://bccm.belspo.be/>
193. Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
194. Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-402.
195. Tamura, K., J. Dudley, et al. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol* 24(8): 1596-9
196. Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-82.
197. Lambiase A, Raia V, Mariassunta DP, Sepe A, Carnovale V, Rossano F. Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis.

198. Rovedder, Paula Maria Eidt et al. Chronic bacterial infection and echocardiographic parameters indicative of pulmonary hypertension in patients with cystic fibrosis. *J. bras. pneumol.* [online]. 2008, vol.34, n.7, pp. 461-467. ISSN 1806-3713.
199. Leite FC. Variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística no hospital de clínicas de Porto Alegre. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. (2009).
200. MAGALHAES, Marcelo; BRITTO, Murilo C. A. de; BEZERRA, Patrícia G. M. and VERAS, Adelma. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórios de fibrocísticos do Recife. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* [online]. 2004, vol.40, n.4, pp. 223-227. ISSN 1676-2444.
201. Agodi A, Mahenthalingam E, Barchitta M, Giannino V, Sciacca A, Stefani S.. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol* 2001, 39, 2891-2896.
202. Frangolias DD, Mahenthalingam E, Rae S, Raboud JM, Davidson AG, Wittmann R, et al. *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1572-7.
203. Coenye T, Vandame P. Diversity and significance of *Burkholderia cepacia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 2003; 5 (9): 719-29.
204. LiPuma JJ, Spiker T, Gill LH, Campbell PW III, Liu L, Mahenthalingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:92-96.
205. Detsika MG, Corkill JE, Magalhães M, Glendinning KJ, Hart CA, Winstanley C. Molecular typing of, and distribution of genetic markers among *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41 (9): 4148 – 4153
206. Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Sá-Correia I, Barreto C. Infecção respiratória por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*: Evolução clínica em doentes com fibrose quística. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 2008, 14(1):5-17.
207. Carvalho GM, Carvalho AP, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, Merquior VL, Albano RM, Marques EA. Transient isolation of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with *Burkholderia vietnamiensis*. *J Cyst Fibros.* 2005;4(4):267-70.

208. Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:43-48.
209. Egan TM, Detterbeck FC, Mill MR, et al. Long term results of lung transplantation for cystic fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:602-609.
210. Aris RM, Routh JC, LiPuma JJ, Health DG, Gilligan PH. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex: survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2102-2106
211. Alexander BD, Petzold EW, Reller LB, et al. Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex. *Am J Transplant* 2008;8:1025-1030.
212. Noone PG. Lung transplant and cystic fibrosis: what's new from UK and France? *Thorax* 2008;63:668-670.
213. Boussand V, Guillemain R, Grenet D, et al. Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonized with *Burkholderia cepacia* complex: results from two French centers. *Thorax* 2008;63:732-737.
214. Taussig LM. The score is.... [editorial]. *Pediatr Pulmonol*. 1994;17:279-80.
215. Lewin L, Byard PJ, Davis PB. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonization on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. *J Clin Epidemiol* 1990;43:125-131.
216. Storms, V., N. Van Den Vreken, T. Coenye, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, M. Gillis, and P. Vandamme. 2004. Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia*-like isolates leading to the emended description of *Burkholderia pyrrocinia*. *Syst. Appl. Microbiol*. 27:517-526.
217. Tabacchioni S, Ferri L, Manno G, Mentasti M, Cocchi P, Campana S, Ravenni N, Taccetti G, Dalmastrì C, Chiarini L, Bevivino A, Fani R. Use of the *gyrB* gene to discriminate among species of the *Burkholderia cepacia* complex. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;281(2):175-82.

ANEXOS

ANEXOS



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 09/11/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 791/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0578.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “COMPLEXO BURKHOLDERIA CEPACIA E OUTROS PATÓGENOS EMERGENTES NA DOENÇA PULMONAR DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA IDENTIFICAÇÃO, PREVALÊNCIA E IMPORTÂNCIA CLÍNICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Priscila Dentini

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/10/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/10/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Conhecer a prevalência e incidência da infecção pulmonar causada pelos genômicos do Complexo Burkholderia cepacia e outros patógenos emergentes em pacientes com Fibrose Cística atendidos no HC da Unicamp; proceder a análise das relações clínico-laboratoriais com a finalidade de compreender o papel destes agentes na doença pulmonar para otimizar a terapêutica, orientar normas de proteção e isolamento e melhorar as condições clínicas destes pacientes.

III - SUMÁRIO

Trata-se de projeto de pesquisa de Mestrado em saúde da Criança e do Adolescente. Considerando as dificuldades de isolamento e caracterização do conjunto de bactérias não fermentadoras, através de métodos convencionais comprometem o diagnóstico laboratorial, a avaliação clínica e o tratamento adequado, o estudo propõe uma investigação clínico-laboratorial dos agentes no trato respiratório de pacientes com Fibrose Cística atendidos do Ambulatório de Pediatria do HC, no período de 01/01/2008 a 30/06/2009. Como complemento, serão utilizadas informações e amostras anteriores obtidas no período de 01/01/2006 a 31/12/2007. Inclui seis etapas: triagem da população de estudo; avaliação clínica dos pacientes; coleta de amostras do trato respiratório; diagnóstico microbiológico; confirmação do diagnóstico microbiológico através de análise molecular; correlação clínico-laboratorial e conclusões do estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Recomendação: Corrigir o telefone do CEP no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAwww.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html**V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2.007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ (nome do pai ou responsável), portador da cédula de identidade RG n.º _____, telefone _____ residente na rua _____, nº _____, bairro _____, cidade de _____, estado _____, declaro por livre espontânea vontade permitir a participação de _____ (nome da criança), com idade de _____ anos que se encontra sobre minha responsabilidade, na pesquisa **“Complexo *Burkholderia cepacia* EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA – IDENTIFICAÇÃO, PREVALÊNCIA E IMPORTÂNCIA CLÍNICA”**, sendo este projeto para tese de mestrado da aluna **Priscila Dentini**, da Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP.

Este estudo propõe a investigação clínico-laboratorial destes agentes no trato respiratório de pacientes com Fibrose Cística atendidos no HC / UNICAMP, com o objetivo de avaliar as dificuldades de identificação fenotípica, padronizar os métodos moleculares, compreender a importância dos mesmos e auxiliar a terapêutica. O Complexo *Burkholderia cepacia* tem sido apontado como um grupo de patógenos importantes na doença pulmonar de pacientes com Fibrose Cística (FC). Outros patógenos emergentes, incluindo *Ralstonia* spp.; *Pandoraea* spp.; *S. maltophilia* e *A. x. xylosoxidans*, entre outros, estão sendo isolados com frequência em amostras de pacientes com FC, porém, sua importância clínica ainda é pouco conhecida. As dificuldades de isolamento e caracterização deste conjunto de bactérias não fermentadoras, através de métodos convencionais comprometem não somente o diagnóstico laboratorial, mas a avaliação clínica e o tratamento adequados. Os resultados ficarão em absoluto sigilo, estando somente disponíveis para pesquisa. Vale esclarecer que a criança poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento, mesmo após a assinatura deste termo. O referido projeto será submetido à comissão de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Qualquer dúvida ligar para:

Pesquisadora: Priscila – Telefone (19) 3521-7435 / 9142-7008,

Orientador: Prof Dr. José Dirceu Ribeiro – Telefone: (19) 3521-7064 / 9175-3563

Orientador: Prof Dr. Carlos Emílio Levy – Telefone: (19) 3521-8663 / 9214-7525

Comitê de Ética em Pesquisa: (19) 37888936

Campinas, ____/____/____

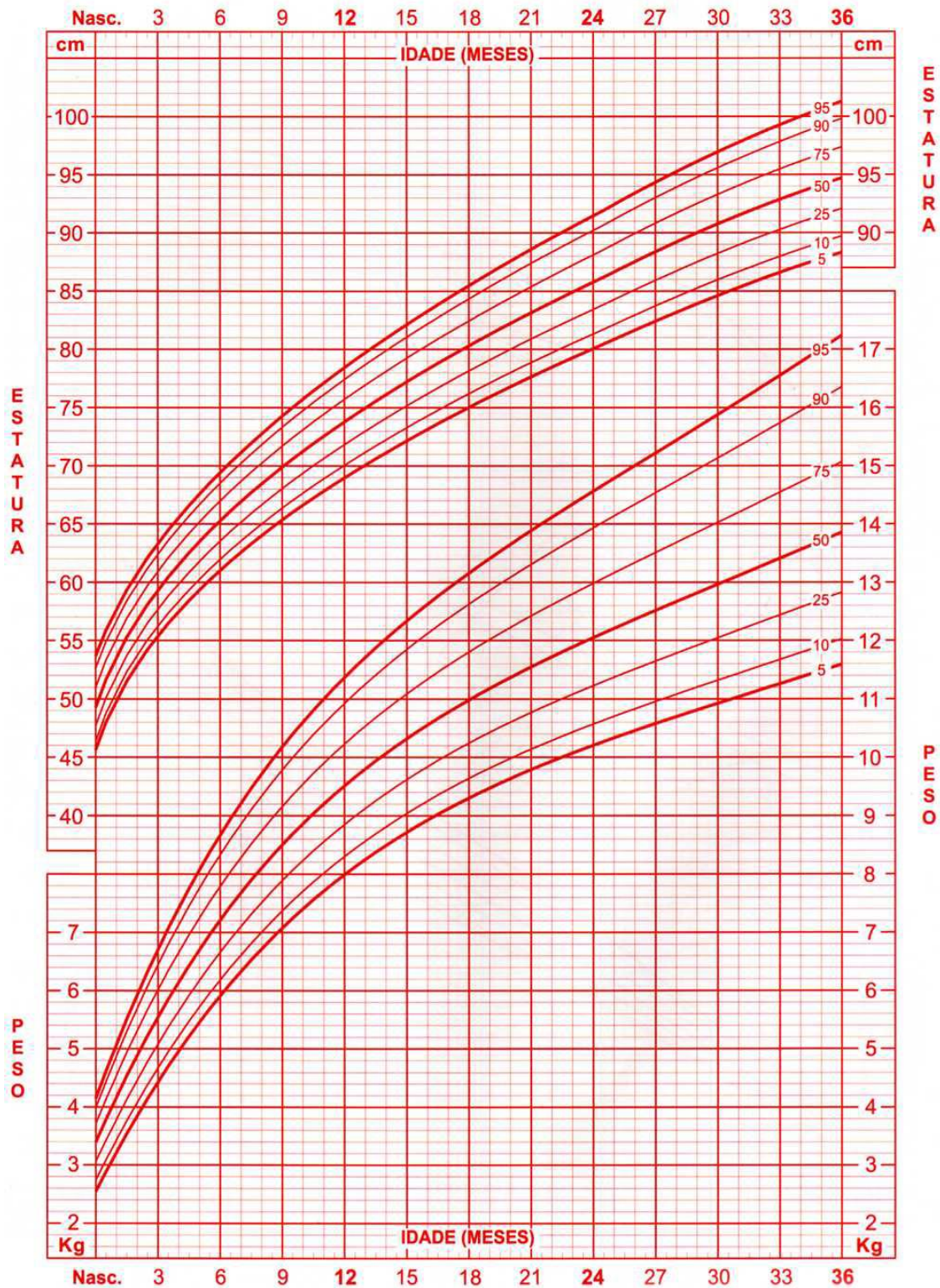
Nome do responsável: _____

CPF/RG: _____

Anexo 3

GRÁFICOS DE PERCENTIS – PESO/IDADE – ESTATURA/IDADE – IMC/IDADE

Nascimento a 36 meses: Meninas Percentis de estatura para idade e peso para idade



Anexo 3

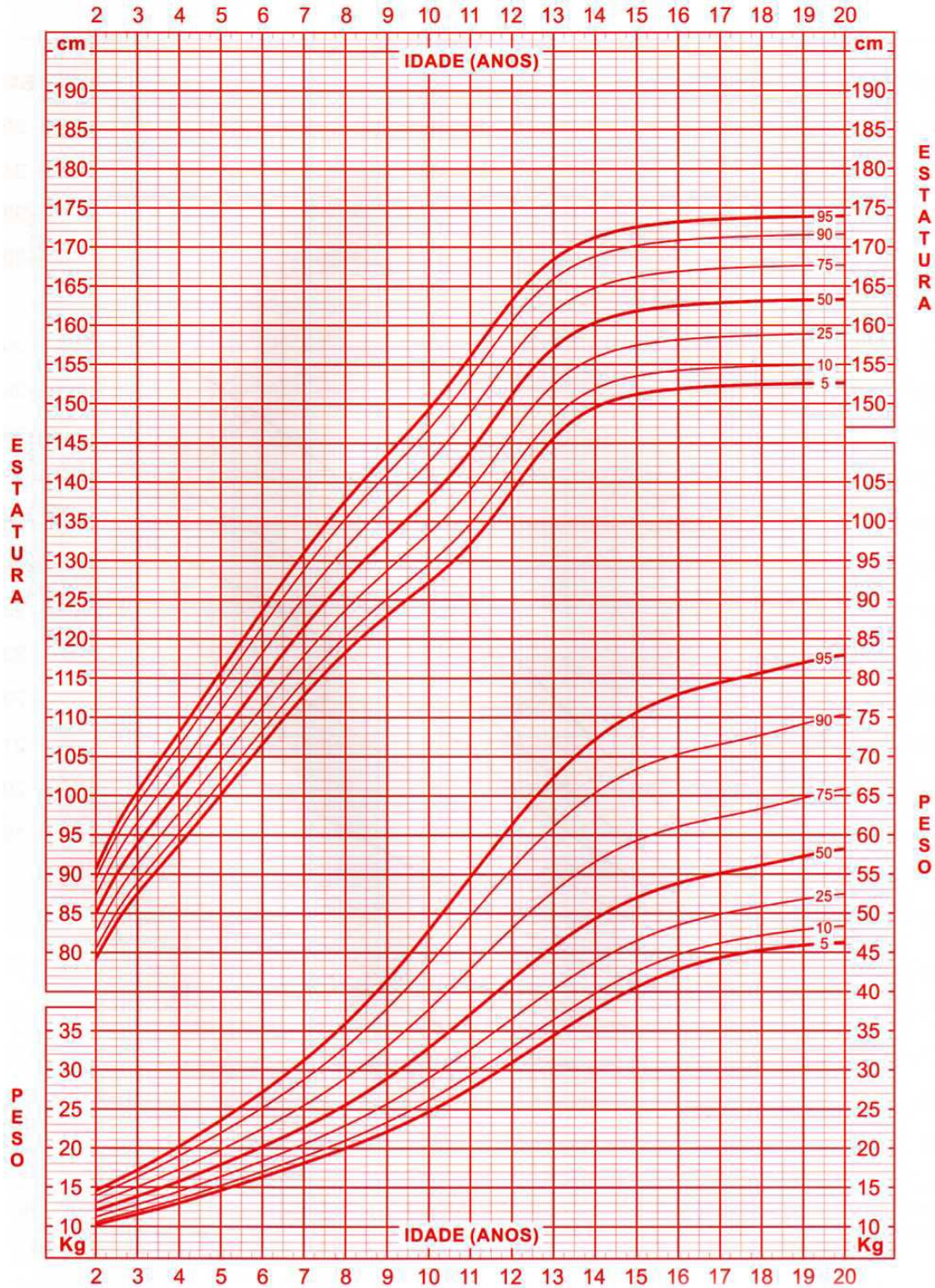
GRÁFICOS DE PERCENTIS – PESO/IDADE – ESTATURA/IDADE – IMC/IDADE

2 a 20 anos: Meninas

Percentis de estatura para idade e peso para idade

NOME _____

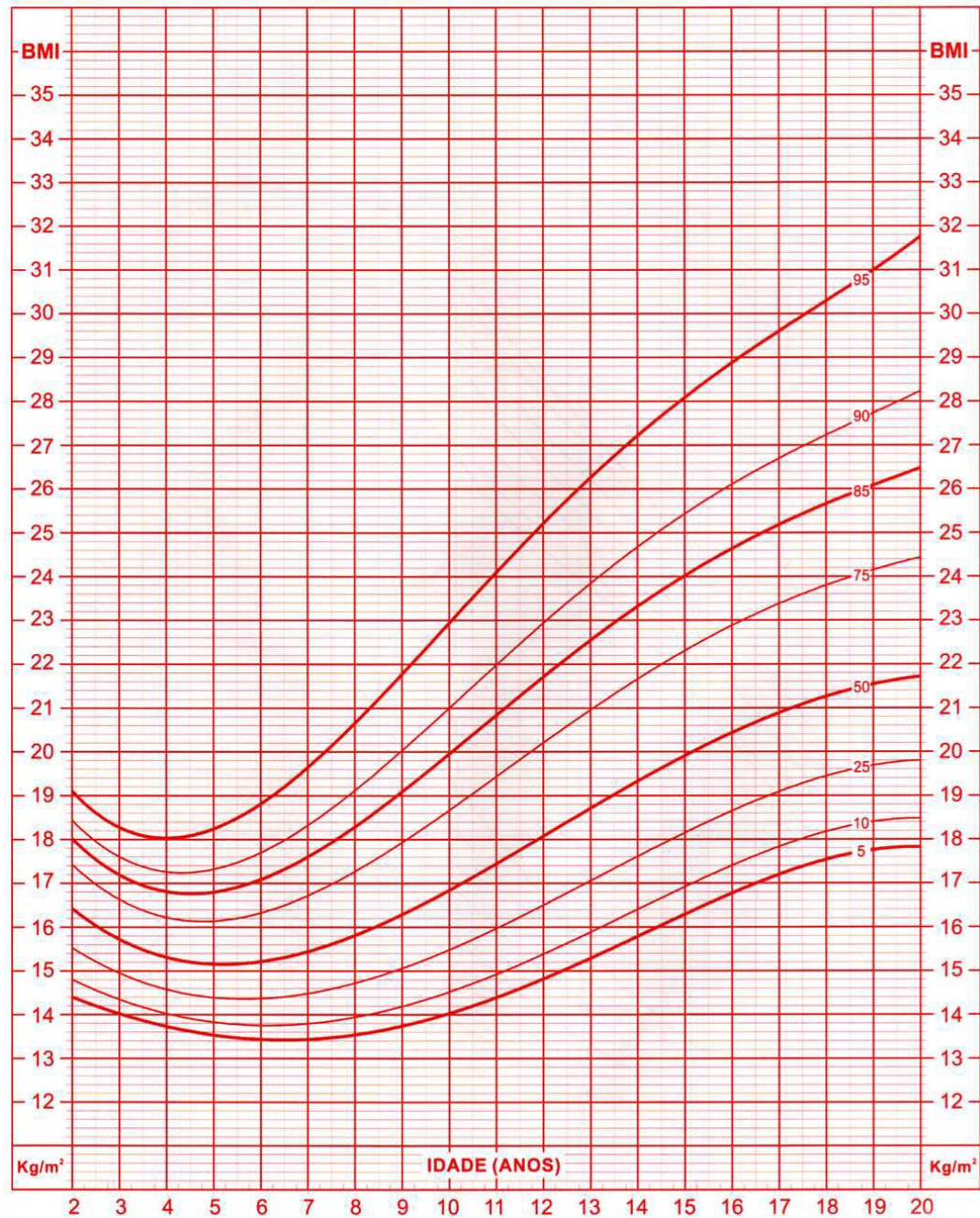
REGISTRO # _____



Anexo 3

GRÁFICOS DE PERCENTIS – PESO/IDADE – ESTATURA/IDADE – IMC/IDADE

2 a 20 anos: Meninas Percentis de idade por índice de massa corpórea

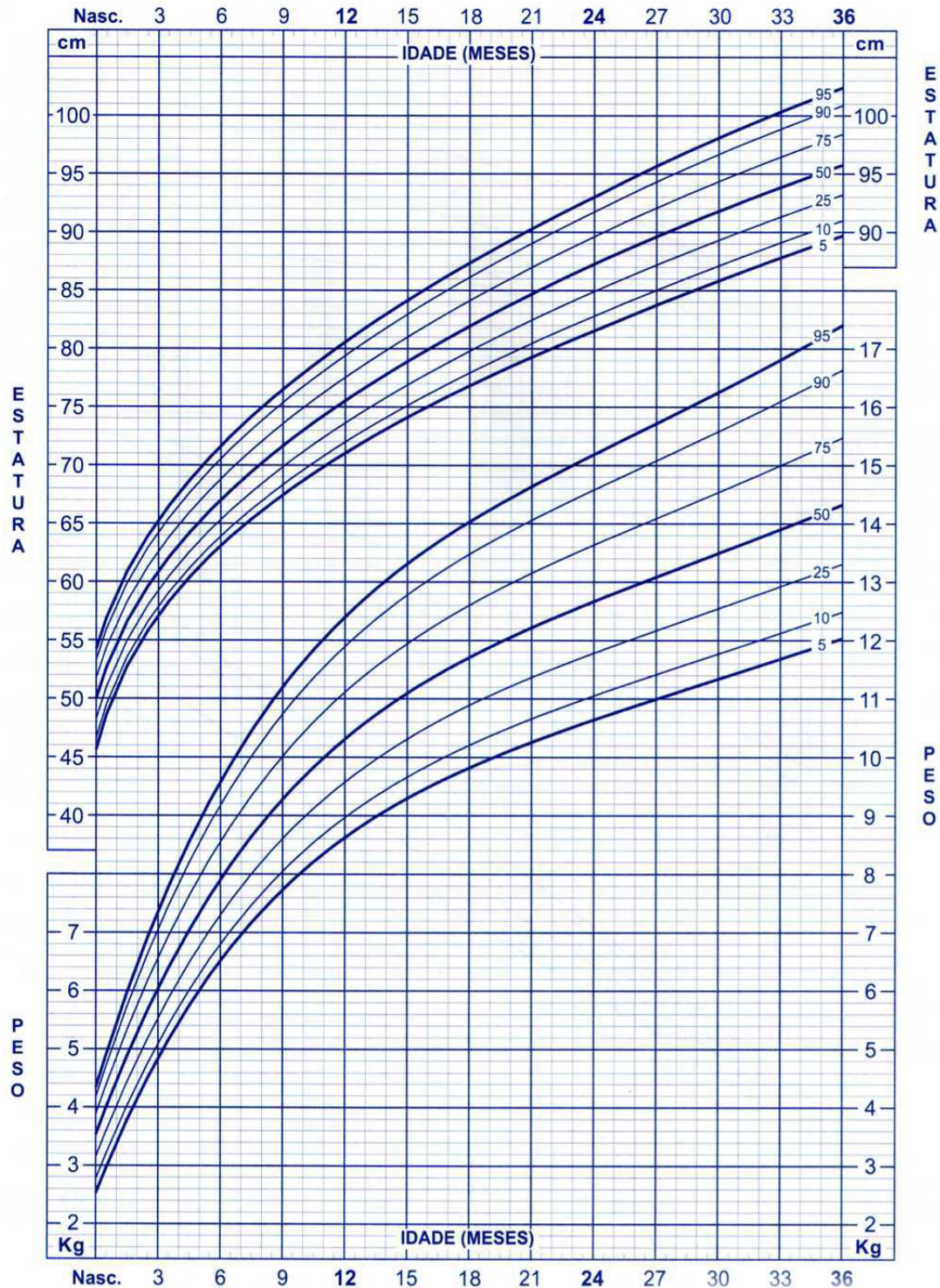


Published May 30, 2000 (modified 10/16/00).
SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with
the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>

Anexo 3

GRÁFICOS DE PERCENTIS – PESO/IDADE – ESTATURA/IDADE – IMC/IDADE

Nascimento a 36 meses: Meninos Percentis de estatura para idade e peso para idade



Published May 30, 2000 (modified 4/20/01).
SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with
the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>

Anexo 3

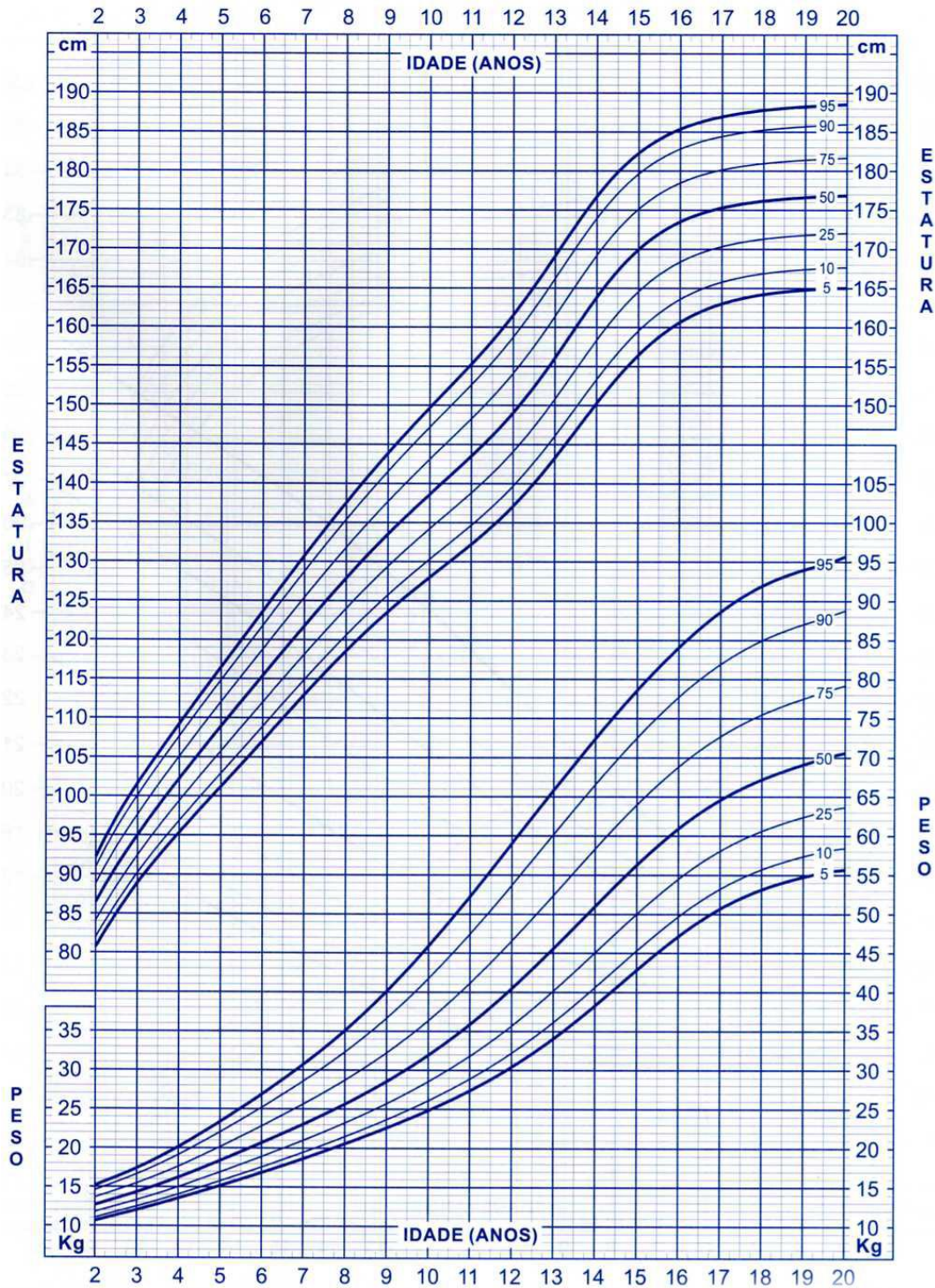
GRÁFICOS DE PERCENTIS – PESO/IDADE – ESTATURA/IDADE – IMC/IDADE

2 a 20 anos: Meninos

Percentis de estatura para idade e peso para idade

NOME _____

REGISTRO # _____



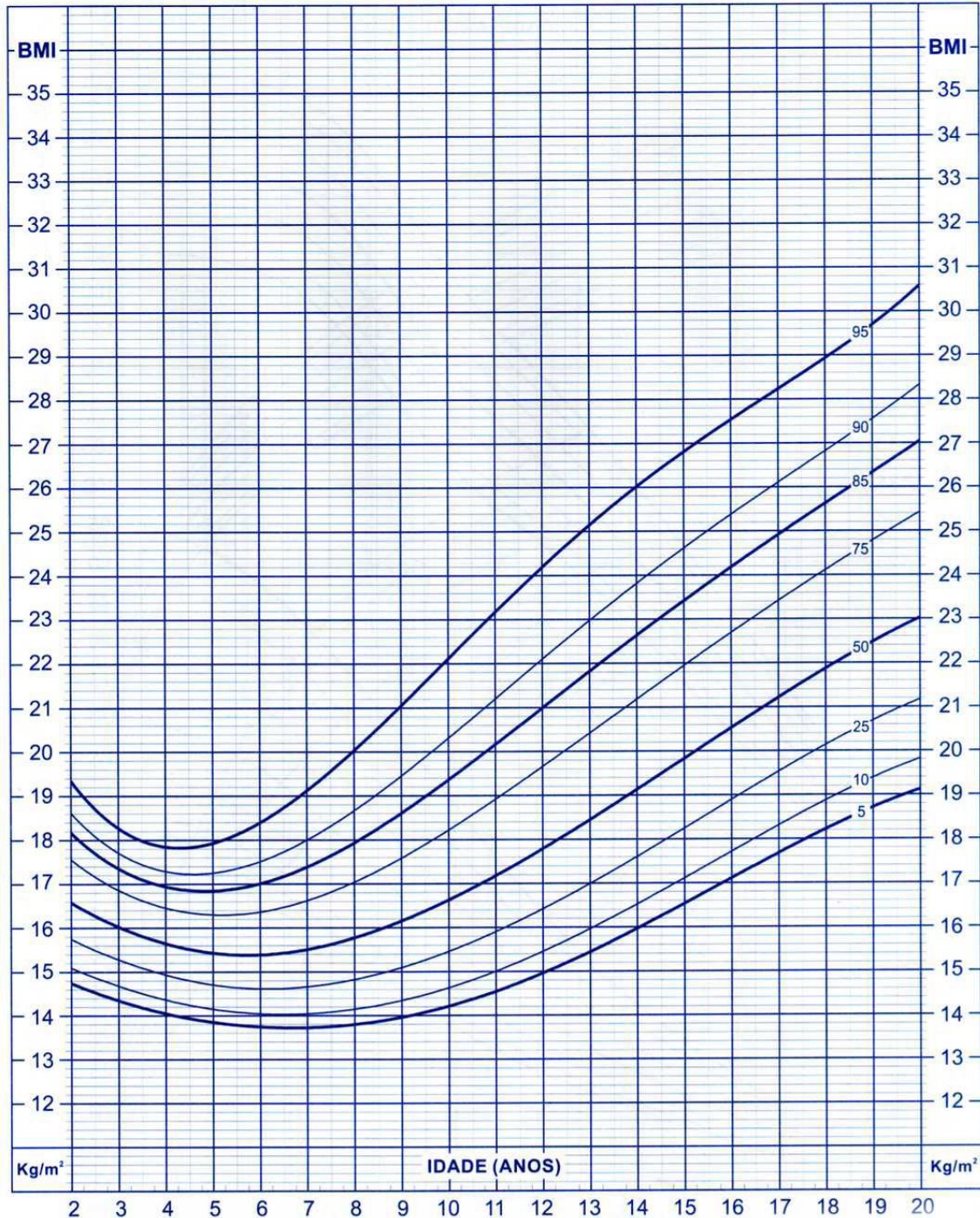
Published May 30, 2000 (modified 11/21/00).
 SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with
 the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>

Anexo 3

GRÁFICOS DE PERCENTIS – PESO/IDADE – ESTATURA/IDADE – IMC/IDADE

2 a 20 anos: Meninos

Percentis de idade por índice de massa corpórea



Published May 30, 2000 (modified 10/16/00).
 SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistic in collaboration with
 the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).
<http://www.cdc.gov/growthcharts>