

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Burkholderia  
cenocepacia* PROVENIENTES DE PACIENTES  
FIBROCÍSTICOS PELA TÉCNICA DE PFGE**

**Luana Pretto**

**Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina**

**2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Burkholderia*  
*cenocepacia* PROVENIENTES DE PACIENTES  
FIBROCÍSTICOS PELA TÉCNICA DE PFGE

**Luana Pretto**

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Co-orientadora: Me. Fernanda de Paris

Porto Alegre, julho de 2010.

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino e formação de qualidade.

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth pela oportunidade da orientação, disponibilidade, atenção e pelos valiosos ensinamentos.

À Mestre Fernanda de Paris um agradecimento especial pela ativa participação em todas as etapas do trabalho, pela paciência, pelo aprendizado adquirido e, sobretudo, pela amizade e confiança.

Às farmacêuticas-bioquímicas Andreza Francisco Martins, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, Maria Izolete Vieira e Odelta dos Santos pelos conhecimentos partilhados.

À equipe profissional da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do HCPA pela maneira acolhedora como sempre me receberam.

Aos meus queridos pais, Luiz e Suzana, pelo apoio incondicional e por todo amor e carinho que dedicaram em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Angelo e Luiza, pela amizade e pelos conselhos.

Ao meu namorado, Leonardo, pelo companheirismo, pela compreensão e pelo apoio indispensável nesta trajetória.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BCESM - *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker

CBC – complexo *Burkholderia cepacia*

CFTR - *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CHEF – *contour-clamped homogeneous electric field*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

ET12 – *electrophoretic type 12*

FC – Fibrose Cística

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

PCR – *polymerase chain reaction*

PFGE – *pulsed field gel electrophoresis*

UPGMA – *unweighted pair-group method with average linkages*

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	7
2. INTRODUÇÃO	
2.1. A Fibrose Cística.....	9
2.2. Infecções em Fibrose Cística.....	11
2.3. O Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	13
2.3.1. <i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	15
2.3.2. Propagação interpessoal de cepas.....	16
2.4. Tipagem Molecular de Microrganismos.....	18
2.5. A Técnica de Macrorestrição de DNA seguida de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.....	19
2.5.1. Princípio da técnica.....	19
2.5.2. A metodologia.....	20
2.5.3. Interpretação dos perfis genotípicos.....	21
3. OBJETIVOS.....	27
4. REFERÊNCIAS.....	28
5. ARTIGO.....	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47

## 1. RESUMO

**Introdução:** A fibrose cística (FC) é uma doença genética que predispõe os portadores a infecções crônicas recorrentes do trato respiratório. O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), formado por espécies bacterianas estreitamente relacionadas (genomovares), são bacilos Gram-negativos não fermentadores que causam graves infecções oportunistas em pacientes fibrocísticos. Dentre as espécies do complexo, *B. cenocepacia* (genomovar III) é considerada a mais virulenta e a que possui o maior potencial de se propagar entre os pacientes com FC. A macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é uma técnica de tipagem molecular que permite avaliar similaridade genética entre microrganismos e o grau de similaridade entre cepas isoladas de pacientes tratados no mesmo centro pode evidenciar transmissão interpessoal.

**Objetivo:** Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi realizar a tipagem molecular por PFGE de isolados de *B. cenocepacia* provenientes de pacientes fibrocísticos, com o intuito de avaliar o grau de similaridade genética entre eles.

**Materiais e Métodos:** Foram submetidos à técnica de PFGE 28 isolados de *B. cenocepacia* (19 isolados III A e 9 isolados III B) provenientes de pacientes com FC atendidos no HCPA no ano de 2008 e um isolado da cepa de *B. cenocepacia* III A ET12. Os perfis genotípicos gerados por PFGE foram analisados pelo *software* BioNumerics, que mostra o percentual de similaridade entre os isolados através da construção de dendrogramas.

**Resultados:** Isolados do mesmo paciente, com períodos de isolamento diferentes, apresentaram o mesmo perfil genotípico (mesmo clone). Na análise de similaridade entre isolados de pacientes diferentes, os resultados mostraram a presença de alguns grupos clonais formados por mais de um isolado. Constatou-se também que os isolados de *B. cenocepacia* III A analisados possuem baixa similaridade com a cepa ET12.

**Discussão:** Os resultados obtidos sugerem a ocorrência de disseminação clonal de cepas de *B. cenocepacia* entre os pacientes fibrocísticos e a permanência de infecção no paciente pela mesma cepa após períodos prolongados de antibioticoterapia.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. A Fibrose Cística

A fibrose cística (FC) é a doença genética de herança autossômica recessiva mais comum em populações caucasianas, com uma incidência de aproximadamente 1 em 2.500 nascidos vivos e uma frequência de portadores de 1 em 25 [1, 2]. No mundo, mais de 50.000 pessoas são afetadas e muitas mais carregam o gene defeituoso que resulta na FC [2]. Quando a doença foi descrita pela primeira vez em 1938, 80% dos bebês afetados morreram antes de completar o primeiro ano de vida. A melhor compreensão da doença e a melhoria das condições de tratamento nos últimos anos resultaram em um aumento dramático no tempo médio de sobrevida dos pacientes fibrocísticos [3].

A FC é causada por mutações em um gene, localizado no braço longo do cromossomo 7, que é responsável pela codificação de uma proteína de 1480 aminoácidos conhecida como CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [4]. Já foram descritas 1521 mutações ao longo de todo o gene CFTR. A denominação das mutações descreve a alteração na sequência ao nível de DNA. A mutação  $\Delta F508$  é a mais prevalente, tendo sido a primeira identificada. O seu aparecimento é condicionado pela deleção da sequência CTT, causando perda da fenilalanina na posição 508. Na população mundial, cerca de 70% dos casos de FC correspondem a esta mutação [5].

A proteína CFTR constitui um canal de cloro na membrana apical das células epiteliais exócrinas, participando da regulação do transporte eletrolítico através das membranas celulares [4]. Esta proteína pertence a uma família de proteínas designada ABC (*ATP-Binding Cassette*), que inclui proteínas que participam da regulação do transporte transmembranar de íons, aminoácidos e bactérias [5]. O mecanismo preciso pelo qual a disfunção da CFTR leva ao fenótipo da FC é desconhecido, embora esteja claro que os efeitos da disfunção dessa proteína no epitélio das vias aéreas sejam responsáveis pelo aumento da viscosidade das secreções respiratórias e diminuição da habilidade do organismo em combater as infecções bacterianas [6].

As manifestações clínicas da FC afetam órgãos que expressam a proteína CFTR. Em geral, a doença apresenta comprometimento multissistêmico, caracterizado pela perda progressiva da função pulmonar, insuficiência pancreática exócrina, doença hepática, perturbações da motilidade intestinal, infertilidade masculina (azoospermia obstrutiva) e elevadas concentrações de eletrólitos no suor [4]. As mudanças mais notáveis são observadas nas vias respiratórias, onde o defeito genético básico leva à instalação de infecções crônicas do trato respiratório causadas por patógenos bacterianos tipicamente isolados de pacientes fibrocísticos [7].

O diagnóstico da FC inclui a presença de pelo menos um achado fenotípico, história familiar de FC ou triagem neonatal positiva, acompanhada de evidência laboratorial de disfunção da CFTR (teste do suor

positivo ou diferença de potencial nasal (DPN) positivo), ou pela identificação de mutações conhecidas como causa de FC no gene da CFTR [4].

O tratamento da doença é baseado no tratamento sintomático e na correção das disfunções orgânicas. O regime terapêutico padrão para a doença pulmonar inclui antibioticoterapia, higiene das vias aéreas, agentes mucolíticos, broncodilatadores, agentes antiinflamatórios, suporte nutricional e suplementação de oxigênio [4].

## **2.2. Infecções em Fibrose Cística**

O defeito primário da FC, que compromete a proteína reguladora de condutância transmembranar da FC (CFTR), resulta em aumento da viscosidade das secreções glandulares exócrinas. Essas alterações acarretam, no epitélio das vias aéreas, diminuição da depuração mucociliar, alterações inflamatórias e predispõem à infecção do trato respiratório. Dessa forma, a FC é uma doença associada a infecções respiratórias recorrentes ou persistentes [8].

A colonização bacteriana crônica das vias aéreas principais, que leva a exacerbações debilitantes da infecção pulmonar, é a principal causa de morbi-mortalidade em pacientes com FC [9]. O pulmão fibrocístico apresenta um ambiente único aos microrganismos patogênicos. Em indivíduos saudáveis, as bactérias inaladas são direcionadas ao revestimento das vias respiratórias principais contendo muco, movidas em direção à boca por depuração mucociliar e, em seguida, são engolidas e destruídas pelos ácidos do estômago; patógenos oportunistas capazes de superar a depuração mucociliar são confrontados com células fagocíticas auxiliadas

por mecanismos imunológicos, incluindo anticorpos opsonizantes específicos. Em pacientes fibrocísticos, a depuração mucociliar de bactérias dos pulmões fica comprometida devido à natureza viscosa das secreções respiratórias [2].

As infecções em FC são provocadas por um conjunto único de bactérias que são adquiridas segundo uma sequência temporal relativamente conhecida [10]. Dentre os microrganismos envolvidos, os mais frequentes são *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* [11]. Nas crianças fibrocísticas, as infecções são mais comumente causadas por *S. aureus* e *H. influenzae*, os quais podem ser isolados em outras crianças com doenças crônicas e em adultos não-fibrocísticos com bronquiectasias [10]. *P. aeruginosa* é uma das bactérias mais importantes na infecção crônica em pacientes fibrocísticos adultos. Sua ocorrência pode se dar muito precocemente na vida do paciente com FC e está associada com um declínio mais rápido da função pulmonar do que nos pacientes não infectados [8].

Com a melhora da sobrevida dos fibrocísticos, patógenos emergentes como bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans* também têm sido isolados de amostras respiratórias desses pacientes [4, 11]. Destas bactérias, o complexo *B. cepacia* é o que provoca o quadro clínico mais grave devido ao desenvolvimento de febre alta, bacteremia e rápida progressão de pneumonia necrotizante à morte [10].

### 2.3. O Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC)

*Burkholderia cepacia* foi descrita pela primeira vez em 1950 por William Burkholder como *Pseudomonas cepacia*, um fitopatógeno responsável pela podridão bacteriana da escama da cebola [12, 13]. A análise taxonômica molecular de *P. cepacia* e espécies relacionadas oriundas de diversos ambientes, incluindo patógenos de plantas, animais e seres humanos, levou à sua inclusão no novo gênero *Burkholderia* [13].

*B. cepacia* foi primeiramente identificada como uma bactéria única, no entanto, estudos taxonômicos detalhados classificaram este microrganismo como um complexo de dez espécies estreitamente relacionadas (também chamadas de genomovares). Este complexo consiste nas espécies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* e *B. ubonensis* (genomovares I ao X, respectivamente) [14, 15, 16]. Recentemente, sete novas espécies, incluindo *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans* e *B. lata* foram propostas [17]. Na espécie *B. cenocepacia*, distinguem-se ainda quatro subgrupos filogenéticos designados por III A, III B, III C e III D [18]. Essa distinção de *B. cenocepacia* em subgrupos deve-se a sua alta heterogeneidade genética baseada no polimorfismo do gene *recA* [19].

O CBC é formado por bactérias geneticamente distintas, mas fenotipicamente similares, que têm emergido como patógenos pulmonares de pacientes imunocomprometidos [20]. São bacilos Gram-negativos não fermentadores, nutricionalmente versáteis, que causam graves infecções oportunistas, particularmente, em indivíduos fibrocísticos [21]. Em geral, são

microrganismos encontrados no solo e na água, podendo ser também encontrados na rizosfera como simbiontes ou patógenos de plantas. Causam infecções oportunistas no homem nos casos clínicos que envolvem pacientes imunodeprimidos ou através da contaminação de instrumentos médicos. Somente causam infecção primária significativa em pacientes com FC ou doença granulomatosa crônica [12, 22].

Todas as espécies do CBC possuem genomas muito grandes, variando entre 6 e 9 Mb de tamanho, e separam seu DNA em dois ou mais replicons, o que proporciona grande flexibilidade na aquisição, perda e expressão de genes. Esta enorme capacidade genética é que sustenta a versatilidade do CBC em ambientes naturais e no organismo dos pacientes infectados [15].

A infecção pelo CBC é especialmente problemática nos pacientes com FC devido à gravidade potencial das manifestações respiratórias, à fácil propagação interpessoal e à resistência intrínseca dessas bactérias a um amplo espectro de agentes antimicrobianos, desinfetantes e anti-sépticos [18, 20]. Alguns pacientes apresentam colonização transitória e outros colonização crônica ou assintomática. O desfecho clínico da infecção pelo CBC varia de colonização brônquica à deterioração dramática e fatal da função pulmonar, com pneumonia necrotizante e septicemia, quadro esse conhecido como “síndrome cepacia”. As taxas globais de mortalidade devido à colonização pelo CBC podem chegar a 50%, dependendo da espécie [14, 21].

### 2.3.1. *Burkholderia cenocepacia*

*B. cenocepacia* é o membro do CBC com maior prevalência entre os pacientes com FC, seguida por *B. multivorans* [16, 23]. É encontrada em solos agrícolas, na rizosfera do milho, em campos de plantio de cebola e, ocasionalmente, no solo de áreas urbanas [11].

*B. cenocepacia* é considerada mais virulenta do que as outras espécies do complexo e está envolvida na maioria dos casos de propagação interpessoal da infecção pelo CBC [1, 24]. Foram identificados nesta espécie fatores de virulência como proteases, fosfolipases e sideróforos. Sob condições de alta concentração de NaCl, cepas de *B. cenocepacia* expressam o gene *cblA*, que codifica o *pili* bacteriano (estrutura que medeia a aderência da bactéria e invasão das células epiteliais respiratórias) [25, 26]. Estes organismos também possuem BCESM (*B. cepacia epidemic strain marker*), que codifica um regulador transcricional de função ainda desconhecida [26].

É considerada a espécie do CBC responsável pela “síndrome cepacia” e está associada com a maior mortalidade dos pacientes infectados quando comparada às outras espécies do complexo [27]. Uma das características marcantes de infecção por *B. cenocepacia* é a dificuldade de erradicar a bactéria devido à sua resistência intrínseca a muitos antibióticos [28].

Pacientes infectados por *B. cenocepacia* apresentam um curso clínico variável e imprevisível, variando de assintomático a um quadro fatal. Os casos mais dramáticos de infecção pelo CBC foram relacionados a uma cepa altamente transmissível de *B. cenocepacia* III A, nomeada ET12

(*electrophoretic type 12*), que se espalhou entre os pacientes fibrocísticos do Canadá, Inglaterra e Escócia na década de 80 e que levou à denominação da “síndrome cepacia” [29, 30]. A ET12 expressa o gene *cbIA*, que é um marcador útil para a cepa e foi associado com a patogenicidade e com o comportamento epidemiológico da bactéria [26, 31]. Os pacientes infectados pela ET12 possuem elevado risco de mau prognóstico após transplantação pulmonar [32].

### **2.3.2. Propagação interpessoal de cepas**

A propagação de cepas do CBC entre os pacientes fibrocísticos, tanto no contexto de cuidados de saúde como fora deste contexto, ocorre através do contato direto ou indireto com secreções infectadas e partículas infecciosas disseminadas [33]. Este contato ocorre por meio de internações hospitalares simultâneas ou por contato social fora do hospital [34]. No ambiente hospitalar, a aquisição do CBC está associada com hospitalização recente, higienização inadequada das mãos, uso de equipamento para terapia respiratória contaminado e, possivelmente, uso de chuveiros. No contato social fora do hospital, a propagação ocorre pela partilha de itens de uso pessoal (por exemplo, talheres), beijo, contato íntimo, aperto de mão, entre outras situações (Tabela 1) [11].

Até o momento, a estratégia mais eficaz adotada nos centros de FC para combater infecções pelo CBC tem sido a estrita segregação dos pacientes infectados. Embora bem sucedida, a política de segregação não previne a aquisição esporádica de organismos do CBC de ambientes naturais [35].

Tabela 1. Fatores associados com a aquisição do CBC.\*

---

**Fator de risco em contextos fora dos cuidados de saúde**

- Participação em acampamento de verão de FC
  - Dormir na mesma barraca
  - Compartilhar itens de uso pessoal (por exemplo, talheres)
  - Dançar com ou abraçar um campista infectado com CBC
- Participação em programa educativo de verão
- Participação em um grupo de apoio para adultos com FC

**Contato social**

- Beijar
- Contato íntimo
- Viagens prolongadas de carro
- Aula em academia
- Partilha do mesmo copo
- Aperto de mão

Irmãos com CBC

**Fator de risco em contextos de cuidados de saúde**

- Riscos de internação
  - Hospitalização recente
  - Uso de chuveiro específico
  - Partilha de quarto hospitalar com outro paciente infectado com CBC
  - Ser cuidado por um estudante de medicina
- Uso de equipamentos para terapia respiratória
  - Partilha de equipamento
  - Nebulizadores hospitalares
  - Espirômetro
  - Filtros do bocal

---

\*Adaptado de Saiman & Siegel, 2004 [11].

## 2.4. Tipagem Molecular de Microrganismos

As técnicas moleculares são muito eficazes no monitoramento da propagação de infecções nosocomiais devido aos patógenos envolvidos serem, na maioria das vezes, geneticamente relacionados. Nos últimos anos, os métodos de genotipagem têm sido amplamente utilizados para analisar a relação entre os microrganismos, pois permitem determinar se organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados [36].

A tipagem de microrganismos por métodos moleculares permite investigar clonalidade de cepas isoladas de um grupo de pacientes tratados no mesmo centro e o grau de similaridade dos isolados analisados pode evidenciar transmissão interpessoal. Desse modo, a vigilância epidemiológica das infecções respiratórias por cepas do CBC é de fundamental importância para os centros de tratamento de pacientes com FC [11].

As técnicas de biologia molecular ocupam posição de destaque entre as ferramentas de investigação epidemiológica, pois possibilitam a tipagem dos microrganismos com grande poder discriminatório. Entre os métodos utilizados, a macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerado o padrão-ouro [37].

## **2.5. A Técnica de Macrorestrição de DNA seguida de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado**

A restrição do DNA com enzimas de ação rara no genoma bacteriano seguida de eletroforese em gel de campo pulsado é a técnica mais utilizada para separar grandes fragmentos de DNA por meio da reorientação desses fragmentos no gel pela ação de campos elétricos alternados [38]. Esta técnica é reconhecida como padrão-ouro para tipagem molecular, pois possibilita a análise de um grande número de espécies bacterianas diferentes sendo considerado o método mais reprodutível e de maior poder discriminatório [36, 37].

### **2.5.1. Princípio da técnica**

A eletroforese de DNA em gel é uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular [39]. Em uma eletroforese convencional com gel de agarose, é possível separar moléculas de DNA que se posicionam no gel em função do seu peso molecular, que pode variar de 0.1 a 60 kb. Acima desse tamanho, os fragmentos de DNA migram juntos, pois são maiores que os poros do gel, e sob um campo elétrico estão sujeitos a produzirem forças contrárias ao movimento [40].

O problema da co-migração foi estudado inicialmente por Schwartz *et al.* (1982) e Schwartz & Cantor (1984). Baseados no fato de que o tempo de reorientação das moléculas de DNA está relacionado ao tamanho, empregaram a estratégia de desorganizar a orientação de um campo elétrico estabelecido e forçar as moléculas a processos de reorientação [40].

Para esse fim, em 1983, os pesquisadores desenvolveram um sistema de eletroforese com dois campos elétricos perpendiculares em suas direções de migração de modo que, após um certo tempo de corrida (pulso), a direção era alterada, forçando as moléculas à migração em nova direção. As grandes moléculas de DNA que migram segundo um processo de reptação se reorientam quando da alteração do campo elétrico, até tomarem novamente a conformação esticada que permite sua passagem pelos poros do gel. O tempo dispendido neste processo de reorientação é proporcional ao tamanho da molécula, de modo que as menores se adiantam em relação às maiores e, portanto, podem ser separadas. O método foi denominado “eletroforese em gel de campo pulsado”, PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) [39, 40].

### **2.5.2. A metodologia**

A técnica de PFGE envolve várias etapas. As células bacterianas são incorporadas em agarose sob a forma de blocos (para manter a integridade do DNA) e são submetidas à lise celular *in situ* com enzimas que rompem a parede e a membrana celular bacterianas. Sucessivas lavagens são realizadas para a remoção dos restos celulares. Para a digestão do DNA cromossomal bacteriano, os blocos são incubados com uma endonuclease de restrição que cliva com baixa frequência (corte raro), reproduzindo perfis de macrorestrição de DNA. Como os fragmentos resultantes da restrição são muito grandes, são separados por uma eletroforese sob corrente elétrica aplicada em pulsos (direções alternadas) realizada de acordo com parâmetros pré-determinados. Os perfis genotípicos dos isolados analisados

são então comparados uns com os outros para determinar a sua similaridade [37].

### **2.5.3. Interpretação dos perfis genotípicos**

Para a interpretação correta e epidemiologicamente relevante dos padrões de fragmentos de DNA gerados por PFGE, é necessário que se compreenda como os eventos genéticos aleatórios podem vir a alterar os perfis genotípicos obtidos pela técnica. Idealmente, isolados bacterianos envolvidos em surtos de infecção apresentam perfis genotípicos indistinguíveis um dos outros e perfis distintos daqueles isolados não-relacionados ao surto. No entanto, eventos genéticos aleatórios como mutações, inserções e deleções de DNA podem alterar os padrões gerados por PFGE durante o curso de um surto (Figura 1). Neste contexto, a compreensão da influência dos eventos genéticos sobre os padrões de PFGE permite classificar os isolados envolvidos em uma das seguintes categorias: padrão indistinguível daquele do surto, padrão estreitamente relacionado ao do surto, padrão possivelmente relacionado ao do surto, ou padrão não-relacionado ao surto [37].

A análise de similaridade genética entre isolados bacterianos pode ser realizada não apenas nos casos de surtos de infecção hospitalar, mas também para avaliar a propagação de patógenos entre pacientes tratados em um mesmo centro, como ocorre na FC. Ao invés de comparar os perfis genotípicos dos isolados que se quer analisar com uma cepa índice (como ocorre em surtos monoclonais), em casos de propagação interpessoal específica (restrita à um grupo particular de pacientes) os isolados são

comparados entre si e alocados em grupos clonais de acordo com o grau de similaridade genética [30].

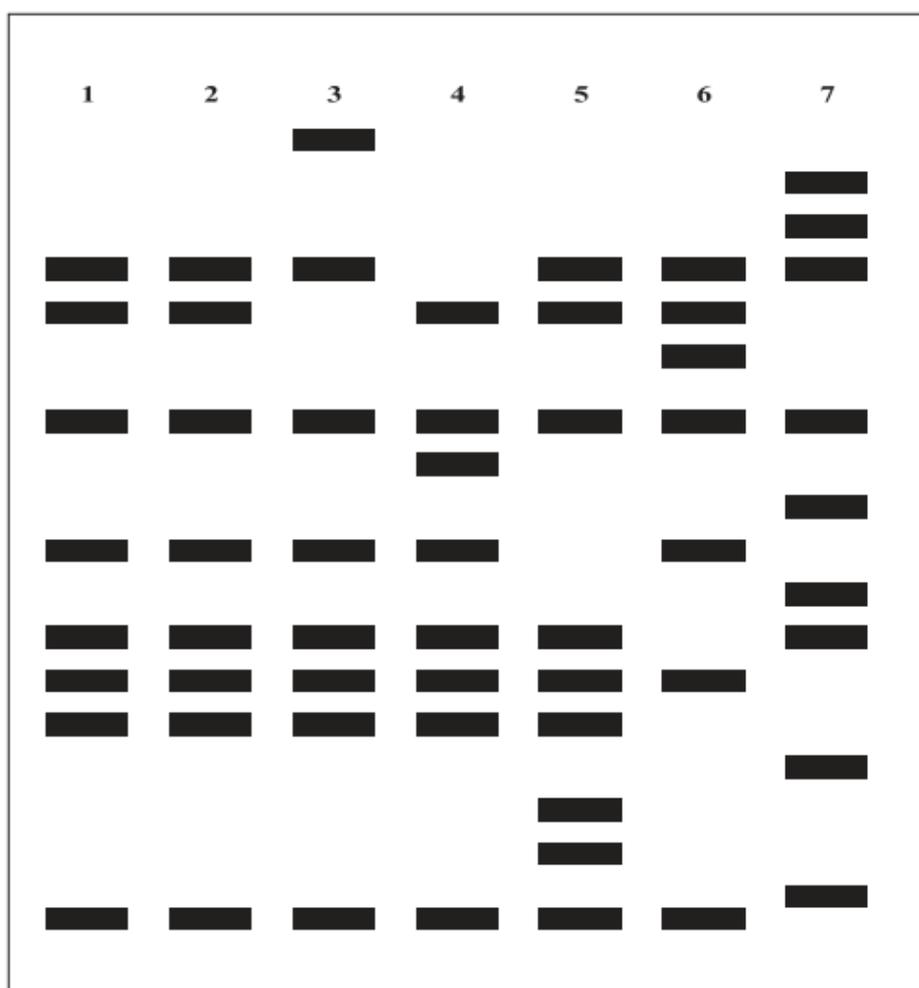
Bactérias envolvidas em um surto (ou propagação interpessoal específica) devem apresentar padrões indistinguíveis e aquelas não envolvidas devem apresentar padrões genotípicos distintos. Considera-se que um mínimo de dez fragmentos de DNA, que representam dez bandas no gel, devem ser obtidos para que a técnica tenha poder discriminatório alto [37].

Quando isolados bacterianos têm seus padrões de bandas gerados por PFGE comparados, é possível detectar a relação genética entre eles. Os isolados são considerados geneticamente indistinguíveis se seus padrões de restrição tiverem o mesmo número de bandas e as bandas correspondentes tiverem o mesmo tamanho aparente; a interpretação epidemiológica, neste caso, é que os isolados representam a mesma cepa. Os isolados são considerados estreitamente relacionados se a diferença entre seus padrões de restrição for compatível com um único evento genético, ou seja, uma mutação de ponto, uma inserção ou uma deleção de DNA; essas alterações genéticas tipicamente resultam em diferença de duas a três bandas no gel. Os isolados são considerados possivelmente relacionados se a diferença entre seus padrões de restrição for compatível com dois eventos genéticos independentes; essas alterações são resultantes de inserções ou deleções de DNA ou da criação ou da perda de sítios de restrição e causam uma diferença de quatro a seis bandas no gel. Os isolados são considerados diferentes (não-relacionados) se a diferença entre seus padrões de restrição for compatível com três ou mais eventos genéticos; em geral, essas

alterações causam uma diferença de sete bandas ou mais no gel (Tabelas 2 e 3) [37].

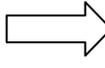
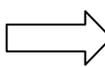
A análise dos perfis genotípicos pode ser realizada utilizando um *software* como o BioNumerics, que permite analisar os dados contidos nas imagens dos géis. O *software* tem a vantagem de conseguir comparar um grande número de isolados, já que tem a capacidade de normalizar os padrões de bandas de vários géis e armazenar as informações em um banco de dados. Além disso, contém algoritmos que permitem a análise filogenética dos isolados, através da construção de dendrogramas pelo método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA). Nesta análise por dendrogramas, em geral, isolados são considerados idênticos se apresentarem 100% de similaridade e possuem relação clonal se a similaridade entre eles for maior do que 80% [36, 37].

Figura 1. Esquema de padrões de PFGE.\* Canaletas 1 e 2 representam isolados com padrões indistinguíveis. Canaleta 3, um dos fragmentos recebeu uma inserção de DNA e aumentou de tamanho. Canaleta 4, um dos fragmentos sofreu uma deleção de DNA e diminuiu de tamanho. Canaleta 5, uma mutação criou um sítio de restrição, aumentando o número de fragmentos. Canaleta 6, uma mutação alterou um sítio de restrição e dois fragmentos foram perdidos, surgindo um de maior tamanho. Canaleta 7, isolado com padrão diferente, não relacionado ao padrão do surto (canaletas 1 e 2).



\*Adaptado de Magalhães et al., 2005 [38].

Tabela 2. Efeitos de eventos genéticos sobre os padrões de fragmentos de PFGE.\*

Tipo de evento genético		Mudanças resultantes no padrão de PFGE em comparação ao padrão do surto
Mutação de ponto resultando na criação de um sítio de restrição		O padrão alterado terá falta de um fragmento e adição de dois novos fragmentos menores em comparação ao padrão do surto. A soma dos tamanhos dos dois fragmentos menores deve se aproximar do tamanho do fragmento maior substituído. Esta é considerada uma diferença de 3 fragmentos.
Mutação de ponto resultando na perda de um sítio de restrição		O padrão alterado terá adição de um novo fragmento maior e perda de dois fragmentos menores em comparação ao padrão do surto. Esta é uma diferença de 3 fragmentos.
Inserção de DNA em um fragmento de restrição existente (o novo DNA não possui um sítio de restrição)		O padrão alterado terá o mesmo número de fragmentos, porém perderá um fragmento menor e apresentará um novo fragmento de tamanho maior. Esta diferença de dois fragmentos é referida como mudança de fragmento.
Deleção de DNA de um fragmento (o material deletado não possui um sítio de restrição)		O padrão alterado apresentará um novo fragmento de tamanho menor e perderá um fragmento maior. Esta é uma diferença de 2 fragmentos.

\*Adaptado de Tenover et al., 1995 [37].

Tabela 3. Critérios para a interpretação dos padrões de fragmentos de PFGE.\*

<b>Categoria</b>	<b>Nº de diferenças genéticas em comparação à cepa do</b>	<b>Nº de fragmentos diferentes em comparação ao padrão</b>	<b>Interpretação epidemiológica</b>
Indistinguível	0	0	Isolado relacionado ao surto
Estreitamente relacionado	1	2-3	Isolado provavelmente
Possivelmente relacionado	2	4-6	Isolado possivelmente
Diferente	≥3	≥7	Isolado não relacionado ao surto

\*Adaptado de Tenover et al., 1995 [37].

### 3. OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Realizar a tipagem molecular, através da técnica de PFGE, de isolados de *Burkholderia cenocepacia* provenientes de pacientes fibrocísticos atendidos no HCPA no ano de 2008.

- **Objetivos Específicos**

- ❖ Através da análise dos perfis genotípicos obtidos por PFGE:

Avaliar o grau de similaridade genética existente entre isolados de *B. cenocepacia* de um mesmo paciente.

Avaliar o grau de similaridade genética existente entre isolados de *B. cenocepacia* provenientes de pacientes diferentes.

Comparar os perfis genotípicos dos isolados III A em estudo com o perfil genotípico de um isolado da cepa de *B. cenocepacia* ET12.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coenye T, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3300-7.
2. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev. 1996;60(3):539-74.
3. Silbert S, Barth AF, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2001;39(11):3976-81.
4. Dalcin PT, Abreu E Silva FA. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. J Bras Pneumol. 2008;34(2):107-17.
5. Damas C, Amorim A, Gomes I. Fibrose cística: Revisão. Rev Port Pneumol. 2008;14(1):89-112.
6. Boyle MP. Adult cystic fibrosis. JAMA. 2007;298(15):1787-93.
7. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet. 2003;361:681-9.
8. Rovedder PME, Ziegler B, Pasin LR, Pinotti AFF, Barreto SSM, Dalcin PTR. Infecção bacteriana crônica e indicadores ecocardiográficos de hipertensão pulmonar em pacientes com fibrose cística. J Bras Pneumol. 2008;34(7):461-7.
9. Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. Curr Opin Pulm Med. 2000;6:545-50.

10. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168: 918–51.
11. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):57-71.
12. Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Riley M, Jiang R, et al. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1999;179:1197-205.
13. Leitão JH, Sousa SA, Ferreira AS, Ramos CG, Silva IN, Moreira LM. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87:31-40.
14. Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10): 5136-42.
15. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol.* 2008;104: 1539-51.
16. Martins KM, Fongaro GF, Rodrigues ABD, Tateno AF, Azzuz-Chernishev AC, Oliveira-Garcia D, et al. Genomovar status, virulence markers and genotyping of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from Brazilian cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2008;7:336-9.

17. Fang Y, Lou M, Li B, Xie GL, Wang F, et al. Characterization of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis patients in China and their chitosan susceptibility. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; 26:443-50.
18. Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Sa-Correia I, Barreto C. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev Port Pneumol.* 2008;14(1):5-26.
19. Manno G, Dalmastrri 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):1491-97.
20. Bevivino A, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli ML, Piana S, et al. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3): 846-51.
21. Boussaud V, Guillemain R, Grenet D, Coley N, Souilamas R, Bonnette P, et al. Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonised with *Burkholderia cepacia* complex: results from two French centres. *Thorax.* 2008;63:732-37.
22. Foweraker J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Brit Med Bulletin.* 2009;89:93-110.

23. Jones AM, Dodd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, et al. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004;59:948-51.
24. Kidd TJ, Douglas JM, Bergh HA, Coulter C, Bell SC. *Burkholderia cepacia* complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. *Res Microbiol*. 2008;159:194-9.
25. Bhatt S, Weingart CL. Identification of sodium chloride-regulated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Curr Microbiol*. 2008;56:418-22.
26. Chen JS, Witzmann KA, Spilker T, Fink RJ, LiPuma JJ. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001;139(5):643-9.
27. Courtney JM, Dunbar KEA, McDowell A , Moore JE , Warke TJ, Stevenson M, Elborn JS. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros*. 2004;3:93-8.
28. Gugliera P, Pasca MR, De Rossi E, Buroni S, Arrigo P, Manina G, Riccardi G. Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol*. 2006;6(66):1-14.
29. Graindorge A, Menard A, Neto M, Bouvet C, Miollan R, Gaillard S, et al. Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2010;66:29-40.
30. Johnson WM, Tyler SD, Rozee KR. Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus

- enzyme electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol.* 1994;32(4): 924-30.
31. Turton JF, O'Brien E, Megson B, Kaufmann ME, Pitt TL. Strains of *Burkholderia cenocepacia* genomovar IIIA possessing the *cbIA* gene that are distinct from ET12. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2009;64:94-7.
  32. Sajjan US, Hershenson MB, Forstner JF, LiPuma JJ. *Burkholderia cenocepacia* ET12 strain activates TNFR1 signalling in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2008;10(1):188-201.
  33. Saiman L, Siegel J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Contr.* 2003;31(3):5-52.
  34. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, Lipuma JJ. (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3427-36.
  35. McDowell A, Mahenthiralingam E, Dunbar KEA, Moore JE, Crowe M, Elborn JS. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol.* 2004;53:663-8.
  36. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):512-30.
  37. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns

- produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
38. Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005;64(2):155-61.
  39. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz D. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols.* 2007;2(3):677-84.
  40. Pizzirani-Kleiner A, Muhlen GS. Aplicações da técnica de eletroforese de campo pulsado para separação de cromossomos de microrganismos. *Ecologia microbiana – Embrapa.* 1998;cap.9:229-51.

## 5. ARTIGO

Segundo as normas da Revista Científica do HCPA

**Análise de similaridade genética entre isolados de *Burkholderia cenocepacia* provenientes de pacientes fibrocísticos tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

*Genetic similarity analysis among Burkholderia cenocepacia isolates from fibrocystic patients in hospital of Southern Brazil*

Luana Pretto<sup>1</sup>, Fernanda de-Paris<sup>2</sup>, Afonso Luís Barth<sup>3</sup>

1. Aluna do curso de Biomedicina, UFRGS.
2. Farmacêutica-bioquímica, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS.
3. Farmacêutico-bioquímico, chefe do Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Doutor em Microbiologia Clínica.

**Correspondência:** Fernanda de Paris, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: 55 51 3359-8860. E-mail: [fparis@hcpa.ufrgs.br](mailto:fparis@hcpa.ufrgs.br)

## RESUMO

**Introdução:** *Burkholderia cenocepacia* é uma bactéria que causa graves infecções oportunistas em fibrocísticos e possui grande potencial de se propagar entre os pacientes. A técnica de PFGE permite avaliar similaridade genética entre microrganismos e o grau de similaridade entre os isolados bacterianos pode evidenciar transmissão interpessoal.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi realizar a tipagem molecular por PFGE de isolados de *Burkholderia cenocepacia* (III A e III B) provenientes de pacientes fibrocísticos, com o intuito de avaliar similaridade genética.

**Métodos:** Foi realizada a tipagem molecular de 28 isolados de *B. cenocepacia* (19 de III A e 9 de III B) e de um isolado da cepa de *B. cenocepacia* III A ET12 (cepa associada a quadros clínicos graves). Os perfis genotípicos gerados por PFGE foram comparados para avaliar similaridade genética entre os isolados.

**Resultados:** A análise de isolados do mesmo paciente mostrou que eles são geneticamente indistinguíveis. Na análise de isolados de pacientes diferentes, observamos a presença de alguns grupos clonais formados por mais de um isolado. Constatamos também que os isolados III A analisados possuem baixa similaridade com a cepa ET12.

**Discussão:** Nossos resultados sugerem a ocorrência de disseminação clonal de cepas de *B. cenocepacia* entre os pacientes com FC analisados e a permanência de infecção no paciente pela mesma cepa após períodos prolongados de antibioticoterapia.

**Palavras-chave:** Fibrose cística, *Burkholderia cenocepacia*, PFGE, similaridade genética.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Burkholderia cenocepacia* is an opportunistic agent that may cause serious infections in fibrocystic patients and has great potential to spread among them. The PFGE technique allows the evaluation of the degree of similarity among the bacterial isolates may what evidence interpersonal transmission.

**Objective:** The aim of this study was to perform the molecular typing by PFGE of *Burkholderia cenocepacia* isolates (III A and III B) from fibrocystic patients, searching for genetic similarity.

**Methods:** We performed molecular typing of 28 *B. cenocepacia* isolates (19 III A and III B 9) and one isolate of *B. cenocepacia* III A ET12 strain (associated with severe clinical conditions). The genotypic profiles generated by PFGE were compared in order to check genetic similarity among isolates.

**Results:** Analysis of isolates from same patient showed that they are genetically indistinguishable. In the analysis of isolates from different patients, we observed the presence of some clonal groups formed by more than one isolate. We also reported low similarity between III A isolates and ET12 strain.

**Discussion:** Our results suggest the occurrence of clonal spread of *B. cenocepacia* strains among the CF patients and the persistence of infection in patients by the same strain after long periods of antibiotic therapy.

**Keywords:** Cystic fibrosis, *Burkholderia cenocepacia*, PFGE, genetic similarity.

## INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) se manifesta como uma síndrome clínica caracterizada por infecção sinopulmonar crônica, desordens gastrointestinais, nutricionais, além de outras anormalidades. A base genética para FC é bem caracterizada; uma doença monogênica recessiva grave, encontrada predominantemente em populações caucasianas, que surge a partir de mutações no gene que codifica a proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [1]. A disfunção desta proteína no epitélio das vias aéreas é responsável pelo aumento da viscosidade das secreções respiratórias e diminuição da habilidade do organismo em combater as infecções bacterianas [2].

Na FC, a infecção crônica ou recorrente do trato respiratório, que leva à deterioração progressiva da função respiratória, é a principal causa de morte. [3]. O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) é um grupo de bactérias Gram-negativas estreitamente relacionadas que têm emergido como patógenos oportunistas de fibrocísticos, estando associadas com um declínio dramático no quadro clínico destes pacientes. [4]. Este complexo consiste nas espécies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* e *B. ubonensis* (genomovares I ao X, respectivamente) [5, 6]. Na espécie *Burkholderia cenocepacia*, distinguem-se ainda quatro subgrupos filogenéticos designados por III A, III B, III C e III D [7].

Dentre as espécies do complexo, *B. cenocepacia* é a bactéria clinicamente mais importante, estando associada com a rápida deterioração da função pulmonar pelo desenvolvimento de pneumonia necrotizante e sepse, resultando em morte precoce [8]. Esse quadro clínico dos pacientes foi denominado “síndrome cepacia”. O termo foi adotado pela primeira vez na década de 80, quando um clone altamente transmissível de *B. cenocepacia*, nomeado ET12, se espalhou entre os fibrocísticos do Canadá, Inglaterra e Escócia e os conduziu a esse quadro debilitante [9]. Além disso, *B. cenocepacia* é considerada a espécie mais virulenta e a que possui o maior potencial de se propagar entre os pacientes com FC [10]. Essa propagação interpessoal pode ocorrer através de internações hospitalares simultâneas ou por contato social fora do hospital [11]. Desse modo, políticas de segregação dos pacientes infectados vêm sendo adotadas nos centros de FC como medidas de prevenção contra a aquisição de cepas do CBC [12].

A tipagem molecular de microrganismos permite investigar clonalidade de cepas isoladas de um grupo de pacientes tratados no mesmo centro e o grau de similaridade genética entre os isolados analisados pode evidenciar transmissão interpessoal [10]. As técnicas de biologia molecular ocupam posição de destaque entre as ferramentas de investigação epidemiológica, pois possibilitam a tipagem dos microrganismos com grande poder discriminatório. Entre os métodos utilizados, a macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada o padrão-ouro [13]. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi realizar a tipagem por PFGE de isolados de *B. cenocepacia* provenientes de pacientes fibrocísticos atendidos no HCPA no ano de 2008, com o intuito de avaliar similaridade genética.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Características das amostras

As amostras utilizadas neste estudo são isolados bacterianos que foram armazenados durante o ano de 2008 e são provenientes de pacientes com FC, conhecidamente, colonizados por cepas de *B. cenocepacia*. Estas amostras foram enviadas à Unidade de Microbiologia do HCPA para o acompanhamento dos pacientes. Foram incluídos no estudo 28 isolados de *B. cenocepacia*; destes 19 pertencentes ao genótipo III A e 9 pertencentes ao genótipo III B.

**Tabela 1.** Dados gerais referentes aos isolados de *B. cenocepacia* incluídos no estudo.

Nº do isolado	Paciente	Data de Nascimento	Data de isolamento	Genótipo
638	C. M. L.	10/05/2002	26/02/2008	III A
642	D. M.	03/10/1994	05/03/2008	III B
650	A. L. F.	15/08/2007	09/04/2008	III A
654	N. P. O.	19/03/1973	09/04/2008	III A
656	A. L. F.	15/08/2007	29/04/2008	III B
657	L. H. M.	02/07/1999	30/04/2008	III A
660	C. Z.	06/12/1986	30/04/2008	III B
665	L. S.	18/05/1985	06/05/2008	III A
671	E. I. B.	30/11/1994	06/05/2008	III A
674	B. R. P.	19/03/2000	06/06/2008	III A
675	O. W. J.	30/05/1994	09/06/2008	III B
682	R. G.	03/04/1998	03/06/2008	III A
688	M. Z. F.	11/06/1988	21/07/2008	III A
702	K. K.	23/06/2001	31/07/2008	III A
706	D. S. M.	05/11/1994	08/08/2008	III B
710	E. R. S.	23/06/1981	03/09/2008	III B
724	L. F. M.	10/04/2003	17/09/2008	III A
725	L. K. B.	19/12/2001	17/09/2008	III B
728	E. I. B.	30/11/1994	02/10/2008	III A
734	V. G. N.	24/10/2002	21/10/2008	III A
738	G. B.	19/05/1999	07/11/2008	III A
741	M. Z. F.	11/06/1988	07/11/2008	III A
742	L. S.	18/05/1985	07/11/2008	III A
748	E. R. S.	23/06/1981	11/11/2008	III A
760	G. A.	30/08/1995	05/12/2008	III A
762	R. G.	03/04/1998	09/12/2008	III A
766	O. W. J.	30/05/1994	16/12/2008	III B
768	L. M.	06/03/1996	22/12/2008	III B

### Identificação genotípica

As amostras foram submetidas à técnica de PCR *nested* para confirmação do CBC, da espécie (*Burkholderia cenocepacia*) e dos subgrupos filogenéticos (IIIA e IIIB).

Para a extração de DNA, foram realizados lise térmica (incubação a 100°C por 15 minutos e congelamento a -20°C logo em seguida) e uso do kit comercial QIAmp (Qiagen®, Valencia, USA), conforme instruções do fabricante.

Foram realizadas 3 reações de PCR, sendo 2 para a confirmação do CBC e 1 para identificação da espécie (*B. cenocepacia*) e dos subgrupos filogenéticos (IIIA e IIIB). Na primeira reação, foram utilizados os *primers* externos BCR1 e BCR2 (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Na segunda reação, empregou-se o par de *primers* internos REC-IN-5 e BCRBM2 (Invitrogen®, Carlsbad, USA) e uma alíquota da primeira reação de PCR. Na terceira reação, foram utilizados os pares de *primers* BCRG3A1 e BCRG3A2 para genotipar III A e BCRG3B1 e BCRG3B2 para genotipar III B (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Também nesta reação foi utilizada uma alíquota da primeira reação de amplificação. A sequência dos *primers* utilizados nas amplificações e o tamanho do fragmento formado são os mesmos descritos por Drvíněk *et al.* 2002 [14].

Os produtos finais das amplificações foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. A visualização foi realizada em transiluminador sob luz ultravioleta. Um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®, Carlsbad, USA) foi empregado para avaliar os produtos da PCR.

### Tipagem Molecular por PFGE

Pares de isolados de *B. cenocepacia* do mesmo paciente, com diferença de isolamento de 4 a 6 meses, foram tipados por PFGE e tiveram seus perfis genotípicos comparados. Foram analisados 5 pacientes diferentes (4 colonizados por *B. cenocepacia* III A e 1 colonizado por *B. cenocepacia* III B).

Foram submetidos à técnica de PFGE 15 isolados de pacientes diferentes pertencentes ao genotipo III A e 8 isolados de pacientes diferentes pertencentes ao genotipo III B para comparação dos perfis genotípicos.

Além disso, a cepa ET12, que é uma cepa de *B. cenocepacia* III A que nos foi cedida por outro centro de FC, teve seu perfil genotípico gerado por PFGE e comparado ao perfil dos isolados III A.

Para a execução da técnica, foi utilizado o seguinte protocolo: os isolados clínicos foram semeados em ágar sangue e incubados em estufa a 37°C por 48 h. Após esse período de crescimento, colônias bacterianas foram suspensas em caldo K e mantidas sob incubação em estufa a 37°C por 72 h. Partindo de um inóculo aproximado de 6,0 (escala de Mc Farland), a cultura bacteriana foi centrifugada (12.000 rpm) e o precipitado foi ressuspenso em tampão TE (Tris HCl, EDTA). A suspensão bacteriana foi misturada com agarose 2% (*Low Melting Point*) para confecção dos blocos. Os blocos foram incubados *overnight* em banho a 37°C com tampão de lise (NaCl, EDTA, Tris HCl, Na-*lauroylsarkosine sodium salt*, *deoxycholic acid sodium salt*) e lisozima (1 mg/ml). A solução de lise foi desprezada e os blocos foram incubados *overnight* em banho à 56°C com tampão ES (Na-*lauroylsarkosine sodium salt*, EDTA) e proteinase K (0,65 mg/ml). Para remoção dos restos celulares após lise da parede celular bacteriana e digestão protéica, os blocos foram

submetidos a sucessivas lavagens sob agitação com água autoclavada e tampão TE. Para a restrição do DNA bacteriano, os blocos foram seccionados em partes menores e incubados em banho a 37°C por 4h com a reação de restrição: tampão adicionado de BSA e endonuclease de restrição *SpeI* (10U/amostra) (New England Biolabs). Após o período de restrição, os blocos foram submetidos à eletroforese em gel (agarose 1%) de campo pulsado no equipamento CHEF-DRII. O tampão utilizado na cuba durante a corrida foi TBE (Tris, Ácido Bórico, EDTA) 0,5x. O marcador de peso molecular utilizado foi *Pulse marker* (Sigma), com tamanho dos fragmentos na faixa 50-1,000 kb. Os parâmetros de corrida utilizados foram: temperatura de refrigeração de 12°C, velocidade 70L/min da bomba, voltagem 6 V/cm, pulso inicial 5s, pulso final 55s e tempo de corrida 22h [15]. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e lavado com água autoclavada. O resultado foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

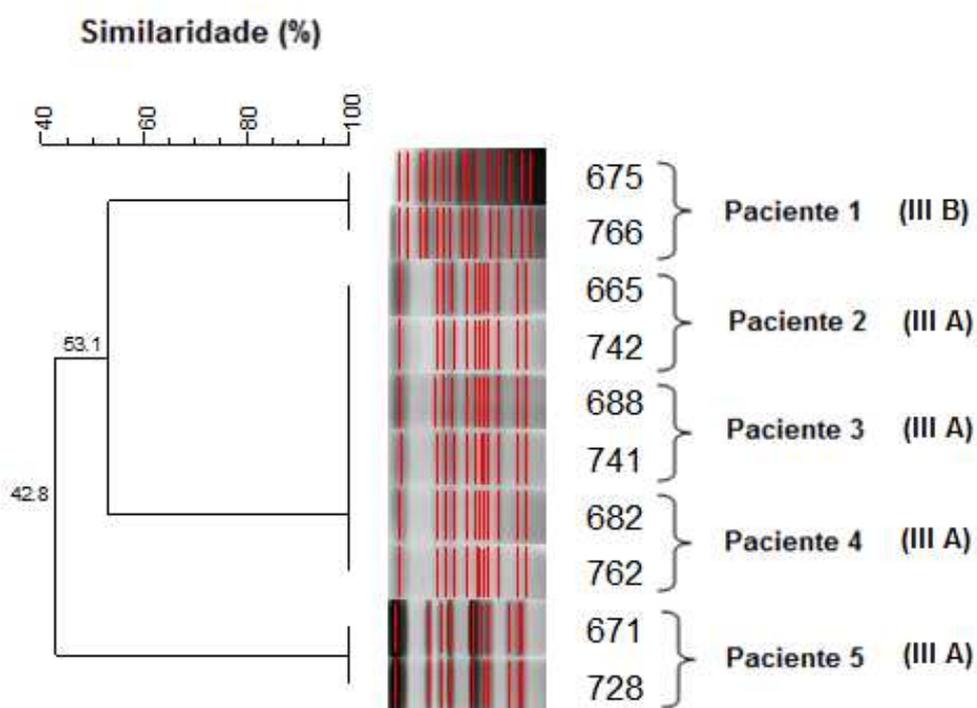
### **Análise dos perfis genotípicos**

Os perfis genotípicos gerados por PFGE foram comparados utilizando o *software* BioNumerics versão 6.0 e, através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA), foram obtidos os dendrogramas. A similaridade genética foi calculada pelo coeficiente de Dice e *cut-off* de 80% de similaridade foi usado para definir os grupos clonais [16].

## RESULTADOS

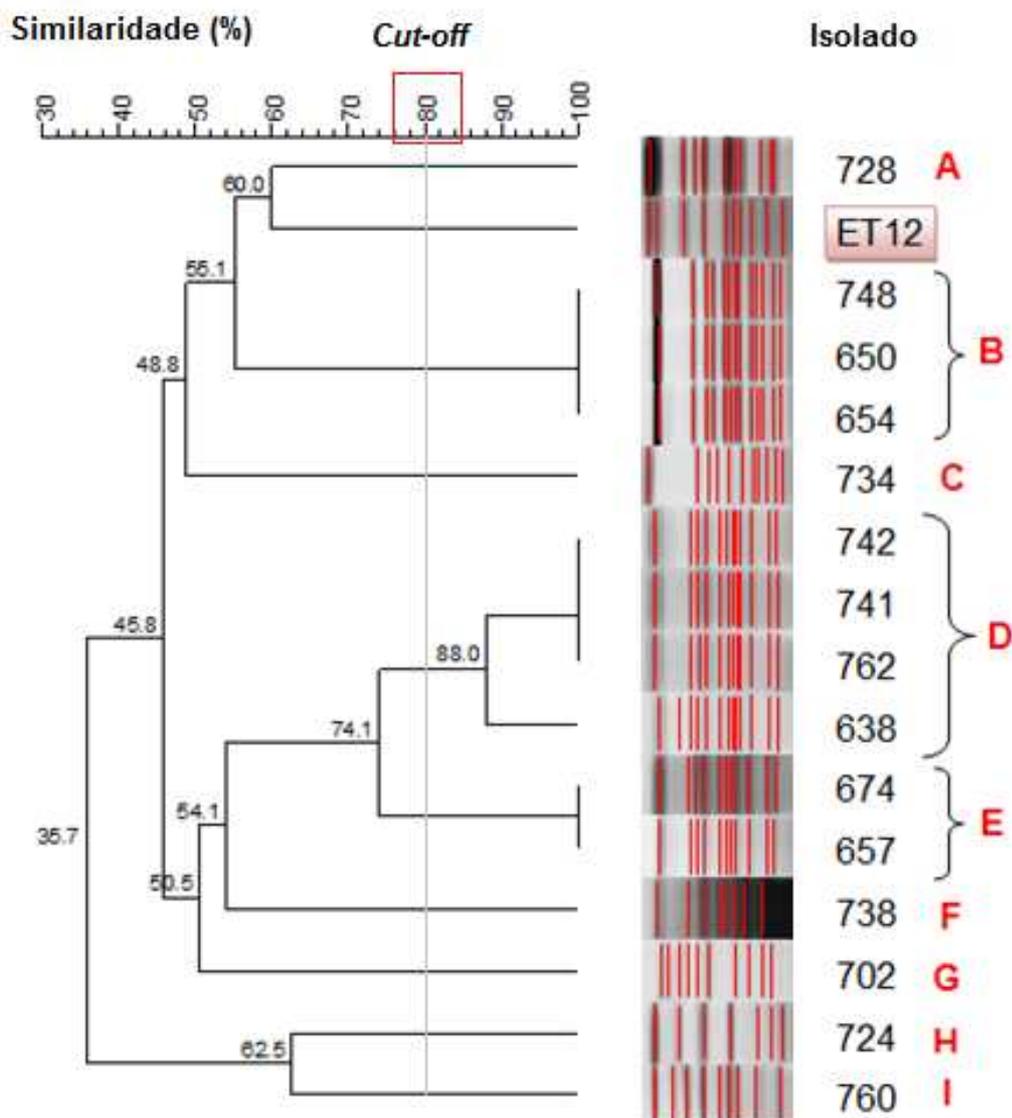
Os dois isolados de *B. cenocepacia* do mesmo paciente, que possuem 4 a 6 meses de diferença no isolamento, apresentaram o mesmo perfil de macrorestrição de DNA (100% de similaridade genética) (Figura 1). Este resultado nos levou a incluir na análise de similaridade entre pacientes diferentes apenas 1 isolado por paciente.

**Figura 1.** Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de PFGE de pares de isolados de *B. cenocepacia* de 5 pacientes. Nesta análise, observa-se que isolados do mesmo paciente apresentam perfil genotípico único (são o mesmo clone).



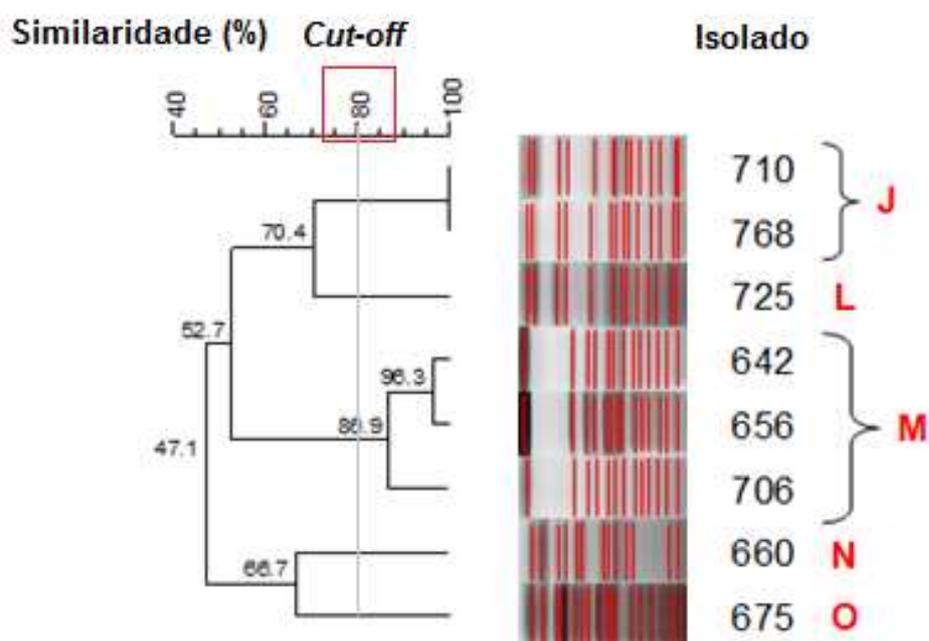
A análise de similaridade dos 15 isolados III A provenientes de pacientes diferentes nos mostrou a presença de nove grupos clonais distintos (representados de A-I) (Figura 2). O grupo A é formado por 1 isolado (728); o grupo B é formado por 3 isolados (748, 650 e 654) que apresentam entre si 100% de similaridade genética; o grupo C é formado por 1 isolado (734); o grupo D é formado por 4 isolados (742, 741, 762 e 638), sendo que 3 deles apresentam 100% de similaridade; o grupo E é formado por 2 isolados (674 e 657) que apresentam 100% de similaridade; o grupo F é formado por 1 isolado (738); o grupo G é formado por 1 isolado (702); o grupo H é formado por 1 isolado (724); e o grupo I é formado por 1 isolado (760). Esta análise também nos permitiu constatar que os isolados de *B. cenocepacia* III A provenientes de pacientes fibrocísticos atendidos no HCPA apresentam baixa similaridade genética com a cepa ET12.

**Figura 2.** Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de PFGE dos isolados III A de pacientes diferentes. Nesta análise, observa-se a presença de nove grupos clonais, sendo que alguns grupos (B, D e E) são formados por isolados com alta similaridade (acima de 80%). Também observa-se que os isolados III A apresentam baixa similaridade com a cepa ET12 (máximo 60%).



A análise de similaridade dos 8 isolados III B provenientes de pacientes diferentes nos mostrou a presença de cinco grupos clonais distintos (de J-O) (Figura 3). O grupo J é formado por 2 isolados (710 e 768) que apresentam 100% de similaridade genética entre si; o grupo L é formado por 1 isolado (725); o grupo M é formado por 3 isolados (642, 656 e 706); o grupo N é formado por 1 isolado (660); e o grupo O é formado por 1 isolado (675).

**Figura 3.** Dendrograma do percentual de similaridade entre os perfis de PFGE dos isolados III B de pacientes diferentes. Nesta análise, observa-se a presença de cinco grupos clonais, sendo que alguns grupos (J e M) são formados por isolados com alta similaridade (acima de 80%).



## DISCUSSÃO

As bactérias pertencentes ao CBC são importantes patógenos de pacientes com FC [17]. Além disso, devido à sua ampla distribuição no meio ambiente, à extraordinária versatilidade nutricional e à capacidade de sobreviver em ambientes inóspitos, como na presença de alguns desinfetantes, espécies do CBC têm sido cada vez mais relacionadas a infecções nosocomiais [18].

A transmissão de cepas do CBC entre indivíduos fibrocísticos pode ocorrer por contato interpessoal direto ou indireto e pela disseminação de secreções respiratórias infectadas [19]. Além disso, a aquisição de bactérias do CBC tem sido associada com hospitalização recente, higienização ineficiente das mãos, contaminação de equipamento para terapia respiratória e, possivelmente, contaminação do chuveiro hospitalar [10]. Muitos centros de FC têm adotado políticas de segregação dos pacientes infectados pelo CBC, a fim de minimizar os impactos causados pela propagação da infecção.

Os métodos moleculares são muito eficazes em estudos epidemiológicos para tipagem de microrganismos. A técnica de macrorestrição de DNA seguida de PFGE é considerada padrão-ouro para avaliação da relação epidemiológica e para análise de similaridade genética entre isolados bacterianos. Nos dendrogramas de PFGE, em geral, os isolados são considerados idênticos se apresentarem 100% de similaridade e possuem relação clonal se a similaridade entre eles for maior do que 80% [16]. Neste estudo, a análise dos isolados provenientes de pacientes fibrocísticos diferentes nos permitiu constatar a presença de grupos clonais formados por isolados com 100% de similaridade genética e outros apresentando similaridade superior a 80%. Desse modo, estes resultados sugerem a ocorrência de disseminação clonal de *B. cenocepacia* entre os pacientes com FC tratados no HCPA no ano de 2008.

Ao longo dos últimos anos, vários estudos epidemiológicos têm mostrado que a maioria dos casos de transmissão da infecção pelo CBC entre pacientes fibrocísticos envolveu cepas de *B. cenocepacia* [20]. Os quadros clínicos mais dramáticos foram associados à ET12, uma cepa de *B. cenocepacia* III A que apresenta elevado potencial de propagação e causa “síndrome cepacia”, uma situação clínica caracterizada por pneumonia necrotizante e sepse, resultando muitas vezes em morte precoce [21]. A importância clínica da infecção pelo CBC foi reconhecida pela primeira vez na década de 80 e se deve à cepa ET12 [22]. Naquela época, esta cepa altamente transmissível de *B. cenocepacia* se disseminou entre pacientes com FC do Canadá, Inglaterra e Escócia e culminou na “síndrome cepacia” [9].

Ao que tudo indica, a cepa ET12 é uma cepa endêmica, isolada predominantemente em centros de FC de países norte-americanos e da Europa. Conforme o esperado, nossos resultados mostraram que o isolado da cepa ET12 analisado por PFGE apresentou um perfil de macrorestrição do DNA bastante distinto dos perfis dos isolados de *B. cenocepacia* III A provenientes de pacientes com FC atendidos no HCPA.

Nosso estudo também evidenciou a permanência de um único perfil genotípico no mesmo paciente ao longo do tempo. Observamos a presença do mesmo clone de *B. cenocepacia* em amostras com 4 a 6 meses de diferença no isolamento dos 5 pacientes analisados. Estes resultados sugerem que, mesmo durante períodos de antibioticoterapia, a cepa não é erradicada dos pacientes [23]. Estudos de genotipagem mostraram que a infecção pulmonar crônica de pacientes com FC tipicamente envolve uma única cepa do CBC. Pode ocorrer coinfeção transiente envolvendo duas espécies diferentes do CBC ou

duas cepas da mesma espécie, porém este fenômeno é raro e ocorre preferencialmente no início da infecção [3].

A análise do dendrograma de PFGE de isolados do mesmo paciente (Figura 1), inusitadamente, nos mostrou que isolados III A apresentam alta diversidade genotípica entre si, visto que alguns isolados III A demonstraram maior similaridade com isolados III B. Este achado nos leva a questionar se a divisão de *B. cenocepacia* em subgrupos filogenéticos (III A e III B) tem real validade e relevância epidemiológica ou se novos estudos são necessários para reavaliar essa classificação taxonômica.

Com base em nossos resultados, podemos concluir que grupos de pacientes atendidos no HCPA no ano de 2008 foram colonizados por uma mesma cepa de *B. cenocepacia*. A disseminação clonal das cepas pode ter ocorrido devido ao contato social entre os pacientes fora do hospital, devido a falhas na segregação dos pacientes infectados com os demais pacientes, ou devido à contaminação de algum item hospitalar (chuveiro, equipamento para terapia respiratória, entre outros) que serviu de fonte comum de infecção aos pacientes. Também podemos concluir que, apesar da transmissibilidade observada com algumas das cepas de *B. cenocepacia* III A analisadas, estas não apresentam perfil genotípico similar ao da cepa ET12. Além disso, verificamos que o mesmo paciente permanece colonizado pela mesma cepa de *B. cenocepacia* após meses de antibioticoterapia; este resultado nos leva a concluir que uma mesma cepa de *B. cenocepacia* pode infectar cronicamente o paciente, não sendo erradicada após exposição prolongada a antibióticos.

## REFERÊNCIAS

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2): 194-222.
2. Boyle MP. Adult cystic fibrosis. *JAMA.* 2007;298(15):1787-93.
3. Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ. Simultaneous coinfection by multiple strains during *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2006;54: 95-8.
4. Lambiase A, Raia V, Stefani S, Sepe A, Ferri P, Buonpensiero P, et al. *Burkholderia cepacia* complex infection in a cohort of Italian patients with cystic fibrosis. *J Microbiol.* 2007;45(3):275-9.
5. Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10): 5136-42.
6. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol.* 2008;104: 1539-51.
7. Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Sa-Correia I, Barreto C. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev Port Pneumol.* 2008;14(1):5-26.
8. Holden MTG, Seth-Smith HMB, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeño-Tárraga AM, et al. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol.* 2009;191(1):261-77.
9. Graindorge A, Menard A, Neto M, Bouvet C, Miollan R, Gaillard S, et al. Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2010;66:29-40.
10. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):57-71.
11. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, Lipuma JJ. (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3427-36.
12. McDowell A, Mahenthiralingam E, Dunbar KEA, Moore JE, Crowe M, Elborn JS. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol.* 2004;53:663-8.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.

14. Drvíněk P, Hrbáčková H, Cinek O, Bartosová J, Nyc O, Nemeč A, et al. Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3485-8.
15. Kutty PK, Moody B, Gullion JS, Zervos M, Ajluni M, Washburn R, et al. Multistate outbreak of *Burkholderia cenocepacia* colonization and infection associated with the use of intrinsically contaminated alcohol-free mouthwash. *CHEST*. 2007;132:1825-31.
16. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):512-30.
17. 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.
18. LiPuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11:528-533.
19. Saiman L, Siegel J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Contr*. 2003;31(3):5-52.
20. Kidd TJ, Douglas JM, Bergh HA, Coulter C, Bell SC. *Burkholderia cepacia* complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. *Res Microbiol*. 2008;159:194-9.
21. Turton JF, O'Brien E, Megson B, Kaufmann ME, Pitt TL. Strains of *Burkholderia cenocepacia* genomovar IIIA possessing the *cbIA* gene that are distinct from ET12. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2009;64:94-7.
22. Foweraker J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Brit Med Bulletin*. 2009;89:93-110.
23. Silbert S, Barth AF, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3976-81.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### ❖ Neste trabalho observou-se que:

- ✓ Houve propagação clonal de algumas cepas de *B. cenocepacia* entre pacientes fibrocísticos atendidos no HCPA no ano de 2008.
- ✓ As cepas de *B. cenocepacia* analisadas, apesar da transmissibilidade observada, possuem baixa similaridade genética com a cepa ET12.
- ✓ O paciente fibrocístico pode permanecer colonizado pela mesma cepa de *B. cenocepacia* após períodos prolongados de antibioticoterapia, ou seja, a cepa original de infecção não é erradicada.

### ❖ Perspectivas

- ✓ É necessária uma pesquisa de marcadores de virulência (gene *cbIA* e *BCESM*) para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na propagação das cepas.
- ✓ Dados adicionais são necessários (histórico do paciente, período de internação, progressão do quadro clínico, desfecho da infecção) para avaliar se a transmissão de *B. cenocepacia* ocorreu de um paciente para outro, ou se os pacientes tiveram uma fonte comum de infecção (por ex., uso de item hospitalar contaminado) e qual cepa de *B. cenocepacia* conduziu o paciente ao quadro clínico mais dramático.