

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

Variantes Genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em Pacientes com  
Fibrose Cística no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Fernanda Concli Leite

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Dissertação de Mestrado

2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

Variantes Genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em Pacientes com  
Fibrose Cística no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Fernanda Concli Leite

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Dissertação de Mestrado

2009

L533v **Leite, Fernanda Concli**

Variantes genômicas do complexo *burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística no Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Fernanda Concli Leite ; orient. Afonso Luis Barth. – 2009.

65 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Fibrose cística 2. Ilhas genômicas 3. Burkholderia cepacia 4. Infecções por Burkholderia 5. Epidemiologia 6.

Diagnóstico I. Barth, Afonso Luis II. Título.

NLM: WI 820

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Ao FIPE-HCPA pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth um agradecimento especial pela orientação, disponibilidade, confiança e por todo o aprendizado e experiência adquiridos ao longo desses anos. Sobretudo, pela paciência e humanidade nas horas difíceis.

Aos colegas da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, com agradecimento especial para Alice Pinheiro Machado e Maria Izoete Vieira, as quais tiveram participação ativa e imprescindível na realização deste trabalho. Também pela maneira carinhosa e acolhedora com que me receberam em meio as suas inúmeras atividades de trabalho.

Aos excelentes professores do Programa pelo conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Elizabeth de Andrade Marques pela parceria no trabalho.

À direção e às colegas do Hospital Padre Jeremias pela colaboração e disponibilidade nas horas em que precisei estar ausente.

A minha irmã querida, Marina, por toda a ajuda dispensada na elaboração desta dissertação.

Ao meu noivo, Marcos, pela compreensão e paciência com o adiamento dos nossos planos.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Artur e Ana,  
que priorizaram sempre, acima de tudo, a educação.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - *ATP-Binding Cassete*

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico

BCESM - *B. cepacia epidemic strain marker*

CBC - complejo *Burkholderia cepacia*

CFTR - *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

ET12 - *eletrophoretic type 12*

FC - Fibrose Cística

LPS - Lipopolissacarídeo

PCR - *polymerase chain reaction*

RFLP - *restriction fragment length polymorphism*

PHDC - *Philadelphia-DC*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
INTRODUÇÃO .....	8
REVISAO DA LITERATURA	
A Fibrose Cística .....	11
Infecções em Fibrose Cística .....	16
Taxonomia do complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	
e Importância clínica das variantes genômicas .....	19
Virulência do complexo <i>Burkholdeira cepacia</i> .....	23
Identificação do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	25
Resistência bacteriana do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	28
OBJETIVOS .....	31
REFERÊNCIAS .....	32
ARTIGO .....	40
ANEXO 1 – Prevalência das espécies do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> entre os pacientes .....	64
ANEXO 2 – Prevalência das espécies do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> entre as amostras clínicas .....	65

## RESUMO

A Fibrose cística (FC) é uma condição genética que predispõe os portadores a infecções crônicas repetidas do trato respiratório. O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), formado por espécies (variantes genômicas) intimamente relacionadas, são microorganismos comumente associados a essas infecções. A variante genômica do CBC envolvida na colonização de um determinado paciente influencia diretamente na progressão da sua doença e sobrevida. A identificação fenotípica do CBC é difícil por se tratar de um bacilo Gram-negativo não fermentador e a identificação de suas espécies é ainda mais complexa devido à similaridade fenotípica que existe entre elas. Os principais objetivos do estudo foram a padronização de uma técnica molecular de PCR-RFLP (“polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism”) para identificação do CBC e de suas espécies e o estabelecimento da prevalência dessas espécies entre os pacientes com FC atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de fevereiro a dezembro de 2006. Na análise por PCR foram utilizados iniciadores específicos para o gene *recA* (BCR1 e BCR2). Para o RFLP foram utilizadas as enzimas de restrição *HaeIII* e *MnII* (New England Biolabs Inc., Hitchin, England). No período do estudo foram submetidas ao laboratório amostras de 244 pacientes com FC, sendo que em amostras de 26 pacientes foram identificadas bactérias pertencentes ao CBC. Nesse período, 10.6% (26/244) dos pacientes com fibrose cística que entraram no critério de inclusão estavam colonizados pelo CBC. A análise molecular do gene *recA* mostrou que *B. cenocepacia* foi isolada de 53.8% (14) dos pacientes, *B. multivorans*; 15.4% (4); *B. vietnamensis* 7.7%



(2) e *B. ambifaria* 7.7% (2). Dois pacientes 7.7% (2) estiveram colonizados por *B. cenocepacia* IIIA and IIIB em diferentes momentos. Em dois pacientes não foi possível realizar a identificação em nível de espécie. As técnicas moleculares, como PCR-RFLP são mais eficientes para a identificação do CBC e as únicas capazes de identificar suas variantes genômicas, o que é imprescindível para o acompanhamento clínico dos pacientes portadores de fibrose cística.

## INTRODUÇÃO

A Fibrose cística (FC) é uma das condições genéticas letais mais comuns em descendentes europeus (McKone *et al.* 2003). Na maioria dos casos de FC é observada a mutação  $\Delta F508$  no gene regulador de condutância transmembranar (CFTR-*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), (Gibson *et al.* 2003).

A fisiopatologia da FC inclui infecções pulmonares, insuficiência pancreática e diabetes, desordens biliares e infertilidade (Ratjen & Doring 2003). A pior manifestação patológica é observada no sistema respiratório (Ratjen & Doring 2003). Os efeitos da disfunção da proteína CFTR no epitélio respiratório são responsáveis pelo aumento da viscosidade das secreções respiratórias com conseqüente diminuição da habilidade do organismo em combater as infecções bacterianas (Boyle 2007).

O diagnóstico da FC pode ser realizado de várias maneiras, sendo o rastreamento neonatal a melhor delas, pois possibilita intervenções médicas muito precoces (Damas *et al.* 2008, Grosse *et al.* 2004).

Por razões que ainda não bem conhecidas, pacientes com FC são mais suscetíveis a infecções bacterianas por espécies não patogênicas para pessoas saudáveis. Essas espécies incluem o complexo *Burkholderia cepacia* (CBC), entre outras espécies. (Davies & Rubin 2007, Beringer & Appleman 2000). O CBC consiste em um grupo de varias espécies bacterianas intimamente relacionadas, mas com múltiplas diferenças genéticas, conhecidas como variantes genômicas (Mahenthiralingam *et al.* 2008). A variante genômica envolvida na colonização de um determinado paciente influencia diretamente

na progressão da sua doença e sobrevida. (Jones *et al.* 2004). Estudos indicam que *B. cenocepacia* e *B. multivorans* são as variantes genômicas mais prevalentes em pacientes com FC, sendo que a *B. cenocepacia* é a variante genômica responsável pelos piores prognósticos (Mahenthiralingam *et al.* 2002). O CBC é transmitido de várias maneiras, sendo o contato social entre os pacientes uma delas (Saiman & Siegel 2004).

O CBC é formado por bacilos Gram negativos aeróbicos não fermentadores (McGowan 2006). Esse grupo de bactérias também possui um genoma muito grande e maleável, com grande flexibilidade genética, o que contribui para a alta virulência desses organismos (Mahenthiralingam *et al.* 2008).

O CBC apresenta altos níveis de resistência a antibióticos comuns, como ampicilina, cefalosporinas e macrolídeos (McGowan 2006, Chernish & Aaron 2003). A resistência intrínseca às polimixinas é considerada uma característica inerente ao CBC (Moore & Hancock 1986).

A identificação de bactérias pertencentes ao CBC é muito problemática à medida que essa espécie é facilmente confundida com outros organismos Gram negativos não fermentadores (Davies & Rubin 2007, LiPuma 2003). A identificação desse grupo de bactérias também é dificultada pela sua complexa taxonomia (Davies & Rubin 2007, LiPuma 2003). A identificação precisa do CBC e variantes genômicas é crítica, com conseqüências médicas e sociais para os pacientes com FC. As técnicas baseadas na identificação fenotípica são geralmente consideradas insuficientemente confiáveis para a identificação do CBC e não são capazes de identificar suas variantes genômicas (Segonds *et al.* 1999, van Pelt *et al.* 1999). As técnicas moleculares têm-se mostrado

bastante úteis na identificação do CBC, além de possibilitarem também a identificação das variantes genômicas envolvidas (Mahenthiralingam *et al.* 2000). A análise do gene *recA* por PCR-RFLP (“*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*”) consiste em uma técnica rápida e confiável para essa finalidade (Mahenthiralingam *et al.* 2000).

## A FIBROSE CÍSTICA

A primeira descrição patológica completa da Fibrose Cística (FC) foi reportada em 1938 (Ren 2008). Trata-se de uma doença hereditária que possui caráter autossômico recessivo. (Davis 2006, Damas *et al.* 2008, Ratjen & Doring 2003). A FC é mais comum em descendentes europeus, com uma frequência de 1 doente para cada 3200 nascidos vivos (Quinton 2007). Em indivíduos não brancos, a FC se apresenta como uma patologia mais rara, com uma incidência de aproximadamente 1 em 15000 nascidos vivos em negros, 1 em 9200 em hispânicos e 1 em 10000 em asiáticos. É estimado que existam atualmente 100000 casos da doença espalhados pelo mundo (Boyle 2007). A FC já foi considerada uma doença da infância; entretanto, atualmente, perto de 50% dos pacientes possui 18 anos ou mais. Na próxima década é esperado que a maioria dos pacientes portadores de FC seja composta por adultos. (Proesmans *et al.* 2008).

Em aproximadamente 70% dos casos a FC é causada por uma mutação no gene regulador de condutância transmembranar (CFTR-*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), o qual sofre uma deleção da seqüência “CTT”, causando perda de uma fenilalanina na posição 508 (mutação  $\Delta F508$ ) (Gibson *et al.* 2003). Hoje são descritas mais de 1500 mutações diferentes no gene CFTR, mas a maioria dessas mutações é muito rara, sendo que apenas 11 delas são observadas em mais de 100 casos (Ratjen & Doring 2003, Damas *et al.* 2008, Davis 2006).

O gene CFTR encontra-se localizado no braço longo do cromossomo 7, contém 250kb e codifica uma proteína de 1480 aminoácidos, a proteína CFTR

(Davis 2006, Damas et al. 2008). Essa proteína pertence ao grupo ABC (ATP-Binding Cassete), participando da regulação do transporte de íons, aminoácidos e bactérias. Dentre as funções celulares da CFTR está a regulação, via AMPc, de um canal iônico de cloro que regula o balanço hídrico e iônico através do epitélio. Esse canal encontra-se localizado na membrana apical das células epiteliais de alguns órgãos, como intestino, pâncreas, vias biliares, aparelho respiratório, aparelho reprodutor, glândulas sudoríparas e túbulos renais (Damas et al. 2008).

O mecanismo preciso pelo qual a disfunção da proteína CFTR leva ao fenótipo da FC ainda permanece desconhecido; entretanto, é claro que os efeitos da disfunção dessa proteína no epitélio respiratório e glandular resultam em um aumento da viscosidade das secreções respiratórias e diminuição da habilidade do organismo em combater as infecções bacterianas (Boyle 2007).

Na glândula sudorípara a perda de função da CFTR impede a entrada do cloro (e do sódio, que está na sua dependência) na célula, originando um suor salgado, outro sintoma característico da FC. Quanto ao epitélio pulmonar, existem duas teorias sobre como a doença afeta o sistema respiratório desses pacientes, a hipótese isotônica e a hipótese alternativa. A primeira hipótese postula que o epitélio pulmonar se comportaria de forma essencialmente oposta às glândulas sudoríparas. Nesse modelo a ausência da CFTR levaria a uma maior absorção de sódio pelo canal de sódio epitelial. Como no pulmão existem outros canais de cloro, que não o CFTR, o resultado seria um aumento relativo da absorção de sódio, cloro e água. Estas alterações causariam desidratação das secreções e defeito no transporte mucociliar. A segunda hipótese postula que o epitélio pulmonar se comportaria de forma semelhante

às glândulas sudoríparas, sendo a CFTR a principal via de absorção do cloro. Como consequência ocorreriam altas concentrações de cloreto de sódio, o que causaria a inativação dos peptídeos antimicrobianos. Atualmente a teoria isotônica é mais aceita, pois trabalhos recentes analisaram o líquido da superfície das vias aéreas de indivíduos saudáveis e portadores de FC e verificaram que em ambos os casos esse líquido apresenta-se isotônico. (Damas et al. 2008, Gibson *et al.* 2003).

A fisiopatologia da FC inclui infecções pulmonares, insuficiência pancreática e diabetes, desordens biliares e infertilidade (Ratjen & Doring 2003). A doença pulmonar é a maior causa de morbimortalidade em pacientes portadores de FC. Os pacientes com FC nascem com pulmões aparentemente normais, mas no primeiro ano de vida começam a apresentar infecções crônicas das vias respiratórias (Boucher 2004). Esses pacientes desenvolvem muito precocemente uma infecção bacteriana que aparentemente é curada com terapia antimicrobiana. Porém; mais tarde, nota-se o estabelecimento de colonização permanente das vias respiratórias (Davis 2006).

Os sinais clínicos da FC incluem doença crônica respiratória, caracterizada por tosse produtiva crônica, anormalidades persistentes em radiografias de tórax, obstrução das vias aéreas, pansinusite e presença de pólipos nasais. As manifestações também podem ser gastrointestinais, incluindo insuficiência pancreática, cirrose biliar, edema com hipoproteinemia, deficiência de vitaminas lipossolúveis, entre outras (Ratjen & Doring 2003, Dodge 1986).

Um problema muito freqüente experimentado por mais de um terço dos pacientes com FC pelo menos uma vez ao ano são as exacerbações

pulmonares agudas (Beringer & Appleman 2000). As exacerbações pulmonares são caracterizadas por aumento da tosse, produção de escarro, dispnéia e declínio da função respiratória, podendo estar associadas com a presença de agentes bacterianos como *Pseudomonas aeruginosa* e o complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) (St Denis *et al.* 2007, Goss & Burns 2007). O diagnóstico precoce e o tratamento com o antibiótico apropriado das exarcebacões são cruciais para manter a função respiratória nesses pacientes (Smyth & Elborn 2008).

O diagnóstico da FC pode ser realizado através da evidência de pelo menos uma alteração clínica característica, história familiar de FC, rastreamento neonatal positivo, presença de mutações CFTR ou evidência da disfunção da CFTR pela prova do suor ou pela diferença de potencial nasal (Damas *et al.* 2008). Os benefícios do diagnóstico pelo rastreamento neonatal incluem tratamento adequado precoce, o que contribui para a redução de hospitalizações e melhora da sobrevida (Grosse *et al.* 2004).

A FC é uma doença complexa que envolve múltiplos sistemas. Um acompanhamento intensivo dos pacientes e tratamento adequado são imprescindíveis para a sobrevida dos pacientes (Proesmans *et al.* 2008). A intervenção precoce com estratégias terapêuticas é considerada o fator chave para evitar danos respiratórios permanentes (Ratjen 2008). O tratamento da FC inclui antibioticoterapia, uso de agentes mucolíticos, broncodilatadores, oxigenoterapia, nutrição adequada, terapia antiinflamatória e transplante pulmonar (Damas *et al.* 2008).

A terapia convencional tem aumentado a expectativa de vida dos pacientes afetados, mas a FC ainda é considerada uma doença fatal. A terapia



gênica promete corrigir os defeitos primários e secundários associados com a FC, mas ainda não é considerada segura para os pacientes. A terapia gênica se baseia no processo pelo qual o material genético é utilizado com um propósito curativo. DNA, RNA ou pequenos oligonucleotídeos são inseridos em vetores, que são responsáveis por levar esse material até as células alvo com o objetivo de corrigir o defeito genético. Esse processo pode ocorrer de várias maneiras: pode utilizar uma cópia normal de um gene, impedir a expressão genética de um gene deletério ou inserir genes que alteram a fisiologia das células alvo. A pesquisa de vetores virais e não virais está avançando para a construção de vetores estáveis, seguros e eficazes, o que indica a possibilidade de cura, no futuro, para pacientes portadores de FC (Ziady & Davis 2006).

## INFECÇÕES EM FIBROSE CÍSTICA

As infecções pulmonares são as causas mais significativas de morbimortalidade em pacientes com FC (Beringer & Appleman 2000). Os mecanismos por trás dessas infecções crônicas características são complexos e ainda pouco conhecidos. Os mecanismos sugeridos incluem diminuição do volume de líquido da superfície das vias aéreas, aumento de receptores celulares e a presença de hipóxia pelo aumento da viscosidade das secreções, o que favoreceria o desenvolvimento de organismos anaeróbios (Davies & Rubin 2007).

Existe um conjunto de bactérias que são adquiridas por pacientes com FC segundo uma seqüência temporal relativamente conhecida. Nas crianças, as colonizações mais comuns são por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Ao longo do tempo normalmente surge infecção por *Pseudomonas aeruginosa* que, uma vez presente, possui erradicação quase impossível (Damas et al. 2008).

Por razões que ainda não estão bem estabelecidas, pacientes com FC também são suscetíveis a infecções crônicas do trato respiratório por espécies que normalmente não são patogênicas para pessoas saudáveis. Essas espécies incluem o CBC, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, espécies de *Ralstonia* e bactérias do gênero *Pandora* (Davies & Rubin 2007, Beringer & Appleman 2000).

Existem muitos motivos para o CBC causar particular preocupação em pacientes com FC. Dentre eles constam o alto nível de transmissibilidade,

levando à necessidade de isolamento dos pacientes infectados; a multi-resistência a antibióticos e associação com desfechos clínicos adversos, incluindo possibilidade de infecção sistêmica. A infecção pelo CBC é considerada um prognóstico negativo em pacientes com FC (Davies & Rubin 2007).

A aquisição do CBC em ambiente hospitalar está associada à hospitalização recente, lavagem inadequada das mãos, contaminação de equipamento de terapia respiratória e por água contaminada. A transmissão entre pacientes ocorre através de contato social (Saiman & Siegel 2004). São descritas várias intervenções que visam o controle de infecção por CBC nesse ambiente. Dentre elas estão a ênfase na higiene pessoal, a internação privativa dos pacientes com FC, entre outras, sendo que a prática que vem obtendo mais resultados é a segregação dos pacientes infectados (Saiman & Siegel 2004, Vonberg & Gastmeier 2005, Campana *et al.* 2004).

O CBC é considerado desde os anos 80 um dos mais importantes patógenos oportunistas em pacientes com FC. Nessa época foi descrita uma condição muito grave que atingia esses pacientes e possuía manifestações clínicas inespecíficas, como febre alta, leucocitose e velocidade de sedimentação eritrocitária elevada. Essa condição evoluía para falência respiratória progressiva, bacteremia, choque e falência de múltiplos órgãos, que culminava com a morte em torno de 62 a 100% dos pacientes (Davies & Rubin 2007, Saiman & Siegel 2004). Subseqüentemente essa síndrome foi denominada síndrome cepacia (Isles *et al.* 1984).

Ao que tudo indica a infecção de pacientes com FC tipicamente envolve uma única cepa do CBC. A coinfeção transiente pode ocorrer com duas

espécies diferentes de CBC ou com duas cepas da mesma espécie, mas são muito raras e mais comuns no início da infecção, diferente do que ocorre na infecção por *P. aeruginosa*, na qual os pacientes podem permanecer cronicamente infectados por múltiplas cepas (Silbert *et al.* 2001, Yang *et al.* 2006). Também é possível que ocorra de um paciente infectado por CBC, contrair outra cepa em um momento da evolução da doença e, depois, voltar a apresentar a cepa envolvida na infecção inicial. Isso também indica a possibilidade de coinfeção transiente (Bernhardt *et al.* 2003).

## TAXONOMIA DO COMPLEXO *Burkholderia cepacia* E IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS VARIANTES GENÔMICAS

Em 1950, William Burkholder descreveu *Pseudomonas cepacia* como um patógeno de plantas. Mais tarde, essa bactéria se mostrou muito versátil, com capacidade para várias interações complexas, como degradação de complexos aromáticos e interação com humanos e animais. Com a análise taxonômica molecular de isolados dessa espécie de *Pseudomonas*, muitos foram transferidos para um novo gênero, *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.* 1992, Mahenthiralingam *et al.* 2008).

Estudos de 16S rDNA revelaram que a espécie *Burkholderia* é, na verdade, composta por bactérias que, apesar de intimamente relacionadas e fenotipicamente muito similares, possuem múltiplas diferenças genéticas, suficientes para permitir subdivisões em espécies ou variantes genômicas, que formam o CBC (Coenye & Vandamme 2003, Mahenthiralingam *et al.* 2008). Atualmente o CBC compreende 10 variantes genômicas: *B. cepacia* (variante genômica I), *B. multivorans* (variante genômica II), *B. cenocepacia* (variante genômica III), *B. stabilis* (variante genômica IV), *B. vietnamiensis* (variante genômica V), *B. dolosa* (variante genômica VI), *B. ambifaria* (variante genômica VII), *B. anthina* (variante genômica VIII), *B. pyrrocinia* (variante genômica IX) e *B. ubonensis* (variante genômica X) (Mahenthiralingam *et al.* 2008).

A partir de 2004 a análise do gene *recA* demonstrou a presença de quatro novos filotipos designados *B. cepacia* grupo K, *B. cepacia* grupo AW, BCC1 e BCC2 (Payne *et al.* 2005, Mahenthiralingam *et al.* 2008). Além disso, também subdividiu *B. cenocepacia* em quatro subgrupos distintos: *B.*

*cenosepacia* IIIA, IIIB, IIIC e IIID. Atualmente, com o uso de MLST (*multilocus sequence typing*) novas espécies foram descritas, como BCC3, BCC4, BCC5 e BCC6. Muitos desses novos grupos de espécies diferenciadas por MLST estão sofrendo processo para serem formalmente designadas como novas espécies (Mahenthiralingam et al. 2008).

A variante genômica envolvida na colonização de um determinado paciente influencia diretamente na progressão da sua doença e sobrevida. (Jones et al. 2004). Estudos indicam que *B. cenosepacia* e *B. multivorans* são as variantes genômicas que predominam nos pacientes com FC (Mahenthiralingam et al. 2002). A identificação das variantes é extremamente importante do ponto de vista clínico. *B. cenosepacia* IIIA está associada a um declínio da função pulmonar muito mais acelerado do que o observado em pacientes infectados por *B. multivorans* ou *P. aeruginosa* (Courtney et al. 2004). Outra diferença entre essas duas variantes parece ser que a infecção por *B. cenosepacia* normalmente apresenta-se de forma crônica, enquanto que a maioria dos casos de infecção por *B. multivorans* parece ser transiente (Mahenthiralingam et al. 2002).

A infecção por *B. cenosepacia* é tão devastadora ao ponto de contraindicar o transplante pulmonar em alguns centros, mesmo sendo considerado um tratamento de sucesso nos estágios finais da FC associada à falência pulmonar (Aris et al. 2001, Liou et al. 2005, De Soyza et al. 2004). Essa conduta pode variar entre os hospitais, sendo que alguns, mais radicais, contraindicam a cirurgia para todos os pacientes portadores do CBC e, outros, investem em terapias mais agressivas que o convencional e não fazem

distinção de pacientes baseada na sua flora respiratória (De Soyza *et al.* 2001, De Soyza *et al.* 2004).

*B. cenocepacia* também é considerada a variante genômica responsável pela síndrome cepacia e está associada a uma maior mortalidade dos pacientes infectados quando comparada às outras variantes (Courtney *et al.* 2004). Entretanto, alguns autores, baseados em relatos de casos, consideram que *B. multivorans* também pode ser responsável por um quadro de bacteremia muito semelhante à síndrome cepacia (Jones *et al.* 2004, Zahariadis *et al.* 2003).

A colonização por *B. multivorans* está relacionada à hipertensão pulmonar, outro problema muito freqüente em pacientes com FC. A hipertensão pulmonar é a conseqüência da destruição progressiva do parênquima e sistema vascular pulmonar, que leva à vasoconstrição pulmonar e hipóxia. (Fauroux *et al.* 2004).

Estudos epidemiológicos demonstram que a transmissão do CBC ocorre por contato social (Mahenthiralingam *et al.* 2002). Também já foi demonstrado que cepas virulentas e muito transmissivas de *B. cenocepacia* podem substituir outras variantes genômicas durante a infecção, como a *B. multivorans*, sugerindo a importância da segregação dos pacientes infectados (Courtney *et al.* 2004). Uma revisão sistemática da literatura conduzida de 1996 a 2004 concluiu que os pacientes colonizados por CBC devem, sim, ser separados dos pacientes não colonizados. Entretanto, os estudos analisados não deixam claro se essa recomendação deve ser aplicada para todas as variantes genômicas desse grupo de bactérias tão heterogêneo (Vonberg & Gastmeier 2005). Outro estudo conclui que, apesar dos mecanismos de virulência e da maior incidência

de *B. cenocepacia*, essa variante genômica não é a única com capacidade de infecção cruzada. Os centros de FC deveriam não somente segregar os pacientes colonizados por CBC, como, na medida do possível, segregar também os colonizados por *B. cenocepacia*, *B. multivorans* e quiçá, os colonizados pelas demais variantes genômicas (McDowell *et al.* 2004). Além do isolamento dos pacientes colonizados ainda existe um risco mínimo de infecção cruzada nos centros de tratamento de FC, e a ênfase na higiene deve ser priorizada para reduzir esses riscos (Campana *et al.* 2004).



## VIRULÊNCIA DO COMPLEXO *Burkholderia cepacia*

O CBC é formado por bacilos Gram negativos aeróbicos não fermentadores de açúcares para a geração de energia para o funcionamento celular (McGowan 2006). Os reservatórios naturais desse grupo de bactérias incluem o solo, a água e as plantas (Saiman & Siegel 2004). É considerado um dos mais versáteis grupos de bactérias Gram negativas pela sua habilidade de adaptar-se aos ambientes mais diversos. Todas as espécies de *Burkholderia* possuem um genoma muito grande, entre 6 e 9 Mb, e separam seu DNA em dois ou mais replicons, o que proporciona grande flexibilidade na aquisição, perda e expressão de genes (Mahenthiralingam et al. 2008).

Organismos pertencentes ao CBC apresentam uma variedade de mecanismos clássicos de virulência, o que inclui a produção de proteases, hemolisinas, lípases e endotoxinas. Pacientes infectados por uma mesma cepa também podem apresentar uma variação na evolução clínica, o que indica que a resposta imune do paciente também é importante no combate à infecção (Courtney et al. 2004).

O primeiro momento da infecção por CBC envolve a colonização do trato respiratório superior, que evolui para o trato inferior. A motilidade bacteriana, aderência, dano tecidual e formação de biofilme abundante “*in vivo*” são fatores determinantes para o estabelecimento da infecção (Cunha et al. 2004). A estrutura da camada LPS do CBC também é ligeiramente diferente dos outros organismos Gram negativos, sendo mais endotóxica que a da *P. aeruginosa* (Mahenthiralingam & Vandamme 2005).

Algumas linhagens do CBC possuem grande capacidade de transmissão. Em particular a *B. cenocepacia* cepa ET12 (*eletrophoretic type 12*), que predomina em pacientes com FC do Canadá e Reino Unido (LiPuma 2003). Essa cepa carrega o gene *cblA*, que codifica uma subunidade do “*cable pill*”, estrutura chave que é responsável pela aderência da bactéria na célula epitelial (Davies & Rubin 2007, Miller & Mahenthiralingam 2003). Esse organismo também possui o BCESM (*B. cepacia epidemic strain marker*), que codifica um regulador transcricional de função ainda desconhecida. Somente as cepas de *B. cenocepacia* demonstraram a expressão desses marcadores de transmissão (Davies & Rubin 2007, Saiman & Siegel 2004). A cepa PHDC (*Philadelphia-DC*) de *B. cenocepacia*, epidêmica na América do Norte, não possui “*cable pill*” nem BCESM. O mecanismo preciso envolvido na sua transmissão ainda é desconhecido, mas as conseqüências de infecção cruzada são devastadoras (LiPuma 2003).

*B. cenocepacia* também é capaz de modular a sua expressão gênica para que a sua sobrevivência seja possível em um ambiente considerado hostil para a maioria das bactérias. Como nos pacientes com FC são observadas altas concentrações de cloreto de sódio devido ao mau funcionamento da proteína CFTR, esse mecanismo de virulência é de extrema importância. Essa espécie é capaz de responder às altas concentrações de cloreto de sódio através de um processo complexo que envolve múltiplos sistemas (Bhatt & Weingart 2008).

## IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO *Burkholderia cepacia*

A identificação do CBC nos pacientes portadores de FC colonizados é de extrema importância e está envolvida diretamente com a evolução clínica desses pacientes. A determinação de suas variantes genômicas também tem assumido particular importância nos últimos anos a medida que cada variante está associada a um diferente prognóstico (Correia *et al.* 2008).

A identificação de bactérias pertencentes ao CBC é muito problemática. Essa espécie é facilmente confundida com outros organismos Gram negativos não fermentadores, incluindo *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Pandora* e *Ralstonia*. A complexa taxonomia deste grupo também dificulta sua correta identificação (Davies & Rubin 2007, LiPuma 2003).

Um teste disponível para identificação do CBC pode ser o crescimento em meio seletivo, que separa o CBC de outras bactérias Gram negativas presentes nas secreções respiratórias. A sensibilidade desse método é excelente, estando em torno de 96 e 100%; entretanto, a especificidade não é de 100%, o que permite o crescimento de outras bactérias, que não as do CBC. Esse método laboratorial não deve ser utilizado como definitivo na identificação do CBC, mas é útil quando usado como um teste de triagem para esse grupo de bactérias (van Pelt *et al.* 1999).

Sistemas comerciais de identificação, como API 20NE (bioMérieux), auxiliam no processo, mas não possuem sensibilidade e especificidade suficientes para a identificação dessa espécie nem de suas variantes genômicas. Com uso desses sistemas, membros do CBC costumam ser confundidos com *B. gladioli*, *R. pickettii*, *Alcaligenes spp*, *Pseudomonas spp*, *S.*

*maltophilia*, *Flavobacterium spp* e *Chryseobacterium spp*. Cepas dessas espécies citadas também costumam ser identificadas erroneamente como pertencentes do CBC (van Pelt et al. 1999, Coenye et al. 2001). Esses métodos, apesar de não fornecerem uma identificação definitiva, são úteis para a exclusão de espécies bacterianas não relevantes (Beringer & Appleman 2000, LiPuma 2003).

Os métodos moleculares para a detecção e caracterização de microorganismos revolucionaram o diagnóstico microbiológico e hoje fazem parte da rotina os grandes laboratórios (Speers 2006). As técnicas moleculares têm-se mostrado bastante úteis na identificação do CBC. Essas técnicas também permitem a identificação da variante genômica de isolados pertencentes ao CBC. Podem ser examinadas as seqüências de nucleotídeos de dois genes, o 16S rDNA e o gene *recA* (*RecA* é uma proteína essencial para o reparo e recombinação do DNA) . Alguns estudos demonstram que a análise do gene 16S rDNA é limitada na diferenciação de variantes do CBC. A variação na seqüência de nucleotídeos desse gene não seria suficiente para permitir a identificação de todas as variantes genômicas pertencentes ao complexo (Mahenthiralingam et al. 2000).

A análise do gene *recA* é a alternativa de escolha para essa identificação, pois já provou ser útil em outros estudos que pesquisavam bactérias intimamente relacionadas e pode identificar rapidamente tanto o CBC como a variante genômica com muita rapidez (McDowell et al. 2001, Payne et al. 2005, Lambiase et al. 2006). A análise do gene *recA* pode ser realizada pela técnica de “*polymerase chain reaction*” (PCR) seguida de “*restriction fragment length polymorphism*” (RFLP). O material respiratório é semeado em meio de

cultura apropriado, seu DNA é extraído e submetido à amplificação do gene *recA* por PCR. Em poucas horas são geradas grandes quantidades de material amplificado. Esse produto de PCR; então, é digerido com duas enzimas de restrição. A análise combinada dos padrões de digestão gerados por essas duas enzimas, observados após eletroforese em gel de agarose, revela a variante genômica (Mahenthiralingam et al. 2000, Louie *et al.* 2000).

## RESISTÊNCIA BACTERIANA DO COMPLEXO

### *Burkholderia cepacia*

As bactérias Gram negativas não fermentadoras consistem em um grande problema para a comunidade hospitalar, pois apresentam resistência a múltiplos antibióticos. A resistência intrínseca dos Gram negativos não fermentadores a antibióticos comuns como ampicilina, a maioria das cefalosporinas e macrolídeos é devida principalmente à impermeabilidade da membrana bacteriana a esses agentes. As polimixinas, apesar da potencial nefrotoxicidade, especialmente em pacientes idosos, consistem em uma última classe de antibióticos com atividade consistente contra cepas multi resistentes, como espécies de *P. aeruginosa*, *Achromobacter* spp e *S. maltophilia*. Ainda assim essas espécies podem exibir vários mecanismos de resistência como a produção de enzimas, a expressão de bombas de efluxo, a deficiência de porinas e a alteração dos sítios de ação. Geralmente a resistência é adquirida por mutação espontânea ou por transferência via plasmídeo ou integrinas. Muitos desses mecanismos podem coexistir no mesmo organismo. A resistência a múltiplos antibióticos em Gram negativos não fermentadores fazem com que o tratamento das infecções causadas por esses patógenos torne-se difícil e caro (McGowan 2006, Chernish & Aaron 2003).

O CBC, particularmente, é muito resistente a antibioticoterapia por possuir um genoma muito maleável que é capaz de sofrer várias mutações, adaptando-se as mais diversas condições. A resistência intrínseca às polimixinas é considerada uma característica do CBC (Moore & Hancock 1986).

Inclusive, a resistência a esse antibiótico pode ser utilizada como um teste auxiliar de identificação para esse grupo de bactérias (Nzula *et al.* 2002).

O CBC possui altos níveis de resistência a aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos, deixando poucas opções terapêuticas disponíveis. Essa espécie também apresenta resistência a desinfetantes comumente utilizados, como a clorexidina, o que contribui para a ocorrência de surtos hospitalares em pacientes com FC (Mahenthiralingam & Vandamme 2005).

O CBC também pode adquirir resistência na vigência da terapia antimicrobiana através da produção de  $\beta$ -lactamases, ativação de bombas de efluxo e alteração de alvos para antibióticos. Essa resistência induzida consiste em um problema para pacientes com FC, que fazem uso prolongados de múltiplos antibióticos (LiPuma 2003, Gugliera *et al.* 2006).

Os antimicrobianos que parecem demonstrar atividade “*in vitro*” contra o CBC, utilizados sozinhos ou em combinação, incluem sulfametoxazol-trimetoprima, cloranfenicol, tobramicina, cftazidima, ciprofloxacino e meropenem (Nzula *et al.* 2002, Lewin *et al.* 1993). Entretanto, algumas cepas podem apresentar resistência a todos os antibióticos testados. Na ausência de novos agentes antimicrobianos, a combinação de mais de um agente com efeitos sinérgicos pode apresentar atividade antimicrobiana (LiPuma 2005).

Apesar de uma combinação ativa ótima na terapia das exacerbações pulmonares ser muito difícil de ser alcançada empiricamente, dado todos os mecanismos de resistência já comentados apresentados por essa espécie, uma combinação ativa costuma ser composta por altas doses de tobramicina com meropenem mais um segundo agente intravenoso (ceftazidima, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima ou aztreonam) (LiPuma 2003, Aaron

*et al.* 2000). Sugere-se também que uma mesma cepa pertencente ao CBC pode assumir diferentes perfis de sensibilidade aos antibióticos durante a infecção crônica e as exacerbações. Durante o período de exacerbação pulmonar, as cepas mostraram-se menos sensíveis a meropenem, ciprofloxacino, cloranfenicol, piperacilina e tobramicina (St Denis *et al.* 2007).

A linhagem ET12 de *B. cenocepacia* é a que apresenta maior resistência à maioria dos antibióticos, inclusive ao meropenem. *B. vietnamiensis* parece ser a variante genômica que apresenta maior suscetibilidade a ceftazidima e cloranfenicol (Nzula *et al.* 2002).



## OBJETIVOS

### GERAL:

Avaliar a prevalência do complexo *Burkholderia cepacia* e das suas variantes genômicas na população de pacientes portadores de fibrose cística que fazem acompanhamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### ESPECÍFICOS:

Padronizar um protocolo para extração de DNA de bactérias pertencentes ao complexo *Burkholderia cpacia*.

Padronizar uma técnica molecular baseada na amplificação do DNA seguida de RFLP para identificação do complexo *Burkholderia cepacia* e de suas variantes genômicas.

Avaliar perfil de resistência bacteriana do complexo *Burkholderia cepacia* e de suas variantes genômicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaron, S. D., Ferris, W., Henry, D. A., Speert, D. P. e Macdonald, N. E. (2000) Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, 1206-1212.
- Aris, R. M., Routh, J. C., LiPuma, J. J., Heath, D. G. e Gilligan, P. H. (2001) Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med*, **164**, 2102-2106.
- Beringer, P. M. e Appleman, M. D. (2000) Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med*, **6**, 545-550.
- Bernhardt, S. A., Spilker, T., Coffey, T. e LiPuma, J. J. (2003) *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin Infect Dis*, **37**, 780-785.
- Bhatt, S. e Weingart, C. L. (2008) Identification of sodium chloride-regulated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Curr Microbiol*, **56**, 418-422.
- Boucher, R. C. (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, **23**, 146-158.
- Boyle, M. P. (2007) Adult cystic fibrosis. *JAMA*, **298**, 1787-1793.
- Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Masi, I., Audino, S., Sisi, B., Repetto, T., Doring, G. e de Martino, M. (2004) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J Cyst Fibros*, **3**, 159-163.
- Chernish, R. N. e Aaron, S. D. (2003) Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, **9**, 509-515.
- Coenye, T. e Vandamme, P. (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol*, **5**, 719-729.
- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. e LiPuma, J. J. (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*, **39**, 3427-3436.
- Correia, S., Nascimento, C., Pereira, L., Cunha, M. V., Sa-Correia, I. e Barreto, C. (2008) [The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients]. *Rev Port Pneumol*, **14**, 5-26.
- Courtney, J. M., Dunbar, K. E., McDowell, A., Moore, J. E., Warke, T. J., Stevenson, M. e Elborn, J. S. (2004) Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros*, **3**, 93-98.
- Cunha, M. V., Sousa, S. A., Leitao, J. H., Moreira, L. M., Videira, P. A. e Sa-Correia, I. (2004) Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. *J Clin Microbiol*, **42**, 3052-3058.

- Damas, C., Amorim, A. e Gomes, I. (2008) [Cystic fibrosis: review]. *Rev Port Pneumol*, **14**, 89-112.
- Davies, J. C. e Rubin, B. K. (2007) Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, **28**, 312-321.
- Davis, P. B. (2006) Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, **173**, 475-482.
- De Soyza, A., McDowell, A., Archer, L., Dark, J. H., Elborn, S. J., Mahenthiralingam, E., Gould, K. e Corris, P. A. (2001) Burkholderia cepacia complex genomovars and pulmonary transplantation outcomes in patients with cystic fibrosis. *Lancet*, **358**, 1780-1781.
- De Soyza, A., Morris, K., McDowell, A., Doherty, C., Archer, L., Perry, J., Govan, J. R., Corris, P. A. e Gould, K. (2004) Prevalence and clonality of Burkholderia cepacia complex genomovars in UK patients with cystic fibrosis referred for lung transplantation. *Thorax*, **59**, 526-528.
- Dodge, J. A. (1986) Gastrointestinal tract and nutrition in cystic fibrosis: pathophysiology. *J R Soc Med*, **79 Suppl 12**, 27-31.
- Fauroux, B., Hart, N., Belfar, S., Boule, M., Tillous-Borde, I., Bonnet, D., Bingen, E. e Clement, A. (2004) Burkholderia cepacia is associated with pulmonary hypertension and increased mortality among cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **42**, 5537-5541.
- Gibson, R. L., Burns, J. L. e Ramsey, B. W. (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **168**, 918-951.
- Goss, C. H. e Burns, J. L. (2007) Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*, **62**, 360-367.

- Grosse, S. D., Boyle, C. A., Botkin, J. R., Comeau, A. M., Kharrazi, M., Rosenfeld, M. e Wilfond, B. S. (2004) Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *MMWR Recomm Rep*, **53**, 1-36.
- Gugliera, P., Pasca, M. R., De Rossi, E., Buroni, S., Arrigo, P., Manina, G. e Riccardi, G. (2006) Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol*, **6**, 66.
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P. e Levison, H. (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr*, **104**, 206-210.
- Jones, A. M., Dodd, M. E., Govan, J. R., Barcus, V., Doherty, C. J., Morris, J. e Webb, A. K. (2004) *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*, **59**, 948-951.
- Lambiase, A., Raia, V., Del Pezzo, M., Sepe, A., Carnovale, V. e Rossano, F. (2006) Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis. *BMC Infect Dis*, **6**, 4.
- Lewin, C., Doherty, C. e Govan, J. (1993) In vitro activities of meropenem, PD 127391, PD 131628, ceftazidime, chloramphenicol, co-trimoxazole, and ciprofloxacin against *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*, **37**, 123-125.
- Liou, T. G., Adler, F. R. e Huang, D. (2005) Use of lung transplantation survival models to refine patient selection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **171**, 1053-1059.

- LiPuma, J. J. (2003) Burkholderia and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, **24**, 681-692.
- Lipuma, J. J. (2005) Update on the Burkholderia cepacia complex. *Curr Opin Pulm Med*, **11**, 528-533.
- Louie, M., Louie, L. e Simor, A. E. (2000) The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*, **163**, 301-309.
- Mahenthiralingam, E., Baldwin, A. e Dowson, C. G. (2008) Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol*, **104**, 1539-1551.
- Mahenthiralingam, E., Baldwin, A. e Vandamme, P. (2002) Burkholderia cepacia complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol*, **51**, 533-538.
- Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y. e Vandamme, P. (2000) DNA-Based diagnostic approaches for identification of Burkholderia cepacia complex, Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia multivorans, Burkholderia stabilis, and Burkholderia cepacia genomovars I and III. *J Clin Microbiol*, **38**, 3165-3173.
- Mahenthiralingam, E. e Vandamme, P. (2005) Taxonomy and pathogenesis of the Burkholderia cepacia complex. *Chron Respir Dis*, **2**, 209-217.
- McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Dunbar, K. E., Moore, J. E., Crowe, M. e Elborn, J. S. (2004) Epidemiology of Burkholderia cepacia complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol*, **53**, 663-668.

- McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Moore, J. E. et al. (2001) PCR-based detection and identification of Burkholderia cepacia complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **39**, 4247-4255.
- McGowan, J. E., Jr. (2006) Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*, **119**, S29-36; discussion S62-70.
- McKone, E. F., Emerson, S. S., Edwards, K. L. e Aitken, M. L. (2003) Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*, **361**, 1671-1676.
- Miller, D. A. e Mahenthiralingam, E. (2003) Sequencing of the Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia genomes and their applications in relation to cystic fibrosis. *J R Soc Med*, **96 Suppl 43**, 57-65.
- Moore, R. A. e Hancock, R. E. (1986) Involvement of outer membrane of Pseudomonas cepacia in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **30**, 923-926.
- Nzula, S., Vandamme, P. e Govan, J. R. (2002) Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the Burkholderia cepacia complex. *J Antimicrob Chemother*, **50**, 265-269.
- Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., Lipuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Jones, T. H. e Mahenthiralingam, E. (2005) Development of a recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3917-3927.
- Proesmans, M., Vermeulen, F. e De Boeck, K. (2008) What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr*, **167**, 839-849.

- Quinton, P. M. (2007) Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)*, **22**, 212-225.
- Ratjen, F. (2008) Recent advances in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*, **9**, 144-148.
- Ratjen, F. e Doring, G. (2003) Cystic fibrosis. *Lancet*, **361**, 681-689.
- Ren, C. L. (2008) Cystic Fibrosis: Evolution from a Fatal Disease of Infancy with a Clear Phenotype to a Chronic Disease of Adulthood with Diverse Manifestations. *Clin Rev Allergy Immunol*.
- Saiman, L. e Siegel, J. (2004) Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 57-71.
- Segonds, C., Heulin, T., Marty, N. e Chabanon, G. (1999) 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*, **37**, 2201-2208.
- Silbert, S., Barth, A. L. e Sader, H. S. (2001) Heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **39**, 3976-3981.
- Smyth, A. e Elborn, J. S. (2008) Exacerbations in cystic fibrosis: 3-- Management. *Thorax*, **63**, 180-184.
- Speers, D. J. (2006) Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin Biochem Rev*, **27**, 39-51.
- St Denis, M., Ramotar, K., Vandemheen, K., Tullis, E., Ferris, W., Chan, F., Lee, C., Slinger, R. e Aaron, S. D. (2007) Infection with Burkholderia cepacia complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Chest*, **131**, 1188-1196.



- van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H., Vos, M. C., Tummeler, B., Segonds, C., Reubsaet, F., Verbrugh, H. e van Belkum, A. (1999) Identification of Burkholderia spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol*, **37**, 2158-2164.
- Vonberg, R. P. e Gastmeier, P. (2005) Isolation of infectious cystic fibrosis patients: results of a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **26**, 401-409.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. e Arakawa, M. (1992) 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*, **36**, 1251-1275.
- Yang, J. H., Spilker, T. e LiPuma, J. J. (2006) Simultaneous coinfection by multiple strains during Burkholderia cepacia complex infection in cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **54**, 95-98.
- Zahariadis, G., Levy, M. H. e Burns, J. L. (2003) Cepacia-like syndrome caused by Burkholderia multivorans. *Can J Infect Dis*, **14**, 123-125.
- Ziady, A. G. e Davis, P. B. (2006) Current prospects for gene therapy of cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*, **6**, 515-521.

**Molecular Identification of *Burkholderia cepacia* complex and Species Distribution among Cistic Fibrosis Patients in Southern Brazil**

Fernanda Concli Leite\*, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, Maria Izolete Vieira, Afonso Luis Barth

Unidade de microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

\*Corresponding author. Mailing adress:

Rua Costa, 251/402

CEP 90110-270 - Menino Deus

Porto Alegre, RS - Brasil

Tel: +55 51 32333616/81478190

e-mail: fernanda.cl@terra.com.br

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in white population. It is a chronic condition involving several organs, which causes repetitive chronic infections of respiratory tract. During the course of illness, CF patients become colonized with bacteria that are not pathogenic for healthy people. Of all these unusual bacteria encountered in CF patients, the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) maybe is the one that is most likely to concern. The Bcc is a group composed by closely related bacterial species (genomovars). These organisms are commonly associated with respiratory infections in CF patients. The genomovar status of Bcc may influence both the likelihood of progression from initial to chronic infection and the overall survival of the patients. The Bcc are composed by Gram-negative bacillus and genomovars phenotypic identification is very problematic due to these phenotypic similarities. The aim of this study was to standardize a PCR-RFLP ("polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism") technique to establish the prevalence of the Bcc genomovars at a CF center. During the study period 10.6% (26/244) of CF patients that entered the inclusion criteria were colonized by Bcc. Molecular analysis of *recA* gene showed that *B. cenocepacia* colonized 53.8% of the patients, *B. multivorans* colonized 15.4% of the patients followed by 7.7% patients with *B. vietnaminis* and 7.7% with *B. ambifaria*. Two CF patients (7.7%) were colonized with *B. cenocepacia* IIIA and IIIB in different isolates. In conclusion, our results confirmed that *B. cenocepacia* is the most prevalent species among CF patients. As we have demonstrated, the PCR-RFLP

showed to be an unequivocal method for this purpose. Besides, the differentiation among Bcc species contributes to prognosis establishment and therapeutical conductance, which improve the CF patient following.

## INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal genetic disease among Caucasians (Quinton 2007, Ratjen & Doring 2003). CF causes a generalized exocrinopathy which affects mainly the respiratory tract leading to chronic infection of the airways. There is a variety of bacterial species involved in the CF respiratory infection although *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) are the main microorganisms associated with the airway infection (Davis 2006, LiPuma 2003). The Bcc consists of a group of phenotypically and phylogenetically closely related but distinct bacterial species (genomovars) as follows: *Burkholderia cepacia* (genomovar I), *Burkholderia multivorans* (genomovar II), *Burkholderia cenocepacia* (genomovar III with subgroups IIIA, IIIB, IIIC and IIID), *Burkholderia stabilis* (genomovar IV), *Burkholderia vietnamiensis* (genomovar V), *Burkholderia dolosa* (genomovar VI), *Burkholderia ambifaria* (genomovar VII), *Burkholderia anthina* (genomovar VIII), *Burkholderia pyrrocinia* (genomovar IX) and *Burkholderia ubonensis* (genomovar X). A new specie is under process of being formally designated according to multilocus sequence typing (Mahenthiralingam *et al.* 2008).

Bcc infections are usually associated to a decline in lung function, which may shorten the survival of CF patients. It may also increases morbidity and mortality following lung transplantation (Beringer & Appleman 2000, Aris *et al.* 2001, Liou *et al.* 2005). Patients infected with Bcc can develop a serious condition characterized by a fulminating pneumonic illness sometimes associated with septicemia, known as “cepacia syndrome”, which leads to a

high mortality (Isles *et al.* 1984). Although Bcc is found in soil and water as natural reservoirs, the potential patient-to-patient spread among CF patients has been reported for all the Bcc species; hence, the importance of a strict segregation of infected patients (Saiman & Siegel 2004, Vonberg & Gastmeier 2005, Campana *et al.* 2004). The intrinsic and acquired antibiotic resistance is considered to be a characteristic of Bcc. All strains of Bcc are resistant to polymyxin B and there is only a few antimicrobials effective against Bcc infections (Moore & Hancock 1986, Nzula *et al.* 2002). Although *B. cenocepacia* has been considered the most common species, the species prevalence may vary among different CF centers (Cunha *et al.* 2003, Campana *et al.* 2005, Brisse *et al.* 2004)

Based on the importance of patient segregation and on the different prognosis of infected CF patients, the isolation and identification of Bcc and its species has been considered very important (Correia *et al.* 2008). The identification of Bcc is problematic and misidentification is common as Bcc is easily confused with other non-fermentative Gram-negative bacteria (LiPuma 2003). Furthermore, due to the taxonomic complexity of these bacteria and the similarity of the species, the identification of individual Bcc species is often a challenge (Moore *et al.* 2002, Coenye *et al.* 2001). The molecular procedure “polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) based on *recA* gene has been described as one of the most reliable methods for the identification of Bcc and its species (Lambiase *et al.* 2006, Payne *et al.* 2005, McDowell *et al.* 2001).

The aim of the present study was to standardize a PCR-RFLP technique to establish the prevalence of the Bcc species (types I to VIII) at a CF center in

a university hospital in southern Brazil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). The species identification by PCR-RFLP was compared to the identification by a phenotypic commercial system (API 20NE -Biomérieux). The Bcc species were further evaluated according their antimicrobial resistance.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial reference strains:** The strains belonging to the different Bcc species I to VIII used to validate the PCR-RFLP technique were obtained from the Health Protection Agency, London, UK.

**Study population:** To analyze the prevalence of the species, we considered all patients attending “Hospital de Clínicas de Porto Alegre” from February to December 2006. This group consisted of 244 patients with 1238 isolates (1 to 20 for each patient). Isolates that met the inclusion criteria (80 isolates) were selected for the study.

**Inclusion criteria:** All bacteria isolated from respiratory material of CF patients that grew in *B. cepacia* selective agar medium (BCSA-Oxoid) supplemented with *Burkholderia cepacia* Selective Supplement (Oxoid) which proved to be resistant to polymixin (disc with 300U) and were negative for pyrrolidonyl arylamidase (PYR) were selected for the PCR-RFLP.

**Phenotypic identification:** A total of 77 isolates that met the inclusion criteria were also submitted to a phenotypic identification by the API 20NE system (Biomérieux) in accordance to the supplier’s protocol. We have considered as unequivocal identification by the API system all results which displayed 99.9% of likelihood percentage. Moreover, in this study we had considered the identification of “*B. cepacia*” by API as comparable to the identification of Bcc by PCR.

**Preparation of template DNA from bacterial cultures:** Fresh cultures of the bacterial isolates were suspended in 500µL of TE buffer, heated to 80°C for 20 minutes and immediately frozen. After 20 minutes, the suspension was



thaw and centrifuged at 11,000 g for 4 minutes. Supernatants containing the bacterial genomic DNA were collected and stored at 2 to 8°C. The presence of DNA in the supernatants was confirmed by electrophoresis in 0.7% (wt/vol) agarose gels (Life Technologies GIBCO BRL Products) and the quantity and purity of DNA were assessed at 260 and 280nm.

**PCR analysis:** A PCR with a specific primer for *recA* gene was used to identify the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). The Bcc *recA* gene (1,043bp) was amplified using primers BCR1 (5'TGACCGCCGAGAAGAGCAA3') and BCR2 (5'CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC3'). Approximately 20 ng of DNA was transferred to a tube with 50µL of reaction mix containing 1 U Taq DNA polymerase, 250 µM (each) deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1X PCR buffer. Approximately 20 pmol of each primer was added to reaction mix plus DNA and amplification was carried out using a Thermo Techne TC-300 Barloworld Scientific. Samples were initially heated at 96°C for 3 minutes before amplification using 35 cycles consisting of 1 minute of denaturation at 96°C, 1 minute of annealing at 56°C, and 1.5 minute of extension at 72°C. The PCR was completed with a final extension step at 72°C for 10 minutes (McDowell et al. 2001).

**RFLP analysis of the Bcc *recA* gene:** Bcc *recA* amplicons were digested with *Hae*III (Amersham-Pharmacia Biotech, St. Albans, England) and *Mn*II (New England Biolabs Inc., Hitchin, England) restriction endonucleases. Amplicons (5 µL) were mixed with the endonuclease and its appropriate enzyme buffer, in accordance to the manufacturer's instructions and incubated at 37°C for 2 h (McDowell et al. 2001).

**Detection of PCR and RFLP products:** PCR-amplified products and the restriction fragments were analyzed by electrophoresis in 2% (wt/vol) agarose gels. Molecular size markers (100-bp ladder; Life Technologies GIBCO BRL Products) were used in all gels. DNA products were stained with ethidium bromide and viewed under UV light.

**Antibiotic resistance:** The disc diffusion method of susceptibility testing was performed to compare the results among the different species of *B. cepacia*. The technique was performed in accordance to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006) and the results were classified as “Resistant”, “Intermediate” and “Susceptible” according to the criteria used for *P.aeruginosa* for the following antibiotics (Oxoid): amikacin, aztreonam, cefepime, ciprofloxacin, doxycycline, chloramphenicol, gentamicin, imipenem, ticarcillin-clavulanate, tobramycin and piperacillin-tazobactam. The antibiotics ceftazidime, meropenem and trimethoprim-sulfamethoxazole were classified according to the criteria of *B.cepacia* (CLSI 2006).

**Statistical analysis:** Comparison of the antibiotic resistance among genomovars was performed using the Fisher’s exact test. SPSS 12.0 was used for statistical analysis. A p-value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant for the majority of the comparisons, The Bonferroni correction (i.e.,  $p < 0.0036$ ) was also used.

## RESULTS

**Phenotypic analysis:** From the 77 isolates which were submitted to API 20NE identification, 37 isolates were identified as *Burkholderia cepacia*, 2 were identified as *Pseudomonas fluorescens*, 2 as *Oligella* sp, 1 as *Alcaligenes xylosoxidans* and 1 as *Bordetella bronchiseptica*. API 20NE was not able to identify 34 isolates.

**PCR analysis:** PCR primers BCR1 e BCR2 amplified a single 1kb-amplicon from 66/80 isolates that met the inclusion criteria.

**PCR-RFLP for Bcc species:** The analysis of RFLP patterns generated by digestion with *HaeIII* and *MnII* was capable of discriminating among all eight species, including the subgroups IIIA and IIIB, of the reference strains. Therefore, we considered that this method was validated to be used for the isolates included in this study. It is of note, however, that RFLP by *MnII* was not able to distinguish *Burkholderia ambifaria* (VII) from *Burkholderia anthina* (VIII). These species were discriminated only by *HaeIII* PCR-RFLP (Figure 1).

**Correlation of phenotypic and genotypic identification:** From 37 isolates identified as belonging to Bcc by API20NE, 34 were confirmed by PCR. Two isolates, from the same patient, were identified as *Pseudomonas fluorescens* by API 20NE and proved to be *B. vietnamiensis* by the molecular method. The bacteria which API 20NE identified as *Oligella* sp, *Alcaligenes xylosoxidans* and *Bordetella bronchiseptica* were negative for Bcc by PCR. Three isolates were identified by API 20NE as belonging to Bcc and were negative by PCR.

**Prevalence of Bcc genomovars among CF isolates:** From the 66 isolates which were PCR positive for Bcc, 40 were identified as *B. cenocepacia* (31 IIIA and 9 IIIB), 12 as *B. multivorans*, 4 as *B. vietnamiensis* and 6 as *B. anthina*. We were not able to identify the species by PCR-RFLP of 4 isolates (Table 1).

The prevalence of Bcc among CF patients was established as we were able to identify 34 patients with isolates that met the inclusion criteria. Among these, 8 patients had isolates that were negative by PCR for Bcc and 2 patients had isolates that were positive for Bcc but were not identified to specie level by PCR-RFLP. Therefore only 24 patients had isolates which were identified to Bcc specie level. The species distribution among these 24 patients was as follows: 14 patients were colonized by *B. cenocepacia* (10 patients with Bcc IIIA and 4 with Bcc IIIB), 4 patients were positive for *B. multivorans*, 2 for *B. vietnamiensis*, 2 for *B. ambifaria* and 2 patients were positive for both *B. cenocepacia* IIIA and IIIB in different isolates (Table 1).

Considering the total population of CF patients which had respiratory material submitted for bacteriological culture (244 patients) one could consider that the prevalence of Bcc in CF was only 10.6% (26/244).

**Longitudinal distribution within a CF patient:** we were able to evaluate 26 patients with more than one isolate and 24 of them proved to be colonized by the same specie of Bcc. It is of note that two patients had isolates belonging to the genomovar III (*B.cenocepacia*) which were subdivided in types IIIA and IIIB. Isolates from two patients were not identified to species level.

**Antibiotic resistance profile:** We compared each species with all the other species identified in this study according to their antibiotic resistance. *B.*

*multivorans* proved to be more resistant to cefepime ( $p=0.005$ ), piperacillin-tazobactam ( $p=0.012$ ), chloranphenicol ( $p=0.003$ ) and imipenem ( $p<0.001$ ). On the other hand, all *B. multivorans* were susceptible for doxycycline ( $p=0.029$ ). *B. cenocepacia* IIIA were more susceptible than the other species for cefepime ( $p=0.005$ ), doxycycline ( $p=0.029$ ), trimethoprim-sulfamethoxazole ( $p=0.040$ ), piperacillin-tazobactam ( $p=0.012$ ), chloranphenicol ( $p=0.003$ ) and imipenem ( $p<0.001$ ). *B. cenocepacia* IIIB and *B. vietnamiensis* did not display statistical difference of antibiotic profile in relation to the others. *B. ambifaria* proved to be more resistance to chloranphenicol ( $p=0.003$ ) (Table 2).

## DISCUSSION

Bcc infection may be associated with an accelerated decline in pulmonary function and, therefore, it is extremely important to identify the Bcc accurately in the CF pulmonary material. As Bcc may be transmissible among CF patients, it seems obvious that it is important to segregate CF patients Bcc-positive from Bcc-negative, considering their expected prognosis. Moreover, it has been described that *B. cenocepacia* is linked to an even more rapid progression of lung failure in CF patients and this leads to a need for specie identification (Vonberg & Gastmeier 2005, Courtney *et al.* 2004, Saiman & Siegel 2004).

The Bcc presents a complex taxonomic organization and the identification is a challenge for the microbiology laboratories. In the present study, 77/80 isolates were submitted to both API 20NE and PCR-RFLP identification and only 34 (44%) were identified as belonging to Bcc by both methods. According to these results, the API 20NE system proved to be relatively specific for Bcc identification but, on the other hand, this phenotypic method was not capable to discriminate 34 (44%) of the isolates. Therefore, a variety of isolates belonging to Bcc (as established by PCR) was not identified by API system. As the molecular identification by PCR is superior to the biochemical identification procedures, this commercial phenotypic identification do not appear to be suitable for identification mainly when it gives negative results for *B.cepacia*. Moreover, API identification was not able to discriminate to species level of Bcc. Therefore, whether one needs to identify the species (or

genomovars) within the Bcc complex it is necessary to use a molecular method. (van Pelt *et al.* 1999, Coenye *et al.* 2001).

The PCR Bcc investigation is based on the polymorphism of the *recA* gene. This gene encodes the *recA*, a multifunctional protein responsible for DNA repair. The *recA* specific primers, used in the PCR method, are highly specific for members of the Bcc (McDowell *et al.* 2001). In this study, we used initially the amplification of *recA* with primers BCR1 and BCR2 as a mean of classify the isolate within Bcc. Further, RFLP was performed with restriction endonucleases *HaeIII* and *MnlI* in order to identify the specific specie/genomovar. The PCR-RFLP procedure is rapid, sensitive, specific, reproducible and appear to be a more reliable tool to discriminate species of Bcc (van Pelt *et al.* 1999). In this study, this technique was capable of identify 66 isolates as belonging to Bcc and discriminate its species from I to VIII for 93.9% of the Bcc positive isolates. One reason which could explain the fact that a few species could not be identified by PCR-RFLP is that there are other species of Bcc which we did not evaluate in this study. Another reason is that there is no consistent data in the literature regarding small variations on RFLP-PCR patterns (Mahenthiralingam *et al.* 2000, Clode *et al.* 1999).

During the study period 10.6% (26/244) of CF patients that entered the inclusion criteria were colonized by Bcc. Molecular analysis of *recA* gene showed that *B. cenocepacia* colonized 53.8% (14) of the patients, *B. multivorans* infected 15.4% (4) of the patients followed by 7.7% (2) patients with *B. vietnamensis* and 7.7% (2) with *B. ambifaria*. Two CF patients (7.7%) were colonized with *B. cenocepacia* IIIA and IIIB in different isolates. Therefore, *B. cenocepacia* was the most prevalent specie of Bcc recovered in our population

and all patients were colonized only by a single specie. This predominance of *B. cenocepacia* and *B. multivorans* in CF patients in our population was also reported in most countries. In Australia and New Zealand, *B. cenocepacia* and *B. multivorans* were most frequently encountered and represented a total of 75% of the isolates. *B. cenocepacia* represents 45.7% and *B. multivorans* 29.3% followed by *B. cepacia* (11.2%) (Kidd *et al.* 2008).

The prevalence of *B. cenocepacia* found in our CF center was also observed in a variety of other countries. *B. cenocepacia* is prevalent in CF centers in Portugal (Cunha *et al.* 2003), Italy (Campana *et al.* 2005, Golini *et al.* 2006, Manno *et al.* 2004), Canada (Speert *et al.* 2002), Ireland (Crowley *et al.* 2002) and Czech Republic (Drevinek *et al.* 2005). The Bcc species distribution in CF French centers is slightly different from all these countries, where *B. multivorans* is the most prevalent (51%), followed by *B. cenocepacia* (45%) (Brisse *et al.* 2004).

We understand that only a few antibiotics are standardized to be tested for Bcc but, in this study, we evaluate a variety of antibiotics in order to obtain a comparison of results among all the species. We found that the antimicrobial resistance among Bcc species for the antibiotics tested varied greatly. According to this, *B. multivorans* was more resistant to chloranphenicol and imipenem; in the same manner *B. ambifaria* was found to be markedly resistant to chloranphenicol. On the other hand, *B. cenocepacia* IIIA was less resistant to these antibiotics when compared to the others. Among the antibiotics standardized for Bcc (ceftazidime, meropenem and trimethoprim-sulfamethoxazol), only trimethoprim-sulfamethoxazol showed with statistical significance ( $p < 0,05$ ) to be more effective for *B. cenocepacia* IIIA. We



understand that, regardless the antibiotics approved by CLSI, it may be important to evaluate other antibiotics for Bcc as the clinical treatment of the CF patients frequently requires antibiotics other than those standardized by CLSI.

This study demonstrates the application of molecular method based on the polymorphism of the *recA* gene to identify the species belonging to Bcc. It provides an overview of the prevalence, distribution and bacterial resistance of Bcc species at a CF center in Brazil. Our results confirmed that *B. cenocepacia* is the most prevalent specie among CF patients.

In conclusion, the phenotypic methods based on biochemical analysis proved not to be appropriate for the identification of Bcc. Therefore, it is crucial that microbiology laboratories which process specimens from CF patients have a molecular technique available. As we have demonstrated, the PCR-RFLP showed to be an unequivocal method for this purpose. Besides, the differentiation among Bcc species contributes to prognosis establishment and therapeutical conductance, which improve the CF patient following.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Aris, R. M., Routh, J. C., LiPuma, J. J., Heath, D. G. and Gilligan, P. H. (2001) Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med*, **164**, 2102-2106.
- Beringer, P. M. and Appleman, M. D. (2000) Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med*, **6**, 545-550.
- Brisse, S., Cordevant, C., Vandamme, P., Bidet, P., Loukil, C., Chabanon, G., Lange, M. and Bingen, E. (2004) Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, **42**, 4824-4827.
- Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N. et al. (2005) Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol*, **43**, 5136-5142.
- Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Masi, I., Audino, S., Sisi, B., Repetto, T., Doring, G. and de Martino, M. (2004) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J Cyst Fibros*, **3**, 159-163.
- Clode, F. E., Kaufmann, M. E., Malnick, H. and Pitt, T. L. (1999) Evaluation of three oligonucleotide primer sets in PCR for the identification of *Burkholderia cepacia* and their differentiation from *Burkholderia gladioli*. *J Clin Pathol*, **52**, 173-176.

- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. and LiPuma, J. J. (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*, **39**, 3427-3436.
- Correia, S., Nascimento, C., Pereira, L., Cunha, M. V., Sa-Correia, I. and Barreto, C. (2008) [The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients]. *Rev Port Pneumol*, **14**, 5-26.
- Courtney, J. M., Dunbar, K. E., McDowell, A., Moore, J. E., Warke, T. J., Stevenson, M. and Elborn, J. S. (2004) Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros*, **3**, 93-98.
- Crowley, D., Daly, M., Lucey, B. et al. (2002) Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. *J Appl Microbiol*, **92**, 992-1004.
- Cunha, M. V., Leitao, J. H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M. J. and Sa-Correia, I. (2003) Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol*, **41**, 4113-4120.
- Davis, P. B. (2006) Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, **173**, 475-482.
- Drevinek, P., Vosahlikova, S., Cinek, O., Vavrova, V., Bartosova, J., Pohunek, P. and Mahenthiralingam, E. (2005) Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J Med Microbiol*, **54**, 655-659.

- Golini, G., Cazzola, G. and Fontana, R. (2006) Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia*-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **25**, 175-180.
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P. and Levison, H. (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr*, **104**, 206-210.
- Kidd, T. J., Douglas, J. M., Bergh, H. A., Coulter, C. and Bell, S. C. (2008) *Burkholderia cepacia* complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. *Res Microbiol*, **159**, 194-199.
- Lambiase, A., Raia, V., Del Pezzo, M., Sepe, A., Carnovale, V. and Rossano, F. (2006) Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis. *BMC Infect Dis*, **6**, 4.
- Liou, T. G., Adler, F. R. and Huang, D. (2005) Use of lung transplantation survival models to refine patient selection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **171**, 1053-1059.
- LiPuma, J. J. (2003) *Burkholderia* and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, **24**, 681-692.
- Mahenthalingam, E., Baldwin, A. and Dowson, C. G. (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol*, **104**, 1539-1551.
- Mahenthalingam, E., Bischof, J., Byrne, S. K., Radomski, C., Davies, J. E., Av-Gay, Y. and Vandamme, P. (2000) DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and

- Burkholderia cepacia genomovars I and III. *J Clin Microbiol*, **38**, 3165-3173.
- Manno, G., Dalmastri, C., Tabacchioni, S. et al. (2004) 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*, **42**, 1491-1497.
- McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Moore, J. E. et al. (2001) PCR-based detection and identification of Burkholderia cepacia complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, **39**, 4247-4255.
- Moore, J. E., Millar, B. C., Xu, J., Crowe, M., Redmond, A. O. and Elborn, J. S. (2002) Misidentification of a genomovar of Burkholderia cepacia by recA restriction fragment length polymorphism. *J Clin Pathol*, **55**, 309-311.
- Moore, R. A. and Hancock, R. E. (1986) Involvement of outer membrane of Pseudomonas cepacia in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **30**, 923-926.
- Nzula, S., Vandamme, P. and Govan, J. R. (2002) Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the Burkholderia cepacia complex. *J Antimicrob Chemother*, **50**, 265-269.
- Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., Lipuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Jones, T. H. and Mahenthiralingam, E. (2005) Development of a recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3917-3927.
- Quinton, P. M. (2007) Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)*, **22**, 212-225.

- Ratjen, F. and Doring, G. (2003) Cystic fibrosis. *Lancet*, **361**, 681-689.
- Saiman, L. and Siegel, J. (2004) Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 57-71.
- Speert, D. P., Henry, D., Vandamme, P., Corey, M. and Mahenthiralingam, E. (2002) Epidemiology of Burkholderia cepacia complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis*, **8**, 181-187.
- van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H., Vos, M. C., Tummler, B., Segonds, C., Reubsaet, F., Verbrugh, H. and van Belkum, A. (1999) Identification of Burkholderia spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol*, **37**, 2158-2164.
- Vonberg, R. P. and Gastmeier, P. (2005) Isolation of infectious cystic fibrosis patients: results of a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **26**, 401-409.

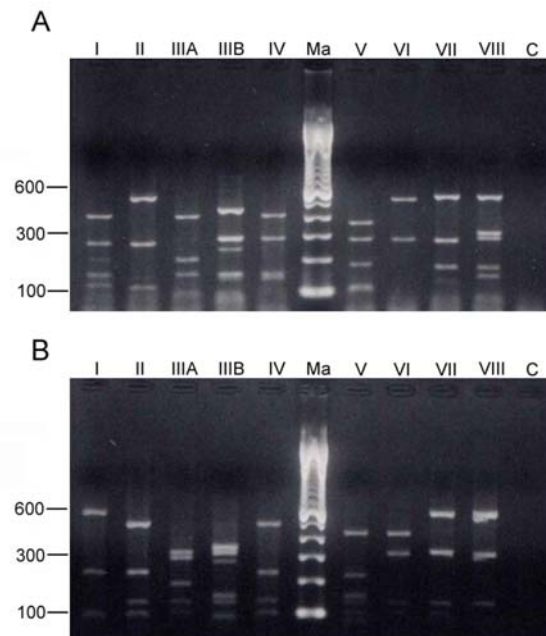


Figure 1. RFLP analysis of the *recA* gene amplified from strains of *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis* (V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII) and *B. anthina* (VIII). Ma, molecular size marker (100-bp ladder). C, negative control. A: *Hae*III RFLP analysis. B: *Mnl*I RFLP analysis.

Table 1. Distribution of genomovars among the 66 Bcc isolates recovered from 26 CF patients

Genomovar	Isolates <sup>a</sup> (%)	Patients <sup>b</sup> (%)
<i>B. multivorans</i>	12 (18,1)	4 (15,4)
<i>B. cenocepacia</i>	40 (60,6)	16 (61,5)
-Subgroup IIIA	31 (77,5)	12 (75,0)
Subgroup IIIB	9 (22,5)	6 (37,5)
<i>B. vietnamiensis</i>	4 (6,1)	2 (7,7)
<i>B. ambifaria</i>	6 (9,1)	2 (7,7)
Not determined by PCR	4 (6,1)	2 (7,7)

<sup>a</sup> Number of isolates belonging to a specific genomovar (as percentage of the 66 isolates examined).

<sup>b</sup> Number of patients infected with a genomovar (as percentage of 26 patients examined). The sum of the percentage of patients infected with the different genomovars IIIA and IIIB exceeds 100% since two patients were infested with both genomovars.



Table 2. Percentage of Bcc isolates resistant to antibiotics tested

	II	IIIA	IIIB	V	VII	p- value
AMK	10(100%)	31(100%)	8(100%)	3(75%)	6(100%)	0,068
ATM	7(87,5%)	4(25%)*	3(50%)	1(33,3%)	2(40%)	0,053
FEP	8(80%)*	8(25,8%)*	5(62,5%)	0	3(50%)	0,005
CAZ	4(40%)	2(6,5%)	1(11,1%)	0	0	0,075
CIP	6(60%)	16(51,6%)	4(50%)	2(66,7%)	5(83,3%)	0,712
DOX	0*	14(45,2%)*	3(37,5%)	0	1(16,7%)	0,029
CHL	3(100%)+	5(22,7%)+	1(25%)	2(66,7%)	3(100%)+	0,003
GEN	10(100%)	30(96,8%)	8(100%)	4(100%)	5(100%)	1,000
IPM	5(100%)+	2(10%)+	2(50%)	0	1(50%)	<0,001
MEM	4(44,4%)	4(12,9%)	2(22,2%)	0	1(16,7%)	0,265
SXT	7(77,8%)	7(30,4%)*	5(71,4%)	1(50%)	4(80%)	0,040
TIM	10(100%)	23(74,2%)	7(87,5%)	3(75%)	6(100%)	0,260
TOB	10(100%)	29(96,7%)	8(100%)	3(75%)	6(100%)	0,301
TZP	7(70%)*	4(13,3%)*	2(25%)	1(25%)	1(25%)	0,012

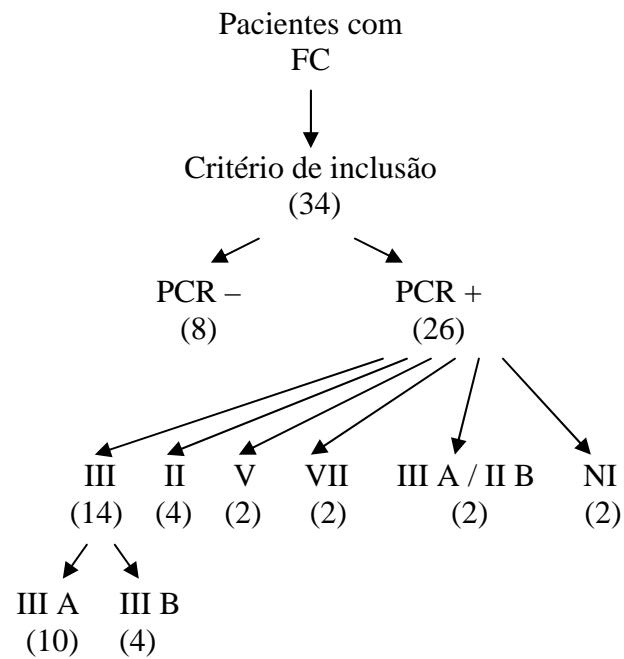
AMK=Amikacin; ATM=Aztreonam; FEP=Cefepime; CAZ=Ceftazidime;  
 CIP=Ciprofloxacin; DOX=Doxycycline; CHL=Choranphenicol; GEN=Gentamicin;  
 IPM=Imipenem; MEM=Meropenem; SXT=Trimethoprim-Sulfamethoxazole;  
 TIM= Ticarcilina-Cavulanate; TOB=Tobramicine; TZP= Piperacillin-  
 Tazobactam

\* p<0,05

+ p<0,0036

## ANEXO 1

Prevalência do complexo *B. cepacia* entre os pacientes portadores de fibrose cística. *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. vietnamiensis* (V), *B. ambifaria* (VII). NI: não identificados.



## ANEXO 2

Amostras clínicas dos pacientes portadores de fibrose cística.  
*B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* IIIA, *B. cenocepacia* IIIB, *B. vietnamiensis*  
(V), *B. ambifaria* (VII). NI:não identificadas.

