



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E DE FATORES
DE VIRULÊNCIA DE *Burkholderia cepacia*, ISOLADAS DE
CASOS DE BACTEREMIA EM PACIENTES E DA ÁGUA DA
UNIDADE DE HEMODIÁLISE

GOUSILIN LEANDRA ROCHA DA SILVA

PROFA. DRA. VERA LÚCIA MORES RALL

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Micro-organismos*.

Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Gousilin Leandra Rocha da.

Caracterização epidemiológica e de fatores de virulência de *Burkholderia cepacia*, isoladas de casos de bacteremia em pacientes e da água da unidade de hemodiálise / Gousilin Leandra Rocha da Silva. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21202001

1. Fatores de virulência. 2. Fatores epidemiológicos.
3. *Burkholderia cepacia*. 4. Bacteriemia.

Palavras-chave: PFGE; ST-767; recA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e todos os colaboradores que contribuíram para minha formação acadêmica, desde a graduação até o fim do mestrado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto em modalidade Mestrado, processo N°888870663570/2022-00.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall, que me acolheu desde quando dei início à iniciação científica em Microbiologia de Alimentos, me dando todo o suporte e conhecimento necessário para a realização da mesma, do meu estágio obrigatório e meu ingresso no programa de Mestrado. Agradeço imensamente à tantos anos de aprendizado, parceria e acolhimento, sem ela nada disso seria possível.

Agradeço à todos que de alguma forma estiveram presentes durante meu tempo no Laboratório de Biologia Molecular. Em especial, agradeço à Stéfani que me acompanhou e me ensinou técnicas novas, me ajudando em tudo que precisei, inclusive nos feriados.

Agradeço às amizades feitas com os laboratórios vizinhos, especialmente no laboratório do Rodrigo Tavanelli, que fizeram meus dias mais leves. Agradeço de coração ao Henrique, ao Iranildo e à Daiany que todas as vezes que pedi socorro me ajudaram de imediato.

Agradeço às minhas queridas amigas, Júlia, Larissa e Marina, por todos esses anos de companheirismo, dividindo os pontos altos e baixos da vida acadêmica e da vida pessoal. Com elas meus dias foram mais leves.

Agradeço à minha família por todo apoio. Esse agradecimento vai principalmente aos meus pais, Ana, Fernando e Alberto, e minha avó, Marina, que me acompanharam nesse caminho, não apenas de 2 anos, mas todos os 6 anos em que a UNESP foi minha segunda casa.

Agradeço ao meu namorado Thiago por ser meu ombro amigo desde o fim da minha graduação, por me levantar em todos os momentos de dor e luta, por comemorar cada vitória que tive durante esse caminho e principalmente por apoiar todas as minhas decisões e acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditei.

Agradeço a cada um que me trouxe luz durante meu trajeto e agradeço à mim por conciliar tantas mudanças em um período tão curto e nunca desistir.

RESUMO

A insuficiência renal provoca a diminuição da diurese e o acúmulo de substâncias nitrogenadas no organismo. Para aumentar a sobrevida do paciente, a hemodiálise é utilizada como substituto parcial da função renal. Entretanto, a contaminação da água utilizada nesse tratamento, causando bacteremia nos pacientes, é uma preocupação em todo o mundo. O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), grupo de bactérias com mais de 20 espécies, é frequentemente isolado de amostras de água de hemodiálise e compreende bactérias oportunistas, afetando pacientes imunodeprimidos, devido sua ampla variedade de fatores de virulência, além da resistência inata a vários antimicrobianos, contribuindo para a permanência no ambiente hospitalar e para a patogênese no hospedeiro. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar molecular e fenotipicamente isolados do Bcc, coletados da água e dialisato da Unidade de Hemodiálise e do sangue de pacientes com bacteremia de um Hospital Público, em Botucatu, entre 2019 e 2022. Foram utilizados 36 isolados de Bcc, previamente obtidos de hemoculturas de pacientes com bacteremia, em tratamento de hemodiálise e 24 isolados, obtidos a partir de amostras de água e dialisato. Todos os isolados foram testados para a verificação da presença de alguns genes que codificam fatores de virulência como *cblA*, *esmR* e *ZmpB*. Considerando-se a epidemiologia do surto, os isolados Bcc foram caracterizados molecularmente por Multi Locus Sequence Type (MLST) e por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE). A verificação e quantificação de biofilme em microplaca de poliestireno foi realizada submetendo os isolados à diferentes temperaturas de incubação (20°C, temperatura média da água e 35°C, temperatura ótima de crescimento do grupo). O antibiograma das amostras de hemocultura (Microscan Walkaway 96 Plus) foi gentilmente cedido pelo Laboratório Clínico do Hospital. Foi identificada a presença de *ZmpB* em todos os isolados, enquanto o *ZmpA* foi observado em 96,5% dos isolados e nenhum deles apresentou os genes *cblA* e *esmR*. O antibiograma de 33 isolados de humanos apontou que todos eram resistentes à gentamicina, à colistina, à ampicilina/sulbactam e ao imipenem. 16 (48,5%) isolados apresentaram resistência à amicacina e menores taxas de resistência foram observadas com relação ao meropenem, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina e piperaciclina/tazobactam (6,1%). Segundo os resultados do PFGE, todos os isolados obtidos de humanos e de água pertenciam ao mesmo pulsotipo (1), cuja identificação como a espécie *B. cepacia* foi confirmada pelo sequenciamento do gene *recA* como, pertencendo ao *sequence type* ST-767. Pela observação de um único pulsotipo dessa espécie ao longo de três anos, pode-se observar a persistência desse isolado no encanamento, contaminando os pacientes submetidos ao

tratamento de hemodiálise, apesar da rotineira desinfecção da água com ácido peracético. Provavelmente, essa persistência ocorre devido à produção de biofilme, que protege as bactérias dos desinfetantes. Tornando esse cenário mais crítico, vários isolados apresentaram não-suscetibilidade a pelo menos três classes de antimicrobianos, dificultando o tratamento dos pacientes.

Palavras-chave: ST-767, *recA*, PFGE.

ABSTRACT

Kidney failure causes a decrease in diuresis and the accumulation of nitrogenous substances in the body. To increase patient survival, hemodialysis is used as a partial substitute for renal function. However, contamination of the water used in this treatment, causing bacteremia in patients, is a worldwide concern. The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), a group of bacteria with more than 20 species, is frequently isolated from hemodialysis water samples and comprises opportunistic bacteria, affecting immunosuppressed patients, due to its wide variety of virulence factors, in addition to innate resistance to several antimicrobials, contributing to the permanence in the hospital environment and to the pathogenesis in the host. The objective of the present study was to characterize molecularly and phenotypically Bcc isolates collected from water and dialysate at the Hemodialysis Unit and from the blood of patients with bacteremia at a Public Hospital, in Botucatu, between 2019 and 2022. 36 Bcc isolates, previously obtained from blood cultures of patients with bacteremia undergoing hemodialysis treatment, and 24 isolates, obtained from water and dialysate samples, were used. All isolates were tested for the presence of some genes that encode virulence factors such as *cblA*, *esmR*, *ZmpA* and *ZmpB*. Considering the epidemiology of the outbreak, the Bcc isolates were molecularly characterized by Multi Locus Sequence Type (MLST) and by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The verification and quantification of biofilm in polystyrene microplates was carried out by subjecting the isolates to different incubation temperatures (20°C, average water temperature and 35°C, optimal temperature for the group's growth). The antibiogram of blood culture samples (Microscan Walkaway 96 Plus) was kindly provided by the Clinical Laboratory of the Hospital. The presence of *ZmpB* was identified in all isolates, while *ZmpA* was observed in 96.5% of the isolates and none of them showed the *cblA* and *esmR* genes. The antibiogram of 33 human isolates indicated that all were resistant to gentamicin, colistin, ampicillin/sulbactam and imipenem. 16 (48.5%) isolates were resistant to amikacin and lower rates of resistance were observed for meropenem, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin and piperacycline/tazobactam (6.1%). According to the PFGE results, all isolates obtained from humans and from water belonged to the same pulsotype (1), whose identification as the *B. cepacia* species was confirmed by sequencing the *recA* gene as belonging to sequence type ST-767. By observing a single pulse type of this species over three years, one can observe the persistence of this isolate in plumbing, contaminating patients undergoing hemodialysis treatment, despite the routine disinfection of water with peracetic acid. This persistence is probably due to the production of biofilm, which protects bacteria from disinfectants. Making

92 this scenario more critical, several isolates showed non-susceptibility to at least three classes of
93 antimicrobials, making it difficult to treat patients.

109 **Key-words:** ST-767, *recA*, PFGE.

SUMÁRIO

110		
111	1. INTRODUÇÃO.....	9
112	1.1 Hemodiálise.....	9
113	1.2 Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	10
114	1.2.1 Fatores de virulência do Complexo <i>B. cepacia</i>	11
115	1.2.2 Resistência aos Antimicrobianos	13
116	1.2.3 Caracterização Molecular	14
117	2. OBJETIVOS.....	17
118	2.1. Objetivo Geral	17
119	2.2. Objetivos Específicos	17
120	3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
121	3.1. Isolados de <i>Burkholderia cepacia</i>	18
122	3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação das espécies, pesquisa de	
123	fatores de virulência e caracterização molecular dos isolados.....	18
124	3.2.1. Extração de DNA	18
125	3.2.2. Amplificação do DNA.....	19
126	3.2.3. Visualização dos produtos amplificados	19
127	3.3. Teste de produção de biofilme <i>in vitro</i>	20
128	3.4. Caracterização molecular por PFGE	21
129	3.5. MLST	21
130	3.6. Estatística	24
131	4. RESULTADOS	25
132	5. DISCUSSÃO.....	31
133	6. CONCLUSÃO.....	33
134	7. REFERÊNCIAS	34

135

136

137

138

139

140

141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemodiálise

Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), cerca de 850 milhões de pessoas no mundo sofrem de doença renal crônica (DRC), ocorrendo, aproximadamente, 2,4 milhões de mortes ao ano. No Brasil, estima-se que 10 milhões de pessoas convivam com essa doença (SBN, 2020).

A insuficiência renal, que é a perda da função dos rins, pode ser aguda ou crônica, sendo essa última caracterizada pela redução progressiva da filtração glomerular, ocasionando o acúmulo de substâncias nitrogenadas no organismo e diminuição da diurese. Sua origem pode decorrer de quadros clínicos envolvendo hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e obesidade. (BUGNO et al, 2007; ZANINI et al., 2012; TRISTÃO et al., 2014)

Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostasia do organismo humano. Além de participar da excreção de água e sais minerais, da produção de hormônios e do controle do pH sanguíneo, eles atuam na eliminação de substâncias tóxicas, pela urina (ZANINI et al., 2012). Essa manutenção ocorre a partir da filtração do sangue, por isso, a avaliação da função renal se baseia na filtração glomerular (FG) que é diminuída em caso de comprometimento do órgão (DOS SANTOS et al., 2017). A evolução dessa síndrome é caracterizada pelo surgimento de esclerose glomerular e fibrose intersticial e resulta na insuficiência renal crônica (IRC), estágio clínico com necessária intervenção por meio de hemodiálise até que ocorra o transplante renal (TRISTÃO et al., 2014; SBN, 2020).

A hemodiálise é capaz de aumentar a sobrevida do paciente, substituindo parcialmente a função renal (LUGON et al., 2013). No procedimento, um equipamento promove a eliminação de líquidos e substâncias tóxicas em excesso presentes no sangue, retornando o sangue livre dessas impurezas e com pH balanceado ao paciente. Para isso, é necessário um acesso vascular que, por bombeamento do equipamento, encaminha o sangue ao filtro de diálise, onde entra em contato com o dialisato através de uma membrana semipermeável e é filtrado, substituindo os produtos indesejáveis pelos íons presentes no dialisato (COIMBRA et al., 2007; SBN, 2021).

O dialisato (ou fluido de diálise) é uma solução não estéril composta por água potável e concentrado polieletrólítico, que banha o dialisador. A água é essencial para a realização da hemodiálise, bem com sua qualidade microbiológica, que necessita estar dentro dos padrões estabelecidos, para que não haja riscos ao paciente (TRISTÃO et al., 2014; CUEVAS et al.,

2020). As sessões de hemodiálise submetem os pacientes à exposição à cerca de 400 litros de água por semana (ANVERSA et al, 2022).

A purificação da água se inicia no pré-tratamento, com o auxílio de filtros de areia, carvão ativado e abrandadores, para reter as impurezas químicas e orgânicas e evitar que a osmose reversa seja prejudicada. A osmose reversa é a etapa principal do tratamento, capaz de eliminar íons metálicos, sais aquosos e deveria também reter bactérias e endotoxinas devido ao uso de filtros com baixa porosidade ($< 0,2$ micrômetros) (COIMBRA et al., 2007; ROCHA, 2018). O padrão de água obtido pela osmose reversa adequada é considerado de alta qualidade, que ainda é submetida, posteriormente, à luz ultravioleta para esterilização (COIMBRA et al., 2007).

A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os padrões para o funcionamento dos Serviços de Diálise com a RDC nº154/2004, que normatiza o tratamento, valores de componentes físico-químicos e limites para a presença de micro-organismos (ANVISA, 2004). O padrão de qualidade exige a ausência de coliformes totais em 100ml de água e o máximo de 200 unidades formadoras de colônias/ml (UFC) na contagem de bactérias heterotróficas, contudo não recomenda a contagem específica de bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNNF) ou outros patógenos (ANVISA, 2004).

Os BGNNF estão frequentemente envolvidos em infecções hospitalares, pois além de poderem produzir biofilme, são patógenos oportunistas que podem apresentar resistência aos antimicrobianos (ANVERSA et al, 2022). No Brasil, Aversa et al. (2022) isolaram BGNNF em 45,8% das amostras de água em centros de hemodiálise, nas etapas de osmose reversa, reuso e dialisato. A presença de contaminantes microbiológicos na água de hemodiálise está associada a casos de bacteremia e à inflamação crônica, que além de agravar o quadro dos pacientes com o declínio da função renal, contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e desnutrição (COULLIETTE; ARDUINO, 2013).

1.2 Complexo *Burkholderia cepacia*

O Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) é um grupo formado por bacilos Gram-negativos, não fermentadores, frequentemente isolados na água e no solo (SAALFELD et al., 2020; CHANG et al., 2021). O primeiro relato da bactéria foi feito pelo pesquisador William Burkholder, em 1950, que identificou o fitopatógeno em cebolas como a nova espécie *Pseudomonas cepacia* (BURKHOLDER, 1950). Com o avanço da taxonomia molecular foi possível reclassificá-la em um novo gênero, *Burkholderia*, passando a ser chamada de

Burkholderia cepacia em 1992 (YABUUCHI et al, 1992). Pela similaridade feno e genotípica com outras espécies desse gênero, formou-se o Bcc, que inicialmente abrangia dez espécies genômicas ou genomovares (HOLMES et al., 1999). Considerando os genomovares de I a X, fazem parte esse grupo as espécies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* e *B. ubonensis* (COENYE et al, 2003). Atualmente, existem mais de 20 espécies identificadas, incluindo *B. aenigmatica*, *B. arboris*, *B. catarinensis*, *B. difusa*, *B. lata*, *B. latens*, *B. metallica*, *B. paludis*, *B. pseudomultivorans*, *B. puraquae*, *B. seminalis*, *B. stagnalis* e *B. territorii* (SCOCH et al., 2020). O genoma de Bcc é complexo (6-9Mb) e a capacidade de se adaptar por mutação reflete-se na plasticidade fenotípica e genotípica, responsável por sua diversidade metabólica (LEITÃO et al., 2013; TAVARES et al., 2020).

Seu caráter oportunista fica evidente por serem majoritariamente isolados, na clínica humana, em pacientes com fibrose cística, imunodeprimidos e em unidades de tratamento, como a hemodiálise (MONTAÑO-REMACHA et al., 2015).

A contaminação por Bcc da água utilizada no tratamento de hemodiálise já foi relatada em diferentes lugares do mundo. Oumokhtar et al. (2013) isolaram *B. cepacia* em 17% das amostras de água coletadas em um centro de hemodiálise em Fez, Marrocos. Um estudo realizado por Ortiz & Rios-González (2014) relatou um surto de *B. cepacia* em uma Unidade de Hemodiálise (UH) no Paraguai, onde a bactéria foi isolada em 75% das amostras de água de diálise. Ainda no Brasil, Lima et al. (2005) isolaram *B. cepacia* em amostras de água de pré e pós-tratamento, coletadas em duas unidades em São Luiz, Maranhão.

A taxa de mortalidade por bacteremia intra-hospitalar por espécies do Bcc é alta (CHANG et al., 2021), afetando pacientes com fibrose cística e outros imunodeprimidos. Esse complexo pode provocar a síndrome Cepacia, caracterizada pelo declínio respiratório, falência múltipla de órgãos e bacteremia (CHANG et al., 2021).

1.2.1 Fatores de virulência do Complexo *B. cepacia*

A ampla variedade de fatores de virulência contribui para sua permanência ambiental, invasão e sobrevivência intracelular em células epiteliais do trato respiratório humano e em macrófagos (MARTINS, 2007).

Para haver ligação e invasão celular, as espécies do Bcc necessitam de dois fatores de virulência importantes, o cable pili e a adesina 22 kDa. O primeiro deles, associado à essa adesina, se liga à proteína de filamento intermediário citoqueratina 13 (CK13), que atua como

receptora na célula hospedeira (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). *B. cenocepacia* que expressam o cable pili ainda conseguem se ligar às mucinas, componentes glicoproteicos presentes no fluido de vias aéreas e em abundância em pulmão com fibrose cística, aumentando o potencial da bactéria em provocar infecção (TOMICH et al., 2003; MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). O cable pili foi identificado pela primeira vez na cepa epidêmica ET12 de *B. cenocepacia*, amplamente difundida em casos de fibrose cística. Outros genes que codificam o cable pili foram encontrados em poucas outras espécies dentro do Bcc (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; TURTON et al., 2007).

A presença de flagelo, um apêndice filiforme que atua na mobilidade bacteriana, faz parte do fenótipo básico de todas as espécies do Bcc (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). A motilidade é um importante fator de virulência pois favorece a invasão celular, principalmente das células epiteliais respiratórias em casos de fibrose cística, bem como impulsiona a disseminação da bactéria pelos tecidos até que alcance a corrente sanguínea, provocando a bacteremia e septicemia (TOMICH et al., 2002; MAHENTHIRALINGAM et al., 2005).

Os lipopolissacarídeos (LPSs) são moléculas presentes na estrutura das membranas celulares de bactérias Gram-negativas e são considerados como fatores de virulências capazes de induzir a resposta imune do hospedeiro (TINTE et al, 2020), sendo compostos pelo Lipídio A, o qual está ligado um polissacarídeo chamado *antígeno O* ou antígeno somático O, sendo que o Bcc é caracterizado por conter uma quantidade menor de fosfato em seu LPS quando comparado à outras bactérias (MAHENTHIRALINGAM et al, 2005). Lipopolissacarídeos estão associados ao estímulo de resposta de neutrófilos e com a liberação de espécies reativas de oxigênio e enzimas, induzindo danos aos tecidos (VINION-DUBIEL e GOLDBERG, 2003).

A produção de metaloproteases de zinco, conhecidas como ZmpA e ZmpB contribuem para a patogênese da bactéria e sua evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro (KOOI et al., 2009). Ambas são proteases de amplo espectro, capazes de degradar substratos envolvido na integridade do tecido e defesa do hospedeiro, como colágeno tipo IV e fibronectina. (KOOI et al., 2006). Enquanto muitas proteases são inibidas por alfa-2-macroglobulina e alfa-1-proteinase, ZmpA e ZmpB tem o potencial de degradar esses inibidores. ZmpA atua clivando o interferon gama, enquanto o ZmpB degrada outros substratos, como imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), lactoferrina e transferrina (KOOI & SOKOL, 2009). Essa inativação aumenta os danos e inflamação dos tecidos, além de impulsionar a disseminação da bactéria no hospedeiro, resultando em septicemia (KOOI et al., 2005). Ambas as metaloproteases são capazes de clivar

e inativar peptídeos antimicrobianos envolvidos na imunidade inata (ROSALES-REYES et al., 2012)

O marcador da cepa epidêmica conhecido como *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker (BCESM), regulado pelo gene *esmR*, é considerado importante fator de virulência e faz parte de uma ilha genômica (*cci*) que codifica genes relacionados à virulência e ao metabolismo (BEVIVINO et al., 2002; BALDWIN et al., 2004; MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). Esse fragmento de DNA é raro em isolados ambientais e ausente em cepas não epidêmicas, sendo exclusivo de *B. cenocepacia*. Isolados que possuem o BCESM são mais transmissíveis e tendem a aumentar a taxa de mortalidade entre os pacientes (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005).

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos produzidos por isolados clínicos de Bcc envolvidos em infecções crônicas relacionadas a pacientes com fibrose cística. Os EPSs contribuem para a aderência e colonização de superfícies sólidas e para a produção de biofilme (OTOBONI, 2007). Além de estarem relacionados a um fenótipo mucoide nos pulmões, interagem com peptídeos antimicrobianos e interferem na quimiotaxia de neutrófilos, comprometendo esse importante mecanismo de defesa do hospedeiro (CUNHA et al., 2003; ZLOSNIK et al., 2008).

A matriz do biofilme, além do EPS, é constituída por DNA externo (eDNA) e proteínas e sua formação ocorre em três etapas: adesão, maturação e dispersão. A adesão é iniciada pelas interações entre flagelos e pili e a superfície biótica ou abiótica (RABIN et al., 2015). Após a ligação entre as bactérias e a superfície, a adesão irreversível acontece pela produção de grande quantidade da matriz EPS, que têm o papel de proteger as células bacterianas contra antibióticos, desinfetantes e mediadores de defesa do hospedeiro (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; RABIN et al., 2015). A seguir, inicia-se o processo de maturação, no qual há o recrutamento de outras células bacterianas, sejam da mesma espécie ou de espécies diferentes das de origem do biofilme, juntamente com a secreção de matriz EPS, ocorrendo o crescimento em camadas dessa estrutura. Em situações de estresse, como falta de nutrientes e superpopulação, ocorre a fase de dispersão, onde bactérias planctônicas são liberadas do biofilme promovendo a disseminação para novos locais (RABIN et al., 2015).

1.2.2 Resistência aos Antimicrobianos

As bactérias do Bcc possuem resistência inata a vários antimicrobianos, como aminoglicosídeos, cefalosporinas, polimixinas e beta-lactâmicos (BAZZINI, UDINE & RICCARDI, 2011). Seu perfil de multirresistência intrínseca se relaciona com a alta taxa de

mortalidade pela infecção, considerando que os pacientes envolvidos já se encontram com a imunidade comprometida, tornando o Bcc um agente significativo em infecções nosocomiais (LO PRIORE et al., 2020).

Existem diversos mecanismos de resistência, sendo a alteração da permeabilidade da membrana celular o mais importante, com a diminuição da absorção dos antimicrobianos (TRIVEDI et al., 2015; UWUMIRO et al., 2021). Entre outros mecanismos do Bcc, pode-se citar a produção de enzimas que degradam antimicrobianos, como as beta-lactamases, bombas de efluxo, alterações no sítio de ligação do antimicrobiano, além da formação de biofilme (MAHENTHIRALINGAM et al, 2005; UWUMIRO et al., 2021). A formação de biofilme atua dificultando a penetração de antimicrobianos e desinfetantes e contribui para resistência à ceftazidima e à ciprofloxacina (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005). Fármacos como o cloranfenicol, trimetoprim e quinolonas são exportados ativamente pela bomba de efluxo de membrana externa presente no Bcc. Enquanto a ação de beta-lactamases periplasmáticas e a presença de proteínas de ligação à penicilina específicas contribuem para que as bactérias sejam menos suscetíveis à ação de beta-lactâmicos. (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; GANESH et al., 2019).

O LPS, quando sofre modificação em sua estrutura, contribui para a resistência intrínseca aos antimicrobianos polipeptídicos catiônicos e à polimixina B. A presença de 4-amino-4-desoxiarabinose ligadas ao fosfato no lipídeo A reduz a carga líquida negativa do envelope celular da bactéria, diminuindo a permeabilidade à antimicrobianos catiônicos, como a polimixina (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; RHODES & SCHWEIZER, 2016; GANESH et al., 2019).

1.2.3 Caracterização Molecular

1.2.3.1 *RecA*

A diversidade genética de espécies dentro do Bcc e a similaridade fenotípica dificultam o processo de identificação das espécies envolvidas, por testes bioquímicos (MEDINA-PASCUAL et al., 2012). A análise do gene 16s tem sido utilizada para a discriminação entre espécies. Entretanto, a técnica possui limitações devido a variação insuficiente de sequências nesse gene (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000; TRABULSI, ALTERTHUM, 2015). Como alternativa, a amplificação e sequenciamento do gene *recA*, que codifica uma proteína multifuncional, possibilita essa caracterização, bem como o estudo da sistemática molecular

dessas bactérias, pois não apresenta variação na sequência espécie-específica (EISEN et al., 1995; KARLIN et al., 1995).

1.2.3.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Para diferenciar as linhagens de uma mesma espécie, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido amplamente utilizada. O método é baseado na clivagem do genoma bacteriano por enzimas de restrição, o qual é separado em diferentes fragmentos de DNA, que formam os padrões de bandas (pulsotipo) em um gel de agarose (ZULKEFLI et al., 2016). Segundo Zulkefli et al. (2016), essa técnica pode ser afetada por rearranjos genômicos, sendo mais adequada para epidemiologias restritas.

Martins et al. (2010) empregaram a técnica de PFGE em um estudo de caso cruzado no Rio de Janeiro, demonstrando a presença de seis clones do Bcc, sendo um prevalente nos três hospitais estudados. A partir da análise, foi possível identificar a fonte do surto de infecções primárias da corrente sanguínea associadas ao Bcc (MARTINS et al., 2010). O uso do PFGE contribuiu para duas investigações epidemiológicas realizadas por Raddaoui et al. (2022) no Centro Nacional de Transusão de Sangue da Tunísia. A análise revelou a presença de cinco clusters entre os 23 isolados de *B. cepacia* investigados. O principal cluster incluiu 18 isolados, confirmando a origem de contaminação e possibilitando uma intervenção eficaz para a erradicação do surto (RADDAOUI et al., 2022).

1.2.3.3 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Ao realizar um estudo geográfico epidemiológico e cruzado de longo prazo, é interessante o uso de métodos que envolvam genes metabólicos essenciais, devido sua conservação (ZULKEFLI et al., 2016), como o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), que utiliza sequências de fragmentos internos de sete genes conservados, chamados *housekeeping* (nesse caso: *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC*, *recA* e *trpB*) para definir o perfil alélico de cada isolado (MAIDEN, 2006). A técnica fornece informações importantes sobre a diversidade genética e dinâmica populacional do Bcc, tendo ainda identificado novas espécies dentro do complexo (SPILKER et al., 2009). Após a caracterização do isolado, pode-se comparar e relacionar cepas de diferentes lugares, utilizando-se um banco de dados (MAIDEN, 2006).

Cesarini et al. (2009) e Wong et al. (2020) utilizaram essa técnica também para a identificação da espécie, como um alternativo ao sequenciamento do *recA*. Wong et al. (2020) identificaram *B. contaminans* ST102 (espécie pertencente ao Bcc) por essa técnica, usando

371 isolados obtidos de diferentes tipos de infecção (doenças pulmonares, reais, oculares, de tecidos
372 moles e por cateter), verificando ainda que essa *sequence type* parece ter distribuição global
373 entre paciente com fibrose cística ou não, em países da União Europeia, Estados Unidos e
374 Rússia, de acordo com a base de dados do PubMLST (<https://pubmlst.org/>).
375

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral foi caracterizar molecular e fenotipicamente isolados do complexo *Burkholderia cepacia*, obtidos de amostras água e de dialisato de uma Unidade de Hemodiálise (UH) e de hemoculturas de pacientes submetidos à hemodiálise e com bacteremia, em um hospital público, na cidade de Botucatu, entre 2019 e 2022.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar molecularmente esses isolados, por MLST e PFGE.
- Verificar a presença de alguns genes ligados à virulência, como *cblA*, *ZmpA*, *ZmpB* e *esmR*.
- Verificar a produção de biofilme nas temperaturas de 20°C e 35°C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Burkholderia cepacia*

Os isolados de *B. cepacia* provenientes da água e dialisato da Unidade de Hemodiálise (UH) de um hospital público de Botucatu/SP foram coletados e identificados por um programa de vigilância, que monitora a qualidade microbiológica da água tratada para esses serviços. O surto foi percebido em novembro de 2019, quando houve um aumento abrupto na identificação de *B. cepacia* nas amostras de água e dialisato, vindos da UH desse Hospital. Pela presença dessa bactéria nos meses seguintes, resultados de água e de hemoculturas de meses anteriores foram examinados e os isolados de *B. cepacia* de ambos os locais foram recuperados, a partir de maio de 2019 para o estudo em questão e se estendeu até abril de 2022.

Os isolados de hemocultura de pacientes submetidos à hemodiálise nessa Unidade durante o mesmo período foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Clínico do Hospital (Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos nº 30818020.4.0000.5411).

Os resultados de sensibilidade aos fármacos acompanharam as amostras de origem humana e foram realizados pelo equipamento Microscan Walkaway 96 Plus, utilizado pelo Laboratório Clínico do Hospital, o qual se baseia em análise colorimétrica e fluorométrica. Os antibióticos testados foram Cefepime, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, Amicacina, Meropenem, Colistina, Ampicilina/sulbactam e Piperaciclina/tazobactam.

3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação das espécies, pesquisa de fatores de virulência e caracterização molecular dos isolados.

3.2.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada segundo Dias et al. (2016). Os isolados de *Bcc* foram cultivados em ágar nutriente e incubados a 37°C/24h. A seguir, uma colônia de cada isolado foi suspensa em 300 µL de água miliq estéril, homogeneizada em vortex em um tubo de microcentrífuga, que foi fervido em banho-maria a 95°C/10min. A suspensão foi centrifugada a 13.000g/5min e o sobrenadante, congelado a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

3.2.2. Amplificação do DNA

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga, com volume final de 25 µL, utilizando-se GoTaq Green Master Mix, 2X (Promega), conforme recomendações do fabricante. A incubação foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem), empregando-se os parâmetros de acordo com o Quadro 1. Em todas as reações realizadas, foi utilizado um controle negativo, pela substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *B. cepacia* ATCC 25416.

O amplicon gerado pela PCR do gene *recA*, para identificação da espécie, foi submetido ao sequenciamento por Sanger.

Quadro 1: Parâmetros utilizados nas reações de PCR, para os genes envolvidos na patogenicidade e genotipagem de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*.

Gene	Corrida (30 ciclos)				
	Denaturação Inicial	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
<i>cblA</i>	94°C/2min	94°C/1min	55°C/1min	72°C/1min	72°C/10min
<i>esmR</i>	94°C/2min	94°C/1min	63°C/1min	72°C/2min	72°C/10min
<i>recA</i> *	94°C/2min	94°C/30s	61°C/45s	72°C/1min	72°C/10min
<i>ZmpA</i>	96°C/4min	96°C/30s	56°C/30s	72°C/4,5min	72°C/10min
<i>ZmpB</i>	95°C/7min	95°C/1min	56°C/30s	72°C/2min	72°C/20min
<i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>lepA</i> , <i>phaC</i> , <i>trpB</i>	96°C/2min	96°C/1min	58°C/1min	72°C/2min	72°C/5min
<i>gltB</i>	96°C/2min	96°C/1min	62°C/1min	72°C/2min	72°C/5min
<i>recA</i>	96°C/2min	96°C/1min	60°C/1min	72°C/2min	72°C/5min

*BCR1 e BCR4

3.2.3. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1%

(Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBr Safe (0,5 mg/ml - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 pares de base (bp) ou 1000 bp (Amersham – Pharmacia Biotech Inc.), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

O Quadro 2 apresenta as sequências dos primers utilizados, tamanho do amplicon e referência.

Quadro 2: Sequências dos *primers* e referências utilizados nas reações de PCR, para os genes envolvidos na patogenicidade e genotipagem de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*.

Gene	Sequência (5'3')	Pb	Referência
<i>cblA</i>	F: CCAAAGGACTAACCCA	664	Urban et al. (2005)
	R: ACGCGATGTCCATCACA		
<i>esmR</i>	F: CCACGGACGTGACTAACA	1400	Mahenthiralingam et al. (1997)
	R: CGTCCATCCGAACACGAT		
<i>recA</i>	F: TGACCGCCGAGAAGAGCAA	597	Mahenthiralingam et al. (2000)
	R: GACCGAGTCGATGACGAT		
<i>ZmpA</i>	F: CCAACCTGAACTATTCGG	228	Gingues et al. (2005)
	R: TGC GGATCGTGGCGC		
<i>ZmpB</i>	F: GCAGACATCACGCAAAGCATTG	1700	Kooi et al (2006)
	R: GCAGCTCTTGTTGTACGCGTTG		

Pb: Pares de bases

3.3. Teste de produção de biofilme *in vitro*

Cada cepa foi semeada em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco) e incubada sob agitação à 35°C/48h, sendo, a seguir, diluída até $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (escala 0,5 de MacFarland). Uma alíquota de 200 µl foi distribuída, em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato. As cepas de *B. cepacia* foram incubadas nas temperaturas de 35°C e 20°C por 48 horas sem agitação. Após incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com cristal violeta 1%, por 15 minutos. Após a remoção do corante, foram feitas três lavagens com água destilada e secagem da placa em temperatura ambiente. O biofilme foi ressuscitado em 200µl de ácido acético glacial 33% e lido em um leitor de ELISA (Biotek, EPOCH2C 200-999nm), em 570

nm. BHI não inoculado foi utilizado como branco, para corrigir o valor da absorbância, sendo realizada uma média dos quatro poços. As cepas testadas foram classificadas em níveis de produção de biofilme segundo Stepanovic et al. (2000). A partir da média da leitura óptica (D.O.) da quadruplicata de acordo com a relação entre D.O. e D.O.c (controle negativo), as amostras foram classificadas em não produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme (Quadro 3). Como controle negativo, foi utilizado *S. epidermidis* ATCC 14990.

Quadro 3. Classificação dos isolados de *B. cepacia*, obtidos a partir de amostras de água, de dialisato e de hemoculturas.

Relação	Interpretação
$D.O. \leq D.O.c$	Não produtor
$D.O.c < D.O. \leq (2 * D.O.c)$	Fraco produtor
$2 * (D.O.c) < D.O. \leq (4 * D.O.c)$	Moderado produtor
$4 * (D.O.c) < D.O$	Forte produtor

D.O.: densidade óptica da cepa em teste; D.O.c: densidade óptica do controle negativo

3.4. Caracterização molecular por PFGE

Foi utilizado o protocolo padrão da PulseNet (CDC, 2017a), usando-se a SpeI (Thermo Scientific, Waltham MA) (50 U por 2 h, a 37°C) como endonuclease de restrição para digerir o DNA genômico de *B. cepacia*. O DNA digerido foi separado por eletroforese usando um CHEF Mapper (campo elétrico homogêneo preso) (Biorad, Hercules, Califórnia), com um intervalo de pulso inicial de 2,2 s, intervalo de pulso final de 54,2 s, voltagem de 6 V e um ângulo incluído de 120 °, por 19 h. Para a corrida PFGE, o tampão de eletroforese utilizado foi o TBE 0,5x.

As imagens do PFGE foram analisadas pelo software Bionumerics v.7.6, utilizando-se tolerância de posição de banda de 1,5%. Empregou-se o método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA), o coeficiente de Dice e índice de similaridade de 80%, segundo Kitchel et al. (2009) para o agrupamento em pulsotipos. Os fragmentos de DNA da ATCC BAA-664 (*Salmonella ser.* Braenderup H9812) foram usados como marcadores para os padrões de digestão e a enzima de restrição usada foi a XbaI (Thermo Scientific).

3.5. MLST

Para o método de MLST, os setes genes conservados (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC*, *recA* e *trpB*) foram submetidos ao sequenciamento por Sanger,

487 pelo Instituto de Biotecnologia (IBTEC/UNESP, Botucatu), utilizando-se os primers
488 apresentados no Quadro 4.
489

Quadro 4: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR para sequenciamento, na técnica de MLST para espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (Jolley et al., 2018).

Gene	Sequência (5' 3')	Pb
<i>atpD</i> *	F: GATCGTACAGTGCATCGG	1395
	R: ATCGTGCCGACCATGTAG	
<i>gltB</i> *	F: CGCTCGAAGATCAAGCAG	4704
	R: GGGAACACCTTCACGAAC	
<i>gyrB</i> *	F: CGACAACTCGATCGACGA	2475
	R: GACAGCAGCTTGTCGTAG	
<i>recA</i> *	F: GATAGCAAGAAGGGCTCC	1071
	R: CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	
<i>lepA</i> *	F: CGACGGCAAGGTCTACAA	1794
	R: AGCATGTGCGACCTTCACG	
<i>phaC</i> *	F: CTCAGCGAATTGCGTACG	741
	R: CTCAGCGAATTGCGTACG	
<i>trpB</i> *	F: GATCTACCTGAAGCGCGA	1194
	R: GTGTGCATGTCCTTGTCG	
<i>atpD</i> **	F: GTTCATCTGGCCGTACAC	443
	R: AACTGACGCTCGAAGTCC	
<i>gltB</i> **	F: AACTGACGCTCGAAGTCC	400
	R: CTTCTTCTTCGTGCGCCA	
<i>gyrB</i> **	F: ATCGTGATGACCGAGCTG	454
	R: CGTTGTAGCTGTCGTTCC	
<i>recA</i> **	F: TGACCGCCGAGAAGAGCAA	393
	R: GACCGAGTCGATGACGAT	
<i>lepA</i> **	F: GGCATCAAGGAAGTACG	397
	R: CTGCGGCATGTACAGGTT	
<i>phaC</i> **	F: AGACGGCTTCAAGGTGGT	385
	R: ACACGGTGTTGACCGTCA	
<i>trpB</i> **	F: CTGGGTCACGAACATGGA	301
	R: CCGAATGCGTCTCGATGA	

*Primer de amplificação; **Primer de sequenciamento; Pb: Pares de bases.

3.6. Estatística

Os resultados obtidos no ensaio de biofilme em microplaca de poliestireno foram submetidos ao teste estatístico Qui-quadrado de Pearson, para avaliar a diferença entre as temperaturas de incubação.

4. RESULTADOS

Na configuração do surto, os isolados de Bcc representaram 13,3% (40) das amostras de água e dialisato coletadas entre 2019 e 2022, sendo o segundo micro-organismo mais comum a ser identificado, além de BGNNF (Gráfico 1). Os isolados que compõem o grupo BGNNF é qualquer outro que não *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* e *Stenotrophomonas maltophilia*. No período considerado pelo trabalho, foi possível observar (Gráfico 2) o aumento repentino em casos de pacientes de hemodiálise infectados por Bcc, ocorrendo um pico de 7 casos em novembro de 2019, concomitante ao aparecimento da bactéria nas amostras de água e dialisato. Como consequência à pandemia de COVID-19, houve uma pausa nas coletas e análises, provocando uma defasagem nos dados. Não foi possível obter dados sobre os períodos de março a setembro de 2020 para as análises de água e dialisato e entre março de 2020 e junho de 2021 para as análises de hemocultura. Essa pausa coincidiu justamente com o período no qual é possível observar o aumento de locais de coleta de água, na Unidade de Hemodiálise, com a presença de *B. cepacia*, chegando à cinco pontos de coleta em fevereiro de 2020.

Gráfico 1. Registro de espécies bacterianas identificadas em análises de água e dialisato da Unidade de Hemodiálise, no período de 2019-2022.

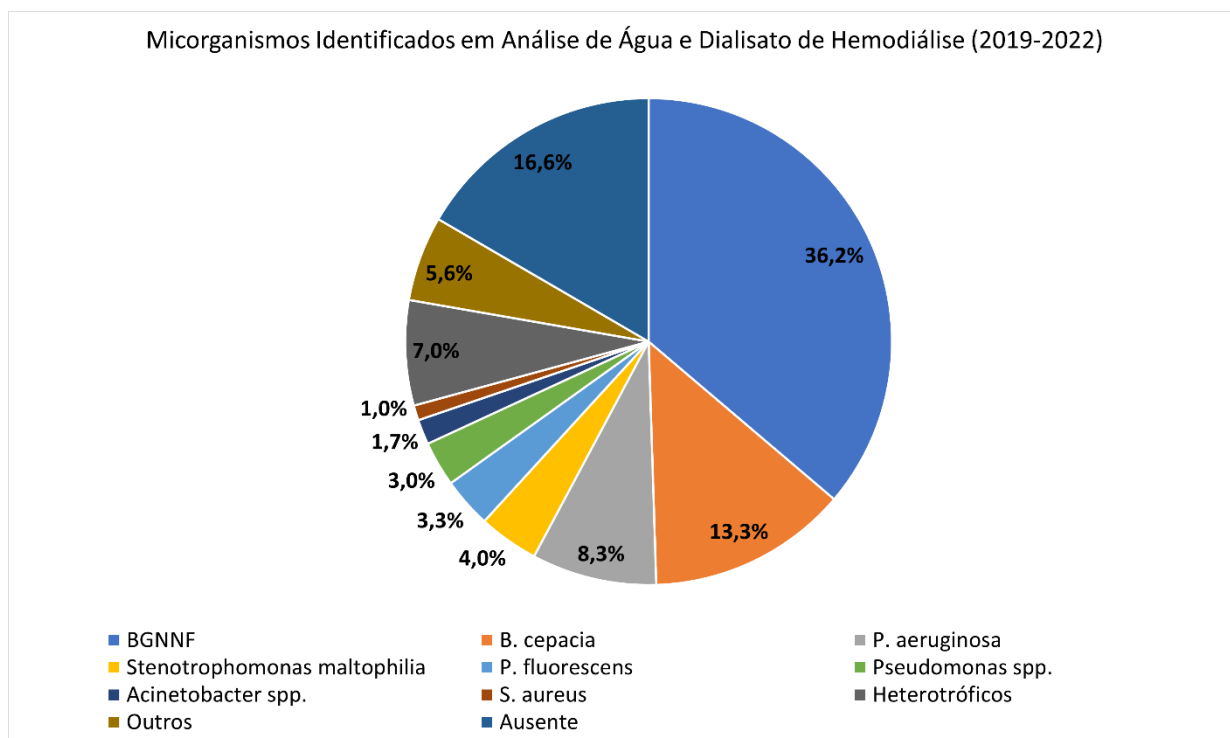
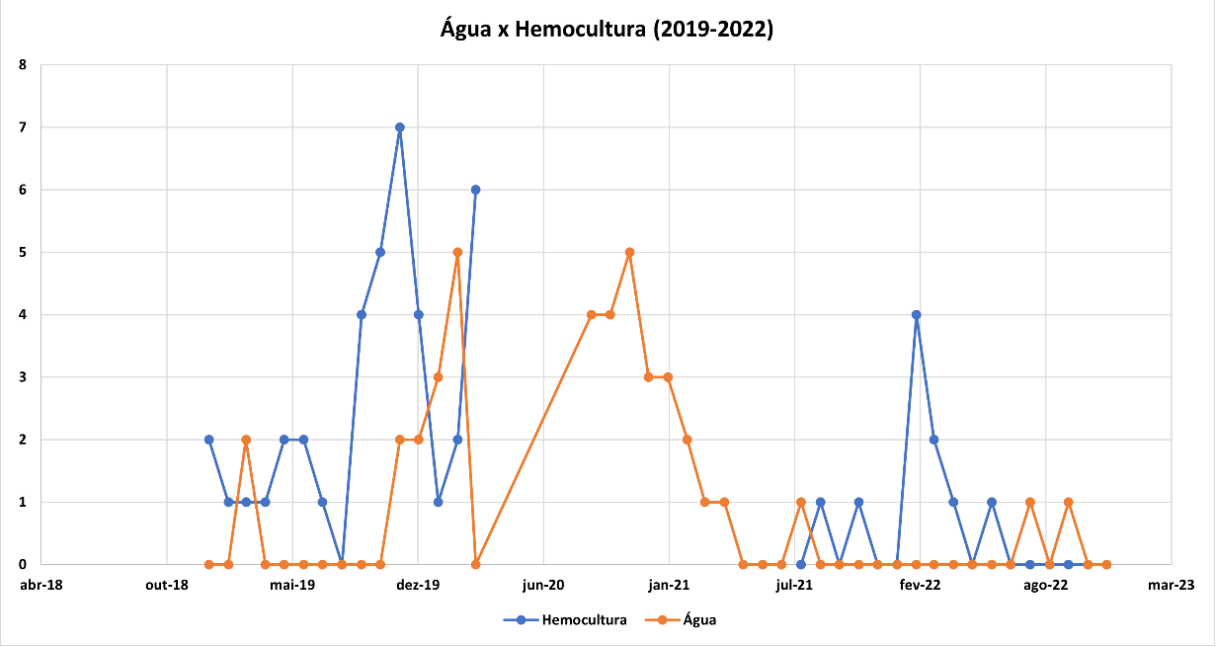


Gráfico 2. Registro mensal (2019-2022) de isolados identificados fenotipicamente como *B. cepacia* em hemoculturas de pacientes de hemodiálise e em água e dialisato da Unidade de Hemodiálise.



Hemocultura: N de pacientes relatados com a bacteremia por *B. cepacia* por mês. Água: N de locais onde é feito o monitoramento da Unidade de Hemodiálise e foi identificado a presença de *B. cepacia* na água e/ou dialisato.

No total, 60 isolados foram identificados e estocados a -70°C durante o período de coleta, de maio de 2019 a abril de 2022, sendo 36 de hemoculturas de pacientes com bacteremia e 24 de amostras água e dialisato.

Em relação à presença dos genes que codificam os fatores de virulência pesquisados, todos os 60 (100%) isolados apresentaram o gene *ZmpB* e 58 (96,6%), o *ZmpA* (ausência em um isolado de água e um de hemocultura). Nenhum isolado apresentou o gene de virulência *cblA* ou o marcador de cepa virulenta *esmR*.

No ensaio de produção de biofilme em microplaca de poliestireno, o mesmo inóculo de cada isolado foi submetido às temperaturas de 35°C , considerada a temperatura ótima de crescimento e de 20°C , a temperatura média em Botucatu (Climate Data, 2023). Segundo a Tabela 1, 29 isolados (48,3%) foram classificados como não produtores, quando incubados à 35°C e esse número foi reduzido a quatro (6,7%), em temperatura de 20°C , segundo Stepanovic et al. (2000). O teste do Qui-quadrado demonstrou diferença significativa ($p < 0.0001$) entre a ação das temperaturas, 20°C e 35°C , em relação à produção do biofilme.

Tabela 1. Classificação dos isolados de *B. cepacia*, obtidos de amostras de água de uma Unidade de Hemodiálise e de hemoculturas em relação à capacidade de produção de biofilme em microplaca de poliestireno, incubadas a 20°C e 35°C.

Classificação*	20°C		35°C	
	Hemoculturas	Água	Hemoculturas	Água
Forte produtor	31 (51,7%)	20 (33,3%)	12 (20%)	1 (1,7%)
Moderado produtor	1 (1,7%)	3 (5%)	6 (10%)	1 (1,7%)
Fraco produtor	0	1 (1,7%)	5 (8,3%)	6 (10%)
Total de produtores	56 (93,3%)		31 (51,7%)	
Não produtor	4 (6,7%)	0	13 (21,7%)	16 (26,6%)
Total geral	60		60	

Até visualmente foi possível perceber uma maior produção de biofilme tanto em quantidade de isolados como na intensidade da coloração pelo cristal violeta 1%, nas temperaturas de 35°C e 20°C, Figuras 1(A) e 1(B), respectivamente.

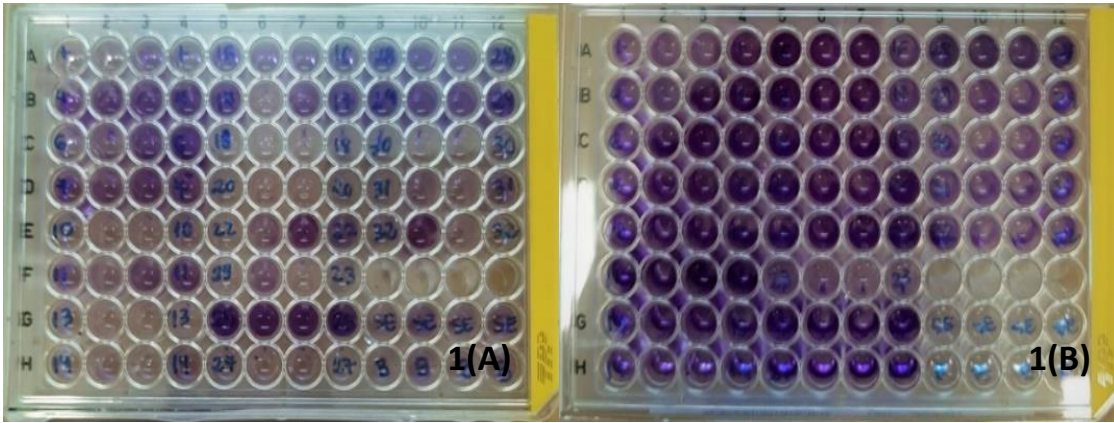


Figura 1. Produção de biofilme em microplacas de poliestireno por *B. cepacia*, isoladas de amostras de água de uma Unidade de Hemodiálise e de hemoculturas, incubada à 35°C (A) e à 20°C (B)

Com exceção de três, todos os isolados obtidos a partir de hemocultura (33), cedidos pelo Laboratório Clínico do Hospital, foram acompanhados dos resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Todos os 33 (100%) isolados foram resistentes à gentamicina, à colistina, à ampicilina/sulbactam e ao imipenem e 16 (48,5%) isolados

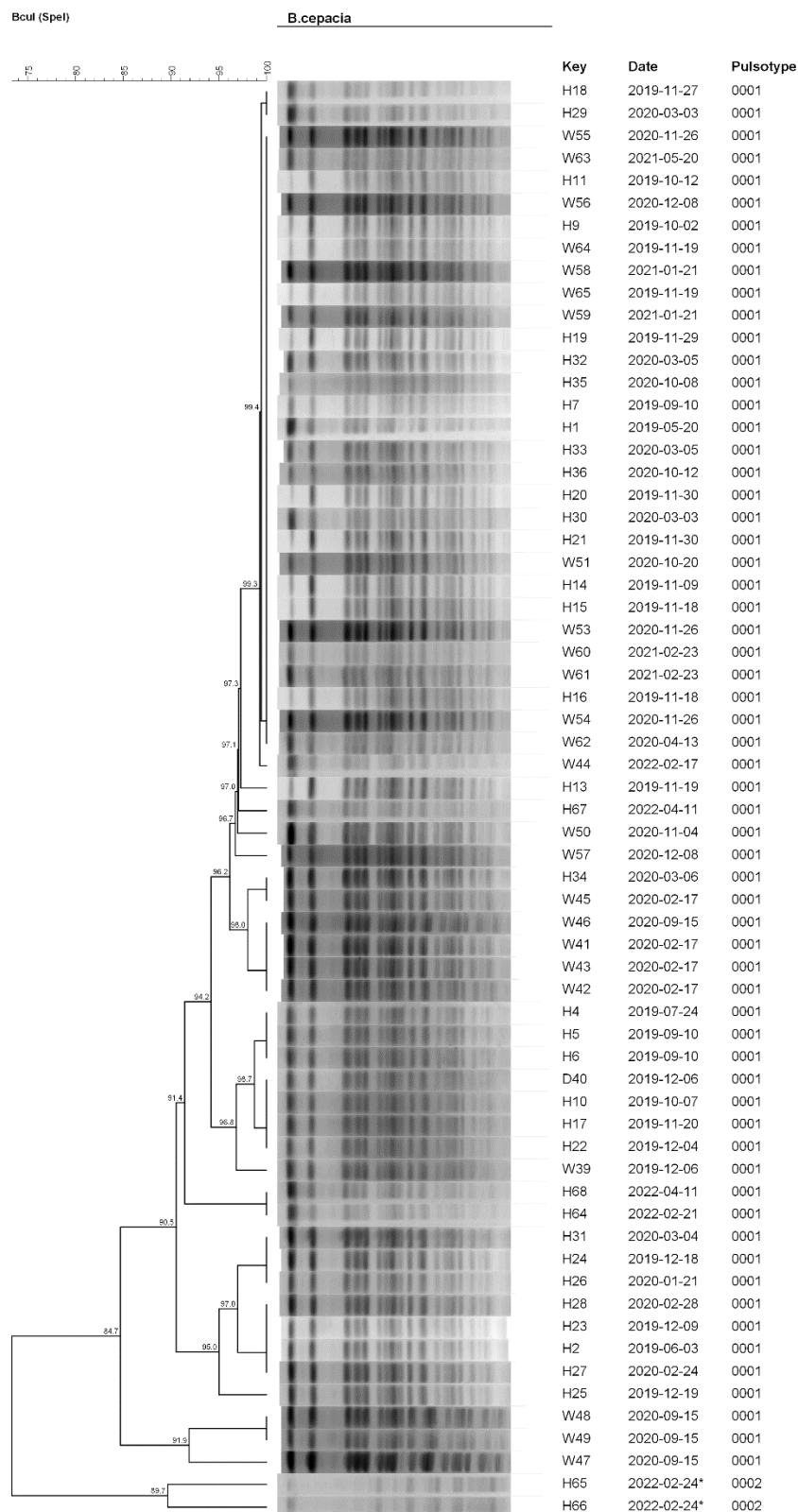
apresentaram resistência à amicacina. Menores taxas de resistência foram observadas com relação ao meropenem, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina e piperaciclina/tazobactam (6,1%). Todos os isolados foram sensíveis ao sulfametazol/trimetoprim, levofloxacina e à tigeciclina, mas todos foram resistentes a pelo menos 3 classes diferentes de antibióticos. A Tabela 2 apresenta o perfil de resistência desses isolados.

Tabela 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos por isolados do Complexo *B. cepacia*, obtidas a partir de hemoculturas de paciente com bacteremia e em hemodiálise, em um Hospital Público em Botucatu/SP.

Número de isolados com o perfil (%)	Antibióticos
1 (3%)	CPM + CAZ + CIP + COL + GEN + IPM + AMI + PIT + APS
1 (3%)	MPM + COL + GEN + IPM + AMI + APS
1 (3%)	CPM + CAZ + COL + GEN + IPM + AMI + APS
2 (6,1%)	COL + GEN + IPM + AMI + APS
1 (3%)	MPM + COL + GEN + IPM + AMI + APS
1 (3%)	CIP + COL + GEN + IPM + AMI + PIT + APS
4 (12,1%)	MPM* + COL + GEN + IPM + AMI + APS
5 (15,2%)	COL + GEN + IPM + AMI + APS
13 (39,4%)	COL + GEN + IPM + APS
4 (12,1%)	MPM* + COL + GEN + IPM + APS

CPM: cefepime; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; AMI: amicacina; MPM: meropenem; COL: colistina; APS: ampicilina/sulbactam; PIT: piperaciclina/tazobactam.
*Classificado como Intermediário.

A tipagem molecular pela técnica de PFGE mostrou que 62 (100%) isolados, abrangendo os obtidos de pacientes e de água pertenciam ao mesmo pulsotipo (1) (Figura 2). As estirpes W64 e W65 foram isoladas em novembro de 2019 e imediatamente foi realizado o teste de PFGE para a pesquisa do surto que estava ocorrendo no hospital naquele ano. Devido à quarentena imposta pela pandemia de COVID -19, os isolados foram congelados a -70°C, até o momento das análises fenotípicas e genotípicas, que se iniciaram em 2021, mas essas duas estirpes não puderam ser recuperadas.



588

589 Figura 2: Dendrograma dos padrões of PFGE, usando-se coeficiente de similaridade acima de 80% de
 590 isolados de *B. cepacia*, obtidos a partir de água de hemodiálise e dialisato e de hemoculturas. *: Os dois
 591 isolados do pulstipo 0002 (H65 e H66) são de origem humana, mas de pacientes com outra fonte de
 592 infecção, que não realizam hemodiálise. Esses isolados são considerados “outgroup”, mostrando que a
 593 técnica é discriminatória.

Somente dois isolados de água e dois de hemocultura foram submetidos ao sequenciamento Sanger do gene *recA* para a identificação da espécie, devido ao predomínio de um único pulsotipo. A comparação das sequências no Blast/GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), resultou no número de acesso GU951989.1, com identidade 100% compatível, (NCBI), identificando esses isolados como a espécie *B. cepacia* (genomovar I), dentro do complexo Bcc.

Pelo mesmo motivo, somente um isolado foi submetido à identificação pelo MLST, sendo classificado molecularmente como o *sequence type* ST-767. A Figura 3 apresenta os amplicons dos genes constitutivos (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC*, *recA* e *trpB*), que foram sequenciados por Sanger (Figura 4).

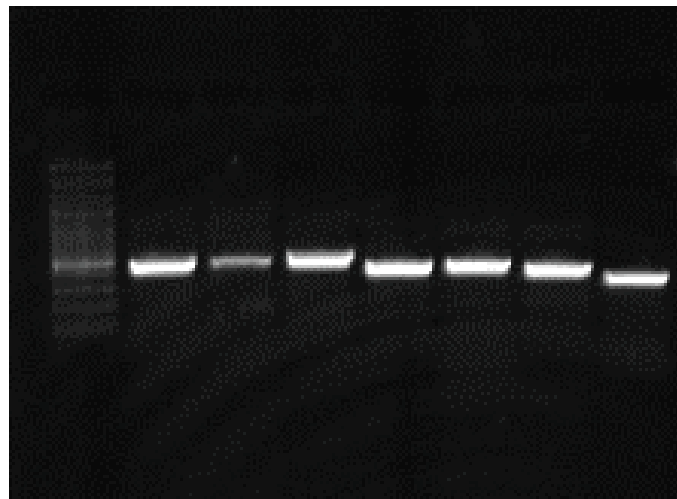


Figura 3. Gel de eletroforese. Poço 1: ladder 100 pares de base; poço 2: *atpD*; poço 3: *gltB*; poço 4: *gyrB*; poço 5: *lepA*; poço 6: *phaC*; poço 7: *recA*; poço 8: *trpB*;

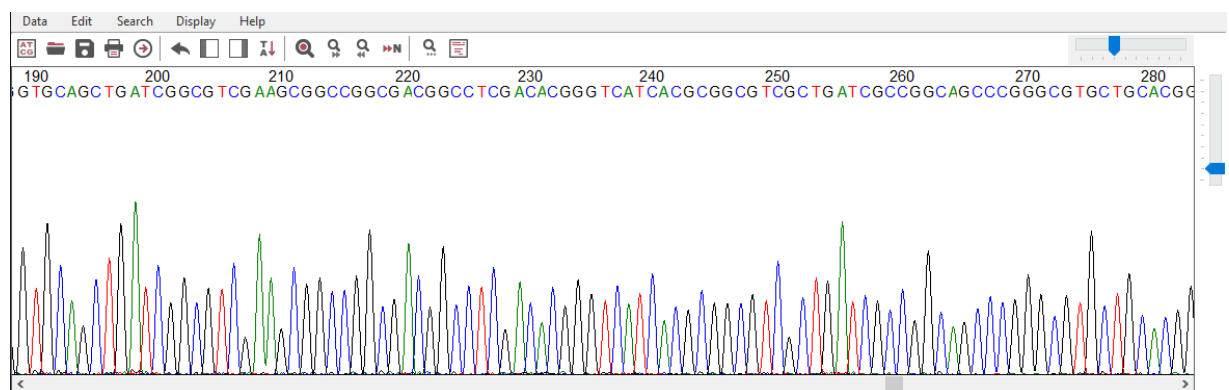


Figura 4. Representação da sequência de nucleotídeos observada no Software MEGA.

5. DISCUSSÃO

A hemodiálise é um tratamento essencial para a sobrevivência de muitos pacientes e envolve riscos quando o controle de qualidade da água não é eficiente (ROCHA, PINHO, 2018). Apesar de visar a purificação da água, o processo de osmose reversa ao remover os íons, remove também o cloro presente na água, eliminando um importante componente bactericida ou bacteriostático, podendo ocasionar o crescimento de vários micro-organismos.

Esse trabalho caracterizou fenotípica e molecularmente os isolados obtidos a partir de amostras de água e dialisato de uma Unidade de Hemodiálise, bem como os obtidos de hemoculturas de pacientes submetidos à essa terapia e que apresentavam bacteremia, em um período de três anos de duração do surto. Outros relatos de surtos por *Bcc* foram relatados em unidades de hemodiálise no Brasil (MAGALHÃES et al., 2003; ROCHA et al., 2021) e países como EUA, Paraguai, Espanha, Marrocos (OUMOKHTAR, 2013; MONTAÑO-REMACHA et al., 2015; ORTIZ, RIOS-GONZÁLEZ, 2014).

A capacidade de sobrevivência e proliferação de *Bcc* em ambientes aquáticos já foi relatada, bem como sua tolerância à amplas variações de temperatura (TAVARES et al., 2020). Com base nos resultados obtidos no ensaio de biofilme em microplaca de poliestireno, pode-se observar a ação positiva da temperatura ambiente (20°C) para uma maior produção de biofilme quando comparada aos testes à 35°C. A formação de biofilme em temperaturas menores já havia sido relatada por Nörner et al. (2011), em um estudo utilizando uma cepa de *B. cepacia* psicrotrófica, isolada de leite refrigerado e que apresentou baixa capacidade de formar biofilme à 4°C de incubação, porém formações mais robustas de biofilme foram observadas a 10°C e 25°C, aumentado de acordo com o aumento das temperaturas (NÖRNBERG et al., 2011).

Carson et al. (1973) já haviam relatado o padrão de crescimento de *B. cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) em temperaturas de 12°C a 45°C. Os pesquisadores identificaram a temperatura de 25°C como ponto de rendimento máximo da população bacteriana, quando comparado as outras temperaturas avaliadas. Ahn et al. (2014) apresentaram resultados coerentes ao demonstrar a persistência de cepas de *B. cenocepacia* em água destilada por 40 dias nas temperaturas de 18°C e 23°C. Apesar de os mecanismos envolvidos na sobrevivência dessas bactérias na água ainda não terem sido completamente elucidados, é relacionado à diversidade genética e nutricional da espécie quanto à metabolização de matéria orgânica, presente nos ambientes aquáticos oligotróficos (TAVARES et al., 2020). Essa maior taxa de multiplicação em temperaturas mais baixas pode explicar a maior produção de biofilme, uma vez que a mesma é controlada por *quorum sensing* (MALOTT et al., 2005).

A produção de biofilme garante resistência fisiológica aos antimicrobianos, desinfetantes e mecanismos de defesa do hospedeiro (TORBECK et al., 2011; SUPPIGER et al., 2013). Caraher et al. (2007) demonstraram as diferenças na ação de antimicrobianos em Bcc cultivadas planctônicamente e em biofilme, apontando a diminuição do efeito do meropenem e piperaciclina/tazobactam em biofilme, quando comparado ao crescimento planctônico. A presença do biofilme pode também interferir na ação dos desinfetantes utilizados para a desinfecção do aparelho e tubulações da hemodiálise, como o hipoclorito de sódio e ácido peracético (SANTOS et al., 2007). A pesquisa de Rocha et al. (2021) acompanhou um surto em hemodiálise por *B. cepacia* e *S. maltophilia* e mesmo após a intensificação do protocolo de desinfecção do sistema de água e substituição de dialisadores, houve a persistência desses micro-organismos. A troca do sistema de encanamento da unidade de hemodiálise, sustentada pela hipótese de formação de biofilmes das mesmas, foi a solução para a erradicação do surto no hospital público de Salvador, Brasil (ROCHA et al., 2021).

Bcc é descrito sendo intrinsecamente resistente a diferentes classes de antibióticos, como aminoglicosídeos, polimixinas e beta-lactâmicos (EL CHAKHTOURA et al., 2017; SARAN et al., 2018). A resistência apresentada por todos os isolados de hemocultura à colistina, gentamicina, imipenem e ampicilina/sulbactam é coerente com Mahenthiralingam et al. (2005), El Chakhtoura et al. (2017) e Saran et al. (2018), pois pertencem às classes de beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e polipeptídeos cíclicos. A literatura já relatou a sensibilidade de Bcc à ceftazidima, meropenem, levofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim, que foi predominantemente observada neste trabalho, já que houve apenas um isolado resistente à ceftazidima e dois outros, resistentes ao meropenem (EL CHAKHTOURA et al., 2017; SARAN et al., 2018; UWUMIRO et al., 2021). Atualmente o tratamento de pacientes com Bcc é dificultado pela multirresistência dessas bactérias (ROCHA et al, 2021). Para garantir a efetividade da terapia é feita uma combinação de diferentes fármacos, como meropenem, ampicilina e ceftazidima (TRIVEDI et al., 2015).

O sequenciamento do *recA* para identificação da espécie caracterizou o pulsotipo 1 do PFGE como um clone de *B. cepacia* (genomovar I) e essa bactéria é uma das mais comumente encontradas, causando infecções em pacientes internados (KENNA et al., 2017). O MLST desse isolado o identificou como *B. cepacia* ST-767, cepa previamente relatada em casos de surto por contaminação em luvas usada em banhos em pacientes, de uma unidade de terapia intensiva na Bélgica (PEETERS et al, 2020) e em uma clínica de cardiologia na Suíça (LO PRIORE et al, 2020).

A ausência do marcador de cepa virulenta (BCESM) *esmR* é coerente com o trabalho de Cunha et al. (2003), que identificaram esse marcador apenas em isolados do genomovar III, sendo todos os isolados do genomovar I negativos para a presença do gene. Segundo a literatura, a prevalência do BCESM ocorre em isolados de casos de fibrose cística, com ênfase em estirpes virulentas de *B. cenocepacia* (genomovar III) (BEVIVINO et al., 2002; BALDWIN et al., 2004; MARTINS et al., 2008), justificando a ausência desse gene nos isolados de água de hemodiálise e de hemocultura neste trabalho.

Martins et al. (2008) também observaram a ausência do gene *cblA* em todos os isolados. Apesar de pesquisas anteriores terem observado a presença desse gene em isolados do genomovar I (LIPUMA et al., 2001; SAJJAN et al., 2002; CUNHA et al., 2003), sua ausência nos isolados do atual trabalho é coerente, pois seu aparecimento está fortemente relacionado com *B. cenocepacia*, mais especificamente a cepa epidêmica ET12 (SAJJAN et al., 2002; TURTON et al., 2007).

São escassos os estudos que pesquisam os genes que codificam a produção das metaloproteases de zinco *ZmpA* e *ZmpB*, sendo Kooi et al. (2005, 2006 e 2009) os pesquisadores mais envolvidos com a investigação desses genes. Tratando-se de elementos que contribuem para patogênese, capazes até de influenciar na resistência aos peptídeos antimicrobianos envolvidos na imunidade inata, a constante presença dos genes observadas nesse trabalho reforça a necessidade de estudos que identifiquem *ZmpA* e *ZmpB* em isolados identificados em surtos hospitalares.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pelo PFGE, pode-se observar a persistência de um único pulsotipo na água e dialisato, ao longo do tempo, contaminando os pacientes submetidos à hemodiálise, à despeito da rotineira desinfecção da água com ácido peracético. Provavelmente, essa persistência ocorre devido à produção de biofilme, que protege as bactérias dos desinfetantes.

Tornando o cenário mais crítico, todos os isolados apresentaram não-suscetibilidade a pelo menos três classes de antibióticos, dificultando o tratamento dos pacientes. Ainda, a presença dos genes de virulência para metaloproteases de zinco (*ZmpA* e *ZmpB*) indicam a capacidade de evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro, aumentando a possibilidade de septicemia nos pacientes já imunocomprometidos.

7. REFERÊNCIAS

- AHN, Y.; KIM, J. M.; AHN, H.; *et al.* Evaluation of liquid and solid culture media for the recovery and enrichment of *Burkholderia cenocepacia* from distilled water. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1109–1118, 2014.
- ANVERSA, L.; ROMANI, C. D.; CARIA, E. S.; *et al.* Quality of dialysis water and dialysate in haemodialysis centres: Highlight for occurrence of non-fermenting gram-negative bacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 4, p. 3416–3429, 2022.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. 2004. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/rdc0154_15_06_2004_rep.html>.
- BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; THICKETT, K. M.; *et al.* Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4665–4673, 2005.
- BALDWIN, A.; SOKOL, P. A.; PARKHILL, J.; *et al.* The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1537–1547, 2004.
- BAZZINI, S.; UDINE, C.; RICCARDI, G. Molecular approaches to pathogenesis study of *Burkholderia cenocepacia*, an important cystic fibrosis opportunistic bacterium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 887–895, 2011.
- BEVIVINO, A. M.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 846–851, 2002.
- BUGNO, A.; ALMODÓVAR, A. P. B.; PEREIRA, T. C.; AURICCHIO, T. Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2: p. 72-175, São Paulo, 2007.
- BURKHOLDER, W. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-118, 1950.
- CARAHHER, E.; REYNOLDS, G.; MURPHY, P.; *et al.* Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 213–216, 2007.

CARSON, L. A.; FAVERO, M. S.; BOND, W. W.; *et al.* Morphological, Biochemical, and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 476–483, 1973.

CESARINI, S.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; *et al.* *recA* gene sequence and Multilocus Sequence Typing for species-level resolution of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 580–588, 2009.

CHANG, T.; CHUANG, Y.; WANG, J.; *et al.* Clinical characteristics and outcomes of non-cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex bacteremia at a medical center in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2021.

CLIMATE DATA. <https://pt.climate-data.org/americas-do-sul/brasil/sao-paulo/botucatu-4227/>. Acesso em 15/02/2023.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719–729, 2003.

COIMBRA, I. K. S.; HIGASKINO, C. E.; SANTOS, E. J. dos; YAMADA, M. P. A.; CORREA, Q. B. Qualidade da água de hemodiálise. Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR. P, 31. 2007.

CORREA-RUIZ, A.; GIRÓN, R.; BUENDÍA, B.; *et al.* *Burkholderia cepacia* complex infection in an Adult Cystic Fibrosis unit in Madrid. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 10, p. 649–654, 2013.

COULLIETTE, A. D.; ARDUINO, M. J. Hemodialysis and Water Quality. **Seminars in dialysis**, v. 26, n. 4, p. 427–438, 2013.

CUEVAS, J.P.; MORAGA, R.; SÁNCHEZ-ALONZO, K.; *et al.* Characterization of the bacterial biofilm communities present in reverse-osmosis water systems for haemodialysis. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. E1418, 2020.

CUNHA, M. V.; LEITÃO, J. H.; MAHENTHIRALINGAM, E.; *et al.* Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a portuguese cystic fibrosis center: a 7-Year Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4113–4120, 2003.

DOS SANTOS, B. O.; OLIVEIRA, V. A.; SOARES, M. C.; *et al.* Doença renal crônica: relação dos pacientes com a hemodiálise. **ABCS health sci**, p. 8–14, 2017.

EISEN, J. A. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of recAs and 16S rRNAs from the same species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 6, p. 1105–1123, 1995.

775 EL CHAKHTOURA, N. G; SAADE, E.; WILSON, B. M; *et al.* A 17-year nationwide study of
776 *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections among patients in the United States
777 Veterans Health Administration. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 8, p. 1327–1334, 2017.

778 GANESH, P. S.; VISHNUPRIYA, S.; VADIVELU, J.; *et al.* Intracellular survival and innate
779 immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-
780 controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. **Microbiology and Immunology**, v. 64,
781 n. 2, p. 87–98, 2019.

782 HOLMES, A.; NOLAN, R.; TAYLOR, R.; *et al.* An epidemic of *Burkholderia cepacia*
783 transmitted between patients with and without cystic fibrosis. **The Journal of Infectious**
784 **Diseases**, v. 179, n. 5, p. 1197–1205, 1999.

785 JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. J. Open-access bacterial population genomics:
786 BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open**
787 **Research**, v. 3, p. 124, 2018.

788 KARLIN, S.; WEINSTOCK, G. M.; BRENDDEL, V. Bacterial classifications derived from recA
789 protein sequence comparisons. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6881–6893, 1995.

790 KENNA, D. T. D; LILLEY, D.; COWARD, A.; *et al.* Prevalence of *Burkholderia* species,
791 including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis
792 patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 490–501, .

793 KOOI, C.; CORBETT, C. R.; SOKOL, P. A. Functional analysis of the *Burkholderia*
794 *cenocepacia* ZmpA metalloprotease. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 13, p. 4421–4429,
795 2005.

796 KOOI, C.; SOKOL, P. A. *Burkholderia cenocepacia* zinc metalloproteases influence resistance
797 to antimicrobial peptides. **Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 2818–2825, 2009.

798 LEITÃO, J. H.; SOUSA, S. A.; FERREIRA, A. S.; *et al.* Pathogenicity, virulence factors, and
799 strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species.
800 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 31–40, 2010.

801 LIMA, J. R. O.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; *et al.* Microbiological analyses of
802 water from hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of**
803 **Microbiology**, v. 36, n. 2, 2005.

804 LIPUMA, J. J.; SPILKER, T.; GILL, L. H.; *et al.* Disproportionate distribution of *Burkholderia*
805 *cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. **American Journal of**
806 **Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 1, p. 92–96, 2001.

807 LO PRIORE, E.; BERNASCONI, S.; SCHLOTTERBECK, H.; *et al.* *Burkholderia cepacia*
808 complex outbreak originating from contaminated wash gloves. **Infection Prevention in**
809 **Practice**, v. 2, n. 1, p. 100039, 2020.

810 LUGON JR, MATTOS JPS, WARRAK EA. Hemodiálise. In: Riella MC. Princípios de
811 nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos. 5 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2014, p.
812 681-1031.

813 MAGALHÃES, M.; DOHERTY, C.; GOVAN, J. R. W.; *et al.* Polyclonal outbreak of
814 *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. **The Journal of**
815 **Hospital Infection**, v. 54, n. 2, p. 120–123, 2003.

816 MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious,
817 multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 2,
818 p. 144–156, 2005.

819 MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**,
820 v. 60, p. 561–588, 2006.

821 MALOTT, R. J.; BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SOKOL, P. A.
822 Characterization of the cciIR *quorum-sensing* system in *Burkholderia cenocepacia*. **Infection**
823 **and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4982-92, 2005.

824 MARTINS, I. S.; PELLEGRINO, F. L. P. C.; FREITAS, A. d'A.; *et al.* Case-crossover study
825 of *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infection associated with contaminated
826 intravenous bromopride. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 5, p. 516–
827 521, 2010.

828 MARTINS, K. M. Avaliação microbiológica e epidemiológica de cepas do complexo
829 *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística. Mestrado em Pediatria,
830 Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

831 MARTINS, K. M.; FONGARO, G. F.; DUTRA RODRIGUES, A. B.; *et al.* Genomovar status,
832 virulence markers and genotyping of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from
833 Brazilian cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the**
834 **European Cystic Fibrosis Society**, v. 7, n. 4, p. 336–339, 2008.

835 MEDINA-PASCUAL, M. J.; VALDEZATE, S.; VILLALÓN, P.; *et al.* Identification,
836 molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of genomovars of the *Burkholderia*
837 *cepacia* complex in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**
838 **Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31,
839 n. 12, p. 3385–3396, 2012.

840 MONTAÑO-REMACHA, C.; MÁRQUEZ-CRUZ, M. D.; HIDALGO-GUZMÁN, Pilar; *et al.*
841 Brote de bacteriemia por *Burkholderia cepacia* en una unidad de hemodiálisis de Cádiz, 2014.
842 **Enferm. infecc. microbiol. clín. (Ed. impr.)**, p. 646–650, 2015.

843 NÖRNBERG, M. F. B. L.; MENTGES, M. L.; SILVEIRA, S. T.; *et al.* A psychrotrophic
844 *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity
845 and adhesion to stainless steel. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 3, p. 257–262, 2011.

846 OTOBONI, A. M. M. B. Estudo de exopolissacarídeos de bactérias fitopatôgenicas. Revista
847 Científica Eletrônica de Agronomia. n. 11. p. 7, 2007.

848 ORTIZ, A. R.; RIOS-GONZÁLEZ, C. M. Outbreak of *Burkholderia cepacia* in a hemodialysis
849 unit of Paraguay, 2014. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 5, p. 688–689, 2017.

850 OUMOKHTAR, B.; LALAMI, A. E. O.; MAHMOUD, M.; *et al.* Prevent infection linked to
851 the dialysis water in a hemodialysis center in Fez city (Morocco). **The Pan African Medical**
852 **Journal**, v. 16, p. 122, 2013.

853 PEETERS, C; ECHAHIDI, F; BEL, A De; *et al.* Polyclonal *Burkholderia cepacia* outbreak
854 originating from contaminated wash gloves. 2020. Disponível em:
855 [https://www.sciensano.be/sites/default/files/polyclonal_burkholderia_cepacia_outbreak_origi](https://www.sciensano.be/sites/default/files/polyclonal_burkholderia_cepacia_outbreak_originating_from_contaminated_wash_gloves_0.pdf)
856 [nating_from_contaminated_wash_gloves_0.pdf](https://www.sciensano.be/sites/default/files/polyclonal_burkholderia_cepacia_outbreak_originating_from_contaminated_wash_gloves_0.pdf). Acesso: 16/01/2023.

857 PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin,
858 meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic
859 and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. **Journal of Antimicrobial**
860 **Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 801–809, 2009.

861 RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; *et al.* Biofilm formation mechanisms and
862 targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512,
863 2015.

864 RADDAOUI, A.; BEN TANFOUS, F.; CHEBBI, Y.; *et al.* An intermittent outbreak of
865 *Burkholderia cepacia* contaminating hematopoietic stem cells resulting in infusate-related
866 blood stream infections. **Journal of Infection Prevention**, v. 23, n. 2, p. 75–78, 2022.

867 REINOSO E.B., EL-SAYED A., LAMMLER C., BOGNIA C., ZSCHOCK M. Genotyping
868 of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples
869 in Argentina. **Microbiological Research**. V. 163, p. 314-322, 2008.

870 RHODES, K. A.; SCHWEIZER, H. P. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. **Drug**
871 **Resistance Updates**, v. 28, p. 82–90, 2016.

ROCHA, R. P. F.; PINHO, D. L. M. Segurança do paciente em hemodiálise. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 12, n. 12, p. 3360–3367, 2018.

ROCHA, V. F. D.; CAVALCANTI, T. P.; AZEVEDO, J.; *et al.* Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* bloodstream infections at a hemodialysis center. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 3, p. 848–853, 2021.

ROSALES-REYES, R. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* type VI secretion system mediates escape of type II secreted proteins into the cytoplasm of infected macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–14, 2012.

SAALFELD, S. M. S.; SHINOHARA, D. R.; DOS ANJOS SZCZEREPA, M. M.; *et al.* Consecutive outbreaks of *Burkholderia cepacia* complex caused by intrinsically contaminated chlorhexidine mouthwashes. **American Journal of Infection Control**, v. 48, n. 11, p. 1348–1353, 2020.

SAJJAN, U.; LIU, L.; LU, A.; *et al.* Lack of cable pili expression by *cblA*-containing *Burkholderia cepacia* complex. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3477–3484.

SANTOS, F.; BERNAT, J. C.; SANTOS, A. M. G.; *et al.* Desinfecção de Máquinas de Hemodiálise com Ozônio. **J. Bras. Nefrol.**, v. 29, n. 1, p. 14–18, 2007.

SARAN, S.; AZIM, A.; GURJAR, M. Multidrug-resistant *Burkholderia cepacia* bacteremia in an immunocompetent adult diagnosed with dengue and scrub coinfection: A rare case report. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 8, n. 3, p. 173–175, 2018.

SCHOCH CL, *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.

SPIKER, T.; BALDWIN, A.; BUMFORD, A.; *et al.* Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607–2610, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Dia mundial do rim**. 2020. Disponível em: <<https://www.sbn.org.br/noticias/single/news/dia-mundial-do-rim/>>

SUPPIGER, A.; SCHMID, N.; AGUILAR, C.; *et al.* Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 400–409, 2013.

TAVARES, M.; KOZAK, M.; BALOLA, A.; *et al.* *Burkholderia cepacia* complex bacteria: a feared contamination risk in water-based pharmaceutical products. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. e00139-19, 2020.

TINTE, M. M.; STEENKAMP, P. A.; PIATER, L. A.; *et al.* Lipopolysaccharide perception in *Arabidopsis thaliana*: Diverse LPS chemotypes from *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas*

syringae and *Xanthomonas campestris* trigger differential defence-related perturbations in the metabolome. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 267–277, 2020.

TOMIC, M.; HERFST, C. A.; GOLDEN, J. W.; *et al.* Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1799–1806, 2002.

TOMIC, M.; MOHR, C. D. Adherence and autoaggregation phenotypes of a *Burkholderia cenocepacia* cable pilus mutant. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, n. 2, p. 287–297, 2003.

TORBECK, L.; RACCASI, D.; GUILFOYLE, D. E.; *et al.* *Burkholderia cepacia*: This decision Is overdue. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 65, n. 5, p. 535–543, 2011.

TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F. Microbiologia. 6a ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TRISTÃO, A. M. V. Qualidade da água nas clínicas de hemodiálise no estado de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2014. [Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

TRIVEDI, M. K. An Effect of Biofield Treatment on Multidrug-resistant *Burkholderia cepacia*: A multihost pathogen. **Journal of Tropical Diseases**, v. 03, n. 03, 2015.

TÜFEKCI, S.; ŞAFAK, B.; NALBANTOĞLU, B.; *et al.* *Burkholderia cepacia* complex bacteremia outbreaks among non-cystic fibrosis patients in the pediatric unit of a university hospital. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 63, n. 2, p. 218, 2021.

TURTON, J. F.; ARIF, N.; HENNESSY, D.; *et al.* Revised approach for identification of isolates within the *Burkholderia cepacia* complex and description of clinical isolates not assigned to any of the known genomovars. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3105–3108, 2007.

UWUMIRO, F.; EDIGIN, E.; OKPUJIE, V. Atypical *Burkholderia Cepacia* resistance to ceftazidime/avibactam and co-trimoxazole. **Cureus**, v. 13, n. 6, p. e15836.

VINION-DUBIEL, A. D.; GOLDBERG, J. B. Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 201–213, 2003.

WONG, M.; TSENG, Y.; HUANG, T.; *et al.* Comparison of Microbiological Characteristics and Genetic Diversity between *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from Vascular Access and Other Clinical Infections. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 51, 2020.

ZANINI, M. T. B.; MARAGNO, F.; ROSA, L.; *et al.* A hemólise no cotidiano dos pacientes renais crônicos. **Inova Saúde**, v. 1, n. 1, 2012.

936 ZLOSNIK, J. E. A.; HIRD, T. J.; FRAENKEL, M. C.; *et al.* Differential mucoid
937 exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of**
938 **Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1470–1473, 2008.

939 ZULKEFLI, N. J.; MARIAPPAN, V.; VELLASAMY, K. M.; *et al.* Molecular evidence of
940 *Burkholderia pseudomallei* genotypes based on geographical distribution. **PeerJ**, v. 4,
941 p. e1802, 2016.