



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MANUELA SOARES COUTO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS E
AMBIENTAIS DE *Burkholderia pseudomallei*, ORIUNDAS
DO ESTADO DO CEARÁ: ANÁLISE BASEADA NAS
REGIÕES 16S E 16S-23S DO DNA RIBOSSÔMICO
NUCLEAR**

FORTALEZA - CEARÁ

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS E
AMBIENTAIS DE *Burkholderia pseudomallei*, ORIUNDAS
DO ESTADO DO CEARÁ: ANÁLISE BASEADA NAS
REGIÕES 16S E 16S-23S DO DNA RIBOSSÔMICO
NUCLEAR**

Dissertação submetida ao Departamento de Medicina
Clínica da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira
Brilhante

Mestranda: Manuela Soares Couto

FORTALEZA-CEARÁ

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE
Burkholderia pseudomallei, ORIUNDAS DO ESTADO DO CEARÁ: ANÁLISE BASEADA
NAS REGIÕES 16S E 16S-23S DO DNA RIBOSSÔMICO NUCLEAR

MANUELA SOARES COUTO

Dissertação submetida ao Departamento de Medicina
Clínica da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Médicas.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Bioquímica

Profa. Dra. Nilce Maria Martinez-Rossi
Universidade de São Paulo – Programa de Pós-graduação em Genética

**“O importante não é progredir depressa, é não cessar
de ir sempre adiante”.**

Filósofo grego *Plutarco* de Querónia

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela oportunidade concedida e confiança depositada, por todos os ensinamentos, incentivos e participação efetiva na minha formação profissional.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Ciências médicas, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Aos professores do Centro Especializado em Micologia Médica, Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha e Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pelos seus préstimos, sugestões, informações técnicas e incentivos úteis para a vida profissional e para a confecção desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela paciência, orientações efetivas e pelos ensinamentos necessários para o alcance deste objetivo, que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Aos colegas de mestrado, do Centro Especializado em Micologia Médica e do Laboratório de Genética Molecular da UFC, pela convivência, incentivo, apoio e amizade durante todo o curso.

Aos funcionários do setor de microbiologia do Depto. de Patologia e Medicina Legal, Terezinha de Jesus Santos Rodrigues e Daniel Teixeira Lima, que de várias formas muito ajudaram, sempre com presteza e profissionalismo para a conclusão deste estudo.

À minha família, a minha gratidão por todo amor e apoio dedicados a mim, e por ter transformado momentos de trabalho tenso em colaboração e incentivos.

Ao meu grande companheiro, Diego Monte, pelas inúmeras vezes que pude contar com seu apoio, carinho e dedicação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de auxílio aos estudos, sem a qual este trabalho não seria possível.

RESUMO

A melioidose é uma doença potencialmente fatal causada pela bactéria *Burkholderia pseudomallei*, sendo considerada emergente no Brasil desde que os primeiros casos foram reportados em 2003, no Estado do Ceará. Este estudo pretendeu realizar a identificação molecular de 31 isolados de *B. pseudomallei* (cinco clínicos e 26 ambientais) mantidos na coleção de culturas do CEMM (Centro Especializado em Micologia Médica), com base nas sequências 16S e 16S-23S DNAr. O DNA destas amostras foi extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), quantificado por espectrofotometria e armazenado a 4°C. A amplificação de um fragmento de 302 pb da região espaçadora 16S-23S DNAr específico para *B. pseudomallei* foi realizada por meio de reação de PCR com os primers Bp1 e Bp4. O sequenciamento das regiões 16S e 16S-23S DNAr foi realizado pelo método da terminação da cadeia pelo didesoxinucleotídeo, usando-se o kit DYEnamic™ ET terminators cycle sequencing (GE Healthcare). A árvore filogenética da região 16S DNAr e as matrizes sequência identidade e contagem de diferenças baseadas na região 16S-23S DNAr foram geradas pelo programa MEGA4, versão 4.1. Os resultados confirmaram a identificação de 15 cepas de *B. pseudomallei* (cinco clínicas e dez ambientais), o que corresponde a 48.4% dos isolados em estudo. A árvore filogenética baseada na região 16S DNAr demonstra que os isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* do Estado do Ceará são evolutivamente agrupados com as cepas *B. pseudomallei* MSHR346 (Austrália), *B. pseudomallei* 1106a (Tailândia), *B. pseudomallei* K96243 (Tailândia), *B. pseudomallei* 1710b (Tailândia) e *B. pseudomallei* 668 (Austrália). Com a utilização do mesmo kit de extração também foi possível extrair DNA de *B. pseudomallei* diretamente de espécime clínico (lavado brônquico), confirmando um novo caso de melioidose no Município de Ubajara/CE. Em nosso estudo, o uso da PCR para a amplificação de um fragmento de 302 pb da região 16S-23S DNAr identificou corretamente *B. pseudomallei*, sendo que para confirmar a discriminação entre *B. pseudomallei* e *B. mallei*, o sequenciamento das regiões 16S e 16S-23S DNAr foi realizado. A técnica de PCR aliada ao sequenciamento das regiões 16S e 16S-23S do DNA ribossômico nuclear resultaram em uma elevada sensibilidade e especificidade de detecção de *B. pseudomallei* neste estudo.

Palavras chaves: *Burkholderia pseudomallei*, melioidose, PCR, sequenciamento das regiões 16S e 16S-23S DNAr, análise filogenética.

ABSTRACT

Melioidosis is a potentially fatal disease caused by the bacterium *Burkholderia pseudomallei*, considered emerging in Brazil since the first cases were reported in 2003, on State of Ceará. This study aimed to perform the molecular identification of 31 isolates of *B. pseudomallei* (26 clinical and 5 environmental) maintained in the culture collection of CEMM (Specialized Center for Medical Mycology), based on sequences 16S and 16S-23S rRNA. The DNA of these samples was extracted with the kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), quantified by spectrophotometry and stored at 4°C. The amplification of a fragment of 302 bp of 16S-23S rRNA specific to *B. pseudomallei* was performed by PCR reaction with primers Bp1 and Bp4. The sequencing of 16S and 16S-23S rRNA was performed by using of the kit DYEnamic™ ET terminators cycle sequencing (GE Healthcare). The phylogenetic tree of 16S rRNA and the sequence identity matrix and sequence difference count matrix based on the 16S-23S rRNA were generated by the program MEGA4, version 4.1. The results confirmed the identification of 15 strains of *B. pseudomallei* (5 clinical and 10 environmental), which represents 48.4% of the isolates analyzed in this study. The phylogenetic tree based on 16S rRNA shows that the clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei* of State of Ceará are evolutionarily clustered with the strains *B. pseudomallei* MSHR346 (Australia), *B. pseudomallei* 1106a (Thailand), *B. pseudomallei* K96243 (Thailand), *B. pseudomallei* 1710b (Thailand) and *B. pseudomallei* 668 (Australia). Using the same extraction kit was possible to extract DNA from *B. pseudomallei* directly from clinical specimen (bronchoalveolar lavage), confirming a new case of melioidosis in Ubajara/CE. In this study, the use of PCR for amplification of a fragment of 302 bp of 16S-23S rRNA identified correctly *B. pseudomallei*, and to confirm the discrimination between *B. pseudomallei* and *B. mallei*, the sequencing of the 16S and 16S-23S rRNA genes was performed. The technique of PCR coupled with sequencing of 16S and 16S-23S rRNA resulted in a high sensitivity and specificity of detection of *B. pseudomallei* in this study.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, PCR, sequencing of 16S e 16S-23S rRNA, phylogenetic analysis.

1. ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
LISTA DE ANEXOS	13
2. INTRODUÇÃO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Aspectos históricos	15
3.2 Epidemiologia	16
3.3 Ecologia	18
3.4 Aspectos microbiológicos	20
3.4.1 Morfologia	20
3.4.2 Metabolismo	21
3.4.3 Fatores de virulência	21
3.5 Aspectos clínicos	22
3.5.1 Fatores de risco	22
3.5.2 Manifestações clínicas	23
3.5.3 Formas de infecção e período de incubação	24
3.6 Diagnóstico laboratorial	25
3.6.1 Diagnóstico microbiológico clássico	25
3.6.2 Diagnóstico sorológico	26
3.6.3 Diagnóstico molecular	26
3.7 Taxonomia e filogenia do gênero <i>Burkholderia</i>	30
3.8 Perfil de sensibilidade antibacteriano e tratamento	31
4. PERGUNTA DE PARTIDA	33
5. HIPÓTESE	33
6. OBJETIVOS	34
6.1 Objetivo geral	34
6.2 Objetivos específicos	34
7. MATERIAL E MÉTODOS	35
7.1 Precauções de biossegurança	35
7.2 Micro-organismos	35
7.3 Extração de DNA genômico	36
7.3.1 Extração de DNA genômico com base em culturas de <i>B. pseudomallei</i>	36

7.3.2 Extração de DNA genômico de <i>B. pseudomallei</i> diretamente de espécime clínico	36
7.3.3 Verificação da presença e da integridade do DNA genômico	37
7.4 Identificação molecular de <i>B. pseudomallei</i> por PCR específica	37
7.5 Amplificação da região 16S DNAr	38
7.6 Amplificação da região 16S-23S DNAr	39
7.7 Sequenciamento de DNA	39
7.7.1 Sequências iniciadoras utilizadas e condições da reação de sequenciamento	39
7.7.2 Precipitação da placa de sequenciamento e análise das sequências	40
7.8 Montagem das sequências consenso, alinhamento múltiplo e edição das sequências	40
7.9 Análise filogenética	40
8. RESULTADOS	42
8.1 Recuperação dos isolados de <i>B. pseudomallei</i> da coleção de culturas do CEMM	42
8.2 Extração de DNA de <i>B. pseudomallei</i> com base em culturas e de lavado brônquico alveolar	42
8.3 Identificação molecular dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> por PCR específica	42
8.4 Confirmação da identificação molecular dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> pela análise das sequências da região 16S DNAr	44
8.5 Alinhamento múltiplo e análise filogenética da região 16S DNAr	45
8.6 Alinhamento múltiplo e análise da sequência 16S-23S DNAr	48
9. DISCUSSÃO	50
10. CONCLUSÕES	61
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
12. ANEXOS	78
13. PUBLICAÇÕES	95

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Mapa mundi mostrando a distribuição mundial da melioidose.	17
FIGURA 2 – Municípios com casos reportados de melioidose no Estado do Ceará.	18
FIGURA 3 – Ágar-sangue e Ágar-Ashdown mostrando colônias de <i>B. pseudomallei</i> .	20
FIGURA 4 – Desenho esquemático dos genes que compõem o DNA ribossômico nuclear de <i>B. pseudomallei</i> .	28
FIGURA 5 – Crescimento característico de <i>B. pseudomallei</i> em caldo BHI.	42
FIGURA 6 – Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando fragmento de 302 pb específico para <i>B. pseudomallei</i> .	43
FIGURA 7 – A história evolutiva da árvore filogenética baseada na região 16S DNAr foi inferida usando-se o método de máxima parcimônia.	47
FIGURA 8 – Matriz Sequência Identidade baseada na região 16S-23S do DNAr dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> oriundos do Estado do Ceará.	49
FIGURA 9 – Matriz Sequência Contagem de Diferenças baseada na região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> oriundos do Estado do Ceará.	49

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Origem dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> incluídas no estudo.	35
TABELA 2 – Sequências de iniciadores que amplificam fragmento de 302 pb da região 16S-23S DNAr específico para a identificação de <i>B. pseudomallei</i> .	37
TABELA 3 – Isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> confirmados por diagnóstico molecular.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC** – American Type Culture Collection
- BHI** – Brain Heart Infusion
- CDC** – Centers for Disease Control and Prevention
- CLED** – Cistina-Lactose-Eletrólito-Deficiente
- DNA** – Ácido Desoxiribonucleotídeo
- DNAr** – DNA ribossômico
- EMP** – Embden-Meyerhof-Parnas
- ELISA** – *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*
- ITS** – *Internal Transcribed Spacer*
- KIA** – *Kliger Iron Agar*
- LPS** – Síntese de polissacarídeo capsular
- MLST** – *Multilocus Sequencing Typing*
- NB3** – Nivel de Biossegurança 3
- OF** – Oxidação-Fermentação
- pb** – pares de bases
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PFGE** – Eletroforese de campo pulsátil
- pH** – Potencial Hidrogeniônico
- RAPD** – *Random Amplification of Polymorphic DNA*
- RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorfism*
- RT-PCR** – PCR Transcriptase Reversa
- SNP** – *Single Nucleotide Polymorfism*
- TBE** – Tris-Borato-EDTA
- TSI** – *Tríplice Sugar Iron*
- TTS3** – Sistema de secreção do tipo III
- VNRT** – *Variable Number Tandem Repeat*

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO I – Protocolo para extração de DNA genômico de bactérias gram-negativas.	79
ANEXO II – Protocolo para extração de DNA genômico de culturas de células.	80
ANEXO III – Protocolo para purificação de DNA (produtos de PCR).	81
ANEXO IV – Protocolo para precipitação de DNA em placa de sequenciamento.	81
ANEXO V – Alinhamento múltiplo das sequências da região 16S do DNA ribossômico nuclear dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> oriundos do Estado do Ceará.	82
ANEXO VI - Alinhamento múltiplo das sequências da região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear dos isolados clínicos e ambientais de <i>B. pseudomallei</i> oriundos do Estado do Ceará.	91

2. INTRODUÇÃO

A melioidose é uma doença endêmica no sudeste da Ásia e no norte da Austrália e também ocorre esporadicamente em outras partes do mundo. No Brasil, é considerada doença emergente desde os primeiros casos reportados na região Nordeste, sendo até então reportada exclusivamente no Estado do Ceará. Este estudo pretende comparar características moleculares de isolados clínicos e ambientais de *Burkholderia pseudomallei*, oriundos do Estado do Ceará, a fim de adicionar informações sobre a biologia deste micro-organismo. A padronização de protocolos para a identificação molecular de *B. pseudomallei* desde amostras clínicas e ambientais é de grande importância, visto que se poderá encontrar diferenças fenotípicas e genotípicas que podem interferir consideravelmente na sensibilidade das técnicas de detecção molecular. Convém ainda salientar que a extração de DNA diretamente de culturas de *B. pseudomallei* é bastante perigosa, sendo necessário o controle das medidas de biossegurança, além da presença de profissionais bem treinados e capacitados para tal função.

Estudos de epidemiologia molecular para o diagnóstico da melioidose têm levado a importantes progressos na observação da distribuição da doença e da confirmação do organismo em regiões endêmicas e emergentes. Desta forma, pretende-se avaliar a diversidade genética de cepas de *B. pseudomallei* de origens humana e ambiental, a fim de se determinar a presença de genótipos peculiares ao homem ou, ainda, a existência de “genótipos ecológicos”, pois só estes são capazes de sobreviver no solo, contaminando o homem e os animais. Assim, a utilização de técnicas moleculares para o diagnóstico da melioidose no Ceará, representará importante opção ao cultivo *in vitro* do micro-organismo, o qual está restrito a laboratórios de contenção biológica do nível 3, tornando possível a análise simultânea de um grande número de amostras clínicas e ambientais suspeitas do patógeno, bem como a melhor compreensão da ecologia deste micro-organismo na região Nordeste.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos históricos

A melioidose é uma doença potencialmente fatal que acomete seres humanos e animais. É causada pela bactéria *B. pseudomallei*, também conhecida como “Bacilo de Whitmore”. A doença foi primeiro descrita pelo capitão britânico Alfred Whitmore e por seu assistente Krishnaswami, no ano de 1912, que denominaram a bactéria causadora de *Bacillus pseudomallei*. O isolamento inicial foi feito em necrópsias de viciados em morfina e mendigos encontrados mortos nas ruas de Rangoon (atualmente Yangon) em Mianmar - antiga Birmânia (WHITMORE; KRISHNASWAMI, 1912; WHITMORE, 1913).

Em 1921, Stanton e Fletcher denominaram a doença de melioidose em razão das similaridades clínicas e anatomopatológicas com o mormo causado pela *Burkholderia mallei* (melioidose: em forma de mormo). Desde sua identificação, o agente etiológico recebeu várias denominações: *Pfeifferella whitmori*, *Pfeifferella pseudomallei*, *Malleomyces pseudomallei*, *Bacillus whitmori*, *Loefferella whitmori*, *Flavobacterium pseudomallei*, *Actinobacillus pseudomallei*, *Pseudomonas pseudomallei* e, mais recentemente, *Burkholderia pseudomallei* em homenagem ao microbiologista Walter Burkholder (STANTON; FLETCHER, 1921; YABUUCHI et al., 1992; WHITE, 2003).

A bactéria começou a ser melhor estudada com a descoberta de que era causadora da doença em sua forma pneumônica, em soldados dos Estados Unidos durante a guerra do Vietnã, em virtude da inalação de poeira levantada por helicópteros e, desde então, é referida como a “bomba do tempo vietnamita”, considerando-se que pode estar incubada nos veteranos da guerra e, em razão desta, de forma semelhante à tuberculose, pode ser reativada após permanecer latente por vários anos ou décadas (GOSHORN, 1987).

A bactéria é considerada potencial agente para guerra biológica e terrorismo biológico, apesar de não ter sido usada até então para esse propósito, estando incluída na categoria B de agentes críticos, publicada em 2001 pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Esta se encaixa em diversos requisitos necessários para um bom agente de guerra biológica como um bom potencial de aerossolização, alta infectividade, pequena quantidade do agente necessária para produzir efeito, boa estabilidade ambiental (micro-organismo telúrico), alta letalidade, é facilmente produzida em grandes quantidades e possui limitadas opções de prevenção e tratamento profilático (ROTZ et al., 2002; PERUSKI; PERUSKI JR., 2003; SEWELL, 2003; WHITE, 2003). Por conta disso, para manipulação de *B. pseudomallei*, são recomendadas medidas de contenção de biossegurança 3 quando existe potencial risco de aerossolização do patógeno por causa do elevado risco de infecção adquirida em laboratório (LEE et al., 2007).

3.2 Epidemiologia

A melioidose é uma doença que ocorre predominantemente em regiões tropicais, numa latitude de 20°N e 20°S da linha do equador. Embora o micro-organismo não esteja estritamente confinado à região equatorial, a probabilidade de adquirir melioidose fora dessa delimitação geográfica é muito baixa (DANCE, 2000b; ELLIS; TITBALL, 1999).

Sua localização abrange, principalmente, o sudeste da Ásia, com uma grande concentração de casos (Vietnã, Camboja, Laos, Mianmar [Burma], Malásia e Cingapura), com regiões hiperendêmicas no nordeste da Tailândia, aonde chega a constituir um verdadeiro problema de saúde pública, com estimativa de 2000 a 3000 novos casos por ano. A Austrália também é considerada um país hiperendêmico para a doença no tocante à sua região norte. Nesse país, cerca de 20% dos casos de septicemias são causados por *B. pseudomallei*, o que é uma situação bastante semelhante a que ocorre no nordeste da Tailândia. Estima-se, ainda, que a bactéria seja responsável por 39% dos óbitos por septicemia e 36% dos óbitos por pneumonia naquela região. Estudos realizados no sudeste da Índia também reforçam a evidência da presença de melioidose no Subcontinente indiano. A doença é reconhecida, ainda, na China, Taiwan, Filipinas, Sri Lanka, Bangladesh e Paquistão. Em outras partes do Globo, ocorrem também casos esporádicos, sendo descritos no Continente africano, em Madagascar, Nigéria, Chade, Burkina Faso, Costa do Marfim, Ilhas Maurítius e Ilhas Reunião. Recentemente, novos surtos também foram reportados na Nova Caledônia. Na Europa, há somente relatos de casos importados (DANCE, 1991, 2000b; VUDDHAKUL et al., 1999; CHENG; CURRIE, 2005; CURRIE et al., 2008).

Diversos eventos de melioidose ocorrem no hemisfério ocidental. Apesar de poucos casos e do escasso conhecimento acerca da prevalência deste micro-organismo em regiões tropicais das Américas, há boas evidências de que a melioidose pode ser endêmica na América do Sul e existem relatos de casos na América Central e América do Norte. Há ocorrências registradas no México, Panamá, Equador, El Salvador, Costa Rica, Porto Rico, Aruba, Guadalupe e Martinica. Nos Estados Unidos, em adição aos casos reportados em trabalhadores recém-chegados do sudeste da Ásia, a melioidose é reconhecida há algumas décadas por ocorrer esporadicamente nos Estados do Havaí e Geórgia. Dessa forma, diversos estudos mostram que a doença é considerada emergente em diversos países e que sua prevalência é ainda subestimada (**Fig. 1**) (DANCE, 1991, 2000b; BRAGA; ALMEIDA, 2005; CURRIE et al., 2008).

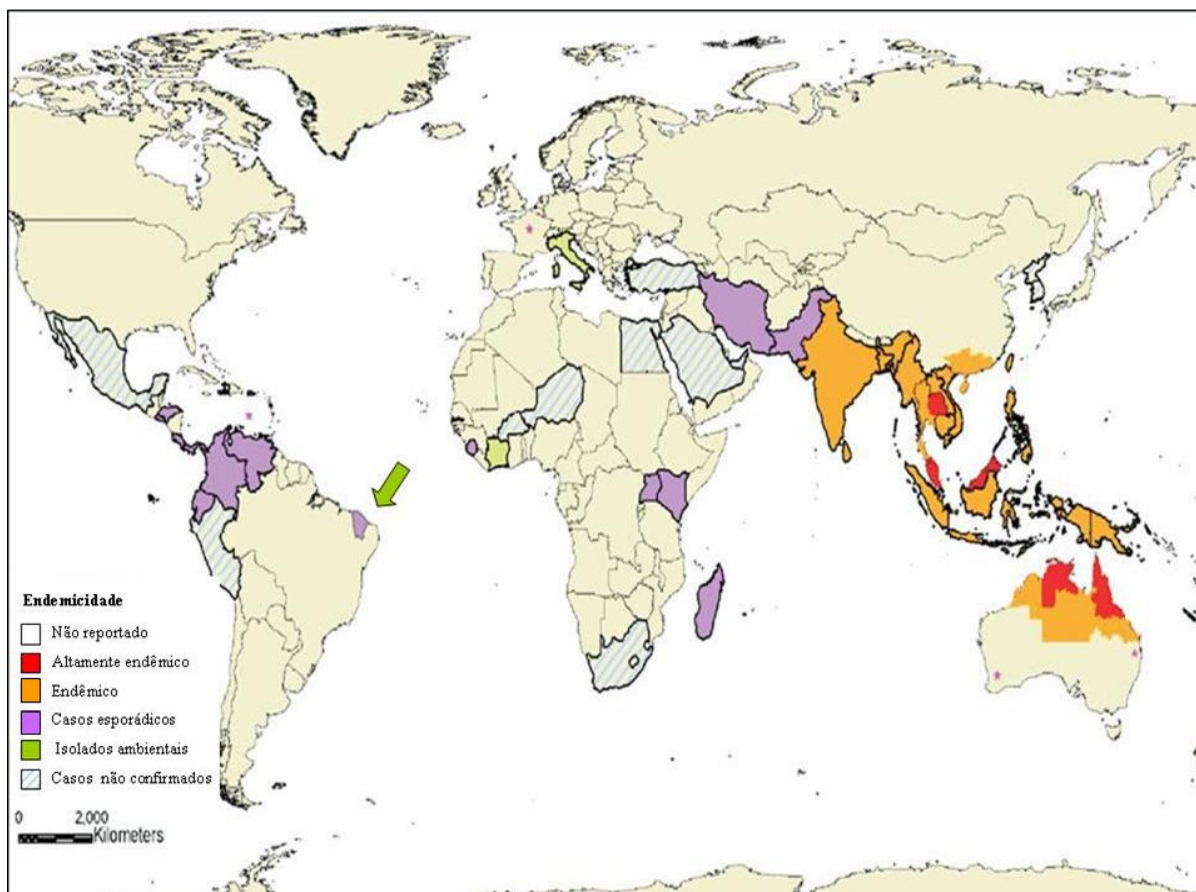


Figura 1. Mapa mundi mostrando a distribuição mundial da melioidose. Fonte: CURRIE et al., 2008, com modificações. A seta verde destaca o Estado do Ceará, que relatou em 2009 o isolamento de cepas ambientais.

No Brasil, a melioidose é uma doença emergente, pois somente em 2003 foi diagnosticada em humanos, sendo todos os casos confirmados da doença ocorridos no Estado do Ceará. Os primeiros relatos sucederam em março de 2003, no Município de Tejuçuoca, quando um surto acometeu quatro irmãos (ROLIM et al., 2005; ROLIM et al., 2009). Desde então, seis novos casos da doença foram diagnosticados, totalizando dez casos (nove fatais) de melioidose reportados no Estado do Ceará (AARDEMA et al., 2005; ROLIM et al., 2005; INGLIS et al., 2006; ROLIM, et al., 2009). A **Figura 2** ilustra os municípios onde há eventos relatados de melioidose no Brasil.



Figura 2. Municípios com casos reportados da melioidose no Estado do Ceará.

3.3 Ecologia

A melioidose apresenta estreita relação com o ambiente, pois a bactéria *B. pseudomallei* é um saprófita que vive livremente em solo e água, podendo ser encontrada na superfície de águas estagnadas, córregos e solos encharcados, como arrozais em áreas endêmicas (ROLIM et al., 2005). A ligação entre solo contaminado e a melioidose foi primeiramente descrita em 1955, quando, na Indochina francesa, um bacteriologista isolou *B. pseudomallei* em amostras de solo lamacento (INGLIS et al., 2001). Vários tipos de solo são relacionados com a presença de *B. pseudomallei*, e tanto a prática de atividades agrícolas, como o cultivo de arroz e distúrbios ambientais (como escavações e ciclones), são associados a casos de melioidose (CURRIE, 2008).

No Brasil, há referência de que a bactéria foi isolada por pesquisadores franceses em 1977, no solo de duas cidades do interior da Bahia (São Félix e Santo Antônio), embora não tenha sido possível conhecer detalhes de como foi feito esse isolamento. Há também relatos de tentativas frustradas de se isolar o micro-organismo da água em São Paulo (PESTANA DE CASTRO et al., 1973; GALLIMAND; DODIN, 1982; DANCE, 1991). Estudo ambiental realizado em duas áreas acometidas pela doença na região Nordeste do Brasil mostrou o isolamento ambiental da bactéria de solo nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú - Ceará,

sendo esta identificada por métodos fenotípicos (ROLIM et al., 2005; ROLIM et al., 2009). Outros estudos realizados na Tailândia, Austrália e Malásia demonstram a associação entre exposição ocupacional ou recreativa ao solo e a ocorrência da doença. Na Tailândia, é bem evidenciada a presença da *B. pseudomallei* em plantações de arroz. Os homens e os animais, portanto, a adquirem mediante exposição ambiental ao micro-organismo (INGLIS et al., 2001).

Em surto na Austrália ocidental, tanto *B. pseudomallei* quanto o parasita *Acanthamoeba* sp. foram isolados de fonte de água potável e do ambiente. Estudos subsequentes sugeriram que *B. pseudomallei* pode infectar trofozoítos de *Acanthamoeba* por fagocitose helicoidal, um processo descrito para outros patógenos, como *Legionella pneumophila* (INGLIS et al., 2000). A cloração dos reservatórios de água potável foi associada ao término de um desses surtos e pareceu ser efetiva contra *B. pseudomallei in vitro* (CHENG; CURRIE, 2005).

Há muitas variáveis que podem influenciar na distribuição do micro-organismo no solo, incluindo fatores climáticos, como temperatura, chuvas, luminosidade e composição do solo (física, química e biológica), sendo o período chuvoso, ou logo após as chuvas, comumente descrito como o preferido para a aquisição da doença em regiões endêmicas. A estação chuvosa pode estar associada a até 75% e 85% dos casos da doença na Tailândia e Austrália, respectivamente (DANCE, 2000a; INGLIS et al., 2001; CURRIE, 2003). Assim, a habilidade da *B. pseudomallei* de sobreviver no solo e água por períodos prolongados pode explicar a relevância do solo e da água na exposição à melioidose (ELLIS; TITBALL, 1999; DANCE, 2000a).

A quantidade de componentes orgânicos que podem ser usados pelo micro-organismo como fonte de energia e de carbono é excepcionalmente ampla, fazendo da *B. pseudomallei* um dos mais nutricionalmente versáteis membros do gênero *Burkholderia*. Dados mostram que, sob condições ótimas de temperatura, pH e umidade, o patógeno pode sobreviver no ambiente por até 726 dias e na superfície da água por 44 dias. Outros estudos relatam a habilidade de *B. pseudomallei* sobreviver em água bi-destilada por até três dias, sendo que pesquisas posteriores acentuam ainda a possibilidade de permanência de células viáveis por até 17 anos. A temperatura ótima para sobrevivência da bactéria situa-se entre 24-36°C, o pH entre 5.0-8.0 e a umidade de 40%. A 0°C ou menos, o micro-organismo é capaz de sobreviver somente por 18 dias. Este pode ser um motivo razoável para a distribuição predominante do patógeno em regiões tropicais e subtropicais (ELLIS; TITBALL, 1999; INGLIS et al., 2001; MOORE et al., 2008).

B. pseudomallei é um micro-organismo resiliente capaz de sobreviver em condições ambientais extremamente hostis, incluindo a prolongada deficiência de nutrientes, soluções antissépticas e detergentes, ambientes acidificados (pH 4.5 por até 70 dias) e desidratação (umidade do solo <10% por até 70 dias). Não é capaz, entretanto, de sobreviver à exposição à radiação UV. Provavelmente condições ambientais extremas podem conferir vantagens seletivas para o crescimento de *B. pseudomallei* (CHENG; CURRIE, 2005). Visto que *B. pseudomallei* é capaz de resistir a uma variedade de extremos ambientais, é interessante o fato de que não haja uma distribuição global mais aparente do micro-organismo (BRETT; WOODS, 2000).

3.4 Aspectos microbiológicos

3.4.1 Morfologia

B. pseudomallei é um bacilo Gram-negativo que mede 5 µm de comprimento e de 0,5 a 1,0 µm de largura, é móvel, levemente curvo e não formador de esporo. A bactéria exibe uma coloração bipolar característica e é vista isolada, aos pares ou, mais comumente, em cadeias (ASHDOWN, 1979; WALSH; WUTHIEKANUM, 1996).

Embora seja de fácil crescimento, frequentemente não é reconhecida por microbiologistas de áreas não endêmicas. Em espécimes com microbiota mista, *B. pseudomallei* pode ser inibida por comensais e conseqüentemente ter seu crescimento prejudicado, por isso, diversos meios para o isolamento seletivo são desenvolvidos para solucionar esse problema. A forma e a coloração do crescimento em meio sólido são altamente variáveis. A estrutura das colônias pode variar de rugosa a mucóide e a coloração de creme a laranja-claro, dependendo do meio de cultivo, por exemplo, em ágar-sangue e chocolate, as colônias assumem coloração creme, já em ágar-Ashdown e Mac Conkey estas se mostram púrpuras (**Fig. 3**). Independentemente do meio de crescimento, as colônias emitem um característico odor de “terra” (DANCE et al., 1989; VIRGÍNIO, 2005).

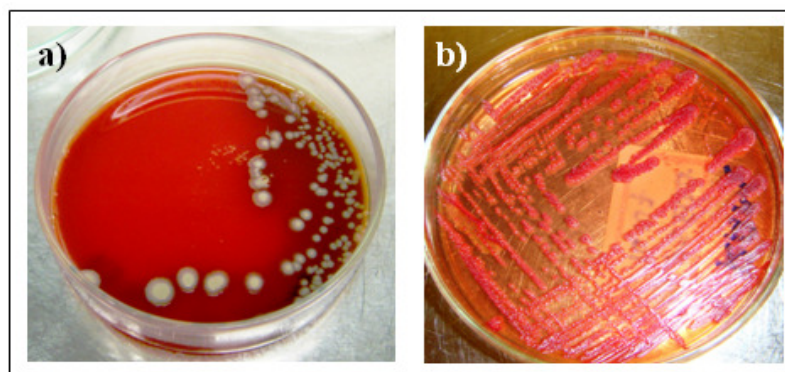


Figura 3. a) Ágar-sangue e b) Ágar-Ashdown mostrando colônias de *B. pseudomallei*.

3.4.2 Metabolismo

As espécies de *Burkholderia* são classificadas como não-fermentadoras de glicose e são aeróbias, ou seja, dependentes do O₂ comoceptor final de elétrons. A espécie *B. pseudomallei* possui, entretanto, a capacidade de crescer em meios contendo nitrato, pois utiliza o nitrato ou nitrito no lugar do O₂ comoceptor final de elétrons, podendo, assim, crescer anaerobicamente. Já a designação “não-fermentador” significa que esse gênero de bactérias não metaboliza carboidratos pela via da fermentação ou pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), também denominada via glicolítica ou anaeróbia (VIRGÍNIO, 2005).

Os principais testes para identificá-la dentro do grupo de não-fermentadores são: KIA (*Kliger Iron Agar*) ou TSI (*Triplice Sugar Iron Agar*), com visualização de pico e fundo alcalinos para *B. pseudomallei* em ambos os meios, além da utilização da glicose em meio Oxidação-Fermentação (OF), redução de nitrato e citocromo oxidase, tendo o micro-organismo perfil bioquímico positivo para os testes citados (KONEMAN et al., 2001).

Cepas que assimilam arabinose são denominadas *Burkholderia thailandensis*, sendo consideradas não virulentas (VUDDHAKUL et al., 1999; INGLIS et al., 2001). Isso acontece porque a capacidade de assimilar a aldopentose L-arabinose do ambiente (presente nesta espécie) inibe uma série de vias metabólicas essenciais à patogênese mediada pelo sistema de secreção de proteínas, além de impedir a transcrição do gene regulador do sistema de secreção do tipo III, presente em muitos micro-organismos patogênicos. A perda dessa via metabólica de “antivirulência” associada à aquisição de outros genes de virulência, podem ter tornado *B. pseudomallei* apta a sobreviver tanto como saprófita no solo quanto como patógeno no hospedeiro. Assim, *B. pseudomallei*, que não assimila oxidativamente a L-arabinose, é conhecidamente patogênica, sendo a não-capacidade de assimilar L-arabinose considerada um fator de virulência deste micro-organismo (SMITH et al., 1997; MOORE et al., 2004; WIERSINGA et al., 2006).

3.4.3 Fatores de virulência

O gênero *Burkholderia* contém mais de 40 espécies, cujos membros reconhecidos como patogênicos são *B. pseudomallei*, *B. mallei* e em certas condições clínicas, como patógeno oportunista em indivíduos com fibrose cística, *B. cepacia*. O gênero também inclui a espécie *B. thailandensis*, que coexiste com *B. pseudomallei* no solo da Tailândia mas raramente causa a melioidose, sendo 10⁵ vezes menos virulenta do que *B. pseudomallei* em hamsters ou roedores. *B. mallei*, conhecida por causar o mormo em animais (principalmente

em cavalos), é potencialmente virulenta para humanos, porém a ocorrência da doença em outro hospedeiro é bastante rara. (WIERSINGA et al., 2006; SCHONMANN et al., 2009).

B. pseudomallei é um micro-organismo capaz de se adaptar a condições bastante adversas. É resistente ao complemento, enzimas lisossomais e peptídeos catiônicos e produz diversos fatores de virulência, como proteases, lipase, lecitinase, catalase, peroxidase, superóxido dismutase, hemolisinas, endotoxinas, exotoxinas e um sideróforo para aquisição de ferro do hospedeiro, que contribui para a sua sobrevivência e manutenção (ASHDOWN; KOEHLER, 1990; WINSTANLEY; HART, 2000; CHENG; CURRIE, 2005).

Diversos estudos demonstram que a virulência de *B. pseudomallei in vivo* está relacionada com características do micro-organismo, com notável variabilidade intraespecífica de cada cepa. A fração capsular da bactéria tem pronunciado efeito supressor, assegurando a proteção de células microbianas encapsuladas no hospedeiro, tornando-se dessa forma um importante fator de virulência. Diversas funções são sugeridas para a cápsula de polissacarídeos: prevenção da dessecação para transmissão e sobrevivência bacteriana, aderência para colonização, resistência à fagocitose e morte mediada pelo sistema complemento e resistência à imunidade específica do hospedeiro em razão da pobre resposta de anticorpos dirigida à cápsula (RECKSEIDLER et al., 2001).

Além da síntese de polissacarídeo capsular (LPS) e da presença da cápsula, outros fatores de virulência já determinados nesta espécie, como o sistema de secreção tipo III, a ausência do *operon* para assimilação de L-arabinose, a presença de flagelos, além da capacidade de induzir fagocitose por meio de rearranjos nas moléculas de actina e miosina do hospedeiro, são descritos como os principais elementos associados à virulência do patógeno (PILATZ et al., 2006; WIERSINGA et al., 2006; YU et al., 2006).

Ainda assim, diferenças na virulência de *B. pseudomallei* recuperadas do ambiente ainda precisam ser elucidadas, apesar de já terem sido relatadas associações clonais entre isolados ambientais, humanos e animais de *B. pseudomallei* em regiões de surto de melioidose (CURRIE, 2008).

3.5 Aspectos clínicos

3.5.1 Fatores de risco

Aparentemente, *B. pseudomallei* não afeta indivíduos saudáveis, sendo comum a associação da melioidose com outras doenças preexistentes, particularmente *Diabetes mellitus*, insuficiência renal, doenças pulmonares crônicas, insuficiência cardíaca crônica, leucemia, linfoma e outras patologias causadoras de imunodeficiência, neoplasmas e feridas penetrantes. Outros fatores de risco associados são alcoolismo e uso de imunossupressores,

sendo a natureza precisa da predisposição para a doença em indivíduos com disfunção imune ainda pouco estudada. As condições de base descritas há pouco levam a diversas deficiências do sistema imune, incluindo deficiências na fagocitose, diminuição da resposta humoral e celular e redução da produção de citocinas (SUPUTTAMONGKOL et al., 1999; DANCE, 2000b; SHORT, 2002; RAJA, 2008). Grupos de risco incluem fazendeiros, trabalhadores do campo, grupos indígenas e viajantes aventureiros (INGLIS et al., 2006).

3.5.2 Manifestações clínicas

Quando humanos e animais entram em contato com a *B. pseudomallei*, uma série de eventos é possível de ocorrer, incluindo: nenhum efeito, soroconversão assintomática e ainda doença clínica aparente. O progresso da infecção vai provavelmente ser determinado pelo inóculo, pela virulência da cepa e pela susceptibilidade do hospedeiro. Cada caso de melioidose é o resultado de um dos três possíveis processos: infecção primária, reinfecção ou reativação da doença latente (DANCE, 2000b).

A melioidose em humanos possui amplo espectro clínico, que varia desde infecção assintomática ou inaparente, bacteremia transitória, infecção localizada supurativa aguda ou crônica, infecção crônica latente, infiltração pulmonar assintomática, até formas graves com pneumonia fulminante e sepse (SUPRAPOM et al., 2007). A pneumonia é a apresentação clínica mais comum em áreas endêmicas, podendo manifestar-se com febre alta, cefaleia, mialgia generalizada e dor torácica, associada ou não a tosse seca ou produtiva. Este acometimento pulmonar manifesta-se desde um quadro de bronquite até pneumonia necrotizante severa. Pneumonia cavitária acompanhada de perda de peso é frequentemente confundida com tuberculose. Infecções localizadas podem ocorrer com formação de abscessos em diversos sítios, como pele, tecido subcutâneo, próstata, articulações, linfonodos, cérebro, pulmões, fígado e baço. Septicemia é outra forma severa da doença e pode manifestar-se com febre, cefaleia severa, diarreia, desorientação, insuficiência respiratória e choque séptico. Na Tailândia é comum parotidite em crianças. Dos casos relatados na Austrália, os quadros clínicos predominantes são as manifestações geniturinária e neurológica. Uma característica importante é a recorrência, que pode acontecer em meses ou mesmo anos após infecção aguda inicial (WHITE, 2003; PEACOCK et al., 2008).

Além do homem, a doença pode acometer uma variedade de animais domésticos e selvagens, tendo sido descrita em primatas, camelos, cães, gatos, golfinhos, cavalos, ovinos, suínos e caprinos, cangurus, pandas, coalas, aves e roedores. De acordo com Sprague e Neubauer (2004), animais de sangue frio são resistentes à *B. pseudomallei*, mas ressaltam que já foram observados casos em crocodilos, cobras e peixes (MOLLARET, 1988;

CHAOWAGUL et al., 1989; LEELARASAMEE et al., 1989; CHOY et al., 2000). Em animais, os sintomas podem variar conforme a espécie afetada e podem mimetizar outras doenças. A doença pode se manifestar desde a forma aguda à crônica, e infecções subclínicas são comuns. A sintomatologia é bastante semelhante à observada em humanos com a presença de abscessos singulares ou múltiplos, que podem estar localizados em diversos órgãos. Aparentemente, os mais afetados são pulmões, fígado e baço. Também podem ocorrer sintomas neurológicos, cujas lesões são predominantemente microscópicas com a presença de microabscessos ou infiltração linfocítica e mastites, principalmente em caprinos. Algumas medidas de saúde pública a fim de evitar a propagação da doença incluem pasteurização do leite e condenação de carcaças e órgãos contaminados em abatedouros (CHOY et al., 2000).

3.5.3 Formas de infecção e período de incubação

A literatura relata três rotas principais de infecção por *B. pseudomallei*: inalação, ingestão e inoculação (CHENG; CURRIE, 2005). A infecção humana ocorre após exposição ao solo e água contaminados por inalação e/ou aspiração de partículas de poeira ou gotículas de água, por inoculação em pele não íntegra e mucosas e por ingestão (CHENG; CURRIE, 2005). Casos graves de melioidose em regiões endêmicas também estão associados com episódios de afogamento. Postula-se a ideia de que, em graves fenômenos meteorológicos, tais como tempestades tropicais, ciclones e tufões, há maior facilidade para inalação de *B. pseudomallei* (CURRIE, 2008). Casos de transmissão sexual entre humanos e transmissão vertical também são relatados (Mc CORMICK, et al., 1975; LUMBIGANON et al., 1988; HALDER et al., 1993; ABBINK et al., 2001; RALPH et al., 2004).

A possibilidade de vetores envolvidos na transmissão está restrita a estudos experimentais. A transmissão via artrópode não ocorre naturalmente, mas, experimentalmente, a doença pode ser transmitida pela pulga do rato e pelo mosquito *Aedes aegypti* (DANCE, 2000b).

Artigos relatam que a principal rota de infecção em animais é a ingestão de alimentos contaminados (STANTON; FLETCHER, 1932). Não há, porém, evidência de transmissão do animal para o homem (DANCE, 2000a).

A propensão de aerossolização de *B. pseudomallei* sob diferentes condições ambientais e climáticas e a frequência com que esta é responsável pela doença exige uma avaliação mais aprofundada. Dessa forma, a existência de um conjunto de contribuições para a infecção, como dose infectante, modo de infecção e as diferenças na virulência das cepas, reflete o quanto ainda há para se descobrir sobre *B. pseudomallei* e melioidose (CURRIE, 2008).

O período de incubação é variável, sendo que, nos casos agudos, o período geralmente é curto. Estudos mostram que o período de incubação pode variar de um a 21 dias, apresentando média de nove dias (STEVENS; GALYOV, 2004). A infecção também pode ser recorrente ou permanecer latente por vários anos, já tendo sido descrita manifestação da doença 62 anos após a contaminação (NGAUY et al., 2005).

3.6 Diagnóstico laboratorial

3.6.1 Diagnóstico microbiológico clássico

As técnicas mais usadas, ainda hoje, para detecção de *B. pseudomallei* em amostras clínicas e ambientais envolvem o isolamento e caracterização da bactéria. Assim, o método padrão-ouro para o diagnóstico de *B. pseudomallei* é o microbiológico e o método de escolha para o diagnóstico definitivo da doença é a cultura, que pode ser realizada por meio de amostras de sangue, escarro, urina, secreção purulenta ou qualquer outro espécime apropriado. O diagnóstico é feito mediante a identificação e observação de características das colônias em meios de cultivo e por intermédio de provas bioquímicas manuais (KIA, TSI, utilização da glicose em meio OF, redução de nitrato e citocromo oxidase) e sistemas semiautomatizados (API 20E, API 20NE e Vitek 1), mais práticos para identificação (DANCE et al., 1989; LOWE, et al., 2002).

Para o diagnóstico laboratorial, entretanto, limitada experiência com este micro-organismo pode resultar em identificação incorreta. Dificuldades práticas para o diagnóstico laboratorial da melioidose incluem a presença de espécies estreitamente relacionadas com espécies de *Burkholderia* em espécimes clínicos não estéreis e morfologia atípica de colônias de algumas cepas *B. pseudomallei*. Apesar das recomendações claras para o rastreamento de colônias suspeitas de *B. pseudomallei*, existe uma grande variação nas abordagens utilizadas pelos laboratórios de diagnóstico (INGLIS et al., 2005).

Para o isolamento e identificação, podem ser usados meios de rotina, como ágar-sangue, chocolate, CLED e Mac Conkey. O desenvolvimento de meios seletivos, como o Ashdown em forma de ágar ou caldo, oferecem maior capacidade de seleção do micro-organismo, pois contém gentamicina e cristal violeta, dois agentes seletivos e vermelho neutro que é incorporado às colônias em crescimento, conferindo a tonalidade púrpura característica das colônias neste meio (ASHDOWN, 1979; WUTHIEKANUM et al., 2001).

Em relação à capacidade de assimilação de carboidratos em meio OF, para a assimilação de arabinose, dá-se preferência ao uso de meio saís mínimo contendo 0,2% de L-arabinose, sendo este considerado mais confiável do que o meio OF, tendo sido preconizado e empregado por diversos autores (WUTHIEKANUM et al., 1996).

Também podem ser usados *kits* comerciais para a identificação de bactérias Gram-negativas não-fermentadoras. Após uma série de estudos questionando a viabilidade da utilização dos sistemas semiautomatizados, muito centros começaram a utilizar o API 20NE (BioMeri  x) para a identificação de *B. pseudomallei*, por conta da sua praticidade, rapidez e maior confiabilidade nos índices de acerto de identificação em comparação aos métodos semi-automatizados similares (DEEPAK et al., 2008). Esses sistemas apresentam, contudo, elevados índices de identificações err neas, sendo para algumas espécies considerados bastante insatisfatórios (INGLIS et al., 2005).

3.6.2 Diagnóstico sorológico

Diversos testes sorológicos são desenvolvidos para a detec o de anticorpos de *B. pseudomallei*, entre estes, o teste de hemaglutina o indireta, ensaio de imunofluorescência e ensaio imunoenzimático, ELISA. Estes, entretanto, não são totalmente confiáveis haja vista a possibilidade de rea o es cruzadas com outros micro-organismos. Outro ponto discutível   que cerca de 20% de resultados sorológicos se mostram negativos no início da doença e ainda podem apresentar elevada incidência de soroconversão na popula o de regiões endêmicas da melioidose. Com o aumento das viagens internacionais, a melioidose tem ocorrido em áreas onde normalmente não   endêmica, casos em que o diagnóstico sorológico pode ter papel relevante (SERMSWAN et al., 2000; SIRISINHA et al., 2000; CHENG; CURRIE, 2005).

3.6.3 Diagnóstico molecular

Estudos de Epidemiologia molecular para o diagnóstico da melioidose conduzem a importantes progressos na observa o da distribui o da doença e da confirma o do organismo e do biótipo casual em regiões endêmicas. Assim, os métodos baseados na tecnologia molecular estão sendo continuamente aplicados na detec o de *B. pseudomallei* em espécimes clínicos e ambientais em virtude do uso potencial de métodos rápidos que garantem sensibilidade e especificidade de detec o (LEW; DESMARCHELIER, 1994; TYLER et al., 1995; GEE et al., 2003).

O genoma de *B. pseudomallei* foi sequenciado recentemente, e este   relativamente grande em compara o com outros genomas procariontes t picos: 7,24 Mb dividido entre dois cromossomos, um com 4,07 Mb e o ou outro, considerado um megaplasm dio, com 3,17 Mb tendo o genoma dessa bactéria um conteúdo de G+C de 68% (HOLDEN et al., 2004). O cromossomo maior possui genes associados a fun o es essenciais como crescimento celular e metabolismo, e o cromossomo menor possui em sua maioria genes com fun o es acessórias associadas a adapta o e sobrevivência em variados ambientes (WIERSINGA et al., 2006).

Recentemente, foi demonstrada a existência de 16 ilhas genômicas que podem estar presentes em ambos os cromossomos e que juntas representam cerca de 6,1% do genoma desse micro-organismo, influenciando, desta forma, a virulência diferenciada dos isolados de *B. pseudomallei* (VESARATCHAVEST et al., 2006).

A tipagem molecular de *B. pseudomallei* foi desenvolvida a fim de promover a diferenciação de isolados ambientais, humanos e animais, mediante a utilização de inúmeras técnicas, como as de ribotipagem (LEW; DESMARCHELIER et al., 1993; LEW; DESMARCHELIER, 1994; SEXTON et al., 1993; TRAKULSOMBOON et al., 1997; VADIVELU et al., 1997), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD (HAASE et al., 1995; LEELAYUWAT et al., 2000), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição – RFLP (SERMSWAN et al., 1994; TUNGPRADABKUL et al., 1999; O’CARROLL et al., 2003; TANPIBOONSAK et al., 2004) e eletroforese de campo pulsátil - PFGE (TRAKULSOMBOON et al., 1994; CHANTRATITA et al., 2006).

Esses métodos de tipagem possuem elevado índice discriminatório para a identificação de isolados de *B. pseudomallei* e provaram ser úteis para estudos epidemiológicos. Apesar disso, entretanto, possuem grande variação no poder discriminatório e, geralmente, ensejam múltiplos padrões que podem ser de interpretação difícil (WONGRATANACHEEWIN, et al. 2000).

Já com relação aos métodos moleculares baseados na amplificação de sequências de nucleotídeos, estes demonstram impacto significativo na detecção e identificação de micro-organismos no campo do diagnóstico microbiológico, sendo cada vez mais utilizados em laboratórios clínicos para confirmar a identificação de bactérias de importância médica (TYLER et al., 1995; MERRITT et al., 2006). Dessa forma, diversas variações da reação em cadeia da polimerase (PCR) são desenvolvidas para amplificar diferentes alvos em *B. pseudomallei* (GAL et al., 2005).

As técnicas de PCR descritas para detecção de *B. pseudomallei* em espécimes clínicos e ambientais possuem como alvo os genes da região 16S do DNA ribossômico nuclear (DNAr), 23S DNAr, região intergênica 16S-23S DNAr (também denominada de ITS - *internal transcribed spacer*), o gene flagelina C (*flicC*), o gene da subunidade protéica ribossomal 21S (*rspU*), o gene da síntese de lipopolissacarídeos tipo do II (LPS), um SNP (*single nucleotide polymorfism*) em um suposto gene antibióticorresistente (denominado P27) e também os genes que codificam o sistema de secreção do tipo III em *B. pseudomallei* (chamados de *orf2*, *orf11*, *orf13* e *SCU2*) (GAL et al., 2005; SUPRAPOM et al., 2007).

O primeiro trabalho utilizando PCR para diagnóstico de *B. pseudomallei* foi publicado em 1994 e utilizou como alvo uma porção conservada da região 23S DNAr (LEW;

DESMARCHELIER, 1994). Posteriormente, Bauernfeind et al. (1998) também utilizaram sequências da região 23S DNAr para a diferenciação molecular entre *B. pseudomallei* e *B. mallei*. Kunakorn et al. (1995) reportaram pela primeira vez uma reação do tipo PCR *nested* para a identificação de *B. pseudomallei* a partir da região 16S-23S DNAr que até hoje é amplamente utilizada por diversos pesquisadores (INGLIS et al., 2005, MERRITT et al., 2006). Depois disso, Dharakul et al. (1996) descreveram uma PCR *nested* que amplifica parte do gene 16S DNAr altamente específica para detecção de *B. pseudomallei* (HAASE et al., 1998; KUNAKORN et al., 2000; GEE et al., 2003).

Dessa forma, o diagnóstico com o uso de iniciadores de oligonucleotídeos permite a utilização de uma variedade de sequências de ácidos nucléicos, sendo a atenção focada para as regiões 16S-23S, 16S e 23S do DNA ribossômico nuclear. Essas regiões são cada vez mais utilizadas como alvos na identificação e detecção molecular de grupos taxonômicos em razão da sua natureza altamente conservada (LEW; DESMARCHELIER, 1994; TYLER et al., 1995; DHARAKUL et al., 1996; HAASE et al., 1998; KUNAKORN et al., 2000; GEE et al., 2003; INGLIS et al., 2005; MERRITT et al., 2006) (Fig. 4).

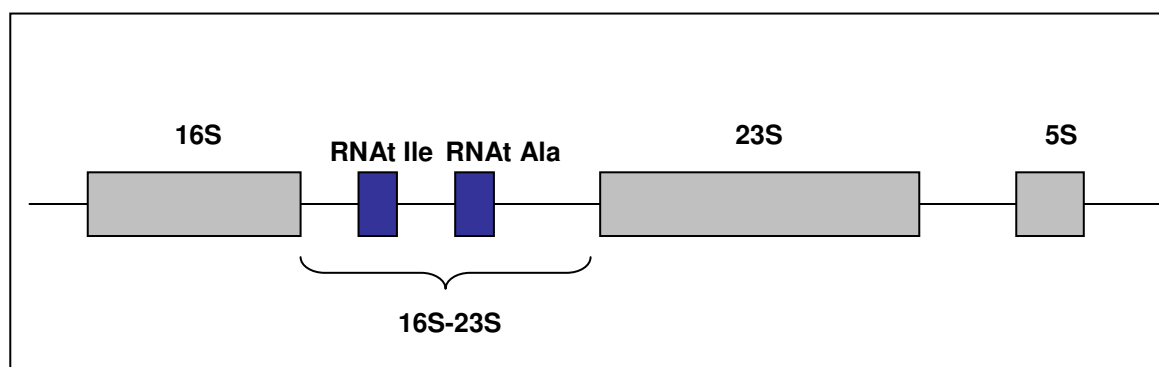


Figura 4. Desenho esquemático dos genes que compõem o DNA ribossômico nuclear de *B. pseudomallei*.

Winstanley et al. (1999) introduziram as pesquisas sobre os genes responsáveis pelo sistema de secreção do tipo III (TTS3), provavelmente transferidos horizontalmente entre diferentes micro-organismos e associados a uma ilha de patogenicidade em *B. pseudomallei*. Em outro trabalho publicado em 2000, esses pesquisadores apresentaram um estudo baseado na detecção de um só *locus* pela utilização da técnica de PCR, relatando uma ligação entre a presença de genes do sistema de secreção do tipo III e o fenótipo arabinose negativo e associando este alvo à virulência de *B. pseudomallei*. Em 2002, quando então reconhecida a espécie *B. thailandensis* (que assimila arabinose), Raibow et al. confirmaram que os genes do TTS3 estão presentes apenas em *B. pseudomallei* e *B. mallei*, e, com a utilização da técnica

PCR transcriptase reversa (RT-PCR), indicam que os genes TTS3 são expressos a 37°C, concluindo assim que esse sistema de secreção está intrinsecamente relacionado à virulência e à patogenicidade desses micro-organismos.

Thibault et al., em 2004, utilizaram a técnica de PCR em tempo real (que utiliza iniciadores marcados com sondas fluorescentes com emissão detectada por um *software* computacional) para pesquisar a especificidade de três genes do TTS3 (*orf11*, *orf13* e *SCU2*) em diferentes espécies bacterianas patogênicas e confirmam que o gene *orf11* é encontrado exclusivamente em *B. pseudomallei*, estando ausente de *B. thailandensis* e *B. mallei*.

Por via da técnica de PCR em tempo real, outros alvos foram reportados para a detecção molecular de *B. pseudomallei*. Tomaso et al. (2005) estabeleceram a técnica de PCR em tempo real, usando hibridização com sondas fluorescentes para os genes DNAr 16S, flagelina C (*fliC*) e o gene da subunidade protéica ribossomal 21S (*rspU*), asseverando que o uso destas regiões pela PCR em tempo real permite a rápida identificação de *B. pseudomallei* diretamente de amostras clínicas e de colônias suspeitas. Também pela técnica de PCR em tempo real, U'ren et al. (2005) identificaram um poderoso marcador filogenético para tipagem molecular de *B. pseudomallei*. Trata-se de um SNP (polimorfismo em nucleotídeo único) em um gene de resistência a antibióticos (denominado P27) capaz de diferenciar *B. pseudomallei* e *B. mallei* de uma diversidade de grupos geneticamente distintos em todo o mundo. Assim, de acordo com U'ren et al. (2007), a análise molecular da diversidade genética de isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* revela em várias escalas geográficas e temporais que esse micro-organismo apresenta diversidade genética substancial. Portanto, a técnica de PCR em tempo real demonstra maiores vantagens quanto à sensibilidade, rapidez e facilidade de uso em relação à técnica de PCR convencional, sendo por conta disso cada vez mais utilizada por diversos autores para detecção molecular de *B. pseudomallei* (YAP et al., 2002; THIBAUT et al., 2004; TOMASO et al., 2005; U'REN et al., 2005; MEUMANN et al., 2006; NOVAK et al., 2006; SUPAPROM et al., 2007).

Atualmente, se confere também grande ênfase no desenvolvimento nas técnicas de microarranjos (*microarrays*) de DNA e de proteínas (DIETRICH, 2003; SCHWEITER et al., 2003; SCHMOOCK et al. 2009), sendo que a tecnologia de *microarrays* de polissacarídeos já é utilizada como um novo enfoque para o diagnóstico de infecções bacterianas (PARTHASARATHY et al., 2006). Para *B. pseudomallei*, já estão sendo realizados estudos para detecção de anticorpos de cápsula e análise da resposta do hospedeiro à imunização em modelos animais e comparação de expressão gênica diferencial em animais e *in vitro* (ONG et al., 2004; ULLET et al., 2005; PARTHASARATHY et al., 2006; TUANYOK, et al., 2006).

Nos últimos anos, o desenvolvimento das técnicas de PCR, da purificação de produtos de PCR e do sequenciamento automatizado de DNA reduz drasticamente o tempo necessário para obtenção de sequências de DNA de excelente qualidade. A convergência dessas técnicas associada aos avanços dos *softwares* computacionais, revolucionaram a aplicação da análise de genes conservados para a identificação bacteriana (GEE et al., 2003).

Além dos métodos moleculares que visam à identificação/detecção de *B. pseudomallei*, recentemente, os avanços das técnicas de tipagem molecular, como as técnicas de *multilocus sequencing typing* - MLST (GODOY et al., 2003; McCOMBIE et al., 2006; VESARATCHAVEST et al., 2006; WATTIAU et al., 2007) e números variáveis de repetições em tandem - VNTR (LIU et al., 2002, PEARSON et al., 2007; YEN et al., 2009) são úteis na discriminação de isolados estreitamente relacionados, no esclarecimento de perguntas epidemiológicas e nos estudos de genotipagem que enfocam, principalmente, virulência e patogenicidade.

3.7 Taxonomia e filogenia do gênero *Burkholderia*

Em 1992, Yabuuchi e colaboradores propuseram a mudança taxonômica de algumas espécies do gênero *Pseudomonas* spp. para o gênero *Burkholderia* spp., tendo como argumentos as sequências do DNA ribossômico 16S, os valores de homologia DNA-DNA, a composição dos ácidos graxos e lipídios celulares, além de características fenotípicas. Dessa forma, o gênero *Burkholderia* foi criado com suporte na subdivisão do gênero *Pseudomonas*, pertencendo de acordo com a nova classificação ao grupo RNA ribossômico do tipo II, juntamente com o gênero *Ralstonia* (YABUUCHI et al., 1992; TAYEB et al., 2008).

B. pseudomallei é uma espécie heterogênea com extensa diversidade no *loci* RNAr. Dois desses ribotipos são predominantes na natureza, onde existem evidências da associação geográfica de um destes com a prevalência em países asiáticos, enquanto o outro ribotipo é mais amplamente distribuído (TYRONE et al., 2000).

O alvo molecular mais utilizado para a realização de análises filogenéticas de micro-organismos é a região 16S DNAr, sendo essa nova ordem taxonômica baseada principalmente nas sequências do gene que compõe essa região (TAYEB et al., 2008; SCHONMANN et al., 2009). O sequenciamento da região 16S DNAr contribui amplamente para a identificação e detecção de um grupo taxonômico em razão da presença de várias cópias no genoma de procariontes, além da sua elevada conservação em espécies estreitamente relacionadas. Portanto, o critério mais utilizado para estimar relações filogenéticas entre bactérias é a homologia entre sequências 16S DNAr (LEE et al., 2007).

Os principais métodos estatísticos utilizados em filogenia incluem a máxima parcimônia, máxima verossimilhança, *neighbour-joining* e mais recentemente, a inferência bayesiana. Todos esses métodos dependem de modelos matemáticos que descrevem a evolução de características observadas nas espécies e são ordinariamente utilizados em filogenia molecular, nos quais as características são sequências alinhadas de nucleotídeos ou aminoácidos (HOLDER; LEWIS, 2003).

Atualmente, dados moleculares, como sequências de DNA e de proteínas, são utilizados na elaboração de árvores filogenéticas, sendo que a aplicação de métodos estatísticos, aliada aos avanços dos *softwares* computacionais tornam possível o melhor entendimento da composição de populações genéticas de espécies de *Burkholderia* sp. (COENYE; VAMDAMME, 2006; LEE et al., 2007).

3.8 Perfil de sensibilidade antibacteriano e tratamento

A bactéria *B. pseudomallei* apresenta resistência intrínseca a uma série de antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, bem como a primeira e a segunda geração de cefalosporinas, penicilinas, colistina e rifamicinas, mas é, usualmente, sensível à amoxicilina-cluvanato, cloranfenicol, doxiciclina, sulfametoxazol-trimetropim, ureido-penicilinas, ceftazidima e carbapenem. A relativa resistência a quinolonas e macrolídeos limita as opções terapêuticas para o tratamento da melioidose. Dessa forma, as drogas comumente utilizadas em infecções comunitárias não têm ação contra a infecção (JENNEY et al., 2001; WHITE, 2003; RAJA, 2008).

A estratégia terapêutica é desenvolvida em duas fases distintas, cujos alvos são respectivamente a resolução clínica da infecção aguda e erradicação da infecção intracelular, a fim de prevenir recaídas. O regime terapêutico ideal deve iniciar eliminando imediatamente tanto bactérias extracelulares como intracelulares, inibindo a liberação de polissacarídeos e outros mediadores exógenos e, conseqüentemente, corrigindo a coagulopatia e a injúria endotelial (INGLIS et al., 2001; LEELARASAME, 2004).

O tratamento adequado é essencial, pois a doença pode apresentar letalidade superior a 80% em casos graves. Vários estudos foram realizados a fim de pesquisar a sensibilidade de *B. pseudomallei* a vários antibióticos. Dessa forma, sabe-se que *B. pseudomallei* é sensível ao imipenem e ao meropenem e, mais recentemente, à ceftazidima, piperacilina, amoxicilina-cluvanato, ceftriaxona, entre outros. Nos últimos 20 anos, estudos em novos tratamentos para melioidose reduziram a mortalidade de 80% para aproximadamente 40% (CHENG; CURRIE, 2005; RAJA, 2008).

B. pseudomallei não só é resistente à terapia com muitos antibióticos, mas clinicamente falha em responder às drogas às quais é susceptível *in vitro*. Observa-se que a resistência a muitos β -lactâmicos é crescente. O sequenciamento do genoma de *B. pseudomallei* revelou a presença de genes de β -lactamase de classe A, C e D, portanto, a terapêutica deve ser realizada em base em testes de sensibilidade (LEELARAMASE, 2004).

Mais recentemente, a atenção é focada para o papel dos biofilmes na proteção da bactéria contra a ação dos antibióticos. Combinações de antibióticos contra *B. pseudomallei* em biofilmes mostram-se efetivas, como: ciprofloxacina-claritromicina, ciprofloxacina-azitromicina e imipenem-azitromicina. A relevância clínica desses tratamentos, contudo, ainda não é bem conhecida (CHENG; CURRIE, 2005).

Atualmente as drogas de eleição para o tratamento são ceftazidima ou carbapenem por duas semanas, seguindo-se terapia de manutenção com amoxicilina-cluvanato ou uma combinação de sulfametoxazol-trimetropim e doxiciclina por dez a 18 semanas, dependendo da severidade e do número de sintomas. O uso de doxiciclina e cloranfenicol pode ser mantido em associação a terapia oral por tempo prolongado (de três a seis meses), para diminuir o risco de recidivas (INGLIS et al., 2006). Resistência adquirida à doxiciclina é observada quando esse antibiótico é usado isoladamente na terapia (CHENG; CURRIE, 2005).

Em resumo, a identificação correta do micro-organismo, a avaliação da gravidade da doença e a realização de teste de sensibilidade a antimicrobianos são parâmetros de crucial importância no desenvolvimento de uma estratégia terapêutica efetiva (BRETT; WOODS, 2000).

4. PERGUNTA DE PARTIDA

- Existe diversidade genética baseada nas regiões 16S-23S e 16S do DNA ribossômico nuclear entre as cepas clínicas e ambientais de *B. pseudomallei* isoladas no Estado do Ceará?

5. HIPÓTESE CONSIDERADA

- A identificação molecular dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei*, oriundos do Estado do Ceará possibilitará a confirmação do diagnóstico da melioidose nesta região. Dessa forma, o estudo apresenta grande importância pois cada vez mais são relatados casos da doença no Ceará. Além disso, a análise genética das regiões 16S-23S e 16S do DNA ribossômico nuclear tornará possível melhor caracterização dos isolados de *B. pseudomallei* no Estado que, em estudos futuros, podem mostrar relação com parâmetros evolutivos importantes, tais como a presença de genótipos peculiares ao homem, ou ainda a existência de “genótipos ecológicos” únicos, capazes de sobreviver no solo, contaminando o homem e os animais.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

- Contribuir para a obtenção de *fingerprinting* genômicos de isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará, que sejam úteis para o estudo da diversidade genética da bactéria nessa região.

6.2 Objetivos específicos

- Padronizar protocolos para extração de DNA genômico de *B. pseudomallei*, com base em culturas do micro-organismo e espécimes clínicos de pacientes com suspeita de melioidose;
- confirmar a identidade molecular dos isolados de *B. pseudomallei* mantidos na coleção de culturas do Centro Especializado em Micologia Médica da Faculdade de Medicina da UFC, por meio de reação de PCR específica;
- analisar a diversidade genética dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* por meio do sequenciamento das regiões 16S-23S e 16S do DNA ribossômico nuclear.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Precauções de biossegurança

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação laboratorial das cepas clínicas e ambientais foram realizados em capela de fluxo laminar II/B, em medidas de contenção de biossegurança 3, conforme o preconizado para *B. pseudomallei* (PEACOCK et al., 2008).

Todo material o gerado no NB-3, proveniente do cultivo de *B. pseudomallei* era inicialmente descartado em formol (P.A.) e, após 24h a 48h autoclavado a 121°C por 30 minutos para completa e eficiente inativação do micro-organismo.

7.2 Micro-organismos

Foram utilizados 31 isolados de *B. pseudomallei* (cinco humanos e 26 ambientais) da coleção de culturas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) – Faculdade de Medicina da UFC - que estavam estocadas em meio mínimo a 25°C. Todos os isolados são oriundos de casos clínicos ou de amostras ambientais de solo coletadas no Estado do Ceará (Tab. 1).

Tabela 1. Origem dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* incluídos no estudo.

ISOLADOS	ORIGEM
CEMM 03-06-033	Clínica – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-034	Clínica – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-035	Clínica – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-036	Clínica – cultura – Ibiapaba/CE
CEMM 03-06-037	Clínica – cultura – Granja/CE
CEMM LBA4	Clínica - lavado brônquico alveolar – Ibiapaba/CE
CEMM 03-06-039	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-040	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-041	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-042	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-043	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-044	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 05-01-041	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-045	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-046	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-047	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 03-06-048	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 153	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1318	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1332	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1335	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1341	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1342	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1344	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1419	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 1517	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE
CEMM 252	Ambiental – cultura – Banabuiú/CE
CEMM 225	Ambiental – cultura – Banabuiú/CE
CEMM 05-01-039	Ambiental – cultura – Banabuiú/CE
CEMM 05-01-040	Ambiental – cultura – Banabuiú/CE
CEMM 2428	Ambiental – cultura – Banabuiú/CE
CEMM EXT3	Ambiental – cultura – Tejuçuoca/CE

Antes da estocagem, os isolados haviam sido identificados por meio de bateria de provas bioquímicas-padrão e identificados fenotipicamente de acordo com os critérios descritos para bacilos Gram-negativos não-fermentadores. Os isolados de *B. pseudomallei* também foram submetidos à prova de produção de oxidase e ao teste de sensibilidade a colistina (10 µg/mL) com a difusão em disco em ágar-Mueller-Hinton. Os isolados apresentaram perfil oxidase positivo e foram resistentes a colistina. O diagnóstico de *B. pseudomallei* foi, então, confirmado pelo sistema semiautomatizado API 20NE (BioMérieux, França) (INGLIS et al., 2004).

7.3 Extração de DNA genômico

7.3.1 Extração de DNA genômico com base em culturas de *B. pseudomallei*

O DNA genômico foi extraído pela utilização do sistema comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações no volume do inóculo e da enzima RNase utilizados no protocolo de extração.

Para o procedimento, os 31 isolados de *B. pseudomallei* estocados foram inicialmente cultivados em ágar-sangue a 37°C por 48h. Feito isso, apenas uma única colônia foi então repicada para caldo BHI e incubada a 37°C por 24h, tendo sido feita a coloração de Gram para checar a pureza dos cultivos.

O protocolo do *kit* para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas encontra-se descrito no **Anexo I**. Alíquotas de DNA obtidas após o primeiro tratamento com o tampão de lise foram incubadas em caldo BHI a 37°C por sete dias. A ausência de qualquer crescimento garantiu a segurança do procedimento. Após o término desta etapa, as amostras de DNA genômico foram estocadas a 4°C.

7.3.2 Extração de DNA genômico de *B. pseudomallei* diretamente de espécime clínico

O DNA genômico foi extraído pela utilização do sistema comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações no volume do espécime clínico e da enzima RNase utilizados no protocolo de extração.

O protocolo do *kit* para extração de DNA genômico de culturas de células foi o utilizado para a extração de DNA de *B. pseudomallei*, diretamente de uma amostra de lavado brônquico de um paciente com suspeita de melioidose e encontra-se descrito no **Anexo II**. Também foi extraído DNA de duas amostras de lavado brônquico de pacientes sem suspeita

da doença, que foram utilizados como controle negativo na realização de PCR específica para identificação molecular de *B. pseudomallei* diretamente de espécime clínico. Assim como na extração de DNA genômico de culturas de *B. pseudomallei*, alíquotas de DNA obtidas após o primeiro tratamento com o tampão de lise foram incubadas em caldo BHI a 37°C por sete dias. A ausência de qualquer crescimento garantiu a segurança do procedimento. Ao término desta etapa, as amostras de DNA genômico foram estocadas a 4°C.

7.3.3 Verificação da presença e da integridade do DNA genômico

Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio, com o objetivo de verificar a presença e a integridade do DNA extraído. A corrida foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 100 V por 50 minutos. Após corrida eletroforética, a presença de DNA resultante foi visualizada sob luz UV e registrada em máquina digital, para que posteriormente fosse avaliado o resultado do procedimento. A concentração e a pureza do DNA nas amostras foram determinadas pela mensuração da densidade óptica a 260 nm e 280 nm usando o espectrofotômetro *Ultrospec 1100 pro* (GE Healthcare, Reino Unido).

7.4 Identificação molecular de *B. pseudomallei* por PCR específica

A identificação molecular dos isolados clínicos e ambientais em estudo foi realizada por meio da PCR proposta por Merritt et al. (2006), com pequenas modificações na concentração e no volume dos reagentes. Para tanto, neste estudo, foi utilizado um par de iniciadores com 18 bases (Invitrogen, USA) que amplifica um fragmento de 302 pb da região 16S-23S específico para *B. pseudomallei*. As sequências dos iniciadores utilizados são mostradas na **Tabela 2** e foram utilizadas anteriormente por Merritt et al. (2006).

Tabela 2. Sequências de iniciadores que amplificam fragmento de 302 pb da região 16S-23S DNAr específico para a identificação de *B. pseudomallei*.

Iniciador	Posições	Fita	Sequências (5'→3')
Bp1	397-415	<i>Senso</i>	CGATGATCGTTGGCGCTT
Bp4	680-662	<i>Antisenso</i>	CGTTGTGCCGTATTCCAAT

A reação foi realizada com um volume final de 25 µL, contendo 10 µL de amostra de DNA (na concentração 30 ng/µL), 2,5 µL de tampão de reação 10X (New England Biolabs, Reino Unido), 1 mmol/L de MgCl₂ (Invitrogen, USA), 50 pmol de cada iniciador Bp1 e Bp4,

10 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA polimerase (New England Biolabs, Reino Unido).

A amplificação de DNA bacteriano foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA). No começo, seguiu-se uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, e 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Após os 45 ciclos, seguia-se um passo de extensão a 72°C por sete minutos. Após a amplificação, o produto foi armazenado a -20°C até a realização de corrida eletroforética. A visualização dos produtos amplificados pela PCR foi realizada em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio e visualizada por transluminador UV. A corrida foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 100 V por 50 minutos.

7.5 Amplificação da região 16S do DNAr

Todas as etapas de amplificação e sequenciamento das regiões 16S-23S e 16S DNAr, com respectiva análise das sequências, foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

A região completa do DNA ribossomal 16S (16S DNAr) foi amplificada *in vitro* por PCR usando os iniciadores 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1525R (AAGGAGGTGATCCAGCC), gerando *amplicons* de aproximadamente 1500 pb.

A PCR para amplificação da região 16S DNAr (feita em quadruplicata para cada amostra) foi realizada com um volume final de 25 µL, contendo 1 µL de DNA (na concentração 200 ng/µL), 5 µL de tampão de reação 5X (*Green GoTaq Buffer*, Promega, USA), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 50 pmol de cada iniciador 27F e 1525R, 10 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA polimerase (*GoTaq DNA polimerase*, Promega, USA).

A amplificação da região 16S DNAr foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA). Inicialmente, seguia-se uma etapa preliminar de desnaturação a 95°C por 2 minutos, anelamento a 62°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida de 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após os 33 ciclos, seguia-se um passo de extensão a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, o produto foi armazenado a -20°C até a realização da corrida eletroforética.

Os produtos da PCR para amplificação da região 16S DNAr foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, sendo as amostras purificadas com o kit *GFX™ PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, Reino

Unido) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O protocolo de purificação do *kit* é descrito no **Anexo III**.

Feito isso, as amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro pela mensuração da densidade óptica a 260 nm e então diluídas em água deionizada estéril para a concentração de 30 ng/ μ L.

7.6 Amplificação da região 16S-23S do DNAr

A região completa do DNA ribossomal 16S-23S (16S-23S DNAr) foi amplificada *in vitro* por PCR usando os iniciadores 16S1400F (CCCGTCACACCATGGGAG) e 23S90R (ATCGCCAAGGCATCCACC), gerando *amplicons* de aproximadamente 600 pb.

A PCR para a amplificação da região 16S-23S DNAr (feita em quadruplicata para cada amostra) foi realizada com um volume final de 25 μ L, contendo 2 μ L de DNA (na concentração 100 ng/ μ L), 5 μ L de tampão de reação 5X (*Green GoTaq Buffer*, Promega, USA), 1,5 mmol/L de $MgCl_2$, 50 pmol de cada iniciador 16S1400F e 23S90R, 10 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo e 1 U de *Taq* DNA polimerase (*GoTaq DNA polimerase*, Promega, USA).

A amplificação da região 16S-23S DNAr foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA). Inicialmente, seguia-se uma fase preliminar de desnaturação a 95°C por 2 minutos, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguida de 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 33 ciclos, seguia-se um passo de extensão a 72°C por 8 minutos e 30 segundos. Após a amplificação, o produto foi armazenado a -20°C até a corrida eletroforética.

Os produtos da PCR para amplificação da região 16S-23S foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, sendo as amostras purificadas com o *kit GFXTM PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, Reino Unido), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

Feito isso, as amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro pela mensuração da densidade óptica a 260 nm e então diluídas em água deionizada estéril para a concentração de 12 ng/ μ L.

7.7 Sequenciamento de DNA

7.7.1 Sequências iniciadoras utilizadas e condições da reação de sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados e diluídos em água ultrapura estéril foram submetidos a reações de sequenciamento de 10 μ L, pelo método da terminação da cadeia pelo

didesoxinucleotídeo (SAMBROOK et al., 1989), usando-se o *kit DYEnamic™ ET terminators cycle sequencing* (GE Healthcare, Reino Unido).

Os dois iniciadores usados para amplificação da região 16S DNAr também foram usados nas reações de sequenciamento, além de outros dois iniciadores, 782R (ACCAGGGTATCTAATCCTGT) e 1100R (AGGGTTGCGCTCGTTG). Já para o sequenciamento da região 16S-23S DNAr foram utilizados somente os dois iniciadores já descritos para a amplificar essa região (16S1400F e 23S90R).

A reação de sequenciamento foi realizada com um volume final de 10 µL por poço da placa, sendo 5 µL de DNA purificado diluído, 1 µL de um só iniciador e 4 µL de pré-mix de reação fornecido pelo *kit*. Para cada amostra de DNA sequenciada, a reação para cada iniciador foi realizada em quadruplicata na placa de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA) em 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

7.7.2 Precipitação da placa de sequenciamento e análise das sequências

Ao término da reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados de acordo com protocolo descrito no **Anexo IV**, para a remoção de sais e componentes do *kit* não incorporados e então analisados em um sequenciador *MegaBACE 1000* (Amersham Biosciences, USA).

7.8 Montagem das sequências consenso, alinhamento múltiplo e edição das sequências

As sequências de DNA foram analisadas em relação à qualidade e montadas com o auxílio do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GRENN, 1998; GORDON et al., 1998). Sequências de alta qualidade (phred > 20) foram comparadas com as sequências correspondentes depositadas no GenBank, por meio do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências com maior similaridade foram alinhadas usando-se o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1997). As edições dos alinhamentos foram realizadas manualmente, com o auxílio do programa Bioedit, versão 5.0.9. (HALL, 1999).

7.9 Análise filogenética

Para analisar a relação genética dos isolados clínicos e ambientais em estudo com outras cepas conhecidas, análises filogenéticas (distância, máxima parcimônia e máxima

verossimilhança) foram realizadas usando-se o programa MEGA4 – Molecular Evolutionary Genetic Analysis, versão 4.1 (TAMURA et al., 2007).

8. RESULTADOS

8.1 Recuperação dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* da coleção de culturas do CEMM

Para realizar a da identificação molecular das amostras de origem humana e ambiental de *B. pseudomallei*, os isolados foram inicialmente semeados em ágar-sangue e, após crescimento, uma só colônia de cada isolado foi repicada em caldo BHI (5 mL). Após 24h de incubação, já se podia observar turvação indicadora de crescimento e uma película esbranquiçada e sem brilho na superfície do meio de cultivo das 31 amostras (**Fig. 5**).



Figura 5. Crescimento de *B. pseudomallei* em caldo BHI.

8.2 Extração de DNA de *B. pseudomallei*, com base em culturas e lavado brônquico alveolar

A extração de DNA pela utilização do *kit* comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, EUA) foi bem-sucedida para as 31 amostras clínicas e ambientais de *B. pseudomallei*, bem como para a amostra de lavado brônquico alveolar de paciente com suspeita de melioidose, sendo que, para todas as amostras, foram obtidas ótimas concentrações de DNA (acima de 150 ng/ μ L).

8.3 Identificação molecular dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* por PCR específica

A identificação molecular foi realizada pela amplificação de um fragmento de 302 pb da região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear específico para *B. pseudomallei* (**Fig. 6**)

(MERRITT et al., 2006). Das 31 cepas identificadas por testes fenotípicos e bioquímicos (inclusive pelo sistema semiautomatizado API 20NE) como *B. pseudomallei*, apenas 15 foram confirmadas como tal: os cinco isolados de origem humana e apenas dez dos 26 isolados de procedência ambiental, o que corresponde a um total de 48.4% das amostras com diagnóstico confirmado pelo método molecular. Todas as amostras de origem clínica foram identificadas como *B. pseudomallei*, o que corresponde a 100% de confirmação da identificação. Quando, porém, se consideram apenas as amostras ambientais, esse número cai para somente 38.4%, ou seja, 16 das 26 amostras ambientais (61.6%) foram falsopositivas para *B. pseudomallei* pela identificação por métodos fenotípicos. Dessa forma, todos os isolados ambientais de *B. pseudomallei* confirmados por identificação molecular são oriundos apenas de amostras coletadas no Município de Tejuçuoca, sendo excluídos os isolados ambientais provindos do Município de Banabuiú.

A amostra de DNA obtida do lavado brônquico alveolar de paciente com melioidose também apresentou identificação confirmada pela PCR específica, fato esse que resultou em nossa primeira publicação (segue anexada em **PUBLICAÇÕES**).

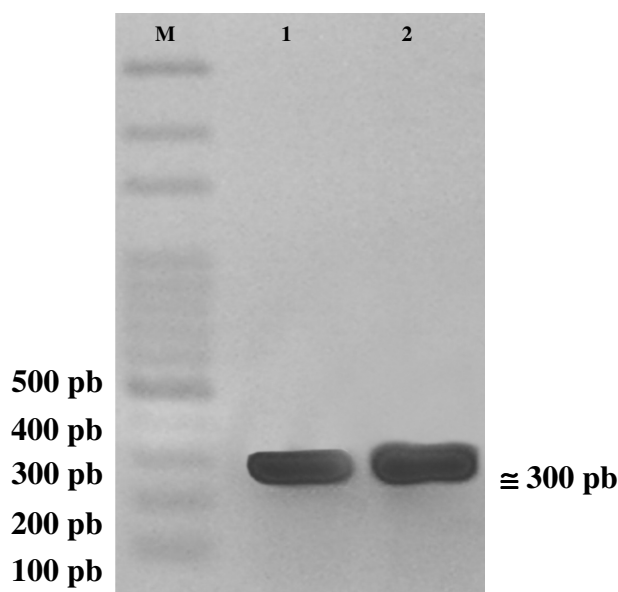


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando fragmento de 302 pb específico para *B. pseudomallei*. M: marcador de peso molecular de 100 pb; 1: amplificação da amostra de DNA obtida diretamente do lavado brônquico alveolar de paciente com melioidose; 2: amplificação de DNA controle (isolado clínico CEMM 03-06-033).

8.4 Confirmação da identificação molecular por PCR dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* pela análise das sequências da região 16S DNAr

Foram analisados pelas sequências da região 16S do DNA ribossômico nuclear os 15 isolados confirmados como *B. pseudomallei* por PCR específica, além de três amostras não confirmadas pela PCR (CEMM 05-01-041, CEMM 05-01-039 e CEMM 05-01-040), a fim de comprovar a especificidade do método utilizado para identificação molecular. Uma amostra *outsider*, confirmada como *Burkholderia cepacia* pelo API 20NE, também foi incluída na análise.

As amostras supracitadas amplificaram a região 16S do DNA ribossômico nuclear por PCR, resultando em *amplicons* de aproximadamente 1400 pb. A montagem das sequências dos genes 16S DNAr dos isolados confirmados por PCR específica apresentaram 100% de sequência identidade com as sequências dos genes 16S DNAr das cepas *B. pseudomallei* 1106a e *B. pseudomallei* 1710b (as sequências dos genes 16S DNAr das cepas 1106a e 1710b foram obtidas a partir de suas correspondentes sequências de genoma disponíveis no GenBank: número de acesso CP000572 e CP000124, respectivamente). Não foi possível, entretanto, sequenciar a região 16S DNAr da amostra clínica CEMM 03-06-033, pois, embora ela tenha sido amplificada com sucesso por PCR preliminar, não foi corretamente amplificada durante a reação de sequenciamento.

As três amostras não identificadas por PCR específica tiveram como resultado 100% de sequência identidade com as sequências dos genes 16S DNAr de *Pandoraea pulmonicola* (CEMM 05-01-039) e *Achromobacter xylosoxidans* (CEMM 05-01-040 e CEMM 05-01-041). O isolado *outsider* identificado como *B. cepacia* (CEMM 05-01-038) por teste bioquímico semiautomatizado foi também identificado por sequenciamento como *Achromobacter* sp.. Dessa forma, foi confirmada a identificação de 14 isolados identificados como *B. pseudomallei* por PCR específica (quatro isolados clínicos e dez ambientais), o que valida a especificidade do método de identificação aqui empregado (**Tabela 3**).

Tab. 3. Isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* confirmados por diagnóstico molecular.

ISOLADOS	PCR ESPECÍFICA	API 20NE	SEQUÊNCIAS 16S E 16S-23S DNAr
CEMM 03-06-33 ^A	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	-
CEMM 03-06-34 ^A	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-35 ^A	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-36 ^A	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-37 ^A	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-38 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-39 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-40 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-41 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-42 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-43 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-44 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-45 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-46 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-47 ^B	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 05-01-041 ^B	PCR -	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>A. xylosoxidans</i>
CEMM 05-01-039 ^B	PCR -	<i>B. pseudomallei</i> 76.8%	<i>P. pulmonicola</i>
CEMM 05-01-040 ^B	PCR -	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>A. xylosoxidans</i>
CEMM 05-01-038 ^B	PCR -	<i>B. cepacia</i> 99.9%	<i>A. xylosoxidans</i>

Legenda: ^A isolados clínicos e ^B isolados ambientais.

8.5 Alinhamento múltiplo e análise filogenética da região 16S DNAr

As sequências nucleotídicas de aproximadamente 1400 pb da completa região 16S do DNA ribossômico nuclear dos 15 isolados PCR positivos para *B. pseudomallei* foram geradas, alinhadas e analisadas. Essas sequências foram comparadas com sequências publicadas de cinco cepas de *B. pseudomallei* (*B. pseudomallei* MSHR346, *B. pseudomallei* 1106a, *B. pseudomallei* K96243, *B. pseudomallei* 668 e *B. pseudomallei* 1710b), quatro cepas de *B. mallei* (*B. mallei* NCTC 10229, *B. mallei* SAVP1, *B. mallei* NCTC 10247 e *B. mallei* ATCC 23344) e uma cepa de *B. thailandensis* (*B. thailandensis* E264) que possuem sequenciamento completo dos seus genomas no Genbank (**Anexo V**).

Por meio do alinhamento, foram encontradas diferenças em sete posições nucleotídicas únicas distribuídas ao longo do gene 16S DNAr: uma posição que distingue *B. mallei* de *B. pseudomallei* e *B. thailandensis* (a posição 46 apresenta uma timina para *B. mallei* e citosina para as demais) e quatro posições que diferem *B. thailandensis* de *B. pseudomallei* e *B. mallei* (a posição 632 apresenta uma citosina para *B. thailandensis* e uma

deleção para as demais, a posição 946 possui uma guanina para *B. thailandensis* e timina para as demais, a posição 949 possui uma timina para *B. thailandensis* e citosina para as demais e a posição 959 apresenta uma citosina para *B. thailandensis* e timina para as demais), destacadas em amarelo no alinhamento; uma posição com alteração no isolado CEMM 03-06-037 (a posição 410 apresenta uma timina para o este isolado e citosina para os demais) e uma posição com alteração nos isolados CEMM 03-06-042 e CEMM 03-06-043 (a posição 1258 apresenta uma guanina para esses dois isolados, enquanto nas demais existe uma deleção), destacadas em verde no alinhamento.

O alinhamento múltiplo das diferentes cópias da região 16S do DNA ribossômico nuclear (o genoma de *B. pseudomallei* contém quatro cópias dessa região, três delas no cromossomo I e outra cópia no cromossomo II) presentes nas cepas *B. pseudomallei* MSHR346, *B. pseudomallei* 1106a, *B. pseudomallei* K96243, *B. pseudomallei* 668 e *B. pseudomallei* 1710b (as sequências dos genes 16S DNAr das cepas MSHR346, K96243, 668, 1106a e 1710b foram obtidas a partir de suas correspondentes sequências de genoma disponíveis no GenBank: número de acesso CP0001408, NC_006350 e NC_009074, CP000572 e CP000124, respectivamente) demonstrou que as diversas cópias dessa região são conservadas dentro do genoma dessa espécie, o que torna a análise do gene 16S DNAr apropriada para a realização de estudos filogenéticos.

Dessa forma, foi gerada uma árvore filogenética consenso da região 16S do DNA ribossômico, baseada em relações de distância, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, que foi obtida se usando o programa MEGA4 – Molecular Evolutionary Genetic Analysis, versão 4.1 (**Fig. 7**) (TAMURA et al., 2007). A árvore filogenética demonstra que os isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* do Estado do Ceará são evolutivamente agrupados com as cepas *B. pseudomallei* MSHR346 (Austrália), *B. pseudomallei* 1106a (Tailândia), *B. pseudomallei* K96243 (Tailândia), *B. pseudomallei* 1710b (Tailândia) e *B. pseudomallei* 668 (Austrália), sendo que estas duas últimas parecem ser mais ancestrais em relação às demais. Pode-se inferir também pelo valor de *bootstrap* (igual a 58) que os isolados ambientais CEMM 03-06-046 e CEMM 03-06-047 estão mais relacionados entre si quando em comparação com os outros isolados de *B. pseudomallei*, oriundos do Estado do Ceará, bem como com as cepas de *B. pseudomallei* com sequências publicadas no GenBank. As espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei* são estreitamente relacionadas (*bootstrap* 99), sendo provável que *B. pseudomallei* seja ancestral de *B. mallei*. Estas duas espécies também apresentam relação evolutiva significativa com a espécie *B. thailandensis* (*bootstrap* 88).

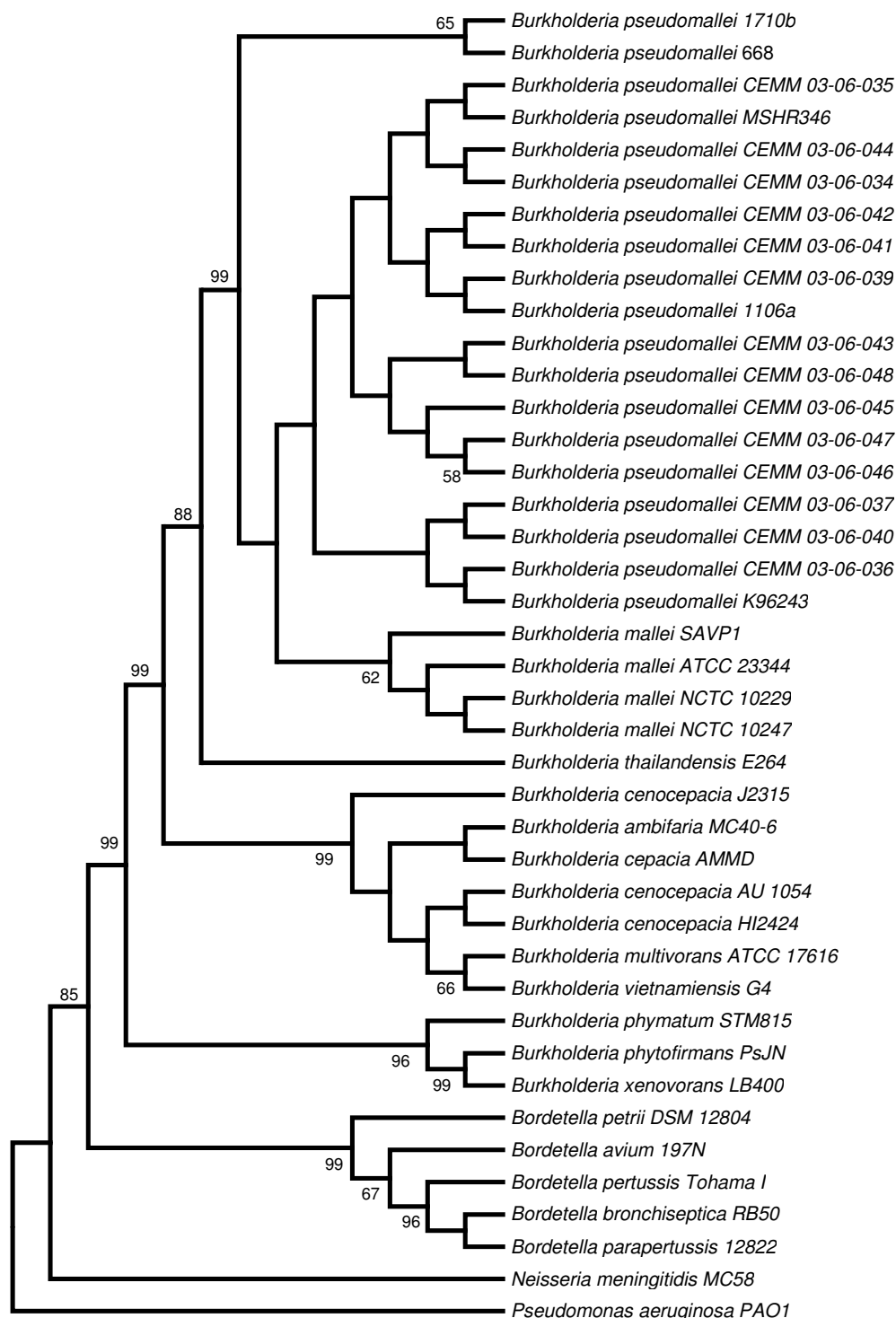


Figura 7. A história evolutiva da árvore filogenética baseada na região 16S DNAr foi inferida usando o método de máxima parcimônia (ECK; DAYHOFF, 1966). A árvore consenso foi inferida com base em 100 repetições e tomada para representar a história evolutiva dos táxons analisados (FELSENSTEIN, 1985). Branchs correspondentes às divisões reproduzidas em menos de 50% de *bootstrap* não possuem valores apresentados. A porcentagem de replicação das árvores em que há associação de táxons agrupados no teste de *bootstrap* (100 repetições) é mostrada próxima aos *branchs* (FELSENSTEIN, 1985). A árvore de máxima parcimônia foi obtida usando-se o algoritmo Close-Neighbor-Interchange (NEY; KUMAR, 2000) com nível de pesquisa 7, no qual as primeiras árvores foram obtidas com adição de sequências aleatórias (100 repetições). Todas as deleções foram tratadas como dados ausentes. Houve um total de 1305 posições no final dos dados, das quais 179 foram parcimônia informativas. A análise filogenética foi conduzida no MEGA4 (TAMURA et al., 2007). As sequências nucleotídicas da completa região 16S DNAr das cepas utilizadas no estudo foram retiradas do banco de sequências GenBank.

8.6 Alinhamento múltiplo e análise das sequências 16S-23S DNAr

As sequências nucleotídicas de aproximadamente 600 pb da completa região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear dos 15 isolados clínicos e ambientais PCR positivos para *B. pseudomallei* foram geradas, alinhadas e analisadas. O alinhamento múltiplo das diferentes cópias da região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear (o genoma de *B. pseudomallei* contém quatro cópias dessa região) presentes nas cepas *B. pseudomallei* MSHR346, *B. pseudomallei* 1106a, *B. pseudomallei* K96243, *B. pseudomallei* 668 e *B. pseudomallei* 1710b demonstrou que existem dois tipos de região intergênica 16S-23S do DNAr no genoma de *B. pseudomallei* (uma que possui um tamanho aproximado de 600 pb e outra que apresenta 668 pb) que se repetem aleatoriamente no genoma dessa espécie. Por conta disso, essa região torna-se inapropriada para a realização de análises filogenéticas em virtude da sua natureza e disposição variáveis no genoma dessa espécie. Dessa forma, foram geradas duas matrizes a fim de se observar diferenças genéticas baseadas nessa região entre os isolados em estudo: uma Matriz Sequência Identidade (**Fig. 8**), que analisa a similaridade entre os isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei*, e a Matriz Sequência Contagem de Diferenças (**Fig. 9**), que destaca em quantas posições cada isolado se distingue entre si. Com o alinhamento múltiplo das sequências 16S-23S DNAr dos isolados de *B. pseudomallei* analisados no estudo (que foi gerado pelo programa Bioedit versão 5.0.9) (**Anexo VI**), as matrizes foram montadas pelo programa MEGA 4.1. Com a análise das duas matrizes, pôde-se observar que as amostras ambientais CEMM 03-06-047 e CEMM 03-06-048 apresentam posições distintas de todas as demais, enquanto as amostras CEMM 03-06-039, CEMM 03-06-040, CEMM 03-06-041, CEMM 03-06-045, CEMM 03-06-046, CEMM 03-06-033, CEMM 03-06-036 e CEMM 03-06-037 são idênticas quando relacionadas a essa região.

Mediante o sequenciamento dessa região, também foram analisados os sítios de ligação dos *primers* utilizados na reação de PCR *semi-nested* (*primers* Bp1, Bp4 e Bp3) realizada em nosso estudo para a identificação de *B. pseudomallei*. Notou-se que o *primer* reverso (o *primer* Bp3 possui sequência complementar TAATCTCAGCTTGTTA) utilizado na segunda etapa de amplificação da reação de PCR não se liga ao sítio correspondente dessa região pois apresenta quatro substituições e uma deleção nucleotídica, revelando que a falha na execução dessa etapa se deu provavelmente por mutações adquiridas pelo *primer* em questão. As regiões que se anelam aos *primers* Bp1, Bp3 e Bp4 estão destacadas no alinhamento múltiplo das sequências 16S-23S DNAr dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* em amarelo, cinza e verde, respectivamente.

Sequence Identity Matrix

	CEMM 03-06-039	CEMM 03-06-040	CEMM 03-06-041	CEMM 03-06-042	CEMM 03-06-043	CEMM 03-06-044	CEMM 03-06-045	CEMM 03-06-046	CEMM 03-06-047	CEMM 03-06-048	CEMM 03-06-033	CEMM 03-06-034	CEMM 03-06-035	CEMM 03-06-036	CEMM 03-06-037
CEMM 03-06-039	ID	1,000	1,000	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	1,000	1,000
CEMM 03-06-040	1,000	ID	1,000	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	1,000	1,000
CEMM 03-06-041	1,000	1,000	ID	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	1,000	1,000
CEMM 03-06-042	0,995	0,995	0,995	ID	1,000	1,000	0,995	0,995	0,991	0,995	0,995	0,995	1,000	0,995	0,995
CEMM 03-06-043	0,995	0,995	0,995	1,000	ID	1,000	0,995	0,995	0,991	0,995	0,995	0,995	1,000	0,995	0,995
CEMM 03-06-044	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	ID	0,995	0,995	0,991	0,995	0,995	0,995	1,000	0,995	0,995
CEMM 03-06-045	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	0,995	ID	1,000	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	1,000	1,000
CEMM 03-06-046	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	0,995	1,000	ID	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	1,000	1,000
CEMM 03-06-047	0,996	0,996	0,996	0,991	0,991	0,991	0,996	0,996	ID	0,990	0,996	0,990	0,991	0,996	0,996
CEMM 03-06-048	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,993	0,993	0,990	ID	0,993	0,993	0,995	0,993	0,993
CEMM 03-06-033	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	0,996	0,993	ID	0,993	0,995	1,000	1,000
CEMM 03-06-034	0,993	0,993	0,993	0,995	0,995	0,995	0,993	0,993	0,990	0,993	0,993	ID	0,995	0,993	0,993
CEMM 03-06-035	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	0,991	0,995	0,995	0,995	ID	0,995	0,995
CEMM 03-06-036	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	ID	1,000
CEMM 03-06-037	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	0,995	1,000	1,000	0,996	0,993	1,000	0,993	0,995	1,000	ID

Figura 8. Matriz Sequência Identidade baseada na região 16S-23S DNAr dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará.

Sequence Difference Count Matrix

	CEMM 03-06-039	CEMM 03-06-040	CEMM 03-06-041	CEMM 03-06-042	CEMM 03-06-043	CEMM 03-06-044	CEMM 03-06-045	CEMM 03-06-046	CEMM 03-06-047	CEMM 03-06-048	CEMM 03-06-033	CEMM 03-06-034	CEMM 03-06-035	CEMM 03-06-036	CEMM 03-06-037
CEMM 03-06-039	ID	0	0	3	3	3	0	0	2	4	0	4	3	0	0
CEMM 03-06-040	0	ID	0	3	3	3	0	0	2	4	0	4	3	0	0
CEMM 03-06-041	0	0	ID	3	3	3	0	0	2	4	0	4	3	0	0
CEMM 03-06-042	3	3	3	ID	0	0	3	3	5	3	3	3	0	3	3
CEMM 03-06-043	3	3	3	0	ID	0	3	3	5	3	3	3	0	3	3
CEMM 03-06-044	3	3	3	0	0	ID	3	3	5	3	3	3	0	3	3
CEMM 03-06-045	0	0	0	3	3	3	ID	0	2	4	0	4	3	0	0
CEMM 03-06-046	0	0	0	3	3	3	0	ID	2	4	0	4	3	0	0
CEMM 03-06-047	2	2	2	5	5	5	2	2	ID	6	2	6	5	2	2
CEMM 03-06-048	4	4	4	3	3	3	4	4	6	ID	4	4	3	4	4
CEMM 03-06-033	0	0	0	3	3	3	0	0	2	4	ID	4	3	0	0
CEMM 03-06-034	4	4	4	3	3	3	4	4	6	4	4	ID	3	4	4
CEMM 03-06-035	3	3	3	0	0	0	3	3	5	3	3	3	ID	3	3
CEMM 03-06-036	0	0	0	3	3	3	0	0	2	4	0	4	3	ID	0
CEMM 03-06-037	0	0	0	3	3	3	0	0	2	4	0	4	3	0	ID

Figura 9. Matriz Sequência Contagem de Diferenças baseada na região 16S-23S DNAr dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará.

9. DISCUSSÃO

Apesar de a melioidose ser comumente descrita no sudeste da Ásia e norte da Austrália, ela pode ser encontrada também em outras regiões, ainda mais considerando-se o aumento do trânsito mundial de pessoas, tanto como migração e turismo, e ainda de animais e produtos que podem servir de transporte para a bactéria *B. pseudomallei* (DANCE, 2000b). A doença é considerada emergente no Brasil, desde que os primeiros casos foram reportados no Estado do Ceará, sendo cada vez mais frequentes os relatos de achados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* nesta região (ROLIM et al., 2009).

A melioidose não é homogeneamente distribuída dentro de áreas endêmicas. Há várias razões para este fato. Primeiro, isto pode decorrer da distribuição irregular da *B. pseudomallei* no solo e na água, tanto em termos de presença ou ausência do organismo, e ainda em quantidade de micro-organismos por grama de solo. Segundo, este fato também pode acontecer por diferenças na virulência de amostras locais de *B. pseudomallei*. Terceiro, podem ocorrer variações nas práticas que levem as pessoas à exposição, ou seja, ocupacional e de lazer, e, finalmente, é possível suceder diferenças entre a susceptibilidade de populações à infecção (DANCE, 2000b).

A atenção é focada para o Brasil desde que os primeiros casos de melioidose foram reportados em 2003, quando um surto atingiu quatro irmãos de uma mesma família em uma região rural no Município de Tejuçuoca, no Estado do Ceará (ROLIM et al., 2005). Depois desse episódio, seis novos casos da doença foram reportados também no Estado do Ceará entre 2004 e 2009: em janeiro de 2004, quando evidenciada a ocorrência de um novo caso no Município de Banabuiú em paciente de 39 anos; em 2005, quando foram reportados dois casos de óbito por melioidose - um no município de Aracoiaba, em paciente de 30 anos, que se contaminou na água de um rio após acidente automobilístico, e outro, em turista holandês, cuja contaminação provavelmente ocorreu no Estado do Ceará, em julho de 2003 (AARDEMA et al., 2005; INGLIS et al., 2006); em 2008, quando foram relatados dois novos casos da doença: o primeiro ocorrido provavelmente no Município de Ubajara, vitimando um jovem de 14 anos, e o segundo, no Município de Granja, acometendo um homem de 69 anos; e, finalmente, em abril de 2009, quando mais um caso de melioidose foi confirmado no município de Granja, totalizando dez casos (nove fatais) de melioidose reportados no Brasil.

O Estado do Ceará possui condições geográficas e climáticas favoráveis para o estabelecimento da bactéria *B. pseudomallei*, pois está compreendido entre as coordenadas geográficas ótimas para o estabelecimento de focos epidêmicos (20°N e 20°S da linha do Equador), possui um clima tropical quente e semiárido, com temperatura compreendida entre

os 24°C e 36°C, considerado o intervalo ótimo para o crescimento bacteriano, além de oferecer solos úmidos na estação chuvosa ou logo após as chuvas, a época preferida para o aparecimento de casos da doença. Os eventos de melioidose no Ceará foram observados na época das chuvas, confirmando relatos de autores diversos acerca das melhores condições climáticas para o encontro e o estabelecimento de focos epidêmicos para *B. pseudomallei*. (DANCE, 2000b; CURRIE, 2008; ROLIM et al., 2009). Dessa forma, a coleta ambiental do micro-organismo é de fundamental importância pois atualmente sabe-se que o solo e a água contaminados se constituem a principal fonte de infecção humana da melioidose (INGLIS et al., 2001).

No Brasil há referência de que a bactéria tenha sido isolada por pesquisadores franceses em 1977, no solo de duas cidades do interior da Bahia (São Félix e Santo Antonio). Há também relatos de tentativas frustradas de se isolar o micro-organismo da água em São Paulo (PESTANA DE CASTRO et al., 1973; GALLIMAND; DODIN, 1982; DANCE, 1991). Um estudo ambiental realizado em duas áreas acometidas pela melioidose no Estado do Ceará mostrou o isolamento ambiental da *B. pseudomallei* nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, sendo a bactéria isolada com base em 26 amostras ambientais de solo coletadas nesses municípios (ROLIM et al., 2009).

Este estudo pretendeu confirmar a identificação desses 26 isolados ambientais, com a utilização de técnicas moleculares, uma vez que, até então, estes só haviam sido identificados por métodos fenotípicos, como testes bioquímicos convencionais e pelo sistema semiautomatizado API 20NE (BioMerioux, França). Além desses isolados ambientais, foram incluídos no estudo outros cinco isolados clínicos referentes a três pacientes acometidos pelo surto em 2003 no município de Tejuçuoca e a dois pacientes acometidos em 2008, um no Município de Ubajara e outro em Granja.

Dificuldades práticas para a correta identificação laboratorial de *B. pseudomallei*, principalmente em áreas não endêmicas da melioidose, incluem: a limitada experiência de profissionais para a correta manipulação do micro-organismo e interpretação das provas laboratoriais, a presença de espécies de *Burkholderia* estreitamente relacionadas em espécimes clínicos oriundos de sítios anatômicos não estéreis e a morfologia atípica das colônias em algumas cepas de *B. pseudomallei* (HOWARD; INGLIS, 2003; LEE et al. 2007). Além disso, apesar de claras as recomendações para o processamento adequado de amostras suspeitas de *B. pseudomallei*, existe grande variação nos procedimentos utilizados pelos laboratórios de diagnóstico (DANCE et al., 1989).

Assim, a confirmação da identificação presuntiva de *B. pseudomallei* requer a combinação do reconhecimento inicial de quais espécies podem estar presentes, de um

esquema de identificação microbiológica bem desenhado, além de prática e experiência científica. O reconhecimento de *B. pseudomallei* fora de áreas endêmicas é um grande desafio aos laboratórios de rotina, que necessitam definir, de forma racional, quais testes devem ser utilizados no diagnóstico, pois falhas na identificação de *B. pseudomallei* podem resultar em exposição involuntária dos profissionais de laboratório (INGLIS et al., 2005).

B. pseudomallei pode ser identificada em laboratórios de saúde pública e de pesquisa por diversos métodos diagnósticos, incluindo os testes fenotípicos convencionais e os sistemas bioquímicos semiautomatizados, técnicas de imunoensaio e uma grande diversidade de técnicas moleculares que cada vez mais reportam elevados índices de sensibilidade e especificidade de identificação.

Com relação aos métodos de identificação fenotípica, os testes bioquímicos semiautomatizados, como o API 20NE, apesar de serem mais rápidos do que os testes bioquímicos convencionais, não apresentam resultados devidamente validados, fazendo com que muitos laboratórios se confiem apenas em testes bioquímicos convencionais para a identificação definitiva de *B. pseudomallei* (INGLIS et al., 2005).

Diversos estudos já foram realizados para determinar a acurácia do sistema API 20NE para a correta identificação de *B. pseudomallei*, e estes mostram-se bastante discrepantes quanto aos resultados apresentados. Um trabalho pioneiro realizado por Dance et al. (1989) mostrou a correta identificação de *B. pseudomallei* em 97.5% dos isolados pela utilização desse sistema. Em outro estudo, entretanto, Inglis et al. (1998) relataram que mais de 20% dos isolados de *B. pseudomallei* foram identificados erroneamente com o API 20NE, sendo *Chromobacterium violaceum* a espécie mais atribuída ao erro na identificação. Outros estudos mais recentes apresentam resultados favoráveis na identificação de *B. pseudomallei* com o uso do API 20NE, como os realizados por Lowe et al. (2002), Amornchai et al. (2007), Kiratisin et al. (2007) e Deepack et al. (2008), que reportaram a correta identificação de *B. pseudomallei* em 98%, 99%, 87% e 99% dos casos, respectivamente. Porém, Glass e Popovic (2005) e Inglis et al. (2005) mostram, porém que o uso desse sistema pode ser pouco eficaz, podendo identificar erroneamente até 40% e 63% dos isolados de *B. pseudomallei*, respectivamente. Após um questionamento preliminar sobre a confiabilidade desse sistema de identificação, Inglis et al. (2005) afirmam que alguns centros continuam utilizando o API 20NE com o entendimento de que este tenha sido aperfeiçoado ou ainda que o seu uso associado ao emprego do API 20E poderia ser utilizado como ponto de referência para a utilização de outros sistemas bioquímicos de identificação. Não existe, no entanto, um consenso quanto ao uso prático do API 20NE, pois, embora alguns autores demonstrem que este sistema é um bom teste bioquímico adicional para a identificação de *B. pseudomallei*,

outros garantem que este não pode ser utilizado como método diagnóstico definitivo por não ser confiável para identificar *B. pseudomallei* e outros isolados desconhecidos de *Burkholderia* sp. de diferentes origens. Além disso, o índice de erros na identificação de *B. pseudomallei* apresentados por esse sistema em muitos casos é inaceitavelmente elevado, sendo que a grande variedade de meios de cultura em que *B. pseudomallei* pode ser cultivada antes da realização do teste e a utilização de diferentes substratos nos painéis de identificação nesse sistema é parâmetro importante que muitas vezes gera perfis errôneos de identificação (DANCE et al., 1989; INGLIS et al., 1998; LOWE et al., 2002; GLASS; POPOVIC, 2005; INGLIS et al., 2005; LOWE et al., 2006; AMORNCHAI et al., 2007; KIRATISIN et al., 2007; DEEPAK et al., 2008).

Inglis et al. (2005) compararam o sistema bioquímico semiautomatizado API 20NE com uma reação de PCR realizada pelo grupo, desde 1998, para confirmar a identificação presuntiva de *B. pseudomallei*. Os autores utilizam uma PCR do tipo *semi-nested* para amplificar uma sequência da região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear específica para *B. pseudomallei*. Esta técnica, novamente reportada pelo grupo em 2006 (MERRITT et al., 2006) e descrita inicialmente por Kunakorn et al. (1995), foi a mesma utilizada em neste estudo para confirmar a identificação dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará.

Com a utilização desse método molecular de identificação, nossos resultados mostraram que apenas 48.4% dos isolados de *B. pseudomallei* procedentes do Estado do Ceará foram identificados corretamente pela utilização do sistema bioquímico semiautomatizado API 20NE. Considerando-se apenas os isolados de origem humana, o API 20NE mostrou-se bastante eficaz, tendo identificado corretamente 100% das amostras. Quando considerados, porém, apenas os isolados de origem ambiental, esse número cai para 38.4%, ou seja, em 61.6% as amostras ambientais foram falsopositivas para *B. pseudomallei* pela identificação por métodos fenotípicos convencionais e pelo sistema API 20NE. Uma hipótese que poderia justificar a grande diferença encontrada no percentual de confirmação entre isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* é a existência de um espectro bem menor de micro-organismos presentes em espécimes clínicos (principalmente se estes são coletados de sítios estéreis ou há a suspeita clínica da doença) quando comparada à diversidade de organismos que estão presentes e que podem ser isolados de amostras ambientais.

No artigo citado anteriormente (INGLIS et al., 2005), os autores utilizam a técnica de PCR *semi-nested* para confirmar a identificação feita por métodos fenotípicos, como o sistema bioquímico semiautomatizado API 20NE, e afirmam que o método molecular apresenta maior

confiabilidade, menor tempo para obtenção do resultado, além de rapidez e simplicidade na execução, sendo que a tendência é de que as reações de PCR passem a adquirir baixo custo, o que no futuro poderá tornar essa técnica o método preferido para a identificação de *B. pseudomallei*.

Esse protocolo de PCR do tipo *semi-nested* é realizado inicialmente com uma reação com dois *primers* (Bp1 e Bp4) específicos para a amplificação da região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear de *B. pseudomallei*, sendo o produto dessa amplificação novamente amplificado utilizando-se os *primers* Bp1 e Bp3, que se anelam dentro dessa região. Neste ensaio, entretanto, não foi possível realizar a segunda etapa de amplificação da técnica em decorrência de mutações presentes no *primer* reverso Bp3, utilizado na segunda etapa de amplificação da reação de PCR (Merritt et al., 2006).

Merritt et al. (2006) identificaram corretamente 71 de 72 isolados de *B. pseudomallei*, utilizando essa técnica de PCR. De acordo com os autores, que também não conseguiram reproduzir a segunda etapa da PCR *semi-nested*, essa falha ocorreu por conta de uma variação anômala na sequência interna do sítio de ligação do *primer* reverso (*primer* Bp3) utilizado na segunda etapa de amplificação. Os autores, que sequenciaram a região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear de *B. pseudomallei*, afirmam ainda que essa falha encontrada no sítio de ligação interna do *primer* Bp3 existe desde o protocolo original dessa técnica, que foi preconizada por Kunakorn et al. (1995).

Inglis et al. (2005) discutem o fato de que mesmo com a grande aplicabilidade das técnicas de identificação de *B. pseudomallei* baseadas em reações de PCR, existe a necessidade de que estas sejam analisadas com cautela, pois a confiança excessiva nos protocolos de PCR específicos para a detecção de patógenos humanos pode tornar o diagnóstico laboratorial vulnerável em decorrência de fatores externos imprevisíveis, tais como a variabilidade genética nos sítios de ligação de *primers*.

Kunakorn et al. (1995) relatam que essa PCR do tipo *semi-nested* não é capaz de diferenciar *B. pseudomallei* de *B. mallei* em decorrência das similaridades nas sequências das regiões 16S-23S, 16S e 23S do DNA ribossômico nuclear. A homologia do DNA e a composição das células lipídicas e ácidos graxos revelam que *B. pseudomallei* e *B. mallei* são espécies evolutivamente relacionadas, sendo que a grande similaridade nas sequências de DNA dessas duas bactérias dificulta a sua diferenciação pelo emprego de métodos moleculares de identificação (LEE et al., 2005).

Mesmo sem a execução da segunda etapa da PCR *semi-nested* e pela não-distinção entre as espécies *B. pseudomallei* e *B. mallei* com o uso desse protocolo, este estudo não foi prejudicado, pois esta PCR *semi-nested* é capaz de diferenciar *B. pseudomallei* de outras

bactérias, incluindo *Burkholderia cepacia*, *B. multivorans*, *B. thailandensis*, *B. vietnamiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, embora *B. pseudomallei* e *B. mallei* sejam estreitamente relacionadas, elas diferem consideravelmente em outros aspectos importantes, incluindo o comportamento ecológico. *B. pseudomallei* é um organismo de vida livre, facilmente isolado do solo e da superfície de águas em áreas onde é endêmica e só em raras ocasiões encontra o hospedeiro animal como nicho. *B. mallei*, no entanto, se comporta com maior sucesso especificamente em hospedeiros animais (principalmente coelhos e equinos) e é considerada por muitos autores um parasita obrigatório. A principal distinção morfológica entre essas duas espécies é a presença de flagelo em *B. pseudomallei* e a ausência em *B. mallei* (ANUNTAGOOL; STITAYA, 2002).

Outras espécies relacionadas à *B. pseudomallei* incluem *B. cepacia*, que, em certas condições clínicas, pode atuar como patógeno oportunista, principalmente em indivíduos com fibrose cística. *B. thailandensis*, que coexiste com *B. pseudomallei* no solo da Tailândia, mas raramente causa a melioidose, difere de *B. pseudomallei* na utilização de arabinose, produção e excreção de produtos exógenos, virulência em modelos animais bem como na sequência de nucleotídeos da região 16S do DNA ribossômico nuclear (BROWN; BEACHAM, 2000; WIERSINGA et al., 2006).

Com o uso de um método alternativo seguro para extração de DNA diretamente de lavado brônquico alveolar, conseguiu-se também, mediante essa PCR, detectar a presença de *B. pseudomallei* diretamente de espécime clínico de paciente com suspeita de melioidose, protocolo esse que reduziu em quase 48 horas o tempo necessário para a obtenção do resultado diagnóstico definitivo da doença, o qual identificou corretamente *B. pseudomallei* antes mesmo da confirmação pela cultura e foi suficiente para gerar a nossa primeira publicação.

Várias técnicas de PCR são desenvolvidas para a identificação molecular de *B. pseudomallei*, porém, a maioria delas utiliza apenas DNA extraído de culturas da bactéria (SUPRAPOM et al., 2007). Recentemente, diversas técnicas de PCR em tempo real reportam a rápida detecção de *B. pseudomallei* por meio de DNA extraído diretamente de espécimes clínicos e utilizam principalmente sangue como espécime clínico eleito para extração (SUPRAPROM et al., 2007; MEUMANN et al., 2006; NOVAK et al., 2006; CHANTRATIDA et al., 2007).

Apenas Chantratida et al. (2007) relatam a extração de DNA diretamente de variados tipos de espécimes clínicos (sangue, urina, escarro e *swabs* de garganta e de leões-pele) para detecção de *B. pseudomallei* por PCR em tempo real, porém não utilizam amostras de lavado

brônquico alveolar. Embora esses autores não tenham conseguido bons índices de sensibilidade e especificidade de detecção de *B. pseudomallei* com base em amostras de sangue, esses índices foram satisfatórios para as amostras de trato respiratório (70.8% de sensibilidade e 99.4% de especificidade). Entretanto, apesar de a PCR em tempo real ser rápida e específica para a detecção de *B. pseudomallei*, esta técnica não é aplicável para o diagnóstico de rotina em muitos laboratórios.

A eficácia de um método de detecção de *B. pseudomallei* a partir de espécimes clínicos oriundos do trato respiratório é muito importante, uma vez que a pneumonia é a principal apresentação clínica da melioidose (CURRIE, 2003). Dessa forma, o método para detecção de *B. pseudomallei* utilizado neste estudo é muito interessante, visto que também é um método rápido, de fácil execução e aplicável ao diagnóstico de rotina da melioidose em muitos laboratórios com recursos limitados em países em desenvolvimento.

A fim de confirmar a eficácia da técnica de PCR utilizada neste estudo e analisar a diversidade genética dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará, realizou-se o sequenciamento das regiões 16S e 16S-23S do DNA ribossômico nuclear.

Em procariontes, o *operon* RNA ribossômico nuclear contém os genes que compõem as regiões 16S, 23S e 5S do DNA ribossômico nuclear, sendo que múltiplas cópias desse *locus* são frequentemente observadas. Esses genes, que geralmente ocorrem na ordem 16S – 23S – 5S, podem apresentar exceções frequentes, incluindo variações na disposição, no número de repetições e nos arranjos e ligações (TYLER et al., 1995).

Por tratar-se de uma região conhecidamente conservada, o uso do sequenciamento da região 16S do DNA ribossômico nuclear é uma excelente opção, tanto para a identificação de micro-organismos como para o estudo da relação evolutiva entre espécies procarióticas (DHARAKUL et al., 1996; GEE et al., 2003; SCHONMANN et al., 2009). Neste estudo, pôde-se observar que todos os isolados clínicos e ambientais confirmados por PCR específica, como *B. pseudomallei* foram corretamente identificados, pois a montagem das sequências dos genes 16S DNAr dos isolados confirmados por PCR apresentam 100% de sequência identidade com as sequências dos genes 16S DNAr das cepas *B. pseudomallei* 1106a e *B. pseudomallei* 1710b publicadas no Genbank. Não foi possível, porém, sequenciar a região 16S do DNAr do isolado clínico CEMM 03-06-033, o que provavelmente aconteceu em razão de problemas no anelamento em um dos *primers* internos utilizados na reação de sequenciamento dessa região. Além dos isolados PCR positivos para *B. pseudomallei*, foram sequenciados mais quatro isolados de origem ambiental: três que foram PCR negativos em neste estudo (CEMM 05-01-039, CEMM 05-01-040 e CEMM 05-01-041) e um isolado

outsider, identificado fenotipicamente como *B. cepacia* (CEMM 05-01-038). As três amostras não identificadas pela PCR específica tiveram como resultado 100% de sequência identidade com sequências depositadas no GenBank dos genes que compõem a região 16S DNAr de *Pandoraea pulmonicola* (CEMM 05-01-039) e *Achromobacter xylosoxidans* (CEMM 05-01-040 e CEMM 05-01-041). O isolado *outsider* identificado como *B. cepacia* por teste bioquímico semiautomatizado também foi identificado por sequenciamento como *Achromobacter* sp., resultados esses que realmente validam a especificidade do nosso método molecular de identificação.

Achromobacter xylosoxidans e *Pandoraea pulmonicola* são bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose, pertencentes à ordem *Burkholderiales*, são móveis e possuem a água e o solo como habitat natural. *Achromobacter xylosoxidans*, que pertence à família *Alcaligenaceae*, faz parte da microbiota humana, especialmente da pele e do trato gastrointestinal, e pode causar infecções oportunistas. A maioria dos relatos clínicos envolvendo esse micro-organismo descreve infecções nosocomiais em pacientes imunodeprimidos e estão relacionadas à contaminação de líquidos e infusões. Já o gênero *Pandoraea* sp. pertence à família *Burkholderiaceae* e é constituído de cinco espécies: *P. apista*, *P. pulmonicola*, *P. pnomenusa*, *P. sputorum* e *P. norimbergensis*, que podem atuar como patógenos oportunistas, principalmente em pacientes com doenças pulmonares crônicas, particularmente a fibrose cística (VALENZUELA, 2007; LUCATELLI et al., 2009).

Gee et al. (2003) avaliaram o uso do sequenciamento da região 16S do DNA ribossômico nuclear para a rápida identificação de 56 isolados de *B. pseudomallei* e 23 isolados de *B. mallei* e para a diferenciação entre essas duas espécies de outros gêneros e espécies relacionadas como *Pandoraea* spp., *Ralstonia* spp., *Burkholderia gladioli*, *B. cepacia*, *B. thailandensis* e *P. aeruginosa*. Foram encontradas diferenças em oito posições nucleotídicas entre as cepas de *B. pseudomallei* baseadas na região 16S DNAr, sendo que *B. pseudomallei* e *B. mallei* distinguiram em apenas uma posição nucleotídica dessa região, o que mostrou uma similaridade de 99.93% entre as sequências dessas duas espécies. A relação de *B. pseudomallei* e *B. mallei* com outras espécies e gêneros relacionados mostrou que *B. thailandensis* é a espécie mais relacionada a estas, apresentando 99.05% de similaridade (diferindo das duas em 12 pb), e também indica que todos os outros micro-organismos estudados possuem em suas sequências inserções e deleções que facilmente os distinguem de *B. pseudomallei* e *B. mallei*.

Nos resultados deste trabalho, estão diferenças baseadas em duas posições na região 16S do DNA ribossômico nuclear quando considerados apenas os 15 isolados de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará e as sequências publicadas das cinco cepas de *B.*

pseudomallei incluídas no alinhamento. Como o esperado, as sequências das regiões 16S DNAr de *B. pseudomallei* e *B. thailandensis* foram distintas, sendo que, nos mais de 1400 nucleotídeos analisados foram observadas diferenças em quatro posições. Assim como no trabalho realizado por Gee et al. (2003), o alinhamento das sequências publicadas das cinco cepas de *B. mallei* incluídas no estudo mostrou que estas sequências são idênticas, sugerindo assim que a região 16S DNAr seja mais conservada em *B. mallei* do que em *B. pseudomallei*. Esses autores, que também relatam a presença da mesma posição nucleotídica na região 16S DNAr observada neste estudo capaz de diferenciar *B. mallei* de *B. pseudomallei*, afirmam que essa posição pode ser de um alvo importante para a diferenciação molecular entre essas duas espécies. A presença de três posições nucleotídicas bem próximas (posições 946, 949 e 959 da região 16S DNAr) que distinguem *B. thailandensis* de *B. pseudomallei* e *B. mallei*, também pode atuar como um bom alvo para diferenciação molecular entre essas espécies.

O gênero *Burkholderia* foi criado da subdivisão do gênero *Pseudomonas* em cinco grupos baseados na homologia de hibridização DNA-DNA e RNA-DNA, pertencendo ao grupo RNA ribossômico tipo do II, juntamente com o gênero *Ralstonia*. O alvo molecular mais utilizado para a realização de análises filogenéticas de micro-organismos é a região 16S DNAr, sendo essa nova classificação baseada principalmente nas sequências dos genes que compõem essa região (TAYEB et al., 2008; SCHONMANN et al., 2009).

O sequenciamento do gene 16S DNAr contribui amplamente para a identificação e detecção desse grupo taxonômico por causa da disponibilidade de várias cópias desse alvo no genoma (*B. pseudomallei* possui quatro cópias dessa região, três presentes no cromossomo I e uma cópia presente no cromossomo II) em virtude da sua elevada conservação dentro de espécies procarióticas (LEE et al., 2007).

A comparação do genoma de *B. pseudomallei* com o de *B. mallei* sugere que *B. mallei* tenha evoluído em decorrência da “redução do genoma” de um clone isolado de *B. pseudomallei* (GODOY et al., 2003). Estudos de *microarray* de DNA baseados no sequenciamento do genoma completo da cepa *B. pseudomallei* K96243 são utilizados para comparar isolados de *B. pseudomallei*, *B. mallei* e *B. thailandensis*, sendo que a presença de deleções de regiões em *B. mallei* apresentaram significância no *cluster* genômico quando comparadas às presentes em *B. thailandensis*, que são mais uniformemente dispersadas. Isso indica que os processos de evolução que resultaram na divergência dessas três espécies devem ter ocorrido por mecanismos distintos (ONG et al., 2004).

É bem estabelecido na literatura o fato de que polimorfismos de comprimento ocorrem frequentemente nas regiões espaçadoras entre os genes 16S, 23S e 5S DNAr e variam também no número e no tipo de genes que codificam RNA transportador (RNAt), que também são

presentes nessas regiões. Com relação à região espaçadora 16S-23S do DNA ribossômico nuclear, *B. pseudomallei* possui dois genes que codificam RNAt: um para isoleucina e outro para alanina. O polimorfismo de comprimento dessa região espaçadora é observado nessa espécie, que possui dois tipos de 16S-23S DNAr dispostos aleatoriamente no genoma: um de aproximadamente 600 pb e outro com 668 pb (TYLER et al., 1995). Por conta disso, essa região não é apropriada para uso em análises filogenéticas, sendo utilizada principalmente para a discriminação de diferentes espécies. A fim de se observar diferenças genéticas na região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear entre os isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará, essa região foi sequenciada e, a partir do alinhamento múltiplo das sequências geradas, foram montadas duas matrizes que analisaram as diferenças e semelhanças encontradas entre os isolados em estudo.

Pelo sequenciamento dessa região, também foram analisados os sítios de ligação dos *primers* utilizados na PCR *semi-nested* (*primers* Bp1, Bp4 e Bp3) realizada neste estudo para a identificação de *B. pseudomallei*. De acordo com o relatado por Merritt et al. (2006), observou-se que o *primer* reverso Bp3 utilizado na segunda etapa de amplificação da reação de PCR não se liga ao sítio correspondente na região 16S-23S DNAr por apresentar quatro substituições e uma inserção nucleotídica que provavelmente ocorreram por erros no desenho desse *primer* no protocolo original dessa técnica.

A experiência com métodos de detecção de *B. pseudomallei* baseados em reações de PCR indicam que a identificação molecular dessa espécie focando apenas um alvo genético deve ser realizada com cautela, sendo necessária a interpretação conjunta das características fenotípicas e de outros recursos moleculares, como, por exemplo, o sequenciamento automatizado (MERRITT et al., 2006)

De acordo com Antonov et al. (2008), que testaram diferentes técnicas e alvos moleculares para a identificação e tipagem de *B. pseudomallei* e *B. mallei* e para avaliar a acurácia destes métodos, a realização de um *screening* inicial por PCR e o sequenciamento das regiões 16S DNAr, 16S-23S DNAr, 23S DNAr e/ou do gene *fliC* foram considerados os melhores alvos genéticos para a identificação dessas duas espécies.

Neste estudo, o uso da PCR para a amplificação de um fragmento de 302 pb da região 16S-23S DNAr foi suficiente para a correta identificação de *B. pseudomallei*, sendo que, para confirmar a discriminação entre *B. pseudomallei* e *B. mallei*, o sequenciamento da completa região 16S DNAr e o sequenciamento adicional da região 16S-23S DNAr foram realizados. A utilização dessas duas regiões como alvos genéticos para a identificação bem-sucedida de bactérias patogênicas, incluindo o gênero *Burkholderia*, é bem relatada por diversos autores (GEE et al., 2003; TYLER et al., 1995; ANTONOV et al., 2008). Dessa forma, a técnica de

PCR específica aliada ao sequenciamento das regiões 16S e 16S-23S do DNA ribossômico nuclear resultaram em uma elevada sensibilidade e especificidade de detecção de *B. pseudomallei* no estudo.

O grande avanço das técnicas baseadas na amplificação de DNA destaca o impacto desses métodos de detecção e identificação de micro-organismos no campo do diagnóstico microbiológico, sendo que as técnicas moleculares que focam como alvo as regiões 16S DNAr e 16S-23S DNAr reconhecidamente eficazes. Nos últimos anos, o desenvolvimento das técnicas de purificação de produtos de PCR e do sequenciamento automatizado de DNA reduziu drasticamente o tempo necessário para obtenção de sequências de DNA de excelente qualidade. A convergência dessas técnicas, associada aos avanços dos *softwares* computacionais, revolucionam a aplicação da análise de genes conservados para a identificação bacteriana (GEE et al., 2003).

Dessa forma, este estudo contribuiu para o estabelecimento de protocolos moleculares que garantem a correta identificação de *B. pseudomallei* por técnicas rápidas e de fácil execução, que provam ser úteis na discriminação de isolados estreitamente relacionados e trazem a perspectiva de estudos futuros de genotipagem que esclareçam questionamentos sobre temas importantes, como virulência e patogenicidade.

10. CONCLUSÕES

1. O protocolo para extração de DNA genômico de *B. pseudomallei* utilizado neste estudo foi bem-sucedido tanto para as amostras clínicas e ambientais de *B. pseudomallei*, oriundas do Estado do Ceará, como para a amostra de lavado brônquico alveolar de paciente com melioidose.
2. O diagnóstico molecular por PCR específica utilizando os *primers* Bp1 e Bp4 confirmou a identificação de *B. pseudomallei* em 48.4% dos isolados em estudo, demonstrando que o teste bioquímico semiautomatizado API 20NE não deve ser utilizado como método diagnóstico definitivo por não ser confiável para identificar *B. pseudomallei* e outros isolados desconhecidos de *Burkholderia* sp. de diferentes origens.
3. O sequenciamento automatizado das regiões 16S e 16S-23S do DNA ribossômico nuclear de *B. pseudomallei* confirmam a especificidade da técnica de PCR utilizada neste estudo para a identificação molecular da espécie.
4. A análise filogenética da região 16S do DNA ribossômico nuclear mostrou que os isolados de *B. pseudomallei* utilizados no estudo são evolutivamente agrupados com as cepas *B. pseudomallei* MSHR346 (Austrália), *B. pseudomallei* 1106a (Tailândia), *B. pseudomallei* K96243 (Tailândia), *B. pseudomallei* 1710b (Tailândia) e *B. pseudomallei* 668 (Austrália).
5. Este estudo contribuiu para o estabelecimento de protocolos moleculares que garantem a correta identificação de *B. pseudomallei* por técnicas rápidas e de fácil execução, que provam ser úteis na discriminação de isolados estreitamente relacionados e trazem a perspectiva de estudos de genotipagem, que esclareçam questionamentos sobre temas importantes, como virulência e patogenicidade.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, H.; LUIJNENBURG, M.E.; SALM, E.F.; et al. Changing epidemiology of melioidosis? A case of acute pulmonary melioidosis with fatal outcome imported from Brazil. **Epidemiol Infect.** v. 33, n. 5, p. 871-75, 2005.

ABBINK, F.C.; ORENDI, J.M.; DE BEAUFORT, A.J. Mother-to-child of *Burkholderia pseudomallei*. **N Eng J Med.** v. 344, p. 1171-72, 2001.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; et al. "Basic local alignment search tool." **J Mol Biol.** v. 215, p. 403-10, 1990.

AMORNCHAI, P.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUM, V.; et al. Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and latex agglutination test. **J Clin Microbiol.** v. 45, p. 3774-76, 2007.

ANTONOV, V.A.; TKACHENCO, G.A.; ALTUKHOVA, V.V.; et al. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? **Trans R Soc Med Hyg.** 102/S1, S134-39, 2008.

ANUNTAGOOL, N.; STITAYA, S. Antigenic relatedness between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Microbiol Immunol.** v. 46, p. 143-50, 2002.

ASHDOWN, L.R. An improved screening for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. **Pathol.** v. 11, p. 293-97, 1979.

ASHDOWN, L.R.; KOEHLER, J.M. Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 28, p. 2331-34, 1990.

BAUERNFEIND, A.; ROLLER, C.; MEYER, D.; et al. Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 2737-41, 1998.

BRAGA, M.D.M.; ALMEIDA, P.R.C. Primeira descrição de um caso autopsiado de melioidose no Estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 38, p. 58-60, 2005.

BRETT, P.J.; WOODS, D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. **Acta Trop.** v. 74, p. 201-10, 2000.

BROWN, N.F.; BEACHAM, I.R. Cloning and analysis of genomic differences unique by to *Burkholderia pseudomallei* by comparison with *B. thailandensis*. **J Med Microbiol.** v. 43, p. 933-1001, 2000.

CHANTRATITA, N.; VESARATCHAVEST, M.; WUTHIEKANUN, V.; et al. Short report: pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. **Am J Trop Med Hyg.** v. 74, n. 3, p. 345–47, 2006.

CHANTRATITA, N.; WUTHIEKANUN, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; et al. Prospective clinical evaluation of the accuracy of 16S rRNA real-time PCR assay for the diagnosis of melioidosis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 77, p. 814–17, 2007.

CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northern Thailand. **J Infect Dis.** v. 159, p. 890-99, 1989.

CHENG, A.C.; CURRIE, B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Clin Microbiol Rev.** v. 18, n. 2, p. 383-416, 2005.

CHOY, J.L.; MAYO, M.; JANMAAT, A.; et al. Animal melioidosis in Australia. **Acta Trop.** v. 46, p. 153-58, 2000.

COENYE, T.; VAMDAMME, P. ***Burkholderia: molecular microbiology and genomics.*** 45p. Horizon Bioscience, 1^o edition, 2006.

CURRIE, B.J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. **Eur Respir J.** v. 22, p 542-50, 2003.

CURRIE, B.J. Advances and remaining uncertainties in the epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis. **Trop Med Hyg.** 102/S1, S225-27, 2008.

CURRIE, B.J.; DANCE, D.A.B.; CHENG, A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. **Trop Med Hyg.** 102/S1, S1-4, 2008.

DANCE, D.A.B. Melioidosis: the tip of the iceberg? **Clin Microbiol Rev.** v. 4, n. 1, p. 52-60, 1991.

DANCE, D.A.B. Melioidosis as an emerging global problem. **Acta Trop.** v. 74, p. 115-19, 2000a.

DANCE, D.A.B. Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human-animal hosts. **Acta Trop.** v. 74, p. 159-168, 2000b.

DANCE, D.A.B.; WUTHIEKANUM, V.; CHAOWAGUL, W.; et al. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of a simple screening tests and API 20NE. **J Clin Pathol.** v. 42, p. 645-48, 1989.

DHARAKUL, T.; SONGSIVILAI, S.; VIRIYACHITRA, S.; et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis. **J Clin Microbiol.** v. 34, n.3, p. 609-14, 1996.

DEEPAK, R.N.; CRAWLEY, B.; PHANG, E. *Burkholderia pseudomallei* identification: a comparison between the API 20NE and VITEK 2 GN systems. **Trop Med Hyg.** v. 102/S1, S42-44, 2008.

DIETRICH, G. DNA microarrays in vaccine research. **Curr Opin Mol Ther.** v. 5, p. 575-83, 2003.

ECK, R.V.; DAYHOFF, M.O. **Atlas of Protein Sequence and Structure.** National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland, 1966.

ELLIS, J.F.; TITBALL, R.W. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. **Infect Dis Rev.** v. 1, n. 3, p. 174-81, 1999.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** v.8, p. 175-85, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** v. 8, p.186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evol.** v. 39, p.783-791, 1985.

GAL, D.; MAYO, M.; SPENCER, E.; et al. Short report: application of a polymerase chain reaction to detect *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens from patients with suspected melioidosis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 73, n. 6, p. 1162-64, 2005.

GALIMAND, M.; DODIN, A. Le point sur la mélioiïdose dans le monde. **Bull Soc Pathol Exot.** v. 75, p. 375-83, 1982.

GLASS, M.B.; POPOVIC, T. Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **J Clin Microbiol.** v. 43, p. 479-83, 2005.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.** v. 8, p.195-202, 1998.

GOSHORN, R.K. Recrudescence pulmonary melioidosis: a case report involving the so called "Vietnamese time bomb". **Indian Med.** v. 80, p. 247-49, 1987.

GEE, J.E.; SACCHI, C.T.; GLASS, M.B.; et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 10, p. 4647-54, 2003.

GODOY, D.; RANDLE, G.; SIMPSON, A.J.; et al. Multilocus Sequence Typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J Clin Microbiol.** v. 41, n. 5, p. 2068-79, 2003.

HAASE, A.; SMITH-VAUGHAN, H.; MELDER, A.; et al. Subdivision of *Burkholderia pseudomallei* ribotype into multiple types by random amplified polymorphic DNA analysis provides new insights into epidemiology. **J Clin Microbiol.** v. 33, p. 1687–90, 1995.

HAASE, A.; BRENNAN, M.; BARRETT, S.; et al. Evaluation of PCR for diagnosis of melioidosis. **J Clin Microbiol.** v. 36, p.1039-41, 1998.

HALDER, D.; ABDULLAN, W.A.; JOHARI, M.J.; et al. Neonatal melioidosis. **Singapore Med J.** v. 34, p. 85-86, 1993.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symp.** n. 41, p. 95-98, 1999.

HOLDEN, M.T.G.; TITBALL, R.W.; PEACOCK, S.J.; et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 101, n. 39, p. 14240-245, 2004.

HOLDER, M.; LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature Rev Gen.** v. 4, p. 275-84, 2003.

HOWARD, K.; INGLIS, T.J.J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 41, p. 3312-16, 2003.

INGLIS, T.J.J.; CHIANG, D.; LEE, G.S.; et al. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE. **Pathol.** v. 30. p. 62-64, 1998.

INGLIS, T.J.J.; RIGBY, P.; ROBERTSON, T.A.; et al. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and scape. **Infect Immun.** v. 68, p. 1681-86, 2000.

INGLIS, T.J.J.; MEE, B.J.; CHANG, B.J. The environmental microbiology of melioidosis. **Rev Med Microbiol.** v. 12, n. 1, p. 13-20, 2001.

INGLIS, T.J.J.; FOSTER, N.F.; GAL, D.P.K.; MAYO, M.J.; NORTON, R.; CURRIE, B.J. Preliminary report on the northern Australian melioidosis environmental surveillance project. **Epidemiol Infect.** v. 132, p. 813-20, 2004.

INGLIS, T.J.J.; MERRITT, A.; CHIDLOW, G.; et al. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 43, p. 2201-06, 2005.

INGLIS, T.J.J.; ROLIM, D.B.; SOUSA, A.Q. Melioidosis in the Americas. **Am J Trop Med Hyg.** v. 75, p. 947-54, 2006.

JENNEY, A.W.J.; LUM, G.; FISHER, D.A.; CURRIE, B.J. Antibiotic susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* from tropical northern Australia and implications for therapy of melioidosis. **Inter J Antimicrob Agents.** v.17, p. 109-13, 2001.

KIRATISIN, P.; SANTANIRAND, P.; CHANTRATIDA, N.; et al. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 59, p. 277-81, 2007.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, M.D.; JANDA, W.M.; et al. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In: ___ **Diagnóstico Microbiológico**, 5^a Ed. Medsi. p. 263-247, 2001.

KUNAKORN, M.; MARKHAM, R.B. Clinically practical semi-nested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by immunoassay with and without solution hybridization. **J Clin Microbiol.** v. 33, p. 2131-35, 1995.

KUNAKORN, M.; RAKSAKAIT, K.; C.; SETHAUDOM, R.; et al. Comparison of three PCR primer sets for diagnoses of septicemic melioidosis. **Acta Trop.** v. 74, p. 247-51, 2000.

LEE, M.; WANG, D.; YAP, E.H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 43, p. 413-17, 2005.

LEE, S.; CHONG, C.; LIM, B.; et al. *Burkholderia pseudomallei* animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics. **Diag Microbiol Infect Dis.** v. 58, p. 263–70, 2007.

LEELARASAMEE, A.; BOVORKITTI, S. Melioidosis: review and update. **Rev Infect Dis.** v.11, p.413-25, 1989.

LEELARASAMEE, A. Recent development in melioidosis. **Curr Opin Infect Dis.** v.17, p. 131-36, 2004.

LEELAYUWAT, C.; ROMPHRUK, A.; LULITANOND, A.; et al. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. **Acta Tropica.** v. 77, p. 229–37, 2000.

LEW, A.E.; DESMARCHELIER, P.M. Molecular typing of *Pseudomonas pseudomallei*: restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes. **J Clin Microbiol.** v. 31, p. 533–39, 1993.

LEW, A.E.; DESMARCHELIER, P.M. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. **J Clin Microbiol.** v. 32, p. 1326–32, 1994.

LIU, Y.; WANG, D.; YAP, E.H.; et al. Identification of a novel repetitive DNA element and its use as a molecular marker for strain typing and discrimination of ara- and ara+ *Burkholderia pseudomallei* isolates. **J Med Microbiol.** v. 51, p. 76-82, 2002.

LOWE, P.; ENGLER, C.; NORTON, R. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 4625-27, 2002.

LOWE, P.; HASWELL, H.; LEWIS, K. Use of various common isolation media to evaluate the new VITEK2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 44, p. 856-66, 2006.

LUCATELLI, J.F.; CANTARELLI, V.V.; PICOLI, S.U. Conjutivite por *Achromobacter xylosoxidans*: relato de caso. **Arq Bras Oftamol.** v. 72, p. 261-3, 2009.

LUMBIGANON, P.; PENGSA, K.; PUAPERMPHOONSIRI, S.; et al. Neonatal melioidosis: a report of 5 cases. **Pediatr Infect Dis J.** v.7, p. 634-36, 1988.

McCOMBIE, R.L.; FINKELSTEIN, R.A.; WOODS, D.E. Multilocus Sequence Typing of historical *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in southeast Asia from 1964 to 1967 provides insight into the epidemiology of melioidosis. **J Clin Microbiol.** v. 44, n. 8, p. 2951-62, 2006.

McCORMICK, J.B.; SEXTON, D.J.; McMURRAY, J.G.; et al. Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. **Ann Intern Med.** v. 83, p. 512-13, 1975.

MERRITT, A.; INGLIS, T.J.J.; CHIDLOW, G.; et al. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v. 48, n. 5, p.239-44, 2006.

MEUMANN, E.M.; GAL, D.; NOVAK, R.T.; et al. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis. **J Clin Microbiol.** v. 44, p. 3028–30, 2006.

MOLLARET, H.H. 'L' affaire du jardin des plate's ou comment la mélioiïdose fit son apparition en France. **Med Mal Infect.** v.18, p. 643-54, 1988.

MOORE, R.A.; RECKSEIDLER-ZENTENO, S.; KIM, H.; et al. Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Infect Immun.** v. 72, p. 4172-87, 2004.

MOORE, R.A.; TUANYOK, A.; WOODS, D.E. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in water. **BCM Research Notes.** v. 1, p. 11, 2008.

NEY, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Oxford University Press, New York, 2000.

NGAUY, V.; LEMESHEV, Y.; SADKOWSKI, L.; et al. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 2, p. 970-72, 2005.

NOVAK, R.T.; GLASS, M.B.; GEE, J.E.; et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol.** v. 44, p. 85–90, 2006.

O'CARROLL, M.R.; KIDD, T.J.; COULTER, C.; et al. *Burkholderia pseudomallei*: another emerging pathogen in cystic fibrosis. **Thorax.** v. 58, p.1087-91, 2003.

ONG, C.; OOI, C. H.; WANG, D.; et al. Patterns of large-scale genomic variation in virulent and a virulent *Burkholderia* species. **Genome Res.** v. 14, p. 2295-2307, 2004.

PARTHASARATHY, N.; DESHAZER, D.; ENGLAND, D.; et al. Polysaccharide microarray technology for the detection of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* antibodies. **Diag Microbiol Infect Dis.** v. 56, n. 3, p. 329–32, 2006.

PEARSON, T.; U'REN, J.M.; SCHUPP, J.M.; et al. VNTR analysis of selected outbreaks of *Burkholderia pseudomallei* in Australia. **Infect Gen Evol.** v. 7, p. 416–23, 2007.

PEACOCK, S.J.; SCHWEINZER, H.P.; DANCE, D.A.B; et al. Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **Emerg Infect Dis.** v.14, 2008 (on line report).

PERUSKI, A.H.; PERUSKI-JR, L.F. Immunological methods for detection and identification of infectious diseases and biological warfare agents. **Clin Diag Lab Immunol.** v. 10, p. 506-13, 2003.

PESTANA DE CASTRO, A.F.; CAMPEDELLI, O.; GIORGI, W.; et al. Considerações sobre a melioidose e o seu agente casual: *Pseudomonas pseudomallei*. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v. 15, p. 43-49, 1973.

PILATZ, S.; BREITBACH, K.; HEIN, N.; et al. Identification of *Burkholderia pseudomallei* genes required for the intracellular life cycle and in vivo virulence. **Infect Immun.** v. 74, n. 6, p. 3576–86, 2006.

PITT, T.L.; TRAKULSOMBOON, S.; DANCE, D.A.B. Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Tropica.* v. 74, p. 181-85, 2000.

RAJA, N.S. Cases of melioidosis in a university teaching hospital in Malaysia. **J Microbiol Immunol Infect.** v. 41, p. 174-79, 2008.

RALF, A.; MCBRIDE, J.; CURRIE, B.J. Transmission of *Burkholderia pseudomallei* via breast milk in northern Australia. **Pediatr Infect Dis J.** v. 23, p. 1169-71, 2004.

RECKSEIDLER, D.L.; DE SHAZER, D.; SOKOL, P.; et al. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. **Infect Immun.** v. 69, p. 34-44, 2001.

ROLIM, D.B.; VILAR, D.C.F.L.; SOUSA, A.Q.; et al. Melioidosis, northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 11, n. 9, p. 1458-60, 2005.

ROLIM, D.B.; ROCHA, M.F.G.; BRILHANTE, R.S.N.; et al. Environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceará State, northeastern Brazil. **Appl Environ Microbiol.** v. 75, p. 1215-18, 2009.

ROTZ, L.D.; KHAN, A.S.; LILIBRIDGE, S.R.; et al. M. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerg Infect Dis.** v. 8, p. 225-30, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHMOOCK, G.; EHRLICH, R.; MELZER, F.; et al. DNA microarray-based detection of *B. mallei*, *B. pseudomallei* and *Burkholderia* spp. **Mol Cell Probes.** v. 23, p. 178-87, 2009.

SCHONMANN, S.; LOY, A.; WIMMERSBERGER, C.; SOBEK, J.; et al. 16S rRNA gene-based phylogenetic microarray for simultaneous identification members of the genus *Burkholderia*. **Environ Microbiol.** v. 11, p. 779-800, 2009.

SCHWEITER, B.; PREDKI, P.; SNYDER, M. Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. **Proteomics.** v. 3, p. 2190–99, 2003.

SERMSWAN, R.W.; WONGRATANACHEEWIN, S.; TATTAWASART, U.; et al. Construction of a specific DNA probe for diagnosis of melioidosis and use as an epidemiological marker of *Pseudomonas pseudomallei*. **Mol Cell Probes.** v. 8, p. 1–9, 1994.

SERMSWAN, R.W.; WONGRATACHEEWIN, S.; ANUNTAGOOL, N.; et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. **Am J Trop Med Hyg.** v. 63, n. 3-4, p. 146-149, 2000.

SEXTON, M.M.; GOEBEL, L.A.; DODFREY, A.J.; et al. Ribotype analysis of *Pseudomonas pseudomallei* isolates. **J Clin Microbiol.** v. 31, p. 238–43, 1993.

SEWEL, D.L. Laboratory safety practices associated with agents of biocrime or bioterrorism. **J Clin Microbiol.** v. 41, p. 2801-09, 2003.

SHORT, B.H. Melioidosis: an important emerging infectious disease – a military problem?. **ADF Health.** v. 3, p. 13-21, 2002.

SIRISINHA, S.; AMUNTAGOOL, N.; DHARAKUL, T.; et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. **Acta Trop.** v. 74, p. 235-45, 2000.

SMITH, M. D.; ANGUS, B. J.; WUTHIEKANUM, V.; et al. Arabinose assimilation defines a non-virulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect Immun.** v. 65, n. 11, p. 4319-21, 1997.

SPRAGUE, L.D.; NEUBAUER, H. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. **J Vet Med.** v.51, p. 305-20, 2004.

STANTON, A.T.; FLETCHER, W. Melioidosis, a new disease of the tropics. **Trans Fourth Congr Far East Assoc Trop Med.** v. 2, p. 196-98, 1921.

STEVENS, M.P.; GALYOV, E.E. Exploitation of host cells by *Burkholderia pseudomallei*. **Int J Med Microbiol.** v. 293, p. 549-55, 2004.

SUPRAPOM, C.; WANG, D.; LEELAYUWAT, C.; et al. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. **J Clin Microbiol.** v. 45, n. 9, p. 2894–2901, 2007.

SUPUTTAMONGKOL Y.; CHAOWAQUI, W.; CHETCHOTISAKD, P.; et al. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis. **Clin Infect Dis.** v. 29, p. 408-13, 1999.

TANPIBOONSAK, S.; PAEMANEE, A.; BUNYARATAPHAN, S.; et al. PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **Mol Cell Probes.** v. 18, p. 97–101, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **M Biol Evol.** v. 24, p.1596-99, 2007.

TAYEB, L.A.; LEFREVE, M.; PASSET, V.; et al. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. **Res Microbiol.** v. 159, p. 169-77, 2008.

THIBAUT, F.M.; VALADE, E.; VIDAL, D.R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. **J Clin Microbiol.** v. 42, n. 12, p. 5871–74, 2004.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nuc Acids Res.** v. 24, p. 4876 – 4882, 1997.

TOMASO, H.; PITT, T.L.; LANDT, O.; et al. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. **Mol Cell Probes.** v. 19, p. 9–20, 2005.

TRAKULSOMBOON, S.; PITT, T.L.; DANCE, D.A.B. Molecular typing of *Pseudomonas pseudomallei* from imported primates in Britain. **Vet Rec.** v. 135, p. 65–66, 1994.

TRAKULSOMBOON, S.; DANCE, D.A.B.; SMITH, M.D.; et al. Ribotype differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. **J Med Microbiol.** v. 46, p. 565–70, 1997.

TYLER, S.D.; STRATHDEE, C.A.; ROZEE, K.R.; et al. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic *Pseudomonas* on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 2, n. 4, p. 448-53, 1995.

TUANYOK, A.; TOM, M.; DUNBAR, J.; et al. Genome-wide expression analysis of *Burkholderia pseudomallei* infection in a hamster model of acute melioidosis. **Infect Immun.** v. 74, n. 10, p. 5465-76, 2006.

TUNGPRADABKUL, S.; WAJANAROGANA, S.; TUNPIBOONSAK, S.; et al. PCR-RFLP analysis of the flagellin sequences for identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia cepacia* from clinical isolates. **Mol Cell Probes.** v. 13, p. 99–105, 1999.

ULETT, G.C.; LABROOY, J.T.; CURRIE, B.J.; et al. A model of immunity to *Burkholderia pseudomallei*: unique responses following immunization and acute lethal infection. **Microb Infect.** v. 7, p. 1263–75, 2005.

U'REN, J. M.; ERT, M. N. V.; SCHUPP, J. M.; et al. Use of a real-time PCR TaqMan assay for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5771-74, 2005.

U'REN, J. M.; HORNSTRA, H.; PEARSON, T.; et al. Fine-scale genetic diversity among *Burkholderia pseudomallei* soil isolates in northeast Thailand. **Appl Environ Microbiol.** v. 73, n. 20, p. 6678-6681, 2007b.

VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S.D.; MIFSUD, A.; et al. Ribotyping and DNA macrorestriction analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from cases of melioidosis in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 91, p. 358–60, 1997.

VALENZUELA, M.E.M. Gênero *Pandoraea*. **Rev Chil Infect.** v. 27, p. 407-8, 2007.

VESARATCHAVEST, M.; TUMAPA, S.; DAY, N.P.J.; et al. Non-random distribution of *Burkholderia pseudomallei* clones in relation to geographical location and virulence. **J Clin Microbiol.** v. 44, n. 7, p. 2553-57, 2006.

VIRGÍNIO, C.G. **Aspectos fenotípicos de amostras de *Burkholderia pseudomallei* isoladas de uma microepidemia no município de Tejuçuoca, CE.** 2005. 06-09f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

VUDDHAKUL, V.; THARAVICHITKUL, P.; NA-NGAM, N.; et al. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. **Am J Trop Med Hyg.** v. 60, n. 3, p. 458-61, 1999.

WALSH, A.L.; WUTHIEKANUM, V. The laboratory diagnosis of melioidosis. **Brit J Biomed Sci.** v. 53, p. 249-53, 1996.

WATTIAU, P.; HESSCHE, M.V.; NEUBAUER, H.; et al. Identification of *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria by Multiple-Locus Sequence Typing-derived PCR and real-time PCR. **J Clin Microbiol.** v. 45, n. 3, p. 1045-48, 2007.

WHITE, N.J. Melioidosis. **The Lancet.** v. 361, p. 1715-22, 2003.

WHITMORE, A.; KRISHNASWAMI, C.I. An account of the discovery of a hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. **Indian Med Gaz.** v. 47, p. 262-67, 1912.

WHITMORE, A. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. **J Hyg.** v. 13, p. 1-34, 1913.

WIERSINGA, W.J.; VAN DER POLL, T.; WHITE, N.J.; et al. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. **Nat Rev Microbiol.** v. 4, p. 272-82, 2006.

WINSTANLEY, C.; HALES, B.A.; HART, C.A. Evidence for the presence in *Burkholderia pseudomallei* of a type III secretion system-associated gene cluster. **J Med Microbiol.** v. 48, p. 649–56, 1999.

WINSTANLEY, C.; HART, C.A. Presence of Type III Secretion Genes in *Burkholderia pseudomallei* Correlates with Ara⁻ Phenotypes. **J Clin Microbiol.** v. 38, n. 2, p. 883-85, 2000.

WONGRATANACHEEWIN, S.; KOMUTRIN, K.; SERMSWAN, R.W. Use of multiplex PCR patterns as genetic markers for *Burkholderia pseudomallei*. **Acta Tropica.** v. 74, p. 193–99, 2000.

WUTHIEKANUM, V.; SMITH, M.D.; DANCE, D.A.B.; et al. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. **J Med Microbiol.** v. 45, p. 408-412, 1996.

WUTHIEKANUM, V.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; SIMPSON, A.J.H.; et al. Value of Throat Swab in Diagnosis of Melioidosis. **J Clin Microb.** v. 39, n. 10, 3801-02, 2001.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; et al. 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* comb. nov. **Microbiol Immunol.** v. 36, p. 1251-75, 1992.

YAP, E.P.H.; ANG, S.M.; SEAH, S.G.K.; et al. Homogenous assays for the rapid PCR detection of *Burkholderia pseudomallei* 16S rRNA gene on a real-time fluorometric capillary thermocycler, p. 59–70, 2002. In REISCHL, U.; WITTWER, C.; COCKERILL, F. (ed.), **Rapid cycle real-time PCR— methods and applications: microbiology and food analysis.** Springer, New York, NY.

YEN, M.W.S.; LISANTI, O.; THIBAUT, F.; et al. Validation of ten new polymorphic tandem repeat loci and application to the MVLA typing of isolates collected in Singapore from 1988 to 2004. **J Microbiol Methods.** v. 77, p. 297-301, 2009.

YU, Y.; KIM, H.S.; CHUA, H.H.; et al. Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. **BMC Microbiology**. v. 6, n. 46, 2006.

ANEXOS

ANEXO I

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

WIZARD[®] GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (Promega, Estados Unidos).

PROCEDIMENTO:

- 1- Adicionar 1.8 mL da cultura bacteriana (com crescimento *overnight* em caldo BHI) em microtubo de 1.5 mL;
- 2- Centrifugar de 13.000-16.000 x g por 2 minutos. Remover o sobrenadante;
- 3- Adicionar 600 µL de solução de lise nucléica. Pipetar gentilmente até as células serem resuspendidas;
- 4- Incubar a 80°C por 5 minutos para a lise celular, e então deixar esfriar a temperatura ambiente;
- 5- Adicionar 4 µL de solução Rnase e inverter o tubo de 2 a 5 vezes para misturar;
- 6- Incubar a 37°C de 15 a 60 minutos. Deixar esfriar a temperatura ambiente;
- 7- Adicionar 200 µL de solução de precipitação de proteínas para as células lisadas tratadas com a Rnase. Agitar vigorosamente no vórtex em velocidade máxima por 20 segundos;
- 8- Incubar a amostra no gelo por 5 minutos;
- 9- Centrifugar de 13.000-16.000 x g por 3 minutos;
- 10- Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um microtubo de 1.5 mL limpo contendo 600 µL de isopropanol;
- 11- Misturar gentilmente por inversão o conteúdo até que uma faixa de DNA forme uma massa visível;
- 12- Centrifugar de 13.000-16.000 x g por 2 minutos;
- 13- Cuidado ao desprezar o sobrenadante e secar o tubo com papel absorvente limpo. Adicionar 600 µL de etanol (70%) e inverter o tubo muitas vezes para lavar o pellet de DNA;
- 14- Centrifugar de 13.000-16.000 x g por 2 minutos. Aspirar o etanol com cuidado e desprezar;
- 15- Seque o tubo com papel absorvente limpo e deixe o pellet ao ar seco de 10 a 15 minutos;
- 16- Adicionar 100 µL de solução de rehidratação de DNA e rehidrate o material por incubação a 65°C por 60 minutos. Feito isso, rehidrate o DNA por incubação da solução de rehidratação em *overnight* a temperatura ambiente ou a 4°C;
- 17- Estoque o DNA de 2 a 8°C.

ANEXO II

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE CULTURA DE CÉLULAS

WIZARD[®] GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (Promega, Estados Unidos).

PROCEDIMENTO:

- 1- Transferir 1.8 mL do espécime clínico para um microtubo de 1.5 mL;
- 2- Centrifugar a 13.000-16.000 x g por 10 segundos para formação de pellet de células;
- 3- Remover o sobrenadante, deixar entre o pellet de células entre 10-50 µL de líquido residual;
- 4- Adicionar 200 µL de PBS para lavar as células. Centrifugar como na etapa 2. Retirar o PBS. Vortexar vigorosamente para ressuspender as células;
- 5- Adicionar 600 µL de solução de lise nucléica e pipetar para lise das células. Pipetar até não observar massa de células na solução;
- 6- Adicionar 3 µL de solução RNase no lisado nuclear e misturar a amostra por inversão do tubo de 2-5 vezes. Incubar a mistura por 15-30 minutos a 37°C. Deixar a amostra esfriar a temperatura ambiente por 5 minutos;
- 7- Adicionar 200 µL de solução de precipitação de proteínas e vortexar vigorosamente em alta velocidade por 20 segundos. Resfriar a amostra no gelo por 5 minutos;
- 8- Centrifugar por 4 minutos a 13.000-16.000 x g. O precipitado protéico deverá formar um pellet de massa branca;
- 9- Cuidadosamente remova o sobrenadante contendo o DNA (deixe o pellet de proteínas no tubo) e transfira para um microtubo limpo de 1.5ml contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente;
- 10- Gentilmente misture a solução por inversão até que se forme um cordão de massa visível de DNA;
- 11- Centrifugar por 1 minuto a 13.000-16.000 x g em temperatura ambiente. O DNA será visível como um pequeno pellet branco. Cuidadosamente decante o sobrenadante;
- 12- Adicionar 600 µL de etanol a 70% em temperatura ambiente e gentilmente inverta o tubo diversas vezes para lavar o DNA. Centrifugar por 1 minuto a 13.000-16.000 x g a temperatura ambiente;
- 13- Cuidadosamente aspire o etanol usando pipeta automática. O pellet de DNA é muito frouxo e nesse ponto é preciso muito cuidado evitar que o pellet seja aspirado durante a pipetagem;
- 14- Inverter o tubo em papel absorvente limpo e secar o pellet ao ambiente por 10-15 minutos;
- 15- Adicionar 100 µL de solução de rehidratação de DNA e rehidratar o DNA por incubação a 65°C por 1 hora. Feito isso, rehidrate o DNA por incubação da solução de rehidratação em *overnight* a temperatura ambiente ou a 4°C;
- 16- Estoque o DNA a 2-8°C.

ANEXO III

PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DE DNA (PRODUTOS DE PCR)

KIT GFX™ PCR DNA AND GEL BAND PURIFICATION (GE Healthcare, USA)

PROCEDIMENTO:

- 1- Transferir toda a amostra de reação de PCR para um microtubo de 2 mL e adicionar 500 µL de tampão de captura tipo 2, misturando bem;
- 2- Transferir todo o volume para um microtubo contendo a coluna do filtro e dar spin de 30 segundos na centrifuga;
- 3- Descartar volume do microtubo e recolocar a coluna com o filtro no mesmo;
- 4- Adicionar 500 µL de tampão de lavagem tipo 1 na coluna e dar spin de 30 segundos;
- 5- Transferir coluna com filtro para um novo microtubo limpo;
- 6- Adicionar 50 µL de tampão de eluição e dar spin por 1 minuto;
- 7- Descartar filtro;
- 8- Estocar a -20°C.

ANEXO IV

PROTOCOLO PARA PRECIPITAÇÃO DE DNA EM PLACA DE SEQUENCIAMENTO

PROCEDIMENTO:

- 1- Com o auxílio de pipeta multicanal, adicionar 20 µL de isopropanol 80% em cada poço da placa de sequenciamento;
- 2- Agitar vigorosamente por 20 segundos em vórtex para placa;
- 3- Centrifugar placa por 50 minutos a 4°C (4000 rpm);
- 4- Descartar isopropanol e dar spin invertido de 5 segundos na centrífuga;
- 5- Adicionar 45 µL de etanol 75% em todos os poços;
- 6- Centrifugar por 10 minutos a 20°C (4000 rpm);
- 7- Descartar etanol e dar spin invertido de 5 segundos;
- 8- Deixar secar até que todo o álcool evapore (em torno de 15 minutos);
- 9- Adicionar 10 µL de *loading solution* (faz parte do kit se sequenciamento) em todos os poços da placa;
- 10- Adicionar 10 µL de agarose a 0.12% e agitar vigorosamente em vórtex por 20 segundos;
- 11- Estocar a -20°C.

ANEXO VI

Alinhamento múltiplo das sequências da região 16S-23S do DNA ribossômico nuclear de isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* oriundos do Estado do Ceará.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CEMM 03-06-039 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-041 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-040 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-043 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-042 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-044 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-045 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-046 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-047 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-048 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-033 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-034 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-035 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-036 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG
CEMM 03-06-037 GGCTGGATCACCTCCTTTCTCGAGCTTATTTCCGCGAAGTTGAGCGCTCACGCTTATCGGCTGTA AATTAGGACAGACTCAGGGGTCTGTAGCTCAGTCG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CEMM 03-06-039 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-041 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-040 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-042 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-044 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-045 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-046 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-047 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-048 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-033 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-034 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
CEMM 03-06-035 GTTAGAGCACCGTCTTGATAAAGCGGGGGTCTGGTTGTTTCAATCCAACCAGACCCACCAATTGTCTGGCGGAAAAACCTGAGTGTCTCTGTATGGGGGG-
```


610

....|....|...

CEMM 03-06-039 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-041 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-040 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-043 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-042 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-044 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-045 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-046 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-047 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-048 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-033 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-034 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-035 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-036 CAGACTCGTTATA
CEMM 03-06-037 CAGACTCGTTATA

PUBLICAÇÕES

Será submetido ao Periódico: *Applied and Environmental Microbiology*

Fator de impacto: 3.801 (Qualis A1)

TÍTULO

Molecular identification of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Northeastern Brazil based on 16S and 16S-23S small subunit ribosomal RNA genes sequences

Manuela Soares Couto^{a,b}, Thalles Barbosa Grangeiro^c, Rossana de Aguiar Cordeiro^{a,b,c},
Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,d}, José Júlio Costa Sidrim^{a,b} and Raimunda Sâmia Nogueira
Brilhante^{a,b,*}

^aSpecialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^bPostgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^cDepartment of Biological Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^dPostgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Department of Biological Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Abstract

Melioidosis has been considered an emerging disease in Brazil since the first cases were reported to occur in the northeast region. The goal of our study was identify by molecular methods 31 clinical and environmental strains of *Burkholderia pseudomallei* from Northeastern Brazil previously identified by API 20NE by evaluate of sequences from 16S and 16S-23S rRNA genes. *B. pseudomallei* was confirmed in 5 clinical (100%) and 10 environmental (38.4%) of 31 isolates used in this study.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, specific PCR, 16S and 16S-23S rRNA sequences.

Introduction

Melioidosis is an endemic disease in Southeast Asia and Northern Australia and also occurs sporadically in other parts of world. In Brazil, it has been considered an emerging disease since the first cases reported in the northeast region (Rolim et al., 2009). *Burkholderia pseudomallei* is readily recovered from water and wet soil in paddy fields within endemic areas (Holden et al., 2004). Bacterial transmission is believed to occur by inhalation of contaminated dust, ingestion of contaminated water, and contact with contaminated soil or water especially through abraded skin (Stevens and Galyov, 2004; Ulett et al., 2005). Human melioidosis exhibits a diverse clinical picture ranging from an asymptomatic state, to benign pneumonitis, to acute or chronic pneumonia, or to overwhelming septicemia (Suprapom et al., 2007). Relapse of disease is common even in patients treated with appropriate antibiotics (Stevens and Galyov, 2004).

Melioidosis is an emerging life-threatening disease; the true incidence remains unknown in many parts of the world due to lack of awareness of the disease and a lack of laboratory diagnostic tools (Lee et al., 2007). In Brazil, few extensive studies have been done on melioidosis, and little is known about the microbiological features and ecological behavior of *B. pseudomallei* (Rolim et al., 2009).

For this organism, biosafety level 3 laboratory facilities are recommended when there is a potential risk of aerosolization of the pathogens because of the risk of laboratory-acquired infections (Peacock et al., 2008) The diagnosis of melioidosis relies on an extensive set of biochemical tests and observation of colony and cell morphology, which may take up to 7 days to complete (Inglis et al., 2005). Rapid identification by molecular methods may be useful in defining the source of infection, since melioidosis is primarily associated with environmental exposure to *B. pseudomallei* (Inglis et al., 2000).

Over the last few years, the increasing use of PCR, rapid template purification, and automated DNA sequencing has dramatically reduced the time necessary to yield a high-quality sequence. The use of 16S rRNA gene sequencing to study the relatedness of prokaryotic species is well established and has led to increased availability of 16S rRNA databases (Schonmam et al., 2009). It was recently reported that subtle sequence differences in the 16S rRNA gene could be used for species identification (Gee et al., 2003) and for subtyping and identifying hypervirulent bacterial clones (Pitt et al., 2000). Consequently, the goal of this study was identify by molecular methods 31 clinical and environmental strains of *B. pseudomallei* from Ceará State Northeastern Brazil by evaluate of sequences from 16S and 16S-23S rRNA genes.

Materials and methods

Bacterial strains: 31 *B. pseudomallei* (5 humans and 26 environmental) strains from a collection of CEMM were used in this study. Identification of strains was carried out with a standard battery of biochemical tests: the strains were identified phenotypically according to the criteria described for Gram-negative nonfermentative bacilli and by characteristics such as motility and bipolar stain (Virgínio et al., 2006). The strains of *B. pseudomallei* also were submitted to the oxidase test and colistin (10 µg/ml) sensitivity test, through disk diffusion in Mueller-Hinton medium. Then the *B. pseudomallei* diagnosis was confirmed through API20NE - BioMerieux (Inglis et al., 2004).

DNA extraction: For the extraction of genomic DNA, the *B. pseudomallei* strains were initially cultured on blood agar medium at 37°C for 24 to 48 h. A single colony was then inoculated into 10 ml of brain-heart infusion broth and incubated at 37°C overnight. The total genomic DNA were extracted and purified using a protocol for Gram-negative bacteria from the WIZARD[®] Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, USA), according to the manufacture's instructions. The concentration and purity of the DNA preparation were determined by measuring the optical density at 260 and 280 nm, using a spectrophotometer (Ultrospec 1100 pro; Amersham Bioscience, USA). Aliquots of DNA obtained from strains after first treatment with buffer lysis were incubated in brain-heart infusion broth at 37°C for 7 days. The absence of any growth assured the safety of the procedure.

Amplification of specific 16S-23S spacer region of *B. pseudomallei*: For molecular diagnosis, a PCR was performed according to Couto et al. (2009). The reaction was

performed in a final volume of 25 μ L containing 10 μ L of DNA sample (30 ng/ μ L), 2.5 μ L of buffer (New England Biolabs, UK), 1 mmol/L of MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, USA), 50 pmol each of the primers Bp1 (5'-CGATGATCGTTGGCGCTT-3') and Bp4 (5'-CGTTGTGCCGTATTCCAAT-3'), 10 mmol/L of pooled deoxynucleoside triphosphates and 1 U of *Taq* polymerase (New England Biolabs, UK). PCR comprised 4 min at 94°C, followed by 45 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C and 45 s at 72°C, with a final hold for 7 min at 72°C. PCR products were demonstrated by ethidium bromide gel electrophoresis on 1% agar gel and visualized under a UV light.

16S and 16S-23S rRNA genes sequencing: The 16S sequence was amplified by PCR using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Amplification reactions were performed in a final volume of 25 μ L containing 200 ng of genomic DNA, 1X Green GoTaq reaction buffer (Promega, Madison, USA), 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), 12.5 pmoles of each primer and 1.25 units of GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). Cycling parameters were as follow: an initial denaturation step (2 min at 95 °C) followed by 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 62 °C, and 1.5 min at 72 °C. After the last cycle, reactions were further incubated for 5 min at 72 °C. The 16S-23S sequence was amplified by PCR using the primers 16S1400F (CCCGTCACACCATGGGAG) and 23S90R (ATCGCCAAGGCATCCACC). Amplification reactions were performed in a final volume of 25 μ L containing 200 ng of genomic DNA, 1X Green GoTaq reaction buffer (Promega, Madison, USA), 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L of each dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), 12.5 pmoles of each primer and 1.25 units of GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). Cycling parameters were as follow: an initial denaturation step (2 min at 95 °C) followed by 33 cycles of 30 seg at 95 °C, 1 min at 65 °C, and 1 min at 72 °C. After the last cycle, reactions were further incubated for 8 min at 72 °C. For both 16S and 16S-23S rRNA amplicons, the amplification of the DNA band with the expected size was checked by analyzing a 2 μ L aliquot of PCR reactions by 1.0% agarose gel electrophoresis (Sambrook et al., 1989). Once the specificity of the amplifications was confirmed, PCR products were purified from the remaining reactions using GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The concentration of the purified PCR products was determined by measuring the absorbance at 260 nm of a ten-fold dilution. DNA sequencing was performed with the DYEnamic ET terminators cycle sequencing kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), following the protocol supplied by the manufacturer. The

16S rRNA was sequenced using the primers 27F, 1525R, 782R (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3') and 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'). The 16S-23S rRNA gene was sequenced using the primers 16S1400F and 23S90R. Sequencing reactions were then analyzed in a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). High quality reads (phred >20) were used to generate full 16S sequences using Phred/Phrap/Consed package (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998). The determined sequences were then compared to those already deposited in the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) using the Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (Altschul et al., 1990). The program MEGA4 – Molecular Evolutionary Genetic analysis version 4.1 (Tamura et al., 2001) was used to perform phylogenetic analyses.

Results and Discussion

PCR amplification using the primers Bp1 and Bp4 described by Couto et al. (2009) yielded a single DNA band of approximately 300 bp from 5 clinical and 10 environmental isolates of *B. pseudomallei*, that corresponding 48.7% of the isolates. All clinical samples were identified as *B. pseudomallei*, that corresponding 100% confirmation (5/5 isolates) of identification. However, when considering only the environmental samples, this number drops to only 38.4% (10/26 isolates) (**Table 1**).

Inglis et al. (2005) compared the biochemical system API 20NE with a PCR reaction performed by the group since 1998 to confirm the presumptive identification of *B. pseudomallei*. The results of this study show that API 20NE fails to reliably identify *B. pseudomallei* when used precisely according to manufacturer's instructions to identify an unknown *Burkholderia* sp. isolate from a diverse range of sources. In our hands, the probability of *B. pseudomallei* being given an incorrect bacterial identity was unacceptably high.

According to the authors, that used a semi-nested PCR to amplify a sequence of 16S-23S rRNA gene specific for *B. pseudomallei*, in future is possible that the greater reliability, shorter time to a result, simplicity, and lower cost of PCR may make it the preferred confirmatory method for *B. pseudomallei* identification. This technique, that was initially described by Kunakorn et al. (1995), it was used in this study to confirm the identification of clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei* from the State of Ceará, Northeastern Brazil.

Merritt et al., 2006 identified correctly 71 of 72 *B. pseudomallei* isolates by this PCR analysis, but closer analysis of the semi-nested PCR determined that no amplification occurred in the second round of amplification, despite generation of PCR product in the first round. The authors noted that primer Bp3 contained four nucleotide substitutions and one nucleotide insertion at the binding site for the reverse primer of the second round PCR.

In this study, the assembled 16S rRNA and 16S-23S genes sequences from 5 clinical and 10 environmental isolates had approximately 1.400 bp and 600 bp, respectively. The sequences showed 100% sequence identity and were identical to the 16S and 16S-23S rRNA genes sequences from *B. pseudomallei* 1106a and *B. pseudomallei* 1710b (the genes sequences from the strains 1106a and 1710b were retrieved from their corresponding genome sequences available in the GenBank: CP000572 and CP000124, respectively). The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei* from Northeastern Brazil is showed in **Figure 1**.

We sequenced more four environmental isolates used in this study: three that were PCR negative (isolates CEMM 05-01-039, CEMM 05-01-040 and CEMM 05-01-041) and one outsider isolate, phenotypically identified as *B. cepacia* (CEMM 05-01-038). The three samples PCR negative resulted in 100% sequence identity and were identical to the 16S and 16S-23S rRNA genes sequences from *Pandoraea pulmonicola* (CEMM 05-01-039) and *Achromobacter xylosoxidans* (CEMM 05-01-038, CEMM 05-01-040 and CEMM 05-01-041). Thus, these results validate the molecular diagnostic method performed in our study.

We sought to confirm the identity of all the isolates by 16S and 16S-23S rRNA sequencing because the application of molecular-based technology for the detection of many microorganisms in clinical specimens uses rapid methods with improved sensitivity and specificity (Lew and Desmarchelier, 1994; Tyler et al., 1995). The 16S rRNA gene sequence readily contributes to phylogenetic studies and to identification and detection of a taxonomic group because of the availability of multiple copies of targeted DNA sequences and the high conservation within a similar species (Lee et al., 2007).

According to Antonov et al. (2008), the use of the 16S rRNA gene sequences of *B. pseudomallei* and *B. mallei* can be used to discriminate reliably between the two species. This study indicates that the combination of two 16S and 16S-23S rRNA genes or *fliC* DNA targets for sequencing of the amplicons resulted in high sensitivity and specificity to identify these species.

Thus, the recent detection of melioidosis in northeastern Brazil highlights the extent of its distribution in the Americas and underlines the need for improved diagnostic methods (Inglis et al., 2006; Rolim et al., 2009). The development of molecular technologies has led to

the appearance of new methods for the diagnosis and typing of *B. pseudomallei*. Currently, the greater reliability, shorter time for results, simplicity and lower cost of conventional PCR make it the leading method to confirm *B. pseudomallei* diagnosis (Merritt et al., 2006).

In this study, the use of PCR for amplification of a fragment of 302 bp region of 16S-23S rRNA identified correctly *B. pseudomallei*. The phylogenetic analysis of 16S rRNA showed that the isolates of *B. pseudomallei* used in the study are evolutionarily clustered with the strains *B. pseudomallei* MSHR346 (Australia), *B. pseudomallei* 1106a (Thailand), *B. pseudomallei* K96243 (Thailand), *B. pseudomallei* 1710b (Thailand) and *B. pseudomallei* 668 (Australia). Thus, this study contributed to the correct identification of clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei* from Northeastern Brazil, suggesting that the use of phenotypic tests to identify environmental isolates of *B. pseudomallei* requires careful consideration due to the high risk of false-positive results.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant 475683/2006-4).

References

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; et al. (1990) "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol.* 215: 403-10.

Antonov, V.A.; Tkachengo, G.A.; Altukhova, V.V.; et al. (2008) Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? *Trans R Soc Med Hyg.* 102/S1: 134-39.

Couto, M.S.; Cordeiro, R.A.; Rocha, M.F.G.; et al. (2009) A diagnosis of *Burkholderia pseudomallei* directly in a bronchoalveolar lavage by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 65: 73-75.

Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C.; et al. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8: 175-85.

Ewing, B.; Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8: 186-194.

Gee, J.E.; Sacchi, C.T.; Glass, M.B.; et al. (2003) Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J Clin Microbiol.* 41: 4647-54.

Gordon, D.; Abajian, C.; Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8: 195-202.

Holden, M.T.G.; Titball, R.W.; Peacock, S.J.; et al. (2004) Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 14240-245.

Inglis, T.J.J.; Rigby, P.; Robertson, T.A.; et al. (2000) Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and scape. *Infect Immun.* 68: 1681-86.

Inglis, T.J.J.; Foster, N.F.; Gal, D.P.K.; et al. (2004) Preliminary report on the northern Australian melioidosis environmental surveillance project. *Epidemiol Infect.* 132: 813-20.

Inglis, T.J.J.; Merritt, A.; Chidlow, G.; et al. (2005) Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 43: 2201-06.

Inglis, T.J.J.; Rolim, D.B.; Sousa, A.Q. (2006) Melioidosis in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 75: 947-54.

Kunakorn, M.; Markham, R.B. (1995) Clinically practical semi-nested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by immunoassay with and without solution hybridization. *J Clin Microbiol.* 33: 2131-35.

Lee, S.; Chong, C.; Lim, B.; et al. (2007) *Burkholderia pseudomallei* animal and human isolates from Malaysia exhibit different phenotypic characteristics. *Diag Microbiol Infect Dis.* 58: 263-70.

Lew, A.E.; Desmarchelier, P.M. (1994) Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol.* 32: 1326-32.

Merritt, A.; Inglis, T.J.J.; Chidlow, G.; et al. (2006) PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 48: 239-44.

Peacock, S.J.; Schewinzer, H.P.; Dance, D.A.B; et al. (2008) Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *Emerg Infect Dis*.14: (on line report).

Pitt, T.L.; Trakulsomboon, S.; Dance, D.A.B. (2000) Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Tropica*. 74: 181-85.

Rolim, D.B.; Rocha, M.F.G.; Brilhante, R.S.N.; et al. (2009) Environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceará State, northeastern Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 75: 1215-18.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schmoock, G.; Ehricht, R.; Melzer, F.; et al. (2009) DNA microarray-based detection of *B. mallei*, *B. pseudomallei* and *Burkholderia* spp. *Mol Cell Probes*. 23: 178-87.

Stevens, M.P.; Galyov, E.E. (2004) Exploitation of host cells by *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Med Microbiol*. 293: 549-55.

Suprapom, C.; Wang, D.; Leelayuwat, C.; et al. (2007) Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. *J Clin Microbiol*. 45: 2894–2901.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; et al. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *M Biol Evol*. 24: 1596-99.

Tyler, S.D.; Strathdee, C.A.; Rozee, K.R.; et al. (1995) Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic *Pseudomonas* on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2: 448-453

Ulett, G.C.; Labrooy, J.T.; Currie, B.J.; et al. (2005) A model of immunity to *Burkholderia pseudomallei*: unique responses following immunization and acute lethal infection. *Microb Infect.* 7: 1263–75.

Virgínio, C.G.; Teixeira, M.F.S.; Frota, C.C.; et al. (2006) Phenotypic characterization of three clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101: 95–97.

Table 1. Clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei* from Northeastern Brazil identified by biochemical and molecular methods.

Isolates	Especific 16S-23S rRNA PCR	API 20NE	16S and 16S-23S rRNA sequences
CEMM 03-06-033*	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-034*	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-035*	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-036*	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-037*	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-039 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-040 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-041 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-042 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-043 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-044 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-045 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-046 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-047 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 03-06-048 [#]	PCR +	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>B. pseudomallei</i>
CEMM 05-01-041 [#]	PCR -	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>A. xylooxidans</i>
CEMM 05-01-039 [#]	PCR -	<i>B. pseudomallei</i> 76.8%	<i>P. pulmonicola</i>
CEMM 05-01-040 [#]	PCR -	<i>B. pseudomallei</i> 98.4%	<i>A. xylooxidans</i>
CEMM 05-01-038 [#]	PCR -	<i>B. cepacia</i> 99.9%	<i>A. xylooxidans</i>

Legend: *Clinical and [#]environmental isolates.

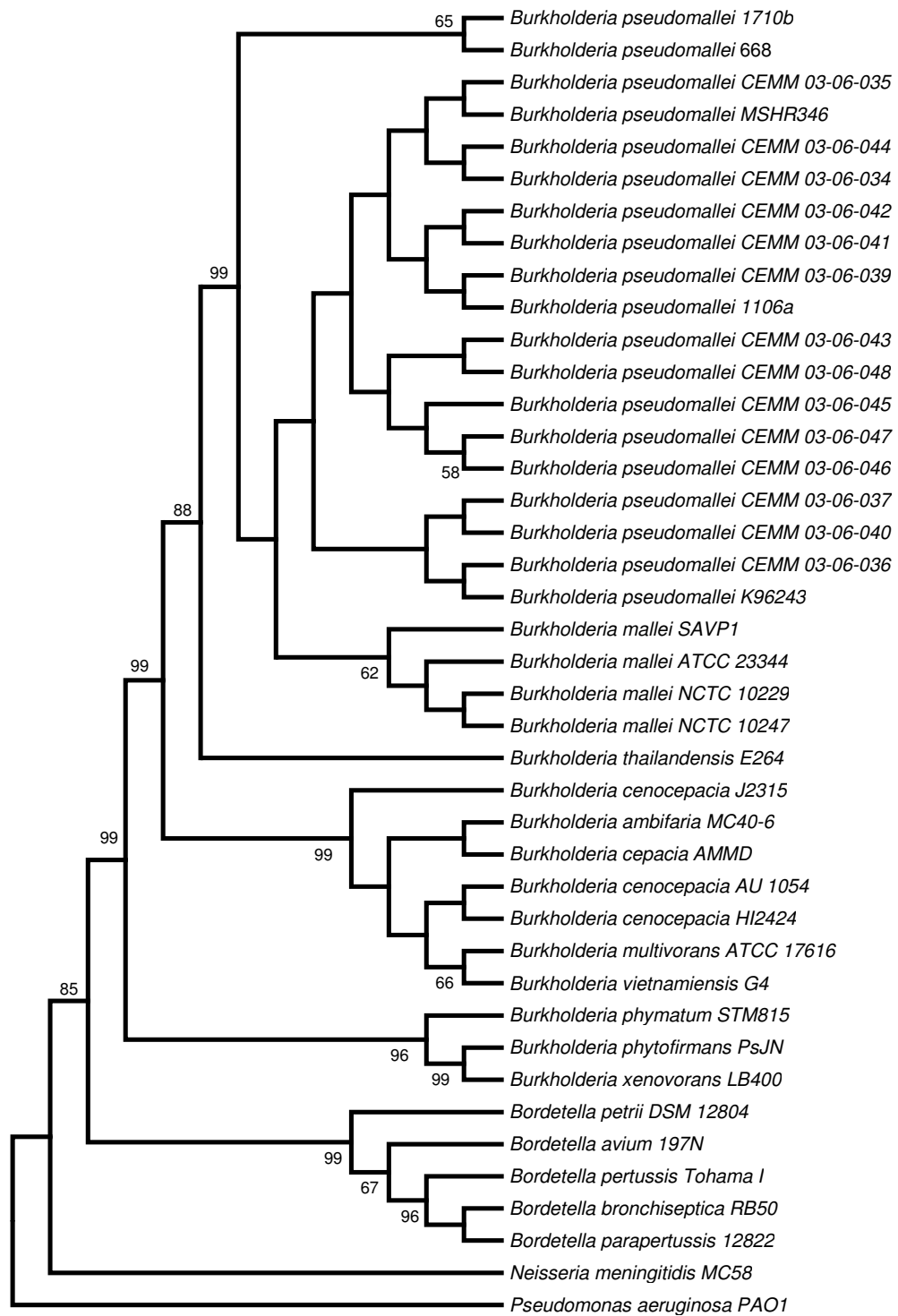


Figure 1. The phylogenetic tree is based on 16S rRNA sequence. The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method. The bootstrap consensus tree inferred from 100 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) is shown next to the branches. The MP tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm with search level 7 in which the initial trees were obtained with the random addition of sequences (100 replicates). All alignment gaps were treated as missing data. There were a total of 1305 positions in the final dataset, out of which 179 were parsimony informative. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4. The sequences of 16S rDNA of the strains used in the study were taken from the GenBank database sequences.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)