



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CAMILA GOMES VIRGINIO

**ASPECTOS FENOTÍPICOS DE AMOSTRAS DE  
*Burkholderia pseudomallei* ISOLADAS DE UMA  
MICROEPIDEMIA NO MUNICÍPIO DE TEJUÇUOCA,  
CE.**

FORTALEZA

2005

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ASPECTOS FENOTÍPICOS DE AMOSTRAS DE  
*Burkholderia pseudomallei* ISOLADAS DE UMA  
MICROEPIDEMIA NO MUNICÍPIO DE TEJUÇUOCA, CE.

Dissertação submetida ao Departamento de Patologia  
e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva  
Teixeira

Mestranda: Camila Gomes Virginio

FORTALEZA

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ASPECTOS FENOTÍPICOS DE AMOSTRAS DE *Burkholderia pseudomallei*  
ISOLADAS DE UMA MICROEPIDEMIA NO MUNICÍPIO DE TEJUÇOCA, CE.

CAMILA GOMES VIRGINIO

Dissertação submetida ao Departamento de Patologia  
e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará,  
Como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira (Orientadora)

Universidade Estadual do Ceará – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

---

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica

---

Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura

Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica

---

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota

Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim e Profa. Dra. Maria Fátima Silva Teixeira, pela paciência, orientações efetivas e pelos ensinamentos necessários para o alcance deste objetivo, que muito contribuíram para a minha formação profissional e humana.

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

Aos professores do Mestrado em Microbiologia Médica pelos seus préstimos, sugestões, informações técnicas e incentivos úteis para a vida profissional e para a confecção desta Dissertação.

Aos colegas de turma do mestrado, Lis Christina de Oliveira, Ila Fernanda Nunes da Silva, Delia Jéssica Medrano e Afrânio Cunha, pela amizade, companheirismo e apoio dispensados durante nossos estudos.

Às amigas do mestrado Cristiane Bezerra, Rossana Aguiar, Roxeane Martins, demais colegas do mestrado e do CEMM, pela ajuda direta e indireta, incentivo e amizade.

Aos funcionários do setor de microbiologia do Depto. de Patologia e Medicina Legal, Olavo Moraes, Terezinha dos Santos e Marta Vasconcelos, que de várias formas muito ajudaram, sempre com presteza e profissionalismo para a conclusão deste estudo.

À minha família, a minha gratidão por ter transformado momentos de trabalho tenso em colaboração e incentivos.

Ao meu grande companheiro, Henrique Coelho, 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.

**“... Se não fosse por ele, com toda a probabilidade, aquela obra não teria sido projetada, nem quando projetada, escrita e nem quando escrita, impressa”.**

**Matemático *Augustus* De Morgan**

## RESUMO

A *Burkholderia pseudomallei* é um bacilo Gram-negativo não-fermentador, saprófita ambiental capaz de causar melioidose em homens e animais. A doença é considerada endêmica em diversos países, entre os quais destacam-se Tailândia e Austrália. Em fevereiro de 2003, ocorreu no Brasil, o primeiro isolamento e identificação da bactéria em quatro crianças da localidade de Tejuçuoca, Ceará. Este trabalho consiste na caracterização fenotípica de 3 amostras de *B. pseudomallei* originárias dos pacientes do município de Tejuçuoca, com o propósito de comparar os dados obtidos de tais amostras com os dados da literatura. Foram avaliados: morfologia das colônias em diferentes meios de cultivo, assimilação de L-arabinose, testes bioquímicos manuais e em sistema semi-automatizado API 20NE, teste de sensibilidade antibacteriano e diagnóstico por PCR, a partir de cultivos bacterianos. Nos resultados obtidos, foi observado o padrão morfológico característico de *B. pseudomallei* em ágar sangue, chocolate, Ashdown, Mac Conkey, CLED e tripticase soja. As amostras 1 e 3 foram classificadas como mucóides e a amostra 2 como rugosa. As três amostras apresentaram os padrões fenotípicos característicos de *B. pseudomallei* tanto nos testes bioquímicos manuais: motilidade, crescimento à 42°C, oxidase positiva e resistência à polimixina B, como no Kit Diagnóstico API 20NE. Neste último, houve diferença na esculina entre as amostras, o que não interferiu no resultado final de identificação, quando a leitura foi realizada com 48h. Todas as três amostras foram incapazes de assimilar o carboidrato L-arabinose, quando testadas em meio sais mínimo e API 20NE, característica de amostras virulentas de *B. pseudomallei* e utilizada também para diferenciar esta espécie da *B. thailandensis*, que é capaz de assimilar este carboidrato. O padrão de sensibilidade resultante do TSA em disco difusão apresentado pelas três amostras foi o característico da espécie *B. pseudomallei*. Os isolados foram resistentes à gentamicina, cefalotina, ciprofloxacina (1 amostra apresentou resistência intermediária) e sulfatrimetoprim; 2 amostras apresentaram sensibilidade intermediária à ceftriaxona. Todas as três amostras foram sensíveis à piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulânico, ceftazidima, imipenem, tetraciclina e cloranfenicol. Com o protocolo fenol-clorofórmio modificado de extração de DNA, a PCR apresentou banda de 718 pb, o que confirmou o diagnóstico da bactéria também por método molecular. O estudo confirma a presença da *B. pseudomallei* em território brasileiro, com fenotipagem semelhante à descrita na literatura internacional.

Palavras-chave: *Burkholderia pseudomallei*, melioidose, caracterização fenotípica, resistência bacteriana à antimicrobianos, PCR

## ABSTRACT

*Burkholderia pseudomallei* is a Gram-negative non-fermentative bacilli, environmental saprophyte able to cause melioidosis on men and animals. The disease is considered endemic in several countries, especially in Thailand and Australia. The bacteria was isolated and identified for the first time in Brazil, february 2003, from four children that lived in a place called Tejuçuoca, Ceará. This work consists of the phenotypic characterization of 3 strains of *B. pseudomallei* isolated from the patients from Tejuçuoca. The main aim of this study is to compare the data from these samples with the ones from the literature. It was assessed: the colonies morphology in different culture mediums, assimilation of L-arabinose, manual and semi-automatized biochemical tests in API 20NE, antibacterial sensitivity test and diagnosis by PCR, from bacterial cultures. In the obtained results, it was observed the morphological pattern of *B. pseudomallei* in blood agar, chocolate, Ashdown, Mac Conkey, CLED and trypticase soy agar. The strains 1 and 3 were classified as mucoid and the strain 2 as wrinkled. The three strains had shown the usual phenotypic patterns of *B. pseudomallei* as much in biochemical manual tests: motility, growth at 42°C, positive oxidase and resistance to polymixin B, as in the API 20NE Diagnosis Kit. In this last one, there was difference in the esculin test among the strains, when the reading was carried out with 48 hours, which did not change on the final identification. All of the three strains were unable to metabolize the carbohydrate L-arabinose, when tested in minimum medium salts and API 20NE, which is a characteristic of virulent strains of *B. pseudomallei* and is also used to differ this species from *B. thailandensis*, that is able to use the carbohydrate. The three isolates had shown a poor sensitivity pattern from disk diffusion on TSA, which were resistant to gentamicin, cefalotin, ciprofloxacin (one strain presented intermediate resistance) and sulfa-trimethoprim; two strains presented intermediate sensitivity to ceftriaxone. All of them were sensitive to piperacilin-tazobactam, ticarcilin-clavulanate, ceftazidime, imipenem, tetracycline and chloramphenicol. A modified extraction protocol based on phenol-chloroform was used to obtain DNA and later to test it by PCR, which had shown a 718 bp product, what also confirmed the diagnosis of the organisms by molecular method. The study confirms the presence of *B. pseudomallei* in Brazil with similar phenotype to that described in the international literature.

Key-words: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, phenotypic characterization, antimicrobial bacterial resistance, PCR

## 1. ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
<b>2. INTRODUÇÃO</b>	
2.1 Aspectos Históricos.....	1
2.2 Epidemiologia.....	2
2.3 Características gerais fenotípicas	
2.3.1 Metabolismo Bacteriano.....	6
2.3.2 Aspectos Fenotípicos.....	8
2.4 Patogênese e Quadro Clínico.....	11
2.5 Diagnóstico	
2.5.1 Diagnóstico Fenotípico.....	16
2.5.2 Diagnóstico Molecular.....	21
2.6 Perfil de Sensibilidade Antibacteriano e Tratamento.....	22
2.7 Prevenção e Controle.....	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
4.1 Amostras Bacterianas.....	27
4.2 Condições do Experimento.....	27
4.3 Processamento Primário.....	28
4.3.1 Isolamento primário e identificação preliminar.....	28
4.3.2 Re-identificação dos isolados.....	28
4.3.2.1 Isolamento em meios de cultivo.....	28
4.3.2.2 Provas bioquímicas.....	29
4.3.2.3 Identificação pelo API 20NE.....	29
4.4 Assimilação de L-Arabinose.....	30
4.5 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).....	30
4.6 Descarte de Resíduos.....	30

4.7 Extração de DNA Genômico.....	31
4.7.1 Verificação da presença e da integridade do DNA genômico.....	31
4.7.2 Quantificação do DNA.....	31
4.8 Reação em Cadeia de Polimerase.....	31
4.8.1 Sequências Iniciadoras Utilizadas.....	31
4.8.2 Preparo das reações de amplificação.....	32
4.8.3 Condições para a reação de PCR.....	32
4.8.4 Eletroforese de DNA amplificado.....	32
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 Isolamento primário.....	33
5.2 Armazenamento em ágar estoque.....	33
5.3 Recuperação das amostras.....	33
5.4 Aspecto macroscópico de <i>B. pseudomallei</i> .....	33
5.4.1 Ágar sangue de carneiro (ASA).....	34
5.4.2 Ágar Chocolate.....	34
5.4.3 Ágar Trypticase soja.....	34
5.4.4 Ágar Mueller-Hintom.....	34
5.4.5 Ágar CLED.....	35
5.4.6 Ágar Ashdown.....	35
5.4.7 Ágar Mac Conkey.....	35
5.5 Aspecto microscópico de <i>B. pseudomallei</i>	
5.5.1 Coloração de Gram.....	38
5.5.2 Coloração Bipolar (Azul de metileno).....	38
5.6 Identificação manual.....	39
5.6.1 Testes bioquímicos.....	39
5.7 Identificação semi-automatizada em API 20NE.....	40
5.8 Assimilação de L-arabinose.....	44
5.8.1 Meio OF.....	44
5.8.2 Assimilação de L-arabinose em API 20NE.....	44
5.8.3 Meio sais mínimo.....	45
5.9 Teste de sensibilidade antimicrobiano.....	45
5.10 PCR.....	47
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>

7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
9. ANEXOS.....	74

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>FIGURA 1</b> - Mapa mundi mostrando áreas consideradas endêmicas para a melioidose.....	<b>3</b>
<b>FIGURA 2</b> - Sobrevivência ambiental e ciclo de infecção de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>4</b>
<b>FIGURA 3</b> - O ciclo de transmissão da melioidose.....	<b>5</b>
<b>FIGURA 4</b> - Vias metabólicas da degradação bacteriana da glicose.....	<b>8</b>
<b>FIGURA 5</b> - Ágar Ashdown mostrando colônias púrpuras características de <i>B. pseudomallei</i> ...	<b>17</b>
<b>FIGURA 6</b> - Fluxograma geral da metodologia experimental.....	<b>27</b>
<b>FIGURA 7</b> - Padrão de crescimento de amostras 3 e 2 de <i>B. pseudomallei</i> em ágar sangue com 72h de incubação à 37°C.....	<b>36</b>
<b>FIGURA 8</b> - Rugosidade característica de <i>B. pseudomallei</i> (amostra 2) em ágar chocolate após 7 dias de incubação à 37°C.....	<b>36</b>
<b>FIGURA 9</b> - Aparência de colônias de <i>B. pseudomallei</i> em diferentes meios de cultivo com 7 dias de incubação à 37°C.....	<b>37</b>
<b>FIGURA 10</b> - Coloração de Gram a partir de cultivo em ágar Mueller-Hintom (1000x).....	<b>38</b>
<b>FIGURA 11</b> - Coloração com azul de metileno evidenciando coloração bipolar dos bacilos (1000x).....	<b>39</b>
<b>FIGURA 12</b> - Identificação de <i>B. pseudomallei</i> em API 20NE.....	<b>43</b>
<b>FIGURA 13</b> - Reação de oxidação em meio OF (5º dia) à 37°C.....	<b>44</b>
<b>FIGURA 14</b> - Ausência de crescimento de <i>B. pseudomallei</i> em meio sais mínimo com 0.2 % de L-arabinose (A) e crescimento de <i>B. pseudomallei</i> em meio sais mínimo com 0.2 % de glicose (B) com 48h de incubação à 37°C.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 15</b> - Teste de sensibilidade mostrando o padrão de sensibilidade da amostra 1 de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>47</b>
<b>FIGURA 16</b> - Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando fragmento de 718 pb.....	<b>48</b>

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>TABELA 1</b> - Identificação de bacilos Gram negativos.....	<b>9</b>
<b>TABELA 2</b> - Características-chave de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>10</b>
<b>TABELA 3</b> - Características diferenciais de <i>B. pseudomallei</i> e <i>B. thailandensis</i> .....	<b>11</b>
<b>TABELA 4</b> - Classificação da melioidose através da avaliação clínica.....	<b>14</b>
<b>TABELA 5</b> - Característica de colônias de <i>B. pseudomallei</i> em diferentes meios de cultivo.....	<b>19</b>
<b>TABELA 6</b> - Recomendações de tratamento para a melioidose.....	<b>24</b>
<b>TABELA 7</b> - Seqüências iniciadoras do gene 16S de RNAr para diagnóstico de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>32</b>
<b>TABELA 8</b> - Padrão bioquímico de testes manuais de amostras de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>40</b>
<b>TABELA 9</b> - Padrão bioquímico de identificação de <i>B. pseudomallei</i> em API 20NE com 48h de incubação.....	<b>41</b>
<b>TABELA 10</b> - Halo de inibição e padrão de sensibilidade de isolados de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>46</b>
<b>TABELA 11</b> - Teste de oxidação- fermentação (OF).....	<b>88</b>
<b>TABELA 12</b> - Diâmetro dos halos de sensibilidade e resistência à Polimixina B.....	<b>90</b>
<b>TABELA 13</b> - Padrões de resistência e sensibilidade das drogas antimicrobianas.....	<b>92</b>
<b>TABELA 14</b> - Testes e substratos utilizados em sistema API 20NE.....	<b>94</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ASA** – Ágar sangue

**ATCC** – American Type Culture Collection

**BGNF** – Bacilo Gram negativo não fermentador

**BHI** – Brain Heart Infusion

**CDC** – Centers for Disease Control and Prevention

**DNA** – Ácido Desoxiribonucleico

**EPI** – Equipamento de proteção individual

**Kg** – Kilograma

**KIA** – Kliger Iron Ágar

**mg** – miligrama

**MIC** – Concentração Inibitória Mínima

**MILI** – motilidade, indol e lisina

**mm** – milímetro

**NB-3** – Nível de Biossegurança 3

**NCCLS** – National Committee for Clinical Laboratory Standards

**NO<sub>3</sub>** – Nitrato

**OF** – Oxidação- fermentação

**ONPG** – Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo

**P.A.** – Para análise

**pb** – Pares de base

**PCR** – Reação em cadeia de polimerase

**RNAr** – Ácido ribonucleico ribossômico

**TSA** – Teste de Sensibilidade à Antimicrobianos

**TSI** – Tríplice Sugar Iron Ágar

**UV** – Ultra violeta

**V.O.** – Via oral

**µg** - Microgramas

**°C** – Graus Celsius

**LISTA DE ANEXOS**

Página

<b>ANEXO I</b> – Fluxograma para identificação rápida de <i>B. pseudomallei</i> .....	<b>75</b>
<b>ANEXO II</b> – Testes Bioquímicos, meios de cultura, soluções e reagentes.....	<b>76</b>
<b>ANEXO III</b> - Características-chave de <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>B. mallei</i> , <i>B. cepacia</i> e <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	<b>96</b>
<b>ANEXO IV</b> – Reagentes e Protocolos utilizados em Biologia Molecular.....	<b>97</b>
<b>ANEXO V</b> – Seqüência nucleotídica do gene 16S de RNAr de <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	<b>102</b>

## 2 INTRODUÇÃO

### 2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

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

Em 1921, Stanton e Fletcher denominaram a doença de melioidose devido às similaridades clínicas e anatomopatológicas com o mormo causado pela *Burkholderia mallei* (Melioidose: em forma de mormo). Desde sua identificação, tem recebido várias denominações: *Pfeifferella whitmori*, *Pfeifferella pseudomallei*, *Malleomyces pseudomallei*, *Bacillus whitmori*, *Loefflerella whitmori*, *Flavobacterium pseudomallei*, *Actinobacillus pseudomallei*, *Pseudomonas pseudomallei* e mais recentemente *Burkholderia pseudomallei* (STANTON; FLETCHER, 1921; YABUUCHI *et al*, 1992).

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

A melioidose tem sido considerada uma das doenças infecto-contagiosas causadora de maior morbidade e mortalidade entre humanos e diversas espécies animais incluindo primatas, camelos, cães, gatos, golfinhos, cavalos, ovinos, suínos e caprinos, aves e roedores. De acordo com Sprague e Neubauer (2004), animais de sangue frio são resistentes à *B. pseudomallei*, mas ressalta que já foram observados casos em crocodilos, cobras e peixes (MOLLARET, 1988; CHAOWAGUL *et al*, 1989; LEELARASAMEE *et al*, 1989; CHOY *et al*, 2000).

A bactéria é considerada um potencial agente para guerra biológica e terrorismo biológico, apesar de não ter sido usada até então para esse propósito, estando incluída na categoria B da lista 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 bom potencial de aerossolização, alta infectividade e pequena quantidade

do agente necessária para produzir efeito. Além do mais possui também boa estabilidade ambiental (microorganismo telúrico), tem 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).

O genoma da bactéria foi seqüenciado recentemente (<http://www.sanger.ac.uk/>), e este é relativamente grande em comparação com outros genomas procariotos típicos: 7,24 Mb dividido entre dois cromossomos, um com 4,07 Mb e o outro com 3,17 Mb e um conteúdo de G+C de 68% (HOLDEN *et al*, 2004).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

*A. B. pseudomallei* é considerada um saprófita ambiental, sendo encontrada na superfície de águas estagnadas, córregos, solos encharcados como arrozais e solos de áreas endêmicas em regiões tropicais e subtropicais compreendidas entre latitudes de 20°N e 20°S. Embora o microorganismo não esteja estritamente confinado à região equatorial, a probabilidade de adquirir melioidose fora dessa delimitação geográfica é extremamente baixa.

Sua localização abrange principalmente o sudeste da Ásia, com uma grande concentração de casos (Vietnã, Cambodja, Laos, Mianmar [Burma], Malásia e Cingapura), com regiões hiperendêmicas no Nordeste da Tailândia onde chega a constituir um verdadeiro problema de saúde pública (estima-se entre 2000-3000 casos/ ano). A melioidose é distribuída irregularmente dentro de áreas endêmicas. Em um estudo realizado por Vuddhakul *et al* (1999) foram encontradas taxas de 137,9 pacientes com a doença a cada 100.000 habitantes na região nordeste do país e 13,4 pacientes a cada 100.000 na região central. A hiperendemicidade do Nordeste da Tailândia contrasta com a parte central da Tailândia, onde somente poucos casos de melioidose tem sido relatados. Esse fato tem sido bastante estudado e foi associado com a presença da *B. pseudomallei* arabinose negativa (Ara-) no solo. Abundantes casos de melioidose têm sido associados com pessoas que haviam visitado o país. Há também diversos relatos no oriente médio, Índia, China, especialmente em Hong Kong, Brunei, Sri Lanka, Bangladesh e Filipinas (DANCE, 1991b; BRETT; WOODS, 2000; DANCE, 2000a; DANCE, 2000b).

A Austrália é considerado um país hiperendêmico para a doença no tocante à sua região Norte. Neste país cerca de 20% de todas as septicemias adquiridas pela comunidade são causadas pela *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. A taxa de infecção anual chega 16,5/100.000 habitantes.

Entretanto em 1997/1998 chegou a ser de 37,5/100.000. Embora as áreas classicamente definidas como endêmicas para a melioidose estejam situadas entre 20°N e 20°S, a melioidose foi primeiro descrita na Austrália em um surto em ovinos no ano de 1949 em Queensland do Norte situada à 22°S. A melioidose humana foi identificada inicialmente em Townsville (19°S) em 1950. O maior número de casos é registrado no Royal Darwin Hospital situado em Darwin no território norte (12°S), seguido por hospitais em Cairns (17°S) e Townsville (19°S) (CURRIE *et al*, 2000a).

Diversos casos de melioidose têm ocorrido no hemisfério ocidental. Apesar de poucos casos confirmados e do escasso conhecimento acerca da prevalência deste microorganismo 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 casos registrados no México, Panamá, Equador, El Salvador, Porto Rico e nos Estados americanos do Havaí e Geórgia. Há relatos de isolamento da bactéria no solo do Peru e Haiti. No Chile ainda persistem dúvidas da presença da bactéria. Há relato recente de isolamento da bactéria no Brasil. Nos Estados Unidos e na Europa, casos confirmados ocorrem entre viajantes e imigrantes de áreas endêmicas. Diversos estudos mostram que a doença é considerada emergente em diversos cantos do mundo e sua prevalência tem sido ainda subestimada (DANCE, 1991a; DANCE, 2000a; CHRISTENSON *et al*, 2003; CDC, 2004; MIRALLES *et al*, 2004; BRAGA; ALMEIDA, 2005). **Fig. 1**



Fonte: DANCE, 1991b.

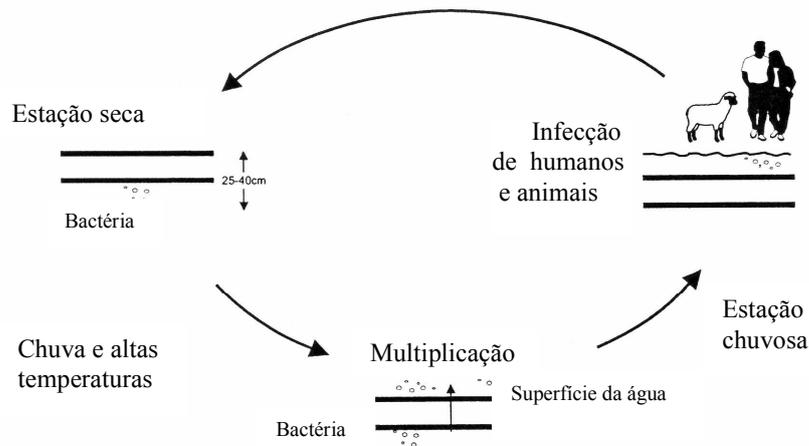
Área escura: principais áreas endêmicas; Áreas hachuradas e asteriscos: isolados esporádicos da bactéria

**Figura 1. Mapa mundi mostrando áreas consideradas endêmicas para a melioidose.**

No Brasil, até fevereiro de 2003, não haviam sido descritos casos da doença envolvendo seres humanos e animais, apenas relatos de isolados ambientais (solo) de *B. pseudomallei* em cidades do interior da Bahia (São Félix e São Caetano) por pesquisadores franceses. Há relatos também de tentativas frustradas de se isolar o microorganismo da água em São Paulo (PESTANA DE CASTRO *et al*, 1973; GALLIMAND; DODIN, 1982; DANCE, 1991b).

De modo geral, é interessante observar que de muitos casos relatados, com poucas exceções, incluindo infecções adquiridas no laboratório, a doença tem ocorrido em indivíduos que haviam vivido ou retornado de áreas endêmicas para a melioidose (GREEN; TUFFNEL, 1968; HOWE *et al*, 1971; MCCORMICK *et al*, 1975; NUSSBAUN *et al*, 1980; SCHLECH *et al*, 1981).

Visto que, a bactéria é capaz de resistir a uma grande variedade de extremos ambientais, é interessante o fato de que não haja uma distribuição global mais aparente do microorganismo (BRETT; WOODS, 2000). O ciclo de sobrevivência ambiental da *B. pseudomallei* encontra-se ilustrado na **Fig. 2**.

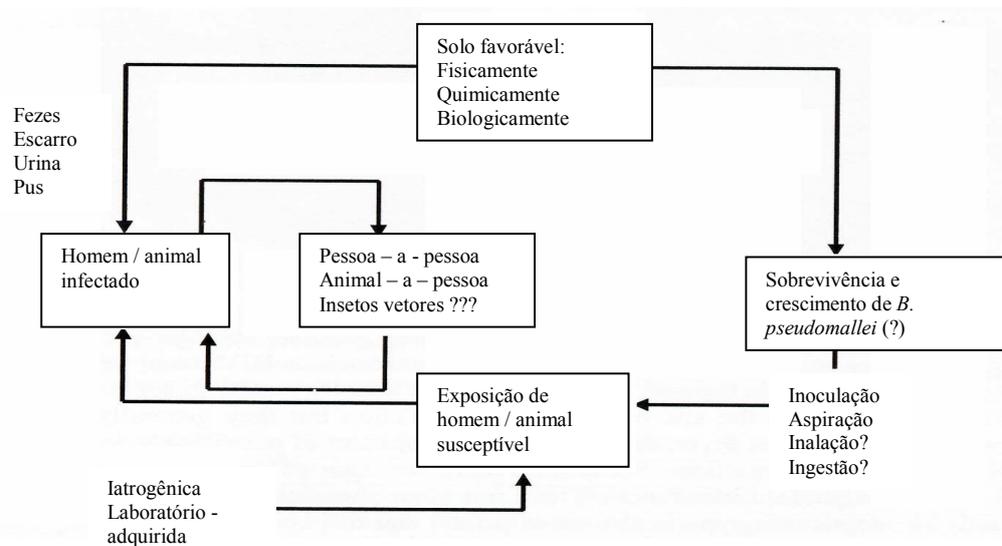


Fonte: ELLIS; TITBALL, 1999.

**Figura 2. Sobrevivência ambiental e ciclo de infecção de *B. pseudomallei***

Diversas espécies animais podem funcionar como reservatórios para o microorganismo, inclusive com potencial zoonótico, ou podem ser suscetíveis à doença. Como humanos e animais são cada vez mais transportados ao redor do mundo, criam-se mais oportunidades para a disseminação da melioidose de áreas endêmicas a novos habitats. Dessa forma, também é possível que solo e água contaminados com a *B. pseudomallei* possam ser importados de áreas

endêmicas. Pessoas podem inadvertidamente transportar solo (de plantas tropicais) e água (contendo peixes tropicais) contaminados com a *B. pseudomallei* e desse modo levar à contaminação de novos ambientes, embora a habilidade da bactéria em se multiplicar uma vez introduzida em um novo ambiente seja inteiramente desconhecida. Há ainda o fato de que animais infectados podem excretar a bactéria na secreção nasal, pus, urina e fezes que podem contaminar seu novo ambiente e se este é apropriado, pode levar ao estabelecimento de novo foco epidêmico, conforme observado na **Fig. 3**



Melioidose: o ciclo de transmissão. Animais e humanos adquirem a infecção do ambiente. O organismo é excretado no escarro, pus, urina e fezes, e então novos ambientes podem ser contaminados. Sob condições apropriadas e ainda pouco estudadas, o microorganismo prolifera, criando um novo foco epidêmico. Raramente, transmissão humano-humano, animal-humano e infecções iatrogênicas podem ocorrer.

Fonte: DANCE, 2000b

**Figura 3. O ciclo de transmissão da melioidose.**

Um bom exemplo deste fato é o relatado por Mollaret (1988) em um zoológico na França, onde a partir de um panda chinês contaminado com a *B. pseudomallei* doado por Mao Tse Tong ao Presidente Pompidou para o zoológico de Paris, ocasionou um surto em que a bactéria disseminou-se à outros zoológicos franceses e clubes e eqüestres de Paris. Os surtos epizooticos tem sido documentados em várias regiões do mundo, exemplos incluem a morte de 24 golfinhos em um aquário de Hong Kong em 1975 e um surto no caribe em 1957 que resultou na morte de

numerosos ovinos, caprinos e suínos (SUTMOLLER *et al*, 1957; GALIMAND; DODIN, 1982; MOLLARET, 1988).

A quantidade de componentes orgânicos que podem ser usados pela bactéria como fonte de energia e de carbono é excepcionalmente ampla, fazendo da *B. pseudomallei* um dos mais nutricionalmente versáteis membros do gênero *Burkholderia*. Há muitas variáveis que podem influenciar a distribuição do microorganismo no solo, incluindo fatores climáticos como temperatura, chuvas, luminosidade e composição do solo (física, química e biológica). 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. A temperatura ótima situa-se entre 24-36°C, o pH entre 5-8 e a umidade de 40%. O período chuvoso, ou logo após as chuvas é comumente descrito como o preferido para a manifestação da doença em áreas endêmicas. A habilidade da *B. pseudomallei* em sobreviver no solo e água por períodos prolongados pode explicar a relevância do solo e da água na exposição à melioidose. À 0°C ou menos, o microorganismo é capaz de sobreviver somente por 18 dias. Este pode ser um razoável motivo da distribuição predominante do patógeno em regiões tropicais e subtropicais. Esses fatores ainda tem sido relativamente pouco estudados (ELLIS; TITBALL, 1999; DANCE, 2000b; YANG, 2000; INGLIS *et al*, 2001b).

## **2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS FENOTÍPICAS**

### **2.3.1 Metabolismo bacteriano**

A degradação bacteriana de carboidratos ocorre através de várias vias metabólicas nas quais íons hidrogênio (elétrons) são transferidos sucessivamente a um composto de maior potencial redox, com a liberação final de energia em forma de trifosfato de adenosina (ATP). Todos os carboidratos de seis, cinco e quatro carbonos são inicialmente degradados a ácido pirúvico, um intermediário inicial. A glicose é o principal carboidrato provedor de carbono para as bactérias e sua degradação ocorre por três vias principais: a de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), a de Entner-Doudoroff (ED) e a de Warburg-Dickins (via da hexose monofosfato).

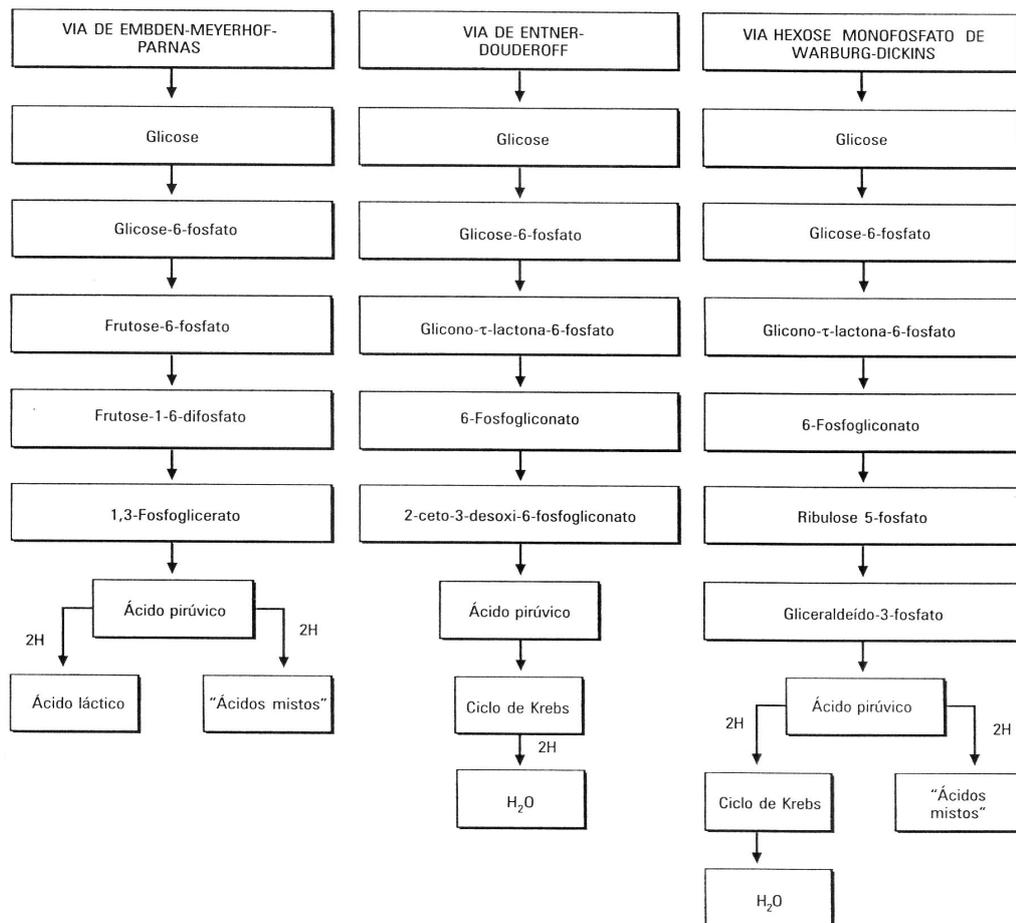
A designação “não-fermentador” significa que este gênero de bactérias não metabolizam carboidratos pela via da fermentação ou pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), também denominada via glicolítica ou anaeróbia. As etapas da via de EMP incluem a fosforilação inicial da glicose, a conversão à frutose fosfato e a clivagem para formar duas moléculas de gliceraldeído fosfato que, através de uma série de etapas intermediárias, forma ácido pirúvico. Este atua comoceptor intermediário de hidrogênio, mas em seguida é oxidado e cede íons

hidrogênio ao lactato de sódio, para formar ácido lático, ou a outros sais orgânicos, para formar um dos vários ácidos denominados mistos. Estes ácidos são os responsáveis pela queda de pH nas provas de fermentação utilizadas para identificar bactérias.

As espécies de *Burkholderia* são dependentes do O<sub>2</sub> como acceptor final de elétrons, são aeróbias estritas, onde o oxigênio molecular é sempre um elemento essencial. Todavia, a espécie *B. pseudomallei* possui a capacidade de crescer em meios contendo nitrato, pois utiliza o nitrato ou nitrito no lugar de O<sub>2</sub> como acceptor final de elétrons, podendo assim, crescer anaerobicamente. Estas bactérias, assim como outros bacilos Gram negativos não fermentadores utilizam a via de Entner-Doudoroff (ED), também chamada via aeróbica, na qual o oxigênio é necessário para a glicólise. Esse metabolismo ocorre em três estágios principais.

Na via de ED, no primeiro estágio as moléculas orgânicas (carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos) são oxidadas e liberam fragmentos de 2 carbonos, os grupos da acetil-coenzima A. No segundo estágio estes grupos acetil são lançados no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tricarboxílico), no qual são degradados enzimaticamente liberando átomos de hidrogênio ricos em energia e também moléculas de CO<sub>2</sub>, o produto da oxidação final dos substratos orgânicos. No terceiro estágio os átomos de hidrogênio são separados em prótons (H<sup>+</sup>) e elétrons ricos em energia. Os elétrons são transferidos ao longo de uma cadeia transportadora de elétrons, onde o oxigênio molecular é reduzido para formar H<sub>2</sub>O (LEHNINGER, 1982).

Os ácidos que são formados via ED ou aqueles que são produzidos no Ciclo de Krebs são extremamente fracos quando comparados a “mistura de ácidos” do resultado da fermentação, exigindo assim, sensíveis indicadores de pH para a determinação deste metabolismo (Ex: azul de bromotimol, presente no meio de oxidação-fermentação de Hugh-Leifson). Um resumo das vias metabólicas pode ser visualizado na **Fig. 4**.



Fonte: KONEMAN *et al*, 2001.

**Figura 4. Vias metabólicas da degradação bacteriana da glicose**

Os processos metabólicos não só contribuem para definir a posição taxonômica das bactérias, mas também determinam as provas e procedimentos utilizados para a identificação de microorganismos (KONEMAN *et al*, 2001).

### 2.3.2 Aspectos Fenotípicos

A *Burkholderia pseudomallei* pertence à família *Pseudomonadaceae* e ao grupo II de RNAr do gênero *Burkholderia*. Desde a descrição deste gênero em 1992 por Yabuuchi *et al*, mais de 15 espécies têm sido identificadas baseadas na seqüência dos genes 16S RNAr, composição de lipídeo celular e ácidos graxos, valores de homologia DNA-DNA e características fenotípicas. A maioria das *Burkholderia* spp. são saprófitas de solo ou patógenas de plantas (ex.: *B. solanocearum*). Do gênero *Burkholderia* somente as espécies *Burkholderia mallei*, *B.*

*pseudomallei*, *B. cepacia* e *B. gladioli* são associadas com doenças humanas (YABUUCHI *et al*, 1992, KONEMAN *et al*, 2001).

A *B. pseudomallei* é um bacilo Gram negativo não-fermentador de glicose, medindo 5 µm de comprimento e de 0,5 a 1,0 µm de largura, é móvel, levemente curvo, aeróbio e não formador de esporo (GILLIGAN; WHITTIER, 1999).

A bactéria exibe uma coloração bipolar característica e é vista isolada, aos pares ou mais comumente, em cadeias. O microorganismo cresce facilmente em muitos meios de rotina e pode ser isolado de sítios normalmente estéreis como sangue utilizando-se técnicas padronizadas (ASHDOWN, 1979; LEELARASAMEE; BOVORNKITTI, 1989; WUTHIEKANUN *et al*, 1990a; IP *et al*, 1995; WALSH; WUTHIEKANUN, 1996).

Embora a bactéria seja de fácil crescimento, freqüentemente não é reconhecida pelos microbiologistas de áreas não endêmicas. Em espécimes com microbiota mista, a *B. pseudomallei* pode ser inibida por comensais e conseqüentemente ter seu crescimento prejudicado, por isso diversos meios para o isolamento seletivo de *B. pseudomallei* têm sido desenvolvidos para solucionar este problema. A forma e coloração do crescimento em meio sólido são altamente variáveis. A estrutura das colônias pode variar de rugosa a mucóide e a coloração de creme à laranja claro, dependendo do meio de cultivo, por exemplo, em ágar sangue e ágar chocolate as colônias assumem coloração creme, já em Agar Ashdown estas se mostram púrpuras e independente do meio de crescimento emitem um característico odor de “terra”. (REDFEARN *et al*, 1966; FARKAS-HIMSLEY, 1968; HOWE *et al*, 1971; ASHDOWN, 1979; DANCE *et al*, 1989a; WUTHIEKANUN *et al*, 1990b).

Os principais testes para identificar a *B. pseudomallei* dentro do grupo de não-fermentadores são: KIA (ágar ferro Kligler - glicose) ou TSI (Tríplice sugar iron - sacarose), utilização da glicose em meio OF, redução de nitrato e atividade de citocromo oxidase (KONEMAN *et al*, 2001). **Tabela 1**

**Tabela 1. Identificação de bacilos Gram negativos**

Teste	<i>B. pseudomallei</i>
KIA	Pico alcalino e fundo alcalino
Redução Nitrato	+
Citocromo oxidase	+

Fonte: KONEMAN *et al*, 2001

A característica fenotípica básica que distingue o gênero *Burkholderia* do gênero *Pseudomonas* é a resistência à polimixina B. Diversas características podem ser utilizadas na distinção da *B. pseudomallei* entre outras espécies de *Burkholderia*. **Tabela 2.**

**Tabela 2. Características-chave de *B. pseudomallei***

Teste	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
Oxidase	+	V (25)	F+ (93)	V (47)
Crescimento:				
Mac Conkey	+	V (88)	+	+
42°C	+	-	V (83)	-
Redução Nitrato	+	+	V (57)	V (33)
Gás do Nitrato	+	-	-	-
Arginina diidrolase	+	+	-	-
Lisina descarboxilase	-	-	V (80)	-
Hidrólise:				
Uréia	V (43)	V (12)	V (45)	V (30)
Gelatina	V (79)	-	V (20)	V (12)
Esculina	V (59)	-	V (63)	-
Citrato	V (77)	-	+	+
Produção de ácido de:				
Glicose	+	+	+	+
Lactose	+	V (12)	+	-
Maltose	+	-	+	-
Manitol	+	V (62)	+	+
Motilidade	+	-	+	+
ONPG	-	-	V (79)	+
Polimixina B	R	R	R	R
Colônias enrugadas	+	-	-	-

+: 90% ou mais de cepas positivas; -: 90% ou mais de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas; os números entre parênteses indicam a percentagem de cepas com reação positiva; R: resistente; F+: fracamente positivo.

Fonte: MURRAY *et al*, 1999; KONEMAN *et al*, 2001.

A *B. pseudomallei* tem sido diferenciada em dois biotipos distintos pela sua habilidade em assimilar oxidativamente a aldopentose L-arabinose. O biotipo Ara+ é capaz de assimilar a

arabinose e o biotipo Ara- não é capaz de assimilar a arabinose. Esses dois biotipos têm demonstrado diferenças na patogenicidade. O biotipo Ara- é considerado virulento tanto para seres humanos como animais e o Ara+ é considerado não virulento e encontrado predominantemente no ambiente. Devido às diferenças no genótipo, fenótipo e patogenicidade desses dois biotipos foi proposto que o biotipo Ara+ não virulento fosse denominada como uma nova espécie, *Burkholderia thailandensis*, devido à alta frequência de achados desta bactéria em solo tailandês. No Nordeste da Tailândia, onde doença clínica é frequente, 75% dos isolados do solo são Ara- e os outros 25% são Ara+. Contudo na região central da Tailândia, onde infecção clínica é rara, somente cepas Ara+ têm sido isoladas do solo (BRETT *et al*, 1998; SMITH *et al*, 1997; VUDDHAKUL *et al*, 1999; SONTHAYANON *et al*, 2002).

Para diferenciar *B. pseudomallei* de *B. thailandensis* são incluídas algumas características adicionais como observação das colônias em meio diferencial, provas bioquímicas e desafio em modelo animal (WUTHIEKANUN *et al*, 1996; WOODS; SONGSIVILAI, 1999). **Tabela 3**

**Tabela 3. Características diferenciais de *B. pseudomallei* e *B. thailandensis***

Teste	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. thailandensis</i>
Assimilação:		
L-Arabinose	-	+
Adonitol	-	+
Dulcitol	+	-
Eritritol	+ (88)	-
5-keto-gluconato	-	+
Meio Ashdown	Colônias secas, rugosas e púrpuras	Colônias lisas, brilhosas e róseas
Inoculação hamster IP	LD <sub>50</sub> < 10 <sup>0</sup>	LD <sub>50</sub> > 10 <sup>5</sup>

IP: intraperitoneal. +: > 90% de cepas positivas. -: > 90% de cepas negativas

Fonte: WUTHIEKANUN *et al*, 1996; WOODS; SONGSIVILAI, 1999.

## 2.4 PATOGÊNESE E QUADRO CLÍNICO

A *B. pseudomallei* é um microorganismo capaz de se adaptar à condições bastante adversas. Pode sobreviver em água triplamente destilada por anos. 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. A fração capsular da bactéria tem pronunciado efeito supressor assegurando a proteção de células microbianas encapsuladas no hospedeiro, se tornando dessa forma um importante fator de virulência. Contudo seu papel específico na infecção ainda não foi elucidado. Diversas funções têm sido sugeridas para a cápsula de polissacarídeos: prevenção da dessecação para transmissão e sobrevivência bacteriana, aderência para colonização, resistência à fagocitose e morte mediada pelo complemento e resistência à imunidade específica do hospedeiro devido à pobre resposta de anticorpos dirigida à cápsula (RECKSEIDLER *et al*, 2001). Os flagelos têm se mostrado importantes determinantes de virulência em estudos experimentais de infecção intranasal e intraperitoneal em camundongos. De acordo com Woods *et al* (1999) a *B. pseudomallei* é um patógeno intracelular facultativo, que pode persistir em células eucarióticas em um estágio dormente até ser reativada. As recaídas ou recorrências da infecção que ocorrem quando o curso do tratamento não é longo o suficiente e dificuldades na terapia antimicrobiana apesar da susceptibilidade *in vitro*, sugerem que a sobrevivência intracelular é importante para a patogênese causada pelo microorganismo. A bactéria é capaz de sobreviver dentro de várias linhagens celulares eucarióticas e tem sido vista em células fagocíticas em espécimes patológicos (ASHDOWN; KOEHLER, 1990; YANG *et al*, 1991; SEXTON *et al*, 1994; WUTHIEKANUN *et al*, 1995; JONES *et al*, 1996; HAUSSLER *et al*, 1998; KESPICHAYAWATTANA *et al*, 2000; LEELARASAMEE, 2004).

A *B. pseudomallei* causa doença em humanos e em uma variedade de animais. Determinadas espécies animais são consideradas altamente susceptíveis à doença como camelos, ovinos e caprinos e outras são consideradas de baixa susceptibilidade como cães, gatos e pássaros (MOLLARET, 1988; CHOY *et al*, 2000).

Tanto em humanos como em animais, a infecção ocorre via inalação, inoculação em pele lesada e ingestão. Casos de transmissão sexual entre humanos e transmissão vertical têm sido relatados. 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* (MC CORMICK *et al*, 1975; LUMBIGANON *et al*, 1988; HALDER *et al*, 1993; ELLIS; TITBALL; CHOY *et al*, 2000; DANCE, 2000b; ABBINK *et al*, 2001).

Em humanos, o período de incubação é normalmente de 2 -3 dias, com média de 9 dias, mas há relatos de desenvolvimento de doença até 26 anos após a exposição inicial (MAYS; RICKETS, 1975; CDC, 2004).

A infecção tem um grande potencial para períodos de latência prolongados, com recaídas para formas agudas e fulminantes. A ativação da infecção latente é associada com doenças intercorrentes ou injúria tecidual. Recaídas da doença após resolução clínica aparente da infecção primária tem mostrado serem recaídas da infecção inicial. Estudos realizados por Sexton *et al* (1993) e Desmarchelier *et al* (1993) usando análises ribotípicas demonstraram que, em muitos casos, recaídas resultam da reativação de focos endógenos persistentes de infecção.

A doença tem sido observada em todas as faixas etárias. Pode ocorrer em indivíduos previamente saudáveis, bem como pessoas com doenças debilitantes. Embora a doença tenha sido documentada em indivíduos aparentemente saudáveis, o microorganismo é provavelmente melhor descrito como um patógeno oportunista.

Fatores de risco para o desenvolvimento da melioidose incluem: diabetes mellitus, alcoolismo, insuficiência renal, doenças pulmonares crônicas como doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose cística, insuficiência cardíaca crônica, leucemia e linfoma, terapia com corticóides, doenças causadoras de imunodeficiência, neoplasmas e feridas penetrantes. A natureza precisa da predisposição para a doença em indivíduos com disfunção imune é ainda pouco estudada. As condições de base descritas acima levam a diversas deficiências do sistema imune, incluindo deficiências na fagocitose, diminuição da resposta humoral, diminuição da resposta celular e diminuição da produção de citocinas. (CHAOWAGUL *et al*, 1993; WOODS *et al*, 1993; BRETT; WOODS, 2000; DANCE, 2000b; SHORT, 2002).

O espectro clínico da melioidose é extremamente diverso e os sinais e sintomas desta doença são semelhantes aos de outras infecções bacterianas, devido à essa característica a doença tem sido denominada de “o grande mimetizador”. Dependendo se a doença é aguda ou crônica, a melioidose pode simular diversas infecções incluindo peste, febre tifóide, tuberculose, coccidioidomicose, histoplasmose, septicemia por outros tipos bacterianos e até mesmo malária e infecções por hantavírus (YEE *et al*, 1988; IP *et al*, 1995; ELLIS; TITTBALL, 1999; SERMSWAN *et al*, 2000).

Quando humanos e animais entram em contato com a *B. pseudomallei*, uma série de eventos são possíveis de ocorrer, e estes incluem: nenhum efeito, seroconversão assintomática e ainda infecção clínica aparente. O desenrolar dos acontecimentos vai ser provavelmente determinado pelo inóculo, a virulência da cepa e pela susceptibilidade do hospedeiro. Cada caso de melioidose é o resultado de um dos três possíveis processos: infecção primária, re-infecção ou re-ativação de doença latente. Diferenças na virulência das cepas infectantes têm sido demonstrada em estudos realizados em animais de laboratório (DANCE, 2000b).

Em animais, os sintomas podem variar conforme a espécie afetada e pode 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 únicos ou múltiplos, que podem estar localizados em diversos órgãos, aparentemente os mais afetados são pulmões, fígado e baço. Também podem ocorrer sintomas neurológicos, onde as lesões são predominantemente microscópicas com a presença de microabscessos ou infiltração linfocitária 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).

Em humanos, diversas formas da doença são reconhecidas: septicemia aguda fulminante, doença aguda, doença sub-aguda doença sub-clínica e infecção crônica. A doença pode ser localizada ou disseminada e vários órgãos ou localizações podem estar afetados entre os quais: pulmões, pele e tecidos subcutâneos, ossos e articulações, fígado, baço, pâncreas, rins, bexiga, próstata, órgãos genitais, cérebro e meninges, glândulas parótidas (especialmente em crianças), linfonodos e pericárdio (DANCE *et al*, 1989b; IP *et al*, 1995; ELLIS; TITTBALL, 1999; LEELARASAMEE, 2004). Um resumo das diferentes apresentações é visto na **Tabela 4**.

**Tabela 4. Classificação da melioidose através da avaliação clínica**

	No. órgãos envolvidos <sup>a</sup>	Hemocultivo	Gravidade da doença	Taxa de mortalidade <sup>b</sup> (%)
Melioidose c/ choque séptico	Vários	positivo	Sepse fulminante / choque séptico	80-95
Melioidose septicêmica disseminada (Ex: pneumonia a partir de abscessos hepáticos ou artrite séptica de abscessos esplênicos)	> 1	Positivo (maioria)	Sepse à sepsse grave	40-50
Melioidose septicêmica (Ex: pneumonia lobar)	1	positivo	Sepse à sepsse grave	10-40
Melioidose localizada	1	negativo	Febre à sepsse	0-10
Melioidose bacterêmica	0	positivo	Inaparente à febre	0
Melioidose assintomática <sup>c</sup>	0	negativo	Inaparente à saudável	0

<sup>a</sup>Classificados pela avaliação clínica. <sup>b</sup>Casos tratados com ceftazidima. <sup>c</sup>Casos com sorologia positiva para melioidose

Fonte: LEELARASAMEE, 2004.

A melioidose aguda septicêmica é mais grave manifestação da doença e ocorre principalmente devido à presença de diversas doenças de base já descritas. O quadro típico é um choque séptico após um breve período de incubação e envolvimento de diversos órgãos com a formação de abscessos. O choque séptico é caracterizado por um alto débito cardíaco, baixa resistência vascular sistêmica e queda da pressão sanguínea. É freqüentemente complicado pelo desenvolvimento de danos irreversíveis aos órgãos e por uma síndrome de múltipla disfunção dos órgãos (anteriormente referida como falência múltipla dos órgãos). O foco primário pode ser demonstrado em mais de 50% dos pacientes mais comumente nos pulmões e menos freqüentemente na pele e tecidos moles de lesões da pele. Apesar da terapia com antibióticos, vasopressores e fluidos intravenosos, as taxas de mortalidade durante as primeiras 48h após a admissão hospitalar podem ser tão altas quanto 80-100%. Estes pacientes septicêmicos mostram disseminação da bactéria a vários órgãos.

A pneumonia é a apresentação clínica mais comum da melioidose em todos os estudos envolvendo áreas endêmicas. Doença pulmonar supurativa aguda crônica pode ocorrer após inalação ou instilação nasal, mas resulta muito mais freqüentemente de disseminação hematogênica. Currie *et al* (2000a), observaram que pacientes com pneumonia por melioidose septicêmica estão freqüentemente muito mais doentes sistemicamente que a aparência radiográfica dos pulmões sugere, indicando disseminação da doença além desse ponto.

A pneumonia causada pela melioidose é bilateral, caracterizada por febre alta, dor de cabeça, mialgia forte e generalizada e dor no peito, com tosse que pode ser ou não produtiva com abundante escarro purulento e algumas vezes contendo estrias de sangue vivo. As radiografias podem mostrar uma aparência de densidade nodular difusa que pode expandir e finalmente cavitatar, formando múltiplos cistos.

A patologia da infecção aguda tipicamente exhibe necrose, com infiltrado polimorfonuclear e algumas células gigantes multinucleadas. A doença supurativa aguda localizada tem comumente como sua primeira apresentação um nódulo doloroso no sítio de inoculação da pele e tecidos moles. Outra forma da doença localizada é a linfadenite regional, que pode supurar com descarga de pus amarelado no local. As formas localizadas podem progredir para a doença hematogênica, desse modo envolvendo muitos órgãos, mais comumente os pulmões, fígado e baço.

A forma sub-aguda da melioidose é caracterizada patologicamente pela necrose caseosa e por infiltrado predominantemente mononuclear e de células do plasma. A apresentação subaguda é vista mais freqüentemente nos pulmões em forma de abscesso ou empiema. De forma semelhante aos pulmões, o fígado pode demonstrar abscessos solitários ou múltipla formação de

abscesso. Estes, no fígado ou baço tem uma aparência de “queijo suíço” ao ultra-som. Tanto na forma subaguda como pulmonar crônica, uma apresentação bem conhecida é um infiltrado supra-lobular, com ou sem cavitação, de forma semelhante à encontrada na tuberculose (SHORT, 2002).

A parotidite supurativa é uma forma da doença aguda vista quase que exclusivamente em crianças. Nesses casos drenagem cirúrgica é necessária para evitar supuração e complicação do neurônio motor inferior.

A síndrome aguda menos freqüente é a melioidose neurológica. Tanto abscessos cerebrais e encefalite podem ocorrer. Tem sido recentemente reconhecida a síndrome da meningoencefalite que pode envolver o tronco cerebral, cerebelo e cordão espinhal. A maioria dos casos de melioidose neurológica de humanos e animais têm sido descritos na Austrália (4% dos casos de melioidose), mas não parecem ser causados por cepas específicas com predileção pelo sistema nervoso central (CURRIE *et al*, 2000b).

As infecções crônicas podem ser assintomáticas e assim persistirem por anos. Reativações de infecções crônicas para aguda podem ocorrer quando o hospedeiro é imunocomprometido (LOWE *et al*, 2002).

A melioidose deve ser suspeitada em viajantes ou refugiados de áreas endêmicas ou suspeitas, que apresentem doença febril aguda ou sintomas de infecção ulcerativa crônica ou com formação de abscessos.

## **2.5 DIAGNÓSTICO**

### **2.5.1 Diagnóstico Fenotípico**

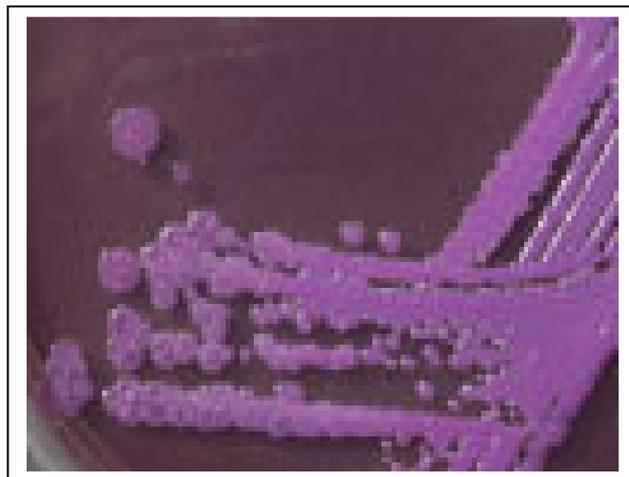
Os métodos mais usados, ainda hoje, para a detecção de *B. pseudomallei* de amostras clínicas e ambientais envolvem o isolamento e a caracterização da bactéria. O diagnóstico microbiológico é feito através de identificação e observação de características das colônias em meios de cultivo e através de provas bioquímicas manuais e sistemas semi-automatizados, mais práticos para identificação. Para o diagnóstico laboratorial, entretanto, limitada experiência com este microorganismo pode resultar em identificação incorreta (DANCE *et al*, 1989a; LOWE *et al*, 2002).

O isolamento e a identificação do agente causal pelo cultivo e testes bioquímicos permanecem como o padrão ouro para o diagnóstico definitivo. O tempo médio para que este se concretize costuma ser de 3 a 7 dias, em muitos casos os resultados são obtidos após o óbito dos pacientes. Os espécimes utilizados para o isolamento e diagnóstico são: hemocultivos, escarro,

fluidos, pus, exsudato de feridas, swab faríngeo e urina. Em casos agudos, cultivos de sangue e urina são freqüentemente positivos, contudo em formas crônicas ou sub-agudas pode ser necessária biópsia.

Para o isolamento e identificação podem ser usados meios de rotina como ágar sangue e Mac Conkey, embora maior facilidade em se isolar a *B. pseudomallei* nestes meios seja conseguida com amostras oriundas de sítios normalmente estéreis como o líquido. O isolamento da bactéria de sítios normalmente não estéreis como escarro e amostras ambientais ocorre com menor sucesso nos meios de rotina, pois a *B. pseudomallei* pode ter seu crescimento prejudicado pela competição com outros microorganismos.

O desenvolvimento de meios seletivos como o Ashdown em forma de ágar ou caldo tem oferecido maior capacidade de seleção do microorganismo, pois contém gentamicina e cristal violeta, dois agentes seletivos e vermelho neutro que é incorporado às colônias em crescimento conferindo a cor púrpura característica das colônias neste meio. **Fig. 5.** Espécimes clínicos contendo microbiota mista como escarro, fezes e swab de faringe devem ser semeados diretamente em ágar Ashdown, reservando os meios de rotina como ágar sangue e ágar chocolate para diagnóstico de espécimes de sítios normalmente estéreis. Amostras de urina podem ser cultivadas em ágar Mac Conkey, Ashdown ou CLED (Cistina-lactose-eletrólito-deficiente) (ASHDOWN, 1979; LEW; DESMARCHELIER, 1994; WALSH; WUTHIEKANUN, 1996; SERMSWAN *et al*, 2000; WUTHIEKANUN *et al*, 2001; SHORT, 2002).



Fonte: [http://www.hpa.org.uk/infections/topics\\_az](http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az)

**Figura 5.** Ágar Ashdown mostrando colônias púrpuras características de *B. pseudomallei*.

Todos os meios sólidos são incubados aerobicamente à 37°C, placas de ágar Ashdown por 4 dias e placas de ágar não seletivo por 2 dias. Cultivos puros de *B. pseudomallei* são geralmente obtidos do sangue e de abscessos fechados ou do trato urinário e estes de modo geral apresentam menos problemas quanto ao diagnóstico. Em sítios estéreis a identificação das colônias é relativamente simples devido à ausência de microbiota contaminante; em cultivos puros, colônias típicas usualmente se desenvolvem em 48h. Em culturas mistas, particularmente do trato respiratório, cuidado e vigilância são necessários para distinguir as colônias de *B. pseudomallei* da flora normal, uma vez que estas se desenvolvem relativamente mais lentamente em comparação com estas. Após semeadura em ágar Ashdown, na presença de outros bacilos Gram negativos, as placas devem ser incubadas por 4 dias antes de serem descartadas como negativas, devido à possibilidade do crescimento mais lento. O crescimento de uma simples colônia de *B. pseudomallei* não é incomum.

Em caldo seletivo Ashdown ou outros meios de cultivo líquidos como o BHI, uma película esbranquiçada e rugosa pode se desenvolver lentamente e quando presente, fornece o primeiro indício da presença da bactéria. Contudo outros microorganismos também podem produzir esta superfície de crescimento como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos. O caldo seletivo deve ser incubado à 37°C (ou 42°C, o que aumenta a seletividade do caldo) por 48h antes de ser subcultivado em ágar Ashdown. Caldos não seletivos são incubados à 37°C por 24h e então subcultivados em caldo seletivo e ágar Ashdown (WUTHIEKANUN *et al*, 1990b; WALSH; WUTHIEKANUN, 1996).

Os meios de cultivo mais comumente usados para isolar e identificar o microorganismo e as características apresentadas nestes, encontram-se descritos na **tabela 5**.

**Tabela 5. Característica de colônias de *B. pseudomallei* em diferentes meios de cultivo.**

Meio de cultivo	Duração da incubação	Tamanho das colônias	Aspecto das colônias
Ágar sangue	24h	≤ 1 mm	Coloração creme, semelhante à coliformes. Algumas colônias são mucóides / pode haver discreto brilho metálico / não hemolisa
	48h	1 - 2 mm	Brilho metálico / podem ser rugosas semelhante à <i>Pseudomonas stutzeri</i>
	72h	2 - 3 mm	Secas e rugosas
CLED	24h	0.5 mm	Colônias de coloração azul claro se isoladas, e amarelo claro (confluentes)
	48h	1-2 mm	Colônias amarelas claro, planas com superfície fosca. Podem ter um leve brilho e início de rugosidade
	72h	< 3 mm	Colônias amarelas com aparência de “ovo frito”, devido à região amarelo escuro em sua parte central. Algumas cepas podem ser muito secas e rugosas neste momento
Ágar Mac Conkey	24-48h	0.5 - 2 mm	Assemelham-se à coliformes fraco fermentadores de lactose / geralmente são lisas / pode desenvolver brilho
Ágar Ashdown	18-24h	Pequenos pontos	Se algum crescimento é visível, as colônias são rosa claro com um brilho visível. Poucas colônias podem precisar de 48h de incubação para se tornarem visíveis
	48h	1-2 mm	Colônias rosa-púrpura, planas, levemente secas com um brilho definido
	72h	2-3 mm	Tornam-se ressecadas e rugosas e aprofundam a cor. Colônias variantes são comuns, como mucóides e secas ou em diferentes tons de púrpura

Fonte: WALSH; WUTHIEKANUN, 1996.

A capacidade de assimilação de carboidratos pode ser feita em meio OF (oxidação-fermentação), mas para a assimilação de arabinose dá-se preferência ao uso de meio sais mínimo contendo 0,2% de L-arabinose, considerado mais confiável que o meio OF, tendo sido preconizado e empregado por diversos autores (WUTHIEKANUN *et al*, 1996).

Para o diagnóstico podem ser seguidos fluxogramas de identificação conforme mostrado no **Anexo I**.

Podem ser usados kits comerciais para a identificação de bactérias Gram negativas não-fermentadoras. Estes sistemas têm alcançado grande credibilidade no meio científico, se tornando aptos para identificação de espécies de *Burkholderia*. Diversos kits têm sido utilizados para o diagnóstico, entre estes: API 20E, API 20NE e Vitek 1 (BioMerieux), alcançando índices de 99%, 98% e 99% respectivamente de identificações corretas de *B. pseudomallei* em estudo realizado por Lowe *et al* (2002). O Vitek 2 tem se mostrado insatisfatório para identificação de *B. pseudomallei* com apenas 19% de cepas identificadas corretamente (DANCE *et al*, 1989a; LOWE *et al*, 2002).

Um sistema que tem sido utilizado com bastante frequência é o API 20NE. Para tanto, após inoculação da cepa a ser identificada, é feita a leitura em um período de até 48h e o resultado é dado através de um perfil numérico de 7 dígitos a ser interpretado por catálogo ou software do fabricante, a fim de identificar a espécie problema. Os perfis numéricos determinados pelo kit para a identificação da bactéria em sua maioria são: **1156577**, **1556577** e **1156576**. Embora seja conveniente e óbvia a necessidade de produção de diversos testes bioquímicos convencionais e meios de teste com os seus concomitantes problemas de controle de qualidade que o teste substitui, o API 20NE oferece praticidade mas não oferece vantagens adicionais em termos de rapidez de identificação. Outra desvantagem do Kit é o seu custo, que pode estar fora do orçamento de muitos laboratórios em áreas onde a melioidose é endêmica. Por outro lado, o sistema API 20NE pode habilitar laboratórios em áreas não endêmicas a identificar cepas de *B. pseudomallei* importadas ocasionalmente. O uso do kit pode ajudar também a esclarecer a verdadeira distribuição epidemiológica da melioidose, que pode estar mais disseminada do que os relatos mostram. Em áreas onde a melioidose é endêmica, testes de triagem simples como semeadura em ágar Ashdown, teste de oxidase, coloração de Gram e resistência à gentamicina (colônias rugosas e púrpuras, oxidase positiva, Gram negativa e resistente à gentamicina) são um modo simples e econômico de identificar cepas suspeitas de *B. pseudomallei*. Nos casos de identificação duvidosa, esta pode ser confirmada por sistema API 20NE ou provas bioquímicas convencionais (DANCE *et al*, 1989a; DANCE, 2000a).

Devido o rápido aumento no número de novas espécies descritas e filogeneticamente relacionadas, torna-se difícil a identificação de *B. pseudomallei* baseando-se apenas em características microbiológicas, principalmente quando esta ocorre em áreas onde normalmente os laboratórios não estão acostumados ao diagnóstico devido à baixa frequência de isolados clínicos e ambientais. Deve ser levado em conta também o nível de complexidade necessário do laboratório microbiológico a fim de permitir manipulações para o cultivo e identificação do microorganismo, considerando-se que todas as manipulações devem ser realizadas em cabines de segurança em laboratórios com nível de biossegurança 3, tendo-se já registrados casos de contaminação laboratorial (SCHLECH *et al*, 1981; GREEN; TUFFNEL, 1986).

Diversos testes sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da doença, entre estes o teste de hemaglutinação indireta, ensaio de imunofluorescência e ensaio imunoenzimático. Apesar de diversos testes sorológicos para detecção de anticorpos de *B. pseudomallei* terem sido desenvolvidos, estes não são totalmente confiáveis devido à possibilidade de reações cruzadas com outros microorganismos. Outro ponto discutível é que cerca de 20% de resultados sorológicos se mostram negativos no início da doença e ainda apresentam alto nível de *background* em áreas onde a melioidose é endêmica uma vez que grande parte da população já pode ter sido exposta ao microorganismo, nesse caso amostras de soro de pacientes residentes em tais áreas podem ser positivas na ausência de doença clínica. Com o aumento das viagens internacionais, a melioidose tem ocorrido em áreas onde normalmente não é endêmica, nesses casos o diagnóstico sorológico pode ter um papel relevante (ASHDOWN, 1981; LEELARASAMEE, 1985; ASHDOWN *et al*, 1989; ANUNTAGOOL *et al*, 1993; VADIVELU *et al*, 1995; SERMSWAN *et al*, 2000; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2000).

### **2.5.2 Diagnóstico molecular**

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 e do biotipo causal em regiões endêmicas, além do mais, métodos moleculares reduzem a exposição dos técnicos e pesquisadores do laboratório ao microorganismo considerado potencialmente perigoso. Dessa forma, o diagnóstico molecular tem-se tornado a opção mais segura, prática e rápida para identificação e caracterização de isolados em todo o mundo (SURA *et al*, 1997; OLIVE; BEAN, 1999; GEE *et al*, 2003).

Utilizando a técnica da PCR tem-se desenvolvido *primers* que permitem de modo simples e rápido a detecção de até duas espécies simultaneamente como para *B. pseudomallei* e *B.*

*thailandensis* (KUNAKORN *et al*, 2000; KONEMAN *et al*, 2001; SONTHAYANON *et al*, 2002).

Para a detecção da *B. pseudomallei* por PCR, diversas seqüências de *primers* tem sido empregadas por diversos autores em diferentes estudos, cada qual com suas peculiaridades e metodologia para a detecção da bactéria. As reações de detecção baseadas na PCR têm a capacidade de amplificar DNA presente em cerca de  $10^4$  células e têm sido usadas para detectar a *B. pseudomallei* tanto em amostras de solo como amostras clínicas. Grande parte das seqüências empregadas utiliza parte dos genes ribossomais 16S e 23S devido à natureza altamente conservada desses genes entre as espécies bacterianas. Também tem sido utilizado genes de seqüências cromossômicas do DNA como *primers* específicos para detectar genes flagelares (LEW; DESMARCHELIER, 1994; TUNGPRADABKUL *et al*, 1999; KUNAKORN *et al*, 2000; CHEN *et al*, 2003).

## 2.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIBACTERIANO E TRATAMENTO

O tratamento da melioidose representa um desafio para profissionais de saúde do mundo todo, pois a doença é difícil de tratar e a resposta ao tratamento empregado pode terminar por desapontar a equipe de saúde envolvida na terapêutica apesar das altas doses de antibióticos via parenteral. Antes do uso dos antimicrobianos, a taxa de letalidade dos casos de infecções por *B. pseudomallei* era de 95%. Entretanto apesar do uso de antibióticos apropriados e terapia intensiva de suporte, a mortalidade em pacientes com melioidose septicêmica é 40% ou maior (WOODS *et al*, 1999).

A estratégia terapêutica tem sido 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 extracelular como intracelular, inibindo a liberação de lipopolissacarídeos e outros mediadores exógenos e conseqüentemente corrigindo a coagulopatia e injúria endotelial (INGLIS *et al*, 2001; LEELARASAMEE, 2004).

A *B. pseudomallei* é intrinsecamente resistente à muitos antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, bem como à primeira e segunda geração de cefalosporinas, benzilpenicilina G, polimixinas e macrolídeos (JENNEY *et al*, 2001).

Até 1989, a terapia convencional para a doença consistia de uma combinação de drogas predominantemente bacteriostáticas: cloranfenicol, sulfa-trimetoprima, doxiciclina e algumas vezes Kanamicina, dadas por um período de seis semanas à seis meses. Na Tailândia, onde a

melioidose é uma doença endêmica, o tratamento convencional para infecções por *B. pseudomallei* incluía esta combinação. O microorganismo pode desenvolver resistência cruzada a todos os componentes da terapia antibacteriana convencional (DANCE *et al*, 1989b).

Novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos vem mostrando uma maior efetividade. De modo geral o microorganismo é sensível à ceftazidima, imipenem, meropenem, piperacilina, amoxicilina-clavulanato, ceftriaxona e cefotaxima.

Testes realizados a partir da década de 80 recomendaram a ceftazidima como o antibiótico de escolha para substituir o uso de altas doses de cloranfenicol, doxiclina e sulfa-trimetoprim. Outras cefalosporinas de 3ª geração são menos efetivas. A ceftazidima, é segura, bem tolerada e altamente ativa contra *B. pseudomallei in vitro* e seu uso para o tratamento da melioidose tem reduzido a mortalidade de casos considerados graves. Contudo, a observação de resistência à ceftazidima durante o tratamento tem sido previamente relatada. Atualmente, estudos mostram que os novos antibióticos carbapenens são também indicados. Os carbapenens eliminam a *B. pseudomallei* mais rapidamente que as cefalosporinas, e destes o imipenem provou ser equivalente à ceftazidima em um grande estudo randomizado. Uma das limitações para o tratamento é que estes antibióticos têm um alto custo e impõem uma grande carga financeira aos países em desenvolvimento (WHITE *et al*, 1989; DANCE *et al*, 1991; SMITH *et al*, 1994).

A *B. pseudomallei* não somente é resistente à terapia com muitos antibióticos, mas clinicamente falha em responder às drogas que é susceptível *in vitro*. Observa-se que a resistência à muitos  $\beta$ -lactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamase é crescente. O sequenciamento do genoma da bactéria revelou a presença de genes de  $\beta$ -lactamase de classe A, C e D, portanto a terapêutica deve sempre ser realizada baseada em testes de sensibilidade (LEELARASAMEE, 2004).

Diversos estudos apontam as fluoroquinolonas como inapropriadas para o tratamento da melioidose. Novas quinolonas como a ciprofoxacina, grepafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e temafloxacina são somente marginalmente ativas contra *B. pseudomallei*. Seu valor terapêutico é duvidoso ou limitado. Entretanto, a sensibilidade pode ser falsamente alta para estas novas quinolonas usando-se os testes convencionais de disco difusão e estes devem ser interpretados com cautela (WINTON *et al*, 1988; SOOKPRANEE *et al*, 1991; HSUEH *et al*, 2001; HO *et al*, 2002).

O protocolo desenvolvido pelo Royal Darwin Hospital, localizado no território norte da Austrália, para o tratamento inicial da melioidose aguda consiste de ceftazidima (2g via intravenosa de 6 em 6 horas por 14 dias [crianças: 50mg/ Kg, IV, de 6 em 6 horas]) ou meropenem (1g de 8 em 8 horas por 14 dias [crianças: 25mg/ Kg, IV, de 8 em 8 horas] com

sulfa-trimetoprim na dose de 320/ 1600mg via oral ou IV de 12 em 12 horas por 14 dias [crianças: 8/ 40 mg/ Kg]. A duração de 14 dias pode ser excedida em pacientes criticamente doentes, com extensiva doença pulmonar, osteomielite, artrite séptica ou melioidose neurológica (SHORT, 2002).

A duração ótima da antibioticoterapia permanece ainda a ser determinada. Recaídas tem ocorrido após tratamentos aparentemente de sucesso com antibióticos. Recomendações para a terapia da melioidose grave de modo geral incluem a ceftazidima ou imipenem por 10 dias à 4 semanas, seguidos por terapia de manutenção com amoxicilina-clavulanato ou uma combinação de sulfa-trimetoprim e doxiciclina por 10 a 18 semanas. A terapia de erradicação utilizando sulfa-trimetoprim, doxiciclina ou cloranfenicol deve ter uma duração mínima de três meses (CHAOWAGUL *et al*, 1999; SHORT, 2002).

Em recente estudo publicado pelo CDC foram estabelecidos dosagem, duração e antimicrobiano a serem usados para tratamento inicial, de manutenção e profilaxia para pessoas expostas ao microorganismo (CDC, 2004). **Tabela 6.**

**Tabela 6. Recomendações de tratamento para a melioidose**

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Duração</b>
<b>Terapia Inicial intensiva</b>		
Ceftazidima	50 mg / Kg (até 2 g) / cd 6h ou	14 d
Meropenem	25 mg / Kg (até 1 g) / cd 8h ou	14 d
Imipenem	25 mg / Kg (até 1g) / cd 6h e (opcional)	14 d
Sulfa-trimetoprim	40 + 8 mg / Kg (até 1600 + 320 mg) / cd 12h	14 d
<b>Terapia de erradicação</b>		
Sulfa-trimetoprim	40 + 8 mg / Kg (até 1600 + 320 mg) / cd 12h e (opcional)	3 meses
Doxiciclina	2 mg / Kg até 100 mg / cd 12h	3 meses
<b>Profilaxia pós – exposição</b>		
Sulfa-trimetoprim	40 + 8 mg /kg (até 1600 + 320 mg) v.o / dia ou	3 semanas
Doxiciclina	2 mg/ kg (até 100mg) v.o / dia	3 semanas

Fonte: CDC, 2004.

Em resumo, a identificação correta do microorganismo, a avaliação da gravidade da infecção e a realização de teste de susceptibilidade à antimicrobianos são parâmetros de extrema importância no desenvolvimento de uma estratégia terapêutica efetiva (BRETT; WOODS, 2000).

## 2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

Até o momento não há vacina para a melioidose. Contudo, alguns laboratórios estão em processo de síntese de possíveis candidatos à vacina como a proteína flagelina, exopolissacarídeo e uma endotoxina derivada do lipopolissacarídeo II devido ao alto nível de Ac anti-lipopolissacarídeo ser significativamente protetor contra *B. pseudomallei* (BRETT; WOODS, 2000; STEINMENTZ *et al*, 2000).

A prevenção da infecção em áreas endêmicas para a doença pode ser difícil uma vez que o contato com o solo contaminado pode ser por vezes comum, dependendo da atividade de trabalho dos habitantes. No setor de saúde, precauções de rotina com sangue e fluidos corporais pelos profissionais, pode prevenir a transmissão.

Uma vez que o período de incubação e reativação pode variar de semanas a muitos anos, a vacina ou uma quimioprofilaxia pode ser uma possível modalidade de intervenção para grupos de alto risco. Quimioprofilaxia pós-exposição pode ser realizada com sulfá-trimetoprim ou doxiclina (tabela 6). A vacina poderia ser usada para reduzir as taxas de recaída.

Estudos realizados por Howard e Inglis (2003b) sugerem que cloração da água (1 ppm de cloro livre por pelo menos 30 minutos antes do uso) pode ser um método satisfatório para a prevenção da multiplicação de *B. pseudomallei* no suprimento de água potável, embora não ocorra eliminação total das bactérias devido este método possuir apenas efeito bacteriostático.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Fazer uma análise fenotípica das amostras de *Burkholderia pseudomallei*, consistindo dos primeiros isolados de microepidemia descritos e caracterizados no território brasileiro.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Caracterizar fenotipicamente os primeiros isolados brasileiros de *B. pseudomallei*
- Determinar o seu perfil de resistência à drogas antimicrobianas
- Realizar o diagnóstico dos isolados bacterianos por PCR

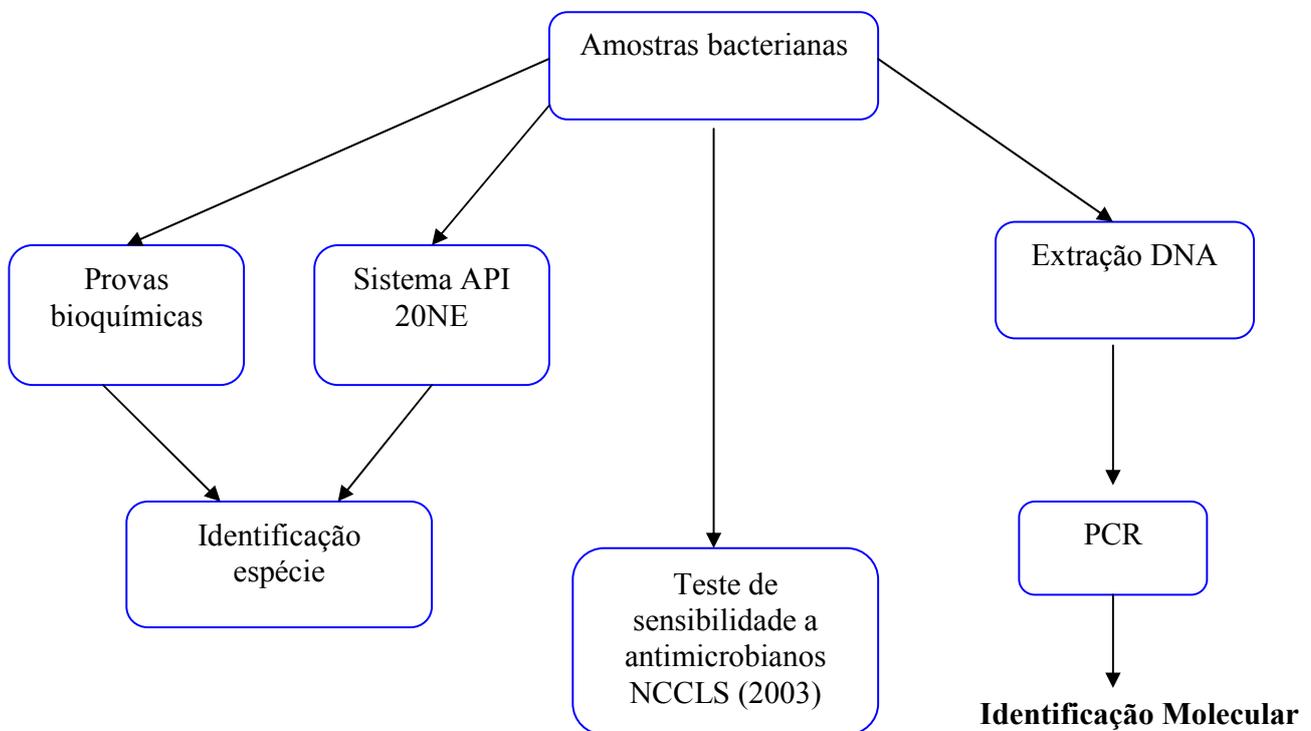
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras bacterianas

Foram utilizados 3 isolados de *Burkholderia pseudomallei* originados de 3 pacientes diferentes. As amostras foram provenientes de um surto microepidêmico, ocorrido em fevereiro de 2003 na localidade de Tejuçuoca, interior do Estado do Ceará, que vitimou quatro crianças da mesma família, com idade variando entre 10 e 15 anos. Destas, três vieram a óbito, sendo que dois isolados foram recuperados *pos mortem* de material de baço, pulmão e fígado, e um isolado foi recuperado de hemocultivo de um paciente sobrevivente. Não tivemos acesso ao quarto isolado bacteriano.

### 4.2 Condições do experimento

Os experimentos foram realizados no setor de microbiologia pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, no período de agosto de 2004 a fevereiro de 2005. Todos os procedimentos envolvendo células viáveis foram realizados em nível de contenção e laboratório de biossegurança nível 3 (Advisory Committee on Dangerous Pathogens, 1990; DESMARCHELIER *et al*, 1993). O experimento seguiu o fluxograma descrito na **Fig. 6**



**Figura 6. Fluxograma geral da metodologia experimental.**

### **4.3 Processamento primário:**

O material proveniente dos tecidos da necropsia foi semeado em caldo BHI e ágar Mac Conkey. Foram observadas as características morfológicas e pureza das colônias. O material isolado do processamento primário após sucessivos repiques foi semeado em ágar estoque, para estudos em etapas posteriores.

#### **4.3.1 Isolamento primário e identificação preliminar:**

A identificação preliminar foi feita através da observação das características das colônias em meio de cultivo Mac Conkey, coloração de Gram, coloração para evidenciar bi-polaridade dos bacilos com azul de metileno, seguida da realização de provas bioquímicas manuais.

Posteriormente, o material foi semeado em meios de rotina ágar sangue e ágar chocolate. Em seguida após a observação da coloração de Gram e realização das provas bioquímicas de triagem como oxidase, motilidade pela gota pendente e TSI, concluiu-se tratar de um microorganismo não fermentador e após a realização de provas bioquímicas complementares de OF, descarboxilação de arginina e lisina, redução do nitrato e nitrato a gás, o microorganismo foi identificado como *B. pseudomallei*.

#### **4.3.2. Re-identificação dos isolados:**

Todos os isolados foram re-identificados através de características morfológicas em ágar sangue, chocolate, Mac Conkey, CLED, tripticase soja e Ashdown; provas bioquímicas de acordo com esquema de identificação proposto por Gilligan e Whittier (1999) e Koneman *et al* (2001) para *B. pseudomallei* e também através do teste semi – automatizado API 20NE preconizado pela literatura para a identificação de *B. pseudomallei*.

##### **4.3.2.1 Isolamento em meios de cultivo**

A fim de melhor caracterizar as amostras fenotipicamente durante este estudo, estas foram retiradas do ágar estoque, inoculadas em BHI e semeadas em ágar sangue de carneiro (ASA), ágar chocolate, ágar Mac Conkey, tripticase soja, CLED e ágar Ashdown, um meio seletivo preferencial para isolamento de *B. pseudomallei* contendo gentamicina descrito por Ashdown (1979), que produz colônias rugosas e púrpuras características. A observação do crescimento foi realizada até 7 dias após incubação à 37°C. O modo de preparo dos meios de cultivo utilizados neste estudo encontra-se descrito no **Anexo II**.

#### 4.3.2.2 Provas bioquímicas

Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de oxidase, produção de catalase, presença de motilidade em ágar semi-sólido, arginina diidrolase, descarboxilação de lisina em meio descarboxilase de Moeller, prova de *orto*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), indol, redução de nitrato, nitrato a gás, citrato, hidrólise da uréia, hidrólise da gelatina, hidrólise da esculina, provas de oxidação-fermentação (OF) de Hugh-Leifson, utilizando os seguintes carboidratos e álcoois: adonitol, dulcitol, eritritol, lactose, maltose, manitol e glucose. As provas foram realizadas utilizando inóculo denso e incubação à 37°C e excetuando-se as de OF, foram avaliadas por até 48h. As reações de oxidação-fermentação foram acompanhadas por até 15 dias.

Foram avaliadas ainda capacidade de crescimento a 42°C em ágar Ashdown, capacidade de crescimento em ágar Mac Conkey à 37°C e avaliação de resistência à polimixina B (Newprov), característica do gênero *Burkholderia* (KONEMAN *et al*, 2001). O modo de realização das provas bioquímicas e o preparo dos meios utilizados encontram-se descritos no **Anexo II**.

#### 4.3.2.3. Identificação pelo API 20NE:

A identidade de todos isolados foi confirmada através de um sistema semi-automatizado preconizado para a identificação de bactérias não entéricas e não fastidiosas (Dance *et al*, 1989a).

As galerias do API 20NE comportam 20 microtubos que contém substratos desidratados. Estas combinam 8 testes convencionais: redução de nitrato, indol, fermentação da glicose, arginina diidrolase, urease, hidrólise da esculina, gelatinase,  $\beta$ -galactosidase e 12 testes de assimilação dos seguintes substratos: glicose, arabinose, manose, manitol, n-acetil-glucosamina, maltose, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato e fenil acetato e ainda, uma base de dados. È necessário fazer o teste da oxidase em separado.

As cepas a serem identificadas foram semeadas em ágar soja-tripticase e após 24h de incubação feita a diluição na escala 0,5 de Mc Farland e realizada a inoculação nas galerias. Estas foram incubadas à 30°C por 24h, feita a primeira leitura e re-incubadas por mais 24h, totalizando 48h. A identificação foi finalizada através da observação do perfil numérico de 7 dígitos fornecido e consulta em catálogo analítico (fornecido pelo fabricante) (6ªEd. 1997 – Bio Merieux). A metodologia mais detalhada para utilização do API 20NE encontra-se descrita no **Anexo II**.

#### 4.4 Assimilação de L-arabinose

Com o propósito de verificar a capacidade de assimilação do carboidrato L-arabinose pela bactéria em estudo, foram realizados testes de assimilação e oxidação deste carboidrato. Utilização de L-arabinose foi determinada em meio OF, em sistema API 20NE e também por crescimento em meio ágar sais mínimo contendo 0,2% de L-arabinose (Difco). Agar sais mínimo contendo glicose (Difco) foi usado como controle do crescimento para os três isolados bacterianos. O modo de preparo dos meios utilizados encontra-se descrito no **Anexo II**.

#### 4.5 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA)

O teste de sensibilidade *in vitro* das 3 cepas isoladas foi realizado pelo método de disco difusão de Bauer & Kirby (1966), que corresponde à padronização estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os testes foram realizados segundo recomendação do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para bactérias Gram negativas que crescem aerobicamente, de acordo com documento M2-A8 do NCCLS (2003).

Os agentes antimicrobianos testados incluíram: piperacilina + tazobactam (100 /10 µg), ticarcilina + ácido clavulânico (75/10 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefalotina (30 µg), imipenem (10 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg) e sulfá + trimetoprim (25 µg). Os agentes antimicrobianos pertenciam à marca Cecon.

Todos os testes de susceptibilidade foram realizados utilizando como controles de qualidade a cepa ATCC 25.922 de *Escherichia coli* e a cepa ATCC 27.853 de *Pseudomonas aeruginosa*, como preconizado pelo NCCLS.

Os critérios de definição para classificar as cepas bacterianas como sensíveis, intermediárias ou resistentes aos antimicrobianos e os tamanhos dos halos das cepas controle de qualidade utilizadas encontram-se no **Anexo II**.

#### 4.6 Descarte de resíduos

Todo material gerado no NB-3 proveniente do cultivo da *B. pseudomallei* era inicialmente descartado em formol (P.A.) ou glutaraldeído 2 % e após 24h à 48h autoclavado à 121°C por 30 minutos para completa e eficiente inativação do microorganismo.

#### 4.7 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído pela técnica de extração fenol-clorofórmio modificada (CLARRIDJE *et al*, 1993).

Para o procedimento, as três amostras de *B. pseudomallei* foram cultivadas em placas de Petri média em ágar Mueller-Hinton por 24h e então subcultivadas e feita coloração de Gram para checar a pureza dos cultivos.

A metodologia seguida para a extração de DNA e o preparo das soluções e reagentes utilizados encontram-se descritos no **Anexo IV**.

Após o término desta etapa os DNAs genômicos das amostras foram mantidos estocados à 4°C.

##### 4.7.1 Verificação da presença e da integridade do DNA genômico

Após a extração as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose à 1% contendo Brometo de etídio, com o objetivo de verificar a presença e a integridade do DNA extraído. Após a corrida eletroforética o padrão de bandas resultante foi visualizado sob luz UV e registrado em máquina digital, para que posteriormente fosse avaliado o resultado do procedimento.

##### 4.7.2 Quantificação do DNA

As amostras foram diluídas na proporção de 1:50 em tampão tris-HCl e a quantificação foi realizada em equipamento Gene Quant *pro* (Amersham Bioscience). A metodologia detalhada da quantificação encontra-se descrita no **Anexo IV**.

#### 4.8 Reação de Cadeia em Polimerase (PCR)

A identidade de todos os três isolados foi confirmada pela técnica de PCR. Para tanto, neste estudo foi utilizado um par de *primers* do gene 16S de RNAr.

##### 4.8.1 Seqüências iniciadoras utilizadas

Foram utilizadas duas seqüências de oligonucleotídeos com 19 bases (Invitrogen). As seqüências de *primers* utilizadas são mostradas na tabela 7 e foram utilizadas anteriormente por Dharakul *et al* (1996)

**Tabela 7. Seqüências iniciadoras do gene 16S de RNAr para diagnóstico de *B. pseudomallei***

<i>Primer</i>	Posições	Fita	Seqüência (5'→ 3')
<b>Outer</b>			
U33	33-52	Sense	AAGTCGAACGGCAGCACGG
OL731	749-731	Antisense	TTTGCTCCCCACGCTTTCG

#### 4.8.2 Preparo das reações de amplificação

Os *primers* do gene 16S do RNAr foram utilizados seguindo modificações do protocolo inicialmente descrito por Dharakul *et al* (1996). As reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, contendo 30 ng de DNA genômico bacteriano, 2,5 µl de tampão da reação 10X (contendo 500 mM de KCl, 100 mM de tris-HCl, 15 mM de MgCl<sub>2</sub> – Eppendorf), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (Eppendorf), 2 pmol de cada *primer* (Invitrogen) e 2,5 U de *taq* DNA polimerase (Eppendorf), o restante do volume necessário para completar o volume final da reação foi obtido com água miliQ® estéril. O controle negativo da reação foi realizado com a água miliQ® utilizada no preparo da reação.

#### 4.8.3 Condições para a reação de PCR

A amplificação de DNA bacteriano foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Inicialmente seguia-se uma etapa de desnaturação inicial à 95°C por 1 minuto e 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento à 60°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto. Após os 35 ciclos seguia-se um passo final de extensão à 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, o produto foi armazenado à 4°C até a corrida eletroforética.

#### 4.8.4 Eletroforese de DNA amplificado

A visualização dos produtos amplificados por PCR foi realizada em gel de agarose à 2%, contendo brometo de etídio (10 µl / 100 ml) e visualizada com luz UV. A corrida foi realizada em tampão Tris - Borato- EDTA (TBE) 1x, utilizando 100 V por 60 minutos.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Isolamento primário**

O material oriundo de necropsia de dois adolescentes, semeado inicialmente em ágar Mac Conkey, mostrou poucas e diminutas colônias nesse meio, juntamente com diversos tipos de colônias bacterianas em placas de ágar sangue e Mac Conkey. As poucas e diminutas colônias foram comparadas com as colônias isoladas anteriormente do hemocultivo e observada a semelhança existente entre elas, e a partir desse momento foi realizado o repique destas colônias para identificação, visto que a origem dos pacientes era a mesma. Este isolamento primário foi realizado no laboratório de Microbiologia do HUWC – UFC (Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará) em março de 2003.

### **5.2 Armazenamento em ágar estoque**

Após o isolamento primário foram feitos sucessivos repiques das 3 amostras bacterianas, até obter-se pureza dos cultivos para sua posterior inoculação em ágar estoque. O modo de preparo deste meio encontra-se descrito no **Anexo II**. As 3 amostras ficaram armazenadas em ágar estoque pelo período de 17 meses, à temperatura ambiente.

### **5.3 Recuperação das amostras**

Para a realização do estudo fenotípico das 3 amostras, seguiram-se a semeadura em ágar sangue, chocolate, Mac Conkey, CLED, tripticase- soja e Ashdown, preparação de inóculos para as provas bioquímicas manuais de identificação (mais completa que a identificação inicial) e inóculos para as provas de identificação em sistema API 20NE. Para que estas metodologias acontecessem neste estudo, foram realizados repiques bacterianos a partir do ágar estoque, 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 3 amostras, película esta que tornava-se mais viscosa com o passar do tempo e era bastante característica da espécie *B. pseudomallei*.

### **5.4 Aspecto macroscópico de *B. pseudomallei***

Para avaliar o aspecto macroscópico das colônias foi realizada a semeadura em diferentes meios de cultivo sólido, a partir de caldo BHI com 24h de incubação. As placas semeadas foram então incubadas à 37°C por até 7 dias, sendo que diariamente era checada a morfologia das colônias bacterianas em ágar. Para todos os meios de cultivo semeados, notava-se que já com 24h

de incubação os cultivos bacterianos das 3 amostras evidenciavam um pronunciado “odor de terra”, levemente adocicado, sentido mesmo sem a abertura da incubadora.

#### **5.4.1 Ágar sangue de carneiro (ASA)**

Após 24h de cultivo as 3 amostras apresentavam colônias pequenas, puntiformes, com relevo plano, bordas regulares, coloração creme e superfície brilhante, não era possível fazer diferença entre as 3 amostras. Com o passar dos dias de cultivo, as amostras 1 e 3 iam se tornando mucóides. Com sete dias, estas duas amostras apresentavam colônias circulares, umbilicadas, com margem ondeada, ainda mostravam a tonalidade creme, sua consistência era viscosa e sua superfície brilhante. A amostra 3 apresentava uma consistência mais mucóide que a amostra 1. Não produziam hemólise. A amostra 2 aos sete dias de cultivo apresentava grandes colônias circulares, umbilicadas, de margem crenada. Sua coloração ainda apresentava-se creme, umas colônias de tonalidade mais claras e outras mais escuras e sua superfície era opaca e rugosa. Esta amostra produziu  $\beta$ -hemólise no ASA. **Figs. 7 e 9A.**

#### **5.4.2 Ágar Chocolate**

A mesma morfologia bacteriana evidenciada em ASA foi observada em ágar chocolate para as 3 amostras, com exceção da produção de hemólise pela amostra 2. As amostras 1 e 3 mantiveram-se mucóides e amostra 2 manteve-se seca e rugosa ao fim dos sete dias de cultivo. **Fig 8.**

#### **5.4.3 Ágar Trypticase soja**

Com 24h de cultivo as 3 amostras apresentavam colônias pequenas, puntiformes, planas, de borda ondulada, textura viscosa, superfície brilhante e coloração creme. Ao final de sete dias de cultivo a amostra 2, de forma semelhante à observada com outros meios de cultivo, mostrava superfície opaca e consistência seca. As colônias eram circulares, seu relevo era umbilicado, a borda crenada e a coloração creme. As amostras 1 e 3 apresentavam consistência viscosa, colônias circulares, superfície brilhante, bordas crenadas, superfície umbilicada e a coloração mantinha-se creme.

#### **5.4.4 Ágar Mueller-Hintom**

O ágar Mueller-Hintom não era utilizado para evidenciar morfologia bacteriana e sim para realização de prova bioquímica de resistência à polimixina, teste de sensibilidade antibacteriano (TSA) e cultivo para extração do DNA bacteriano. Como a semeadura em todos os momentos era realizada em tapete não foi possível evidenciar a morfologia bacteriana detalhadamente neste meio de cultivo, entretanto via-se claramente a superfície fôscas da amostra 2 e a superfície viscosa e brilhante das amostras 1 e 3.

#### 5.4.5 Ágar CLED

Após semeadura em ágar CLED, com 24h de cultivo as 3 amostras se apresentavam bastante semelhantes; também neste meio de cultivo, nesse momento inicial, não era possível distinguir uma amostra da outra. Estas apresentavam tamanho pequeno e eram puntiformes, planas, de margem ondulada e coloração variando de creme à amarelada, a superfície destas inicialmente era brilhante. Com sete dias de cultivo a amostra 2 apresentava colônias maiores, circulares, com borda ondulada, umbilicadas, superfície opaca e consistência seca. As amostras 1 e 3 novamente mostravam-se semelhantes, mas divergindo da amostra 2 em sua morfologia; estas se apresentavam maiores em tamanho, com borda ondulada, umbilicadas, coloração creme à amarelada, consistência viscosa e superfície brilhante. **Fig. 9B.**

#### 5.4.6 Ágar Ashdown

Neste meio, seletivo para o isolamento de *B. pseudomallei* por conter cristal violeta e gentamicina, era observado com 24h de cultivo a presença de diminutas colônias puntiformes planas, margem ondulada e de coloração púrpura. Não era possível distinguir uma amostra da outra até 48h de cultivo, quando então as diferenças entre as amostras iam se acentuando até o 7º dia; na amostra 2 as colônias tornavam-se maiores, irregulares e apresentavam borda crenada, relevo umbilicado e assumiam consistência bastante seca. Sua superfície era opaca e sua tonalidade se tornava ainda mais púrpura pois ao fim do 7º dia, as colônias já haviam incorporado o vermelho neutro presente no meio de cultivo, causando descoloração em sua tonalidade arroxeada inicial. As amostras 1 e 3 após 7 dias de cultivo se apresentavam irregulares, com superfície brilhante, borda crenada, relevo umbilicado e consistência bastante viscosa, que era mais acentuada na amostra 3. De forma semelhante a amostra 2, estas também causavam descoloração do meio Ashdown, ao incorporar o vermelho neutro e se tornarem cada vez mais púrpuras. **Figs. 9C e 9E.**

#### 5.4.7 Ágar Mac Conkey

Inicialmente, com 24h de cultivo, as colônias das 3 amostras apresentavam-se pequenas lisas, brilhosas puntiformes, com borda inteira e róseo-transparentes. Com sete dias de cultivo, as diferenças entre as amostras podia ser observada. As amostras 1 e 3 apresentavam colônias grandes, circulares, viscosas, com superfície brilhante, umbilicadas e bordas inteiras. A amostra 2 também apresentava colônias grandes, circulares, com superfície brilhante, umbilicadas e bordas inteiras, entretanto sua consistência era bastante seca. Ao 7º dia de incubação à 37°C as 3 amostras apresentavam coloração rosada. **Figs. 9D e 9F.**

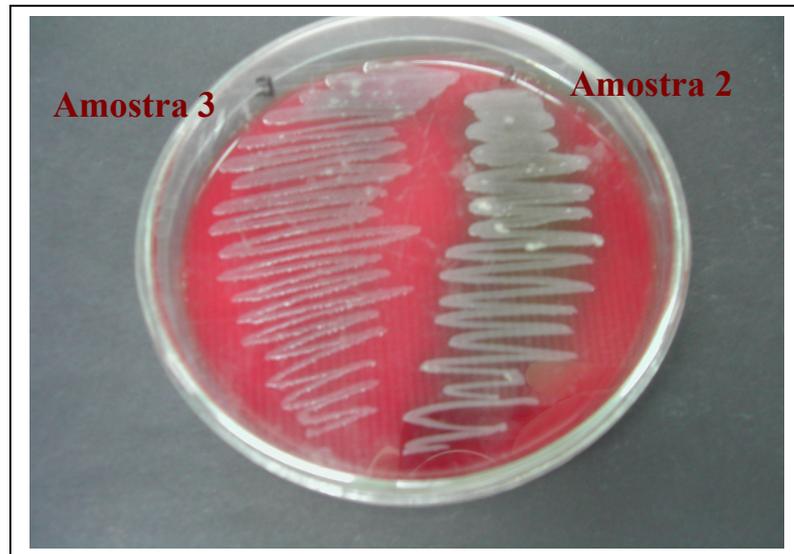


Figura 7. Padrão de crescimento de amostras 3 e 2 de *B. pseudomallei* em ágar sangue com 72h de incubação à 37°C

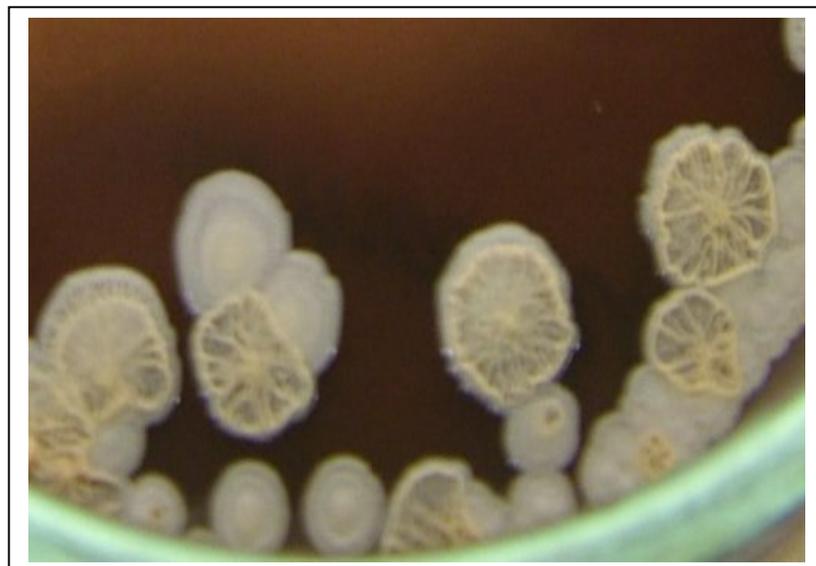


Figura 8. Rugosidade característica de *B. pseudomallei* (amostra 2) em ágar chocolate após 7 dias de incubação à 37°C



Figura 9A Ágar sangue



Figura 9B Ágar CLED

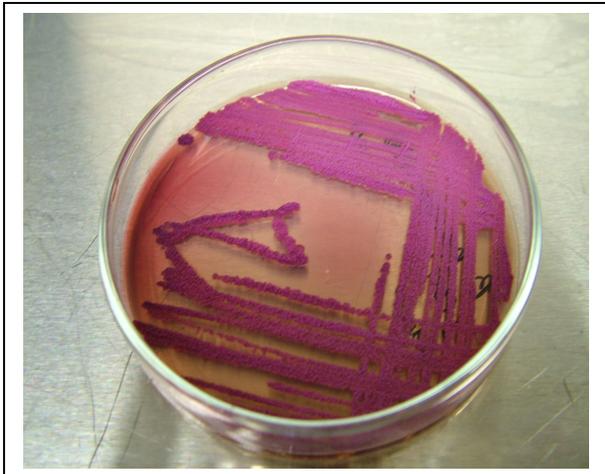


Figura 9C Ágar Ashdown



Figura 9D Ágar Mac Conkey



Figura 9E Ágar Ashdown (aproximado)



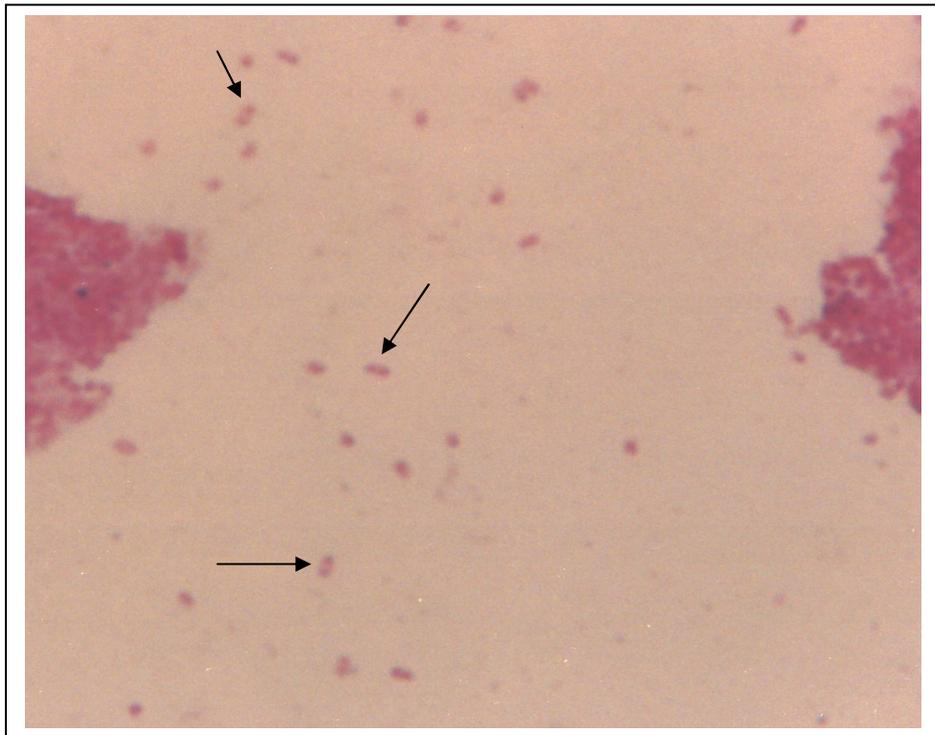
Figura 9F Ágar Mac Conkey (aproximado)

Figura 11. Aparência de colônias de *B. pseudomallei* em diferentes meios de cultivo com 7 dias de incubação à 37°C

## 5.5 Aspecto microscópico de *B. pseudomallei*

### 5.5.1 Coloração de Gram

Após diversas colorações de Gram realizadas, observou-se um padrão uniforme. As amostras bacterianas se apresentaram como Gram negativas, sob a forma de bacilos pequenos e arredondados. Podia ser observada a coloração bipolar dos bacilos. **Fig. 10**

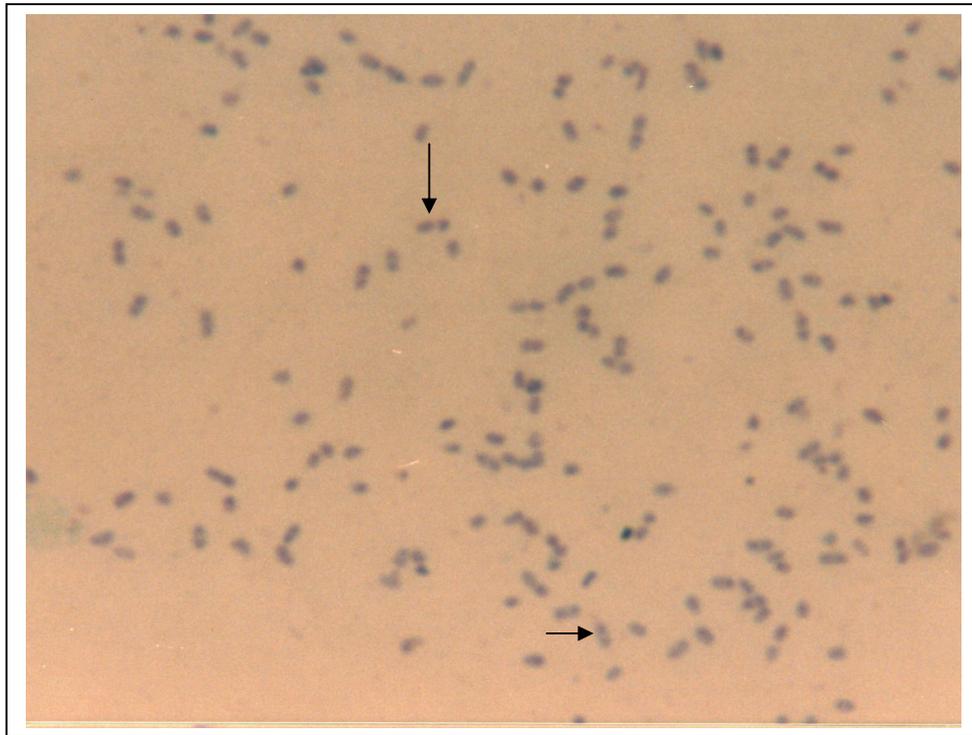


**Figura 10.** Coloração de Gram a partir de cultivo em ágar Müller Hintom (1000x)

### 5.5.2 Coloração Bipolar (azul de metileno)

Foi observada a característica bipolar dos bacilos após coloração com azul de metileno.

**Fig. 11.**



**Figura 11. Coloração com azul de metileno evidenciando coloração bipolar dos bacilos (1000x)**

### **5.6 Identificação manual**

Os testes manuais utilizados para a identificação das cepas bacterianas, de acordo com Gilligan e Whittier (1999) e Koneman *et al* (2001) apresentaram resultado compatível com o esperado para *B. pseudomallei*. Ver tabela com características-chave de *B. pseudomallei* na página 24.

#### **5.6.1 Testes bioquímicos**

Os testes e provas bioquímicas mostraram resultado igual para as 3 amostras, com exceção das provas de OF lactose, maltose e manitol que apresentou resultado positivo (oxidação) para a amostra 2 e resultado negativo para as amostras 1 e 3.

Após a leitura das reações e testes realizados, chegou-se aos resultados mostrados na **Tabela 8.**

**Tabela 8. Padrão bioquímico de testes manuais de amostras de *B. pseudomallei***

Teste bioquímico	Resultado		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Crescimento em Mac Conkey	+	+	+
Crescimento à 42°C em ágar Ashdown	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Indol	-	-	-
Motilidade pela gota pendente	+	+	+
Motilidade em ágar semi-sólido	+	+	+
TSI	PA / FA	PA / FA	PA / FA
Arginina diidrolase	+	+	+
Descarboxilação de lisina	-	-	-
Redução de nitrato	+	+	+
Nitrato a gás	+	+	+
Catalase	+	+	+
ONPG	-	-	-
Citrato	+	+	+
Esculina	+	+	+
Gelatina	+	+	+
Uréia	-	-	-
Resistência à polimixina B	+	+	+
OF:			
Adonitol	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
Dulcitol	+	+	+
Eritritol	+	+	+
Lactose	-	+	-
Maltose	-	+	-
D-Manitol	-	+	-
D-Glicose	+	+	+

+: Reação positiva; -: Reação negativa; PA / FA: Pico alcalino / fundo alcalino

### 5.7 Identificação semi-automatizada em API 20NE (BioMerieux)

As reações foram lidas com 24 e 48h. Com 24h de incubação não foi possível chegar à identificação das bactérias visto que o teste de arginina diidrolase apresentava-se como negativo e

alguns testes de assimilação notadamente adipato, citrato e fenil acetato apresentavam fraca positividade, o que dificultava a leitura, tornando-a duvidosa.

Com 48h de incubação as reações foram lidas novamente (com exceção do NO<sub>3</sub>, formação de indol [TRP] e fermentação da glicose que só podem ser lidos com 24h) e foram obtidos perfis que após serem pesquisados no catálogo de identificação fornecido pelo fabricante apresentaram percentagens de identificação presuntiva de *B. pseudomallei*, sugerindo o encaminhamento das amostras para laboratórios de referência. O resultado do API 20NE para cada amostra bacteriana pode ser observado na **Tabela 9**.

**Tabela 9 . Padrão bioquímico de identificação de *B. pseudomallei* em API 20NE com 48h de incubação**

Teste	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Redução de Nitrato	+	+	+
Formação de indol	-	-	-
Fermentação de Glicose	-	-	-
Arginina Diidrolase	+	+	+
Urease	-	-	-
Hidrólise da esculina	+	-	-
Gelatina	+	+	+
ONPG (β-galactosidase)	-	-	-
Testes de assimilação:			
D-glucose	+	+	+
L-arabinose	-	-	-
D-manose	+	+	+
D-manitol	+	+	+
N-acetil-glicosamina	+	+	+
D-maltose	-	-	-
Potássio gluconato	+	+	+
Caprato	+	+	+
Adipato	+	+	+
Malato	+	+	+
Citrato de trisódio	+	+	+
Fenil-acetato	+	+	+
Citocromo-oxidase	+	+	+

As 3 amostras testadas com o API 20NE apresentaram perfil de identificação semelhante, diferindo apenas na positividade da hidrólise da esculina pela amostra número 1, esta apresentou o perfil final de identificação de **1556577** que no catálogo fornecido pelo fabricante, sugere 99,1% de identificação para *B. pseudomallei*, enquanto as amostras 2 e 3 apresentaram o perfil de identificação **1156577**, que sugerem 99,9 % de identificação para *B. pseudomallei*. **Fig. 12.**



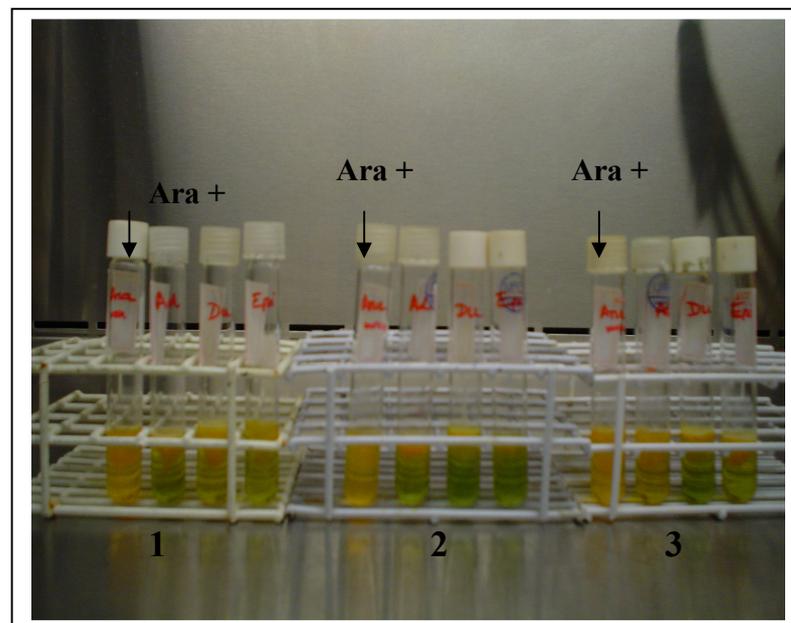
### 5.8 Assimilação de L-arabinose

Os testes para assimilação de L-arabinose, objetivando avaliar a capacidade de assimilação do carboidrato pela bactéria foram realizados em meio OF, API 20NE e meio sais mínimo, e apresentaram diferenças de resultado conforme a metodologia de execução.

#### 5.8.1 Meio OF

O teste de utilização da L-arabinose em meio OF foi repetido por três vezes com diferentes frascos de arabinose e em todos os momentos o resultado do teste foi a oxidação (acidificação) do meio contendo este carboidrato.

O desenvolvimento da oxidação já era evidenciado com 24h de incubação à 37°C. **Fig. 13.**



Ara +: Arabinose positiva

**Figura 13.** Reação de oxidação em meio OF (5º dia) à 37°C

#### 5.8.2 Assimilação de L-arabinose em API 20NE

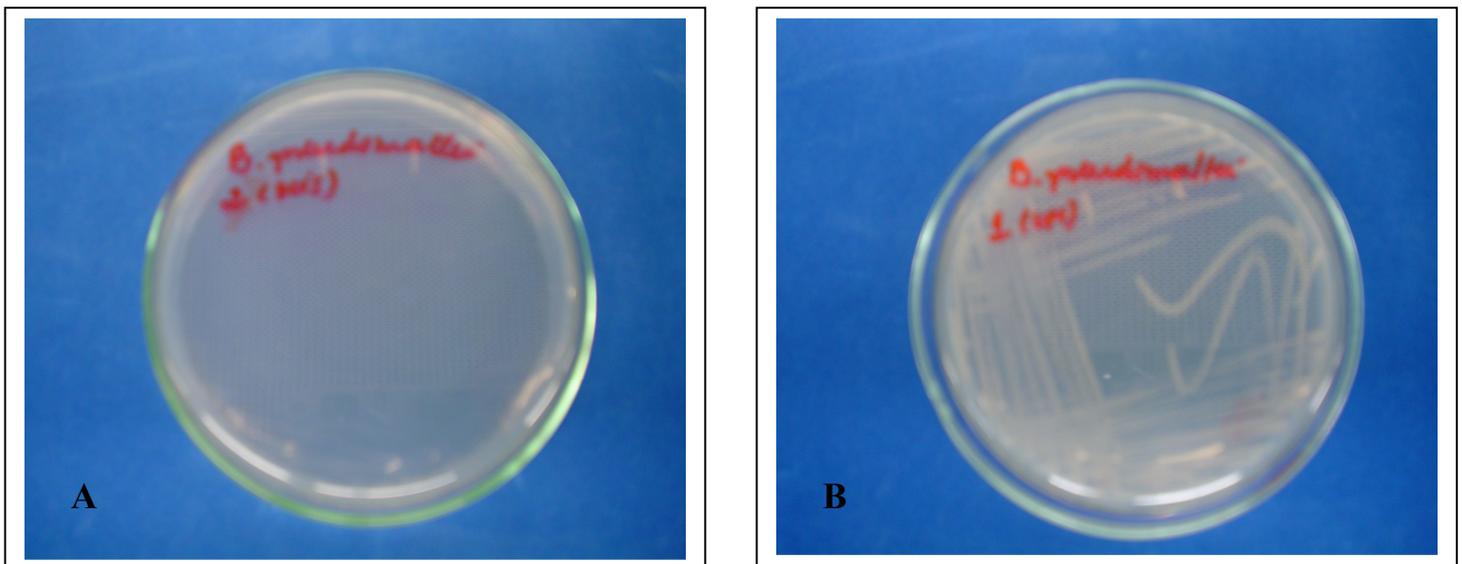
O teste de assimilação de L-arabinose realizado em sistema API 20NE apresentou resultado negativo para as três amostras, ou seja, não houve assimilação do carboidrato, visto que não foi observada turbidez da cúpula contendo o inóculo bacteriano e esta manteve-se translúcida até 48h de incubação, tempo final de leitura do teste.

### 5.8.3 Meio sais mínimo

Quanto à assimilação de arabinose em meio sais mínimo contendo 0,2 % de L-arabinose, as 3 amostras de *Burkholderia* no período de 48h de incubação não apresentaram evidências de crescimento no meio, denotando a não assimilação do carboidrato.

O controle do experimento realizado com meio sais mínimo contendo 0,2 % de glicose evidenciou bom crescimento das 3 amostras estudadas já com 24h de incubação, mostrando a assimilação do carboidrato. **Fig. 14.**

O controle de qualidade do meio sais mínimo contendo L-arabinose e glicose utilizando cepa de *E.coli* ATCC 25922, mostrou resultado dentro do padrão esperado, exibindo crescimento visível já com 24h de semeadura e incubado à 37°C, tanto em meio contendo L-arabinose como D-glicose.



**Figura 14.** Ausência de crescimento de *B. pseudomallei* em meio sais mínimo com 0,2 % de L-arabinose (A) e crescimento de *B. pseudomallei* em meio sais mínimo com 0,2 % de glicose (B) com 48h de incubação à 37°C.

### 5.9 Teste de sensibilidade antimicrobiano

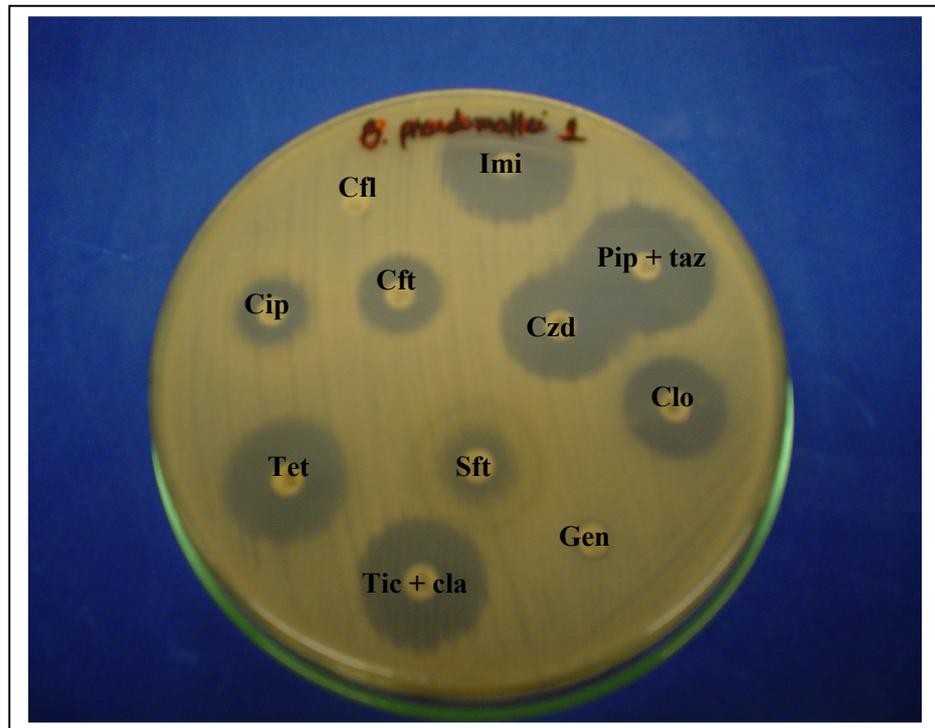
Para o teste de sensibilidade antimicrobiano foi seguida a metodologia preconizada pelo NCCLS (NCCLS, 2003) de disco difusão para bactérias que crescem aerobicamente. As 3 amostras estudadas apresentaram o perfil de sensibilidade antibacteriano característico da espécie *Burkholderia pseudomallei*. De modo geral os testes apresentaram-se semelhantes para as 3

amostras em estudo. Estas se mostraram sensíveis aos antimicrobianos: piperacilina + tazobactam, ticarcilina + ácido clavulânico, ceftazidima, imipenem, tetraciclina, e cloranfenicol. As 3 amostras foram consideradas resistentes aos antimicrobianos: cefalotina, gentamicina e sulfa + trimetoprim. As amostras 1 e 2 mostraram sensibilidade intermediária à ceftriaxona, diferentemente da amostra 3 que se mostrou sensível. A amostra 1 apresentou sensibilidade intermediária à ciprofloxacina, diferindo das amostras 2 e 3 que foram resistentes à esse antimicrobiano. **Tabela 10.** O perfil obtido no TSA pode ser observado na **Fig. 15**

**Tabela 10. Halo de inibição e padrão de sensibilidade de isolados de *B. pseudomallei***

Agente Antimicrobiano	Disco ( $\mu\text{g}$ )	Diâmetro (mm)			Resultado (mm)					
		R	I	S	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3	Amostra 3
Piperacilina + tazobactam	100/10	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$	32	S	31	S	32	S
Ticarcilina + ácido clavulânico	75/10	$\leq 14$	15-19	$\geq 20$	27	S	26	S	29	S
Ceftazidima	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	26	S	24	S	28	S
Ceftriaxona	30	$\leq 13$	14-20	$\geq 21$	20	I	16	I	26	S
Cefalotina	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	-	R	-	R	-	R
Imipenem	10	$\leq 13$	14-15	$\geq 16$	34	S	32	S	39	S
Gentamicina	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$	-	R	-	R	-	R
Tetraciclina	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$	26	S	26	S	20	S
Ciprofloxacina	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$	16	I	15	R	14	R
Cloranfenicol	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$	22	S	20	S	19	S
Sulfa + trimetoprim	25	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$	-	R	-	R	-	R

R= resistente; I= intermediário; S= sensível

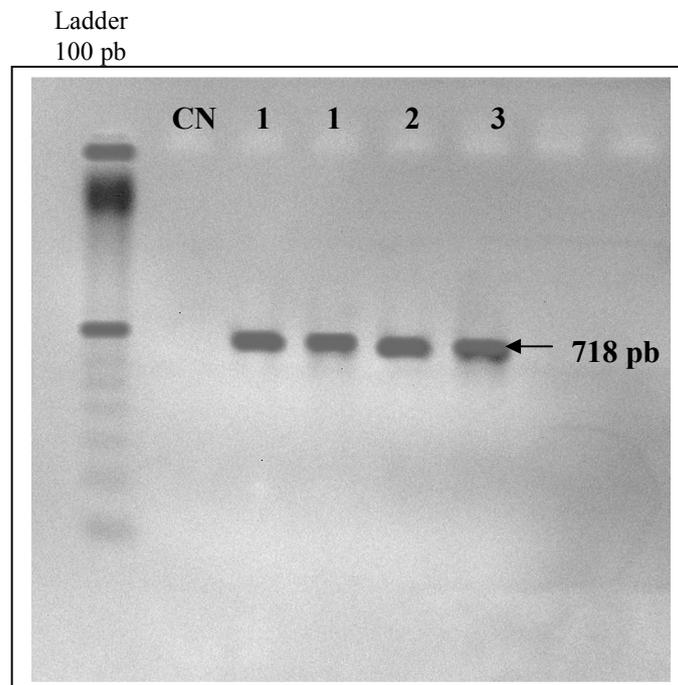


Cip: ciprofloxacina; Cft: Ceftriaxona, Cfl: Cefalexina; Czd: Ceftazidima;  
Clo: Cloranfênicol; Gen: Gentamicina; Tet: Tetraciclina; Tic + cla: Ticarcilina  
+ ácido clavulânico; Pip + taz: Piperacilina + tazobactam; Sft: Sulfa-trimetoprim

**Figura 15. Teste de sensibilidade mostrando o padrão de sensibilidade da amostra 1 de *B. pseudomallei*.**

### 5.10 PCR

Após reação de amplificação em termociclador, utilizando *primers* do gene 16S de RNAr e corrida eletroforética em gel de agarose à 2 %, os três isolados foram identificados pela técnica da PCR. Os fragmentos amplificados apresentaram 718 pb, de acordo com o descrito na literatura (DHARAKUL *et al*, 1996). **Fig. 16.**



CN: controle negativo; 1: amostra 1 em duplicata; 2: amostra 2;  
3: amostra 3

**Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando fragmento de 718 pb**

A PCR foi realizada a partir do DNA cromossômico isolado das três amostras. Um controle negativo sem DNA foi também incluído. O produto da PCR de 718 pb foi separado por eletroforese em gel de agarose à 2% e o tamanho do produto foi determinado comparando com o marcador de peso molecular de 100 pb.

## 6 DISCUSSÃO

Apesar da 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, apesar de aparentemente subdiagnosticada sendo que a cada dia aumentam os relatos de achados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei* em diversos países (DANCE, 2000a).

A melioidose não é homogeneamente distribuída dentro de áreas endêmicas. Há diversas razões para este fato. Primeiro, isto pode ser devido a uma distribuição desigual da *B. pseudomallei* no solo e água, tanto em termos de presença ou ausência absoluta do organismo, e ainda em quantidade de microorganismos por grama de solo. Segundo, este fato também pode ocorrer por diferenças na virulência de amostras locais de *B. pseudomallei*. Terceiro, pode ocorrer variações nas práticas que levem as pessoas à exposição, ou seja, ocupacional e lazer, e finalmente, podem ocorrer diferenças entre a susceptibilidade de populações à infecção (DANCE, 2000b). É possível que a presença de outras bactérias ou fungos ambientais possam antagonizar ou promover a proliferação da *B. pseudomallei* no solo. De acordo com Dance (2000b), é possível fazer uma analogia entre *B. pseudomallei* e *Legionella* spp., pois ambas são saprófitas ambientais com capacidade de causar parasitismo intracelular quando adquiridas do ambiente, mas que raramente se transmitem pessoa-pessoa. Multiplicação intracelular dentro de protozoários ambientais tem sido proposta para explicar diversos aspectos da distribuição, infectividade e patogenicidade de *Legionella* spp (O'BRIEN E BHOPAL, 1993). É possível que a ocorrência de um nicho ecológico ainda desconhecido, formado por organismos unicelulares (protozoários, algas), possa favorecer a proliferação da *B. pseudomallei* no ambiente.

Recentemente nossa atenção foi focada em um relato de melioidose em moradores da localidade de Tejucooca, localizada a 144 Km de Fortaleza (MIRALLES *et al*, 2004). O fato ocorreu em fevereiro de 2003, quando o Ceará foi surpreendido com a notícia de que quatro crianças da mesma família, com idade variando entre 10 e 15 anos estavam apresentando sintomatologia de uma infecção ainda não diagnosticada, até que em março após o óbito de três crianças conseguiu-se o isolamento de uma bactéria considerada rara em nosso país, consistindo nos primeiros casos confirmados de melioidose em humanos no Brasil. Investigações posteriores foram realizadas pelas autoridades sanitárias locais (Secretaria de Saúde do Estado do Ceará e Laboratório Central-Ce) a fim de se determinar a origem da contaminação. Amostras de solo e

água coletadas na residência e em uma barragem onde as vítimas tomaram banho antes de adoecer foram negativas quando submetidas a exames microbiológicos para a detecção de *B. pseudomallei*. No período dessa investigação epidemiológica, não havia ocorrido treinamento da equipe responsável por esta pesquisa para realização do diagnóstico de forma acurada, tanto a partir de amostras clínicas como ambientais. O treinamento dado por especialista australiana só viria a ser realizado no ano seguinte após o registro de novo caso da doença em Banabuiú, Ceará (Núcleo de Epidemiologia – SESA/ CE, 2004). A coleta ambiental é importante pois atualmente acredita-se que solo e água contaminados se constituem na principal fonte de infecção humana (INGLIS *et al*, 2001b).

Como a doença mimetiza muitas outras infecções microbianas e não se tinha conhecimento da existência desta em nosso território foram especulados diversos diagnósticos antes do isolamento e confirmação de melioidose. Uma das primeiras suspeitas recaiu sobre a peste, causada pela *Yersinia pestis* em sua forma pneumônica, com disseminação rápida e período curto de incubação, podendo rapidamente evoluir para sepse. Essa possibilidade foi levantada, devido sua característica Gram negativa e de coloração bi-polar e a zona geográfica acometida ter sido sabidamente zona endêmica para peste. Entretanto, foi afastada a possibilidade uma vez que *Y. pestis* é classificada como uma enterobactéria e é imóvel, resultados que foram discrepantes dos achados dos testes bioquímicos (KONEMAN *et al*, 2001). Devido à epidemiologia e sintomatologia observadas serem favoráveis, outro provável diagnóstico foi febre hemorrágica da dengue, e ainda hantavírus, leptospirose e salmonelose, devido à presença comum de roedores na área.

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 semi-árido, 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. Em Tejuçuoca (média de precipitação de 659,50 mm/ ano e temperatura compreendida entre 26°C e 28°C), os casos de melioidose foram observados na época das chuvas em nosso Estado, confirmando relato de Dance (2000b) acerca das melhores condições geográficas para o encontro e o estabelecimento de focos epidêmicos para *B. pseudomallei*.

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) são grupos de bactérias estritamente aeróbias que usam carboidratos pela via não – fermentativa (KONEMAN *et al*,

2001). Apesar de serem tidos como patógenos oportunistas, podem causar doença em indivíduos previamente saudáveis, como ocorre com a *B. pseudomallei* (LEE *et al*, 1985; CDC, 2004).

Laboratorialmente, a ocorrência de BGNNF torna-se suspeita após a coloração de Gram e teste TSI (pico alcalino / fundo alcalino). A confirmação pode ser obtida com precisão pelo uso do meio OF (KONEMAN *et al*, 2001). A identificação de *Burkholderia* segue após a realização dos testes bioquímicos indicados por Gilligan e Whittier (1999) e Koneman *et al* (2001).

A melioidose é uma infecção potencialmente fatal e que necessita ter seu diagnóstico realizado o mais brevemente possível. Como a bactéria causadora da doença é considerada exótica em nosso país, e há relatos anteriores de falso isolamento ou falhas na caracterização de *B. pseudomallei* em diversas situações em outros países (DANCE, 1991b; DANCE *et al*, 1995), neste estudo foram seguidos diversos caminhos que levassem a um diagnóstico acurado, concluindo finalmente tratar-se de *B. pseudomallei* o microorganismo em estudo.

O isolamento inicial realizado em ágar Mac Conkey a partir da necropsia de duas crianças acometidas pela doença não evidenciou bom crescimento inicial das colônias das amostras, visto que havia a presença de outras bactérias contaminantes, confirmando relato de Walsh e Wuthiekanun (1996) que diz que o microorganismo cresce lentamente, e podendo ter seu crescimento prejudicado devido a competição com outras espécies bacterianas, tanto patogênicas como da microbiota, na mesma placa de ágar, sendo importante a observação e a experiência do microbiologista na detecção de colônias suspeitas e atípicas. Neste caso as diminutas colônias observadas no ágar Mac Conkey quando comparadas com as colônias de cultura pura provenientes do hemocultivo do paciente, permitiram o isolamento de um bacilo Gram negativo de coloração bipolar, que em seguida foi cultivado para a realização das provas bioquímicas, a fim de se identificar o gênero e a espécie envolvidos no quadro infeccioso. Foi evidenciada também a capacidade de a bactéria crescer rápido e facilmente nos diversos meios de cultivo utilizados neste estudo posteriormente, quando já se dispunha de cultivos puros de *B. pseudomallei*, fato que é observado também quando a bactéria é isolada de sítios considerados estéreis.

A característica coloração bi-polar dos bacilos Gram negativos arredondados foi observada em nosso estudo a partir de lâminas de cultivos puros da bactéria, tanto quando coradas pela metodologia preconizada com azul de metileno, como quando coradas pela coloração de Gram tradicional, demonstrando que não foi necessário para a perfeita visualização dos bacilos bi-polares o uso do azul de metileno, entretanto não pode-se afirmar que é uma característica homogênea das amostras brasileiras. De acordo com Sprague e Neubauer (2004) a

coloração bi-polar apresentada pela *B. pseudomallei* ocorre devido à formação de depósitos intracitoplasmáticos de ácido  $\beta$ -hidróxi-butírico (polihidroxibutirato). A estocagem do carboidrato ocorre em condições de excesso de substrato (INGLIS *et al*, 2001b).

No crescimento em meios líquidos foi observado nas 3 amostras, a presença de uma película seca e resistente com uma superfície sem brilho, que podia ser vista sempre que a bactéria era cultivada em caldo BHI. A sua aparência é semelhante à aparência das colônias rugosas em meio sólido. Esta película era observada na interfase líquido-ar do cultivo, e possivelmente é formada devido à aerotaxia positiva, impulsionada pelos flagelos bacterianos. De acordo com Inglis *et al* (2001b), esta película formada na interfase é um tipo de organização multicelular que se assemelha a um biofilme. Os biofilmes são formados quando bactérias colonizam interfaces líquido-sólido, e são comuns em muitas espécies Gram negativas ambientais. A formação de biofilme aparenta ser um aspecto importante da ecologia da *B. pseudomallei* e tem sido proposto como uma das razões para a sua resistência antibiótica *in vivo*.

As amostras estudadas apresentaram características morfológicas das colônias distintas, as amostras 1 e 3 apresentaram-se mucóides, mesmo após 7 dias incubação à 37°C, diferentemente da amostra 2, considerada bastante rugosa (já apresentava tal característica com 2 dias de cultivo) e apesar da rugosidade ser uma característica bastante fidedigna de *B. pseudomallei*, diversos autores relatam a presença também de isolados mucóides, apesar de mais incomum. Segundo Howard e Inglis (2003a) o cristal violeta presente no meio Ashdown seria um possível inibidor do crescimento de amostras de consistência mucóide, o que não foi observado neste estudo pois as amostras cresceram neste meio de cultivo sem problemas, formando colônias rugosas ou mucóides (dependendo da amostra) e na cor púrpura característica, confirmando estudos anteriores que mostram a seletividade do meio para a *B. pseudomallei* (ASHDOWN, 1979). Neste estudo foi semeado diretamente um cultivo puro bacteriano para teste de crescimento, uma vez que tal identificação em ágar Ashdown só foi realizada em etapa posterior ao seu isolamento inicial.

As características morfológicas das colônias se mantiveram constantes para as três amostras em todos os meios de cultivo testados, incluindo os subcultivos, concordando com estudo realizado por Walsh e Wuthiekanun (1996) sobre a apresentação da bactéria em ágar CLED, que produziu colônias amarelas claro, com superfície fosca e também em em ágar sangue e chocolate, que produziu inicialmente colônias de tamanho diminuto, de coloração creme, que com o passar dos dias evidenciou um aumento do tamanho das colônia e de sua rugosidade. Já em ágar Mac Conkey, as colônias desde 24h apresentavam um bom crescimento, produzindo

colônias rosadas, que se apresentavam lisas e também aumentavam de tamanho com o passar do tempo. De modo geral, a amostra 2 mantinha a característica seca e rugosa, e as amostras 1 e 3 mantinham a característica mucóide já descrita por Howard e Inglis (2003a). Em todos os cultivos bacterianos foi observado o característico odor de terra adocicado, resultante do metabolismo bacteriano. Este odor ia se acentuando com o passar dos dias de cultivo (KONEMAN *et al*, 2001).

Uma espécie bacteriana que poderia ser confundida com a *B. pseudomallei* seria a *B. cepacia*, devido à produção de colônias secas e rugosas semelhantes às de *B. pseudomallei*. Entretanto para distinguir uma da outra pode-se usar os testes bioquímicos de arginina diidrolase (ADH), lisina descarboxilase (LDC), ortonitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), redução de nitrato a nitrito (NIT) e nitrato a gás, pois enquanto a *B. pseudomallei* é ADH, NIT positiva e produção de gás em NIT positiva e LDC e ONPG negativa, a *B. cepacia* é ADH, NIT negativa, produção de gás em NIT negativa, mas LDC e ONPG positiva, ou seja, através de testes manuais ou semi-automatizados foi possível fazer a distinção entre as espécies bacterianas (ASHDOWN; CLARKE, 1992).

Em termos de reações bioquímicas, estas apresentaram resultados semelhantes entre os 3 isolados bacterianos, com exceção dos testes de assimilação dos carboidratos lactose, maltose e manitol, que foi idêntico para as amostras 1 e 3 e diferente para a amostra 2. Os resultados das reações bioquímicas observadas concordam com as referidas por Gilligan e Whittier (1999) e Koneman *et al* (2001) para identificação de *B. pseudomallei*, exceto nos testes de assimilação do carboidrato manitol realizado através de reações de oxidação-fermentação (OF) que para as amostras 1 e 3 apresentou resultado negativo para oxidação. Quando comparadas com testes de assimilação por OF realizado por Yabuuchi *et al* (1992) nossos resultados diferiram na oxidação de adonitol, L- arabinose, maltose e lactose para as 3 amostras e de manitol para as amostras 1 e 3. Os testes de OF apresentaram algumas diferenças em sua reatividade bioquímica, que poderia ser explicada pela metodologia empregada, tempo prolongado de armazenamento em ágar estoque e distribuição geográfica das amostras. Entretanto essas diferenças não influenciaram o resultado final da identificação, pois de acordo com Gilligan e Whittier (1999) os resultados destes carboidratos que diferiram não alcançam percentagem de 100% para todas as amostras de *B. pseudomallei*, pois para a lactose 99% das amostras são positivas, para a maltose 99% das amostras são positivas e para o manitol 94% das amostras apresentam positividade.

Com o propósito de identificar e também caracterizar fenotipicamente nossas amostras por meio de kit diagnóstico a fim de comparar com a identificação totalmente manual, utilizamos

o sistema mais recomendado e bastante estudado para o diagnóstico (DANCE *et al*, 1989a), o API 20NE, com 98% de identificações corretas, em estudo realizado por Lowe *et al* (2002). Os resultados das reações bioquímicas foram iguais para as 3 amostras com exceção da hidrólise da esculina pela amostra 1, entretanto como esta é uma característica variável para a espécie de acordo com Gilligan e Whittier (1999) e Koneman *et al* (2001), com 59% de amostras positivas, não interferiu na identificação final.

Quando comparamos os resultados do kit API com os resultados dos testes manuais foi observada diferença na hidrólise da esculina, que ocorreu somente para a amostra 1 (59% de amostras podem ser positivas) e nas reações de assimilação de carboidratos maltose (para a amostra 1) (99% de amostras positivas) e manitol (para as amostras 1 e 3) (94% de amostras positivas) e arabinose para as 3 amostras, quando comparada apenas à metodologia de OF - arabinose. Os demais substratos dos testes de assimilação do API 20NE não foram comparados pois não constavam na relação de testes necessários das tabelas de identificação utilizadas neste estudo e outros carboidratos e álcoois testados manualmente não coincidiram com a base de testes utilizadas pelo kit comercial.

Na realização do teste, foram encontradas relativa facilidade e praticidade para o diagnóstico da bactéria, ao mesmo tempo em que se gerava um resultado fidedigno. Porém observamos que conforme relatado anteriormente por Dance *et al* (1989a) era sempre necessário o período de 48h antes que fosse feita a identificação final, pois com 24h de leitura o teste de arginina diidrolase ainda mantinha-se negativo e alguns testes de assimilação mostravam fraca opacidade, o que tornava dúbia a leitura, fazendo com que o resultado final fosse a não identificação. Este fato ocorreu com Schülin e Steinmetz (2001), que relataram caso em que com leitura realizada apenas com 24h, não conseguiram uma identificação correta do microorganismo. Dessa forma fazendo o teste estritamente como recomendado pelo fabricante e realizando a leitura no período de 48h (com exceção dos testes NO<sub>3</sub>, indol e fermentação de glicose, que eram lidos com 24h) o resultado foi confiável e forneceu perfis de identificação já observados anteriormente por Dance *et al* (1989a) em estudo com Kit API 20NE. O tempo total para que se processasse a identificação foi um fator crítico observado, pois dentro de cinco dias, incluindo todas as etapas de repiques bacterianos já tínhamos o resultado da identificação em mãos, este tempo se comparado a identificação manual e tradicional bioquímica é reduzido, pois para a leitura dos OFs manuais é requerido um tempo maior e estes são necessários para identificação a nível de espécie em regiões que não possuem a doença de forma endêmica e dessa forma não tem

tanta experiência em determinados pontos-chave que podem acelerar a identificação. Esta redução no tempo é bastante importante para o diagnóstico e o tratamento do paciente.

Há controvérsias entre diversos autores sobre a existência de um biotipo (SMITH *et al*, 1997) ou espécie, cuja diferença de *B. pseudomallei* seria a capacidade de assimilar oxidativamente a arabinose. Essa bactéria tem sido denominada *B. thailandensis* por aqueles que a consideram como uma nova espécie (BRETT *et al*, 1998; WOODS; SONGSIVILAI, 1999).

Deve ser enfatizado que o *status* de espécie de *B. thailandensis* foi recentemente provado por hibridização DNA-DNA, o padrão ouro para definição de espécies (YABUUCHI *et al*, 2000). De acordo com Yabuuchi *et al* (2000), há duas espécies distintas de *Burkholderia*: *pseudomallei* e *thailandensis*, que seriam diferenciadas pela habilidade em assimilar a pentose L-arabinose como fonte de energia, apresentando morfologia e antigenicidade similares, mas com diferenças genéticas e patogênicas (SONTHAYANON *et al*, 2002). E uma vez que ambas espécies podem ser encontradas no ambiente como ocorre na região nordeste da Tailândia, e não era conhecido o perfil de nossos isolados foi realizado em nosso estudo testes para avaliar a assimilação de arabinose ou não pelas amostras de *B. pseudomallei*. Apesar dos relatos em sua grande maioria descrever apenas isolados patogênicos de *B. pseudomallei* como Ara -, Lertpatanasuwan *et al* (1999), relataram caso de *B. pseudomallei* Ara + na Tailândia, causando doença em um paciente de 16 anos após acidente de motocicleta, o que mostra que essa espécie pode também ser patogênica e neste caso relatado foi especulada uma grande inoculação do microorganismo devido a traumas gerados no paciente. A *B. thailandensis* ainda não está incorporada ao banco de dados utilizado pelo API 20NE utilizado neste estudo, entretanto não há dúvidas quanto à identificação devido ao resultado negativo de crescimento da bactéria realizado em meio saís mínimo contendo L-arabinose.

Inicialmente para determinar se havia assimilação ou não de arabinose pelos isolados bacterianos foram feitos testes utilizando a metodologia de inoculação em tubos de oxidação-fermentação (OF), método empregado por Yabuuchi *et al*, (1992). Como nossos resultados foram discrepantes nas 3 amostras em relação a dados de outros estudos no tocante à frequência de isolados Ara + causando doença (LERTPATANASUWAN *et al*, 1999; VUDDHAKUL *et al*, 1999), o teste foi repetido por mais duas vezes utilizando substrato de diferentes origens e novamente a assimilação deste carboidrato se repetiu. Foi especulada a possibilidade da arabinose utilizada nos três momentos diferentes de preparo do meio OF, estar com pH baixo, já que por ocasião da preparação do meio este não foi medido. Desse modo, a viragem do indicador de pH de verde para amarelo ocorreria pela própria acidez da arabinose e não como resultado do

metabolismo bacteriano, e o teste se apresentaria como oxidante falso positivo. Entretanto esse fato não foi observado com os outros açúcares e carboidratos utilizados em OF, nos quais o pH também não foi medido, embora estes tenham fornecido resultados coerentes, diferentemente da arabinose. Há ainda o fato de que o percentual de açúcar presente no meio OF (1%) seja excessivo, levando à oxidação do meio contendo o carboidrato e conseqüentemente à mudança de pH dos componentes do meio.

Os estudos realizados por Wuthiekanun *et al* (1996), e Walsh e Wuthiekanun (1996) são indicativos de que a metodologia que utiliza crescimento em meio saís mínimo para verificar assimilação ou não do carboidrato é o teste mais empregado e mais confiável para testar este carboidrato, desse modo este foi realizado e ficou evidenciada a ausência de crescimento neste meio, denotando a não assimilação de arabinose, o que foi confirmado pelo teste API 20 NE, que não exibiu turvação em arabinose. Os achados deste estudo confirmam dados de diversos autores relacionados à freqüência de isolamento de amostras Ara- causando doença em seres humanos (WUTHIEKANUN *et al*, 1996; LERTPATANASUWAN *et al*, 1999).

O perfil de susceptibilidade antimicrobiano das três amostras de *B. pseudomallei* foi bastante semelhante e compatível com estudos anteriores, mostrando que o perfil de resistência aparenta ser independente da origem dos isolados (THIBAUT *et al*, 2004). Apesar de não ter sido possível a realização de TSA utilizando MIC em diluição em ágar, nosso estudo mostrou padrão de resistência à cefalotina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfa-trimetoprim e polimixina B, confirmando estudos realizados por Lee *et al* (1985) e Radu *et al* (2000) que também constataram tal fato utilizando a metodologia de disco difusão (entretanto seus isolados apresentaram sensibilidade à sulfa-trimetoprim). Em estudo realizado por Sookpranee *et al* (1991), utilizando disco difusão e diluição em ágar também se obteve amostras resistentes à sulfa-trimetoprim, como os isolados de Tejuçuoca.

Todas as amostras foram resistentes à gentamicina. Este perfil não usual, isto é, resistência à colistina e gentamicina, mas geralmente suscetível à amoxicilina-clavulanato, é usado conjuntamente com as provas bioquímicas para a identificação da espécie (WHITE, 2003). Esta resistência é devido à presença de um sistema de efluxo multidrogas na *B. pseudomallei* que é específico para aminoglicosídeos e macrolídeos, codificado pelas proteínas AmrAB-OprA (MOORE *et al*, 1999; WOODS *et al*, 1999). Apesar de raro, podem ocorrer mutantes naturalmente susceptíveis tanto a macrolídeos como aminoglicosídeos. Estas cepas não possuem uma bomba de efluxo para exportar estes antibióticos (WHITE, 2003). As fluoroquinolonas tem somente fraca atividade, confirmando os resultados encontrados em nosso estudo em que todas as

amostras foram resistentes ou de resistência intermediária à ciprofloxacina, de acordo com Poole (2000) há para esta droga um sistema de efluxo presente em bactérias do gênero *Burkholderia* que confere resistência para as fluoroquinolonas. Desta forma, apesar de diversos estudos com este antibiótico, os resultados mostram que não é recomendado para o tratamento e /ou profilaxia da melioidose. Todas as amostras foram consideradas resistentes à sulfa-trimetoprima. Esta relativa resistência *in vitro* não é correlacionada com experiência clínica com a sulfa-trimetoprim e este quimioterápico vem sendo tradicionalmente usado para a terapia da melioidose. Algumas discrepâncias entre resultados obtidos com a sulfa-trimetoprima por diferentes métodos de teste de susceptibilidade tem sido documentados (WHITE, 2003). Entretanto, há relatos de real resistência de cepas de *B. pseudomallei* a este quimioterápico (SOOKPRANEE *et al*, 1991).

Estudos *in vitro* utilizando diluição em caldo (macrodiluição) mostraram que a monoterapia com imipenem ou meropenem e a combinação de kanamicina mais ceftazidima, piperacilina, meropenem e imipenem e a combinação de imipenem com azitromicina, sulfa-trimetoprim para a terapia aguda e ciprofloxacina combinada com azitromicina ou claritromicina para terapia de manutenção são os antibióticos com melhor efeito bactericida e portanto mais efetivos para o tratamento da melioidose. De acordo com Vorachit *et al* (2000), a combinação de quinolona e macrolídeos poderia ser uma boa alternativa para o tratamento de manutenção da melioidose, porque a ciprofloxacina pode penetrar em células fagocíticas e os macrolídeos podem inibir ou reduzir a produção de glicocálix, contudo seria necessário a utilização de estudos clínicos a fim de validar os dados obtidos *in vitro*. Recentemente, através de estudos genéticos têm sido elucidados mecanismos de resistência que resultaram na identificação de gene de  $\beta$ -lactamase classe A, bem como gene de  $\beta$ -lactamase classe D (CHEUNG *et al*, 2002; NIUMSUP; WUTHIEKANUN, 2002).

A PCR é uma técnica bastante utilizada para o diagnóstico de *B. pseudomallei*, tanto de cultivos puros bacterianos como do sangue de pacientes septicêmicos (LEW; DESMARCHELIER, 1994; DHARAKUL *et al*, 1996; RATTANATHONGKOM *et al*, 1997; SURA *et al*, 1997; HAASE *et al*, 1998; DHARAKUL *et al*, 1999; KUNAKORN *et al*, 2000; SONTHAYANON *et al*, 2002). Como não havia disponibilidade deste método de diagnóstico para a detecção da bactéria no setor de microbiologia, procurou-se utilizar um protocolo anteriormente descrito e com bastante informações e já utilizado por pesquisadores em outros países, como Austrália e Tailândia (HAASE *et al*, 1998; KUNAKORN *et al*, 2000). Para tanto, o protocolo escolhido foi o testado por Dharakul *et al* (1996). Neste, o autor utiliza PCR *nested* para a amplificação das seqüências do gene ribossomal 16S. Neste tipo de PCR são realizados

muitos ciclos de amplificação com um grupo de *primers* e o produto dessa amplificação é então novamente amplificado utilizando-se um outro grupo de *primers* localizados dentro da região do produto da 1ª PCR (KONEMAN *et al*, 2001). Entretanto não foi possível a continuação do procedimento de PCR até a 2ª etapa de amplificação (*nested*) devido à problemas na reprodutibilidade da 1ª fase do protocolo de PCR.

O protocolo de extração utilizado quando a PCR funcionou era utilizado para a extração de DNA de boa qualidade de micobactérias (CLARRIDJE *et al*, 1993). Neste, se utilizou o detergente Triton, juntamente com tampão tris-EDTA; a massa bacteriana (proveniente de cultivo de 24h em ágar Mueller- Hintom) foi suspensa nesta solução e então seguiu-se a etapa de inativação e lise bacteriana por 30 minutos à 95°C. Neste protocolo adicionou-se proteinase K (500 µg/ml) e 0,5% de SDS (sódio duodecil sulfato) que foram incubadas no tubo contendo a massa bacteriana à 60°C por 1h, e posteriormente adicionou-se RNase DNase – free, a fim de inativar RNA contaminante. A digestão com a enzima foi realizada à 37°C por 1h. Em seguida, o extrato de DNA foi purificado com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico por duas vezes e com clorofórmio uma vez. Após centrifugação, o DNA foi então precipitado com NaCl 5M e álcool etílico absoluto (4°C). Em nenhum momento desta etapa foi observada precipitação das 3 amostras, realizadas em quadruplicata, indicando DNA de baixa qualidade (fragmentação) ou baixa quantidade de DNA. Então as amostras foram colocadas à 0°C por 10 minutos, para aumentar a eficiência do processo; mesmo assim, somente após centrifugação pôde ser observado um precipitado de coloração branca, que foi manipulado cuidadosamente. Este precipitado foi então lavado por 2 vezes com álcool etílico 70% (4°C) e após etapa de secagem, este foi suspenso em tampão tris-EDTA (pH 8,0) e estocado à 4°C até o momento do uso. Quando após a quantificação em espectrofotômetro foi feita a diluição para 30 ng do DNA em água miliQ autoclavada. A eletroforese em gel de agarose desse material revelou algumas amostras com bandas de alto peso molecular com arraste, sinal de possível degradação de DNA. A quantificação em espectrofotômetro Gene Quant *pro* (Amershan Bioscience) na relação  $A_{260/280}$  revelou valores entre 1,5 à 1,78 para as amostras que foram utilizadas. As condições para realização da PCR em termociclador, foram as mesmas referidas por Dharakul *et al* (1996), incluindo tempo e temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, com exceção de uma etapa de desnaturação inicial à 95°C por 1 minuto que não estava incluída inicialmente.

Após a realização de uma PCR que funcionou (metodologia, reagentes utilizados e suas concentrações descritos em materiais e métodos), tentou-se repetir o processo e não foi mais observada a reprodutibilidade da técnica, então utilizou-se o protocolo recomendado no artigo de

referência para a metodologia da PCR (DHARAKUL *et al.*, 1996). Neste protocolo, a *B. pseudomallei* foi cultivada por 18h em ágar Mueller-Hintom e a massa bacteriana foi suspensa em 200 µl de tampão de extração contendo tris-EDTA pH 7,8, 0,5% de tween 20 e 0,2 mg de proteinase K/ ml. A mistura contendo células bacterianas viáveis, foi então incubada à 56°C por 2h e em seguida aquecida à 95°C por 10 minutos, a fim de inativar a proteinase K e as células bacterianas. O DNA então era estocado à 4°C até o momento da quantificação e da diluição em água miliQ autoclavada para uso na PCR. A eletroforese desse protocolo mostrou DNA de qualidade aceitável, ou seja havia banda de alto peso molecular, situada no poço do gel após a corrida, também havia arraste de DNA e algumas amostras com bandas de baixo peso molecular (entre 100 e 200 pb). Aparentemente ocorreu contaminação com RNA, uma vez que não foi adicionado neste protocolo RNase DNase- free. Na quantificação, a relação  $A_{260/280}$  variou entre 1,5 à 1,71.

O protocolo descrito no artigo foi novamente realizado, entretanto a metodologia de extração seguiu a partir de cultivo líquido em caldo BHI com 12h de crescimento (para que ficasse próximo à concentração recomendada de  $10^4$  células / ml). O cultivo era centrifugado e o sedimento foi lavado por duas vezes com solução salina 0,9% e o sedimento foi suspenso no tampão de extração descrito anteriormente, seguindo-se as mesmas etapas já descritas até a quantificação e diluição do DNA para uso na PCR. Entretanto esse protocolo possuía o risco e inconveniência de serem necessárias diversas etapas iniciais de centrifugação com células viáveis, o que poderia acarretar exposição à aerossóis bacterianos, sendo que a centrífuga utilizada não estava localizada no laboratório nível de biossegurança 3 (NB-3). Para minimizar o risco, o suporte da centrífuga era carregado e descarregado no NB-3, entretanto optou-se por não repetir protocolos utilizando cultivos em meio líquido, até porque a eletroforese não mostrou DNA de boa qualidade. As bandas apresentavam tamanho aproximado de 800pb (era adicionado marcador de peso molecular 100pb) e eram fracas, o que foi confirmado na quantificação que não apresentou bons resultados, sendo a relação  $A_{260/280}$  entre 1,35 à 1,58.

Um novo protocolo testado utilizou massa bacteriana com crescimento de 18h em ágar Mueller-Hintom. A massa foi suspensa em tampão tris-EDTA pH 8,0 e inativada à 95°C por 15 minutos. Então era adicionado SDS (0,5 %) e proteinase K (500 µg/ ml), a mistura era incubada à 56°C por 1h. O DNA bacteriano foi então purificado com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (uma vez) e com clorofórmio. Para a etapa de precipitação nessa metodologia, foi adicionado acetato de sódio (concentração final de 0,3M), para proporcionar uma precipitação mais suave e álcool isopropílico (os dois à temperatura ambiente). Novamente nenhum precipitado foi visível

no momento da adição dos reagentes, entretanto após a centrifugação foi observado um sedimento de coloração branca. Este foi manipulado cuidadosamente nas etapas seguintes de lavagem com álcool etílico 70%, secagem e suspensão em tampão tris-EDTA para ser estocado à 4°C até o momento do uso. A eletroforese desse DNA revelou bandas de baixo peso molecular para todas as amostras. A quantificação em espectrofotômetro revelou valores de  $A_{260/280}$  entre 1,66 à 1,9 para as amostras utilizadas.

No último protocolo de extração realizado, a massa bacteriana também proveniente de cultivo de 18h em ágar Mueller-Hinton foi suspensa em 500 µl de tampão salina-fosfato (PBS) e inativada à 95°C por 15 minutos. Então as amostras seguiram por dois caminhos diferentes de extração de DNA simultaneamente. No primeiro caminho após a inativação, as amostras foram centrifugadas e ao sedimento bacteriano foi adicionado tampão tris-EDTA- triton a fim de romper a parede bacteriana, neste protocolo o DNA bacteriano foi precipitado com acetato de sódio e álcool isopropílico, novamente não observou-se precipitado visível, somente após centrifugação, este sedimento foi então lavado com etanol 70%, secado e suspenso em tampão tris-EDTA para o armazenamento à 4°C. A eletroforese desse protocolo mostrou um DNA com arraste, aparentemente degradado, mas que foi utilizado para PCR mudando-se o tempo de desnaturação inicial de 1 minuto para 2 minutos (a temperatura manteve-se constante) e a temperatura de anelamento que era de 60°C foi para 60,5°C (o tempo manteve-se constante), o que não contribuiu para o sucesso da reação. No segundo caminho, que usava o método do guanidium tiocianato, a massa bacteriana suspensa e inativada em PBS, foi centrifugada e ao sedimento foi adicionado trizol (Invitrogen). A mistura foi agitada em vórtex e incubada à 30°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado clorofórmio, homogeneizado por inversão e a mistura incubada à 30°C por 10 minutos. Esta solução foi centrifugada à 10.000 rpm por 15 minutos à 6°C, quando foi coletada a interfase e fase fenólica contendo o DNA e proteínas. O DNA foi precipitado com etanol 100% e estocado à temperatura ambiente por 3 minutos, em seguida este foi centrifugado. O sobrenadante foi removido e o precipitado de DNA lavado duas vezes com citrato de sódio 0,1M (para proporcionar uma precipitação mais suave) em etanol 100%. O sedimento ficava em solução de lavagem por 30 minutos à 30°C. Após a lavagem, o DNA foi suspenso em etanol 75% e estocado 30°C por 15 minutos, quando em seguida foi centrifugado. Este foi secado ao ar e dissolvido em TE pH 8,0. A eletroforese desse protocolo não mostrou DNA de boa qualidade e este não foi quantificado.

A hipótese mais provável para o insucesso da PCR, foi a de falhas nos procedimentos de extração do DNA bacteriano, que não apresentava boa qualidade, pois quando após a extração era

feita a corrida eletroforética em gel de agarose, obtinha-se padrões de bandas com arrastes para as três amostras bacterianas. Apesar de procedimentos de extração de DNA para bactérias Gram-negativas serem relativamente simples, devido à facilidade de lise das células pelos detergentes, problemas com extração de DNA de *B. pseudomallei* foi relatado por Nair *et al* (1999), que apresentou diversos motivos para as falhas no tocante à espécie *B. pseudomallei*, considerada por estes autores “problemática”.

De acordo com Nair *et al* (1999), os principais problemas encontrados foram o baixo rendimento de DNA e a inadequação deste para as técnicas de biologia molecular, entre estas a digestão com endonucleases de restrição. É provável que este problema esteja relacionado com a presença de uma pseudo-cápsula consistindo de polissacarídeos, incluindo galactose, glicose, manose e ramnose. A existência de um exopolissacarídeo capsular também tem sido relatada, este poderia ser co-extraído com o DNA, o que complicaria o processo de extração. Além disso, isolados de cultivo recente possuem uma atividade fosfatase ácida não-específica que poderia interferir com a extração do DNA. Esse problema poderia ser superado com o uso de substâncias tóxicas como o cetiltrimetilamônio (CTAB) e guanidium-tiocianato (Trizol™). Neste estudo foram realizados diversos protocolos de extração de DNA com diversos detergentes e tampões, metodologias que empregavam purificação com fenol-clorofórmio e outras que não possuíam esta etapa. Também foi realizada extração com trizol, mas em nenhum momento houve um protocolo considerado ótimo para a extração de DNA de *B. pseudomallei*. Após extração de um DNA de qualidade “aceitável” das 3 amostras no primeiro protocolo de extração, conseguiu-se a reprodução da 1ª etapa do protocolo de PCR descrito por Dharakul *et al* (1996), e como o DNA possivelmente estaria em fase de degradação, ao se realizar novamente o protocolo de PCR não houve reprodutibilidade da técnica. Mesmo após a repetição de diversos protocolos de extração não foi possível a reprodutibilidade da técnica. Em nosso estudo poderiam ter sido usados *primers* com seqüências de repetição para *B. pseudomallei*, o que poderia ter aumentado a sensibilidade da técnica.

A hipótese mais provável para a não amplificação seria a degradação do DNA genômico, o qual é necessário para a amplificação, visto que o produto de 1ª etapa com 718 pb é considerado um grande fragmento. Apesar de no estudo realizado por Dharakul *et al* (1996) serem utilizados 2 pares de *primers* para aumentar a especificidade do diagnóstico, com o 1º conjunto de *primers* já ocorre amplificação de banda de 718 pb do gene 16S de RNAr, que pode ser característica de *B. pseudomallei*, mas também de *B. mallei* (são idênticas geneticamente a nível do gene 16S RNAr), *B. cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Entretanto essas espécies

bacterianas poderiam ser facilmente diferenciadas através de testes bioquímicos de identificação, como já abordado para *B. cepacia*. A *B. mallei* é uma espécie que acomete predominantemente animais (equinos e asininos), embora possa acometer também o homem causando o mormo. Esta apresenta crescimento bem mais lento que *B. pseudomallei* e é imóvel, onde *B. pseudomallei* é móvel e sua epidemiologia apresenta-se totalmente diferente de *B. pseudomallei* (DHARAKUL *et al*, 1996; SHORT, 2002). A espécie *S. maltophilia* é também classificada como BGNMF, todavia é oxidase-negativa e lisina positiva, ONPG positiva e sensível à polimixina, onde *B. pseudomallei* é oxidase positiva, lisina negativa, ONPG negativa e resistente à polimixina (KONEMAN *et al*, 2001\*). Como a espécie *S. maltophilia* é mais acessível, esta poderia ter sido usada como controle positivo da PCR.

Neste estudo foram amplificadas regiões do gene 16S de RNAr das 3 amostras testadas, produzindo a banda de 718 pb, que quando comparados com marcador de peso molecular, forneceu resultado idêntico ao observado por Dharakul *et al* (1996), confirmando a presença da bactéria no território cearense também por biologia molecular.

A ocorrência dos casos confirmados de melioidose em Tejuçuoca, e posteriormente em Banabuiú (2004) mostra a importância de alertar os serviços de vigilância sanitária e epidemiológica, juntamente com profissionais da área de saúde para a investigação de possíveis casos novos de melioidose em humanos e animais no Ceará e em outras regiões do país.

\* No Anexo III encontra-se uma tabela com as características bioquímicas chave que diferenciam a *B. pseudomallei* de *B. mallei*, *B. cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

## 7 CONCLUSÕES

1. O isolamento, identificação e caracterização fenotípica da *B. pseudomallei* em casos clínicos de pacientes que nunca saíram da localidade de Tejuçuoca, Ceará confirma a presença da bactéria em território brasileiro.
2. O padrão fenotípico manual e por kit diagnóstico API 20NE dos isolados bacterianos de Tejuçuoca segue os padrões comumente descritos na literatura para amostras da bactéria em diversos países.
3. Os testes de assimilação do carboidrato L-arabinose confirmam a presença de amostras arabinose negativa de *B. pseudomallei* virulentas, no território brasileiro.
4. O teste de sensibilidade antibacteriano (TSA) confirmou o alto nível de resistência e o padrão de sensibilidade característico da espécie para as três amostras de *B. pseudomallei*.
5. A confirmação molecular do diagnóstico pôde ser realizada por PCR, entretanto não foi possível a implantação de um protocolo otimizado para o diagnóstico molecular.
6. O estudo enfatiza a necessidade de conhecimento da doença no Estado do Ceará, a fim de realizar treinamento e aperfeiçoamento de equipes de vigilância epidemiológica e de profissionais de saúde aptos a diagnosticar e tratar o microorganismo tanto em casos esporádicos, como em surtos epidêmicos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBINK, F.C.; ORENDI, J.M.; DE BEAUFORT, A.J. Mother-to-child transmission of *Burkholderia pseudomallei*. **N. Eng. J. Med.** v. 344, p. 1171-1172, 2001.
- ADVISORY COMMITTEE ON DANGEROUS PATHOGENS. Categorisation of pathogens according to categories of containment, no. 17. Her Majesty's Stationery Office, London. 1990.
- ANUNTAGOOL, N.; RUGDECH, P.; SIRISINHA, S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p. 1232-1236, 1993.
- ASHDOWN, L.R. An improved screening for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. **Pathol.** v. 11, p. 293-297, 1979.
- ASHDOWN, L.R. Demonstration of human antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* by indirect fluorescent antibody staining. **Pathol.** v.13, p. 597-601, 1981.
- ASHDOWN, L.R.; JOHNSON, R.W.; KOEHLER, J.M.; COONEY, C.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. **J. Infect. Dis.** v. 160, p. 253-260, 1989.
- ASHDOWN, L. R. & KOEHLER, J.M. Production of hemolysin and other extracellular enzymes y clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** v. 28, p. 2331-2334, 1990
- ASHDOWN, L.R.; CLARKE, S.G. Evaluation of culture techniques for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 58, p. 4011-4014, 1992.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 45, p. 493-496, 1966.
- 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, n.1, p. 58-60, 2005.
- BRETT, P. J.; DESHAZER, D.; WOODS, D. E. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 48, p. 317-320, 1998.
- BRETT, P. J. & WOODS, D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. **Acta Trop.** v. 74, p. 201-210, 2000.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disease Information Bulletin. 2001.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory Exposure to *Burkholderia pseudomallei*—Los Angeles, California, 2003. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 53, n.42, p. 988-990, 2004.
- CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J.; DANCE, D.A.B. et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northern Thailand. **J. Infect. Dis.** v. 159, p. 890-899, 1989.

CHAOWAGUL, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; DANCE, D.A.B.; RAJCHANUVONG, A.; PATTARA-ARECHACHAI, J.; WHITE, N.J. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. **J. Infect. Dis.** v. 168, p. 1181-1185, 1993.

CHAOWAGUL, W.; SIMPSON, A.J.H.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; SMITH, M.D.; ANGUS, B.J.; WHITE, N.J. A comparison of chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, and doxycycline with doxycycline alone as maintenance therapy for melioidosis. **Clin. Infect. Dis.** v. 29, p. 375-380, 1999.

CHEN, Y-S; SHIUAN, D.; CHEN, S-C; CHYE, S-M; CHEN, Y-L. Recombinant Truncated Flagellin of *Burkholderia pseudomallei* as a Molecular Probe for Diagnosis of Melioidosis. **Clin Diagn. Lab. Immunol.** v. 10, n. 3, p. 423-425, 2003.

CHEUNG, T.K.; HO, P.L.; WOO, P.C.; YUEN, K.Y.; CHAU, P.Y. Cloning and expression of class A beta-lactamase gene blaA (BPS) in *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, p. 1132-1135, 2002.

CHOY, J.L.; MAYO, M.; JANMAAT, A.; CURRIE, B.J. Animal melioidosis in Austrália. **Acta Trop.** v. 74, n. 2-3, p. 153-8, 2000.

CHRISTENSON B, FUXENCH Z, MORALES JA, SUAREZ-VILLAMIL RA, SOUCHET LM. Severe community-acquired pneumonia and sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei* associated with flooding in Puerto Rico. **Bol Asoc Med P R.** v. 95, n.6, p.17-20, 2003.

CLARRIDGE JE 3RD, SHAWAR RM, SHINNICK TM, PLIKAYTIS BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, n.8, p. 2049-56, 1993.

CURRIE, B.J.; FISHER, D.A.; HOWARD, D.M.; BURROW, J.N.C.; SELVANAYAGAM, S.; SNELLING, P.L.; ANSTEY, N.M.; MAYO, M.J. The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea. **Acta Trop.** v. 74, p. 121-127, 2000a.

CURRIE, B.J.; FISHER, D.A.; HOWARD, D.M.; BURROW, J.N.C. Neurological melioidosis. **Acta Trop.** v. 74, p. 145-151, 2000b.

DANCE, D.A.B.; WUTHIEKANUN, V.; NAIGOWIT, P. et WHITE, N.J. Identification of *Pseudomonas pesudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. **J. Clin. Pathol.** v. 42, p. 645-648, 1989a.

DANCE,D.A.B.; WUTHIEKANUN, V.; CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J. Interactions *in vitro* between agents used to treat melioidosis. **J. Antimicrob. Chemoter.** v. 24, p. 311-316, 1989b.

DANCE, D.A.B. Melioidosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 4, p. 52-60, 1991a.

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

DANCE, D.A.B.; WUTHIEKANUN, V.; CHAOWAGUL, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y. WHITE, N.J. Development of resistance to ceftazidime and coamoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 29, p. 408-413, 1991.

- DANCE, D.A.B.; SANDERS, D.; PITT, T.L.; SPELLER, D.C.E. *Burkholderia pseudomallei* and Indian plague-like illness. **The Lancet**. v. 346, p. 904-905, 1995.
- DANCE, D.A.B. Melioidosis as an emerging global problem. **Acta Trop**. v. 74, p. 115-119, 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.
- DESMARCHELIER, P.M.; DANCE, D.A.B.; CHAOWAGUL, W.; SUPUTTAMONGKOL, Y. WHITE, N.J.; PITT, T.I. Relationships among *Pseudomonas pseudomallei* Isolates from Patients with Recurrent Melioidosis. **J. Clin. Microbiol**. v. 31, n. 6, p. 1592-1596, 1993.
- DHARAKUL, T.; SONGSIVILAI, S.; VIRIYACHITRA, S.; LUANGWEDCHAKARN, V.; TASSANEETRITAP, B.; CHAOWAGUL, W. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in Patients with Septicemic Melioidosis. **J. Clin. Microbiol**. v. 34, n. 3, p. 609-614, 1996.
- DHARAKUL, T.; TASSANEETRITHEP, B.; TRAKULSOMBOON, S.; SONGSIVILAI, S. Phylogenetic Analysis of Ara<sup>+</sup> and Ara<sup>-</sup> *Burkholderia pseudomallei* Isolates and Development of a Multiplex PCR Procedure for Rapid Discrimination between the Two Biotypes. **J. Clin. Microbiol**. v. 37, n. 6, p. 1906-1912, 1999.
- ELLIS, J.F.; TITBALL, R.W. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. **Infec. Dis. Rev**. v. 1, n.3, p. 174-181, 1999.
- FARKAS-HIMSLEY, H. Selection and rapid identification of *Pseudomonas pseudomallei* from other gram-negative bacteria. **Am. J. Clin. Pathol**. v. 49, p. 850-856, 1968.
- FERRY, R. Isolement du bacilli de Whitmore a partir de lésions rencontrées chez le porc à l'abattoir de Niamey au Niger. **Bull. Soc. Pathol. Exot**. v. 66, p. 42-45, 1973.
- GALIMAND, M. & DODIN, A. Le point sur la mélioiïdose dans le monde. **Bull. Soc. Pathol. Exot**. v. 75, p. 375-383, 1982.
- GEE, J.E.; SACCHI, C.T.; GLASS, M.B.; DE, B.K.; WEYANT, R.S.; LEVETT, P.N.; WHITNEY, A.M.; HOFFMASTER, A.R.; POPOVIC, T. 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. 4647-4654, 2003.
- GILLIGAN, P.H.; WHITTIER, S. Miscellaneous Gram-Negative Bacteria. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7<sup>th</sup>- Ed. American Society for Microbiology. p. 526-538, 1999.
- GIRARD, G. Le porc peut-il être un porteur sain de bacilli de Whitmore. **Bull. Soc. Pathol. Exot**. v. 29, p. 712-716, 1936.
- GOSHORN, R.K. Recrudescence pulmonary melioidosis: a case report involving the so called "Vietnamese time bomb". **Indiana Med**. v. 80, p. 247-249, 1987.
- GREEN, R.N. & TUFFNEL, P.G. Laboratory acquired melioidosis. **Am. J. Med**. v. 44, p. 599-605, 1968.

- HAASE, A.; BRENNAN, M.; BARRETT, S.; WOOD, Y.; HUFFAM, S.; O'BRIEN, D.; CURRIE, B. Evaluation of PCR for Diagnosis of Melioidosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, n. 4, p. 1039-1041, 1998.
- HALDER, D.; ABDULLAH, W.A.; JOHARI, M.J.; CHOO, K.E. Neonatal melioidosis. **Singapore Med. J.** v. 34, p. 85-86, 1993.
- HAUSSLER, S.; NIMTZ, M.; DOMKE, T.; WRAY, V.; STEINMETZ, I. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.** v. 66, p. 1588-1593, 1998.
- HO, P.L.; TERENCE, K.M.; CHEUNG, R.; KINOSHITA; CINDY, W.S.; TSE, K.Y.; YUEN; CHAU, P.Y. Activity of five fluoroquinolones against 71 isolates of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 49, p. 1042-1044, 2002.
- HOLDEN, M.T.G.; TITBALL, R.W.; PEACOCK, S.J.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; ATKINS, T.; CROSSMAN, L.C.; PITT, T.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K.; BENTLEY, S.D.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N.R.; BASON, N.; BEACHAM, I.F.; BROOKS, K.; BROWN, K.A.; BROWN, N.F.; CHALLIS, G.L.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; CROSSET, B.; DAVIS, P.; DE SHAZER, D.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KEITH, K.E.; MADDISON, M.; MOULE, S.; PRICE, C.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHEFORD, K.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; SONGSIVILAI, S.; STEVENS, K.; TUMAPA, S.; VESARATCHAVEST, M.; WHITEHEAD, S.; YEATS, C.; BARREL, B.G.; OYSTON, P.C.F.; PARKHILL, J. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 101, n. 39, p. 14240-14245, 2004.
- HOWARD, K. & INGLIS, T.J.J. Novel Selective Medium for Isolation of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 7, p. 3312-3316, 2003a.
- HOWARD, K. & INGLIS, T.J.J. The effect of free chlorine on *Burkholderia pseudomallei* in potable water. **Water Res.** v. 37, p. 4425-4432, 2003b.
- HOWE, C.; SAMPATH, A.; SPOTNIZ, M. The Pseudomallei group: A review. **J. Infect. Dis.** v. 124, n. 6, p. 598-606, 1971.
- HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; LEE, L.N.; YU, C.J.; YANG, P.C.; HO, S.W.; LUH, K.T. Melioidosis: an emerging infection in Taiwan?. **Emerg. Infect. Dis.** v. 7, p. 428-433, 2001.
- INGLIS, T.J.; GOLLEDGE, C.L.; CLAIR, A.; HARVEY, J. Case report: Recovery from persistent septicemic melioidosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 65, n. 1, p. 76-82, 2001a.
- 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, 2001b.
- IP, M.; OSTERBERG, L.G.; CHAU, P.Y.; RAFFIN, T.A. Pulmonary melioidosis. **Chest.** v. 108, p. 1420-1424, 1995.
- 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. 109-113, 2001.

JONES, A. L.; BEVERIDGE, T. J.; WOODS, D. E. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.** v. 64, p. 782-790, 1996.

KESPICHAYAWATTANA, W.; RATTANACHETKUL, S.; WANUN, T.; UTAISINCHAROEN, P.; SIRISINHA, S. *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. **Infect. Immun.** v. 68, p. 5377-5384, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, M.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In: \_\_\_\_ **Diagnóstico Microbiológico**, 5ª Ed. Medsi. p. 263-329, 2001.

KUNAKORN, M.; RAKSAKAIT, K.; SETHAUDOM, C.; SERMSWAN, R.W.; DHARAKUL, T. Comparison of three primer sets for diagnosis of septicemic melioidosis. **Acta Trop.** v. 74, p. 247-251, 2000.

LEE, N.; WU, J.L.; LEE, CH.; TSAI, WC. *Pseudomonas pseudomallei* Infection from Drowning: The First Reported Case in Taiwan. **J. Clin. Microbiol.** v. 23, n.3, p.352-354, 1985.

LEELARASAMEE, A. Diagnostic value of indirect hemagglutination method for melioidosis in Thailand. **J Infect Dis. Antimicrob. Agents.** v. 2, n. 214-215, 1985.

LEELARASAMEE, A.; BOVORNKITTI, 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. 131-136, 2004.

LEHNINGER, A.L. O Ciclo do Ácido Cítrico. In: \_\_\_\_ **Princípios de Bioquímica**. Maryland: Worth Publishers, cap. 16, pág. 311-331, 1982.

LERTPATANASUWAN, N.; SERMSRI, K.; PETKASEAM, A.; TRAKULSOLBOON, S.; THAMLIKITKUL, V.; SUPUTTAMONGKOL. Arabinose-Positive *Burkholderia pseudomallei* Infection in Humans: Case Report. **Clin. Infect. Dis.** v.28, p. 927-928, 1999.

LEW, A.E. & DESMARCHELIER, P.M. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and Hybridization. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, n. 5, p. 1326-1332, 1994.

LOWE, P.; ENGLER, C.; NORTON, R. Comparison of Automated and Nonautomated Systems for Identification of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, n.12, p. 4625-4627, 2002.

LUMBIGANON, P.; PENGSA, K.; PUAPERMPHOONSIRI, S.; PUAPAIROJ, A. Neonatal melioidosis: a report of 5 cases. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 7, p. 634-636, 1988.

MAYS, E.E. & RICKETS, E.A. Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty six years following initial geographic exposure. **Chest.** v. 68, p. 261-263, 1975.

McCORMICK, J.B.; SEXTON, D.J.; MCMURRAY, J.G.; CAREY, E.; HAYES, P.; FELDMAN, R.A. Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. **Ann. Intern. Med.** v. 83, p. 512-513, 1975.

- MIRALLES, I.S.; MACIEL, M.C.A.; ANGELO, M.R.F.; GONDINI, M.M.; FROTA, L.H.F.; REIS, C.M.F.; HOFER, E. *Burkholderia pseudomallei*: A case report of a human infection in Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 46, n. 1, p. 51-54, 2004.
- MOLLARET, H.H. 'L' affaire du jardin des plantes' ou comment la mélioiidose fit son apparition en France. **Med. Mal. Infect.** v. 18, p. 643-654, 1988.
- MOORE, R.A.; DESHAZER, D.; RECKSEIDLER, S. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 43, p. 465-470, 1999.
- NAIR, S.; KARIM, R.; CARDOSA, M.J.; ISMAIL, G.; PANG, T. Convenient and versatile DNA extraction using agarose plugs for ribotyping of problematic bacterial species. **J. Microbiol. Meth.** v. 38, p. 63-67, 1999.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**. 8<sup>a</sup> ed. Wayne, 2003. (approved standard M2-A8).
- NIUMSUP, P.; WUTHIEKANUN, V. Cloning of class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and-resistant strains. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 50, p. 445-455, 2002.
- NÚCLEO DE EPIDEMIOLOGIA. Informe Ambiental – Melioidose. Secretaria de Saúde, Estado do Ceará, 2004. Disponível em: [http://www.saude.ce.gov.br/iternet/inf\\_eventos/informe\\_ambmeli\\_290704.pdf](http://www.saude.ce.gov.br/iternet/inf_eventos/informe_ambmeli_290704.pdf). disponível em 20 fev. 2005.
- NUSSBAUM, J.J.; HULL, D.S.; CARTER, M.J. *Pseudomonas pseudomallei* in an anophthalmic orbit. **Arch. Ophthalm.** v. 98, p. 1224-1225, 1980.
- O'BRIEN, S.J.; BHOPAL, R.S. Legionnaires disease: the infective dose paradox. **Lancet**. v. 342, p. 5-6, 1993.
- OLIVE, D.M. & BEAN, P. Principles and Applications of methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- PERUSKI, A.H. & PERUSKI-JR., L.F. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** v. 10, n. 4, p. 506-513, 2003.
- PESTANA DE CASTRO, A.F.; CAMPEDELLI, O.; GIORGI, W.; SANTA ROSA, C.A. Considerações sobre a melioidose e o seu agente causal: *Pseudomonas pseudomallei*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 15, p. 43-49, 1973.
- POOLE, K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolonas in Gram-negative Bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 44, n. 9, p. 2233-2241, 2000.
- RADU, S.; LING, O.W.; SRIMONTREE, S.; LULITANOND, A.; HIN, W. F.; YUHERMAN; LIHAN, S.; RUSUL, G.; MUTALIB, A.R. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* isolated in Thailand and Malaysia. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** v. 38, p. 141-145, 2000.

- RATTANATHONGKOM, A.; SERMSWAN, R.W.; WONGRATANACHEEWIN, S. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples using polymerase chain reaction. **Moll. Cell. Prob.** v. 11, p. 25-31, 1997.
- RECKSEIDLER, D. L.; DE SHAZER, D.; SOKOL, P.; WOODS, D.E.. Detection of Bacterial Virulence Genes by Subtractive Hybridization: Identification of Capsular Polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a Major Virulence Determinant. **Infect. Immun.** v.69, n.1, p. 34-44, 2001.
- REDFEARN, M.S.; PALLERONI, N.J.; STANIER, R.Y. A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. **J. Gen. Microbiol.** v. 43, p. 293-313, 1966.
- ROTZ, L.D.; KHAN, A.S.; LILIBRIDGE, S.R.; OSTROFF, S.M.; HUGHES, J.M. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerg. Infect. Dis.** v. 8, p. 225-230, 2002.
- SANFORD, J.P.; MOORE, W.L. Recrudescence melioidosis: a southeast Asian legacy. **Am. Rev. Resp. Dis.** v. 104, p. 452-453, 1971.
- SCHLECH, W.F.; TURCHIK, J.B.; WESTAKLE, R.E.; KLEIN, G.C.; BAND, J.D.; WEAVER, R.E. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). **N. Engl. J. Med.** v. 305, p. 1133-1135, 1981.
- SCHÜLIN, T.; STEINMETZ, I. Chronic Melioidosis in a Patient with Cystic Fibrosis. **J. Clin. Microbiol.** v.39, n. 4, p. 1676-1677, 2001.
- SERMSWAN, R.W.; WONGRATACHEEWIN, S.; ANUNTAGOOL, N.; SIRISINHA, S. 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.; GODFREY, A.J.; CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J.; WOODS, D.E. Ribotype analysis of *Pseudomonas pseudomallei* isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p. 238-243, 1993.
- SEXTON, M.M.; JONES, A.L.; CHAOWAGUL, W.; WOODS, D.E. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*. **Can. J. Microbiol.** v. 40, p. 903-910, 1994.
- SEWELL, D.L. Laboratory Safety Practices Associated with Potential Agents of Biocrime or Bioterrorism. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 7, p. 2801-2809, 2003.
- SHORT, B.H. Melioidosis: an important emerging infectious disease – a military problem ?. **ADF Health.** v. 3, p. 13-21, 2002.
- SMITH, M.D.; WUTHIEKANUN, V.; WALSH, A.L.; WHITE, N.J. Susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei* to some newer  $\beta$ -lactam antibiotics and antibiotic combinations using time-kill studies. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 33, p. 145-149, 1994.
- SMITH, M.D.; ANGUS, B.J.; WUTHIEKANUN, V.; WHITE, N.J. Arabinose Assimilation Defines a Nonvirulent Biotype of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.** v. 65, n. 10, p. 4319-4321, 1997.
- SONTHAYANON, P.; KRASAO, P.; WUTHIEKANUN, V.; PANYIM, S.; TUNGPRADABKUL, S. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei*

and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. **Mol. Cell. Prob.** v. 16, p. 217-222, 2002.

SOOKPRANEE, T.; SOOKPRANEE, M.; MELLENCAMP, M.A.; PREHEEIM, L.C. *Pseudomonas pseudomallei*, a Common Pathogen in Thailand That Is Resistant to the Bactericidal Effects of Many Antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 35, n. 3, p. 484-489, 1991.

SPRAGUE, L.D.; NEUBAUER, H. Melioidosis in Animals: A Review on Epizootiology, Diagnosis and Clinical Presentation. **J. Vet. Med.** v. 51, p. 305-320, 2004.

STANTON, A.T.; FLETCHER, W. Melioidosis, a new disease of the tropics. **Trans. Fourth Congr. Far East. Assoc. Trop. Med.** v. 2, n. 196-198, 1921.

STEINMENTZ, I.; NIMTZ, M.; WRAY, V.; HÄUBLER, S.; REGANZEROWSKI, A.; BRENNKE, B. Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei*. **Acta Trop.** v.74, p.211-214, 2000.

SURA, T.; SMITH, M.D.; COWAN, G.M.; WALSH, A.M.; WHITE, N.J.; KRISHNA, S. Polymerase chain reaction for the detection of *Burkholderia pseudomallei*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** v. 29, p. 121-127, 1997.

SUTMOLLER, P.; KRANEVELD, F.C.; VAN DER SCHAAF, A. Melioidosis (*pseudomalleus*) in sheep, goats and pigs on Aruba (Netherland Antilles). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 130, p. 145-417, 1957.

THIBAUT, F.M.; HERNANDEZ, E.; VIDAL, D.R.; GIRARDET, M.; CAVALLO, J.D. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54, p. 1134-1138, 2004.

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

VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S.D.; GENDEH, G.S.; PARASAKTHI. Serodiagnosis of melioidosis in Malaysia. **Singapore Med. J.** v. 36, p. 299-302, 1995.

VADIVELU, J. & PUTHUCHEARY, S.D. Diagnostic and Prognostic value of an immunofluorescent assay for melioidosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 62, n. 2, p. 297-300, 2000.

VORACHIT, M.; CHONGTRAKOOL, P.; ARKOMSEAN, S.; BOONSONG, S. Antimicrobial resistance in *Burkholderia pseudomallei*. **Acta Trop.** v. 74, p. 139-144, 2000.

VUDDHAKUL, V.; THARAVICHITKUL, P.; NA-NGAM, N.; JITSURONG, S.; KUNTHAWA, B.; NOIMAY, P.; BINLA, A.; THAMLIKITKUL. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 60, n. 3, p. 458-461, 1999.

WALSH, A.L. & WUTHIEKANUN, V. The laboratory diagnosis of melioidosis. **Brit. J. Biomed. Sci.** v. 53, p. 249-253, 1996.

WHITE, N.J.; DANCE, D.A.B.; CHAOWAGUL, W.; WATTANAGOON, Y.; WUTHIEKANUN, V.; PITAKWATCHARA, N. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. **The Lancet.** 23<sup>rd</sup>: p. 697-700, 1989.

WHITE, N.J. Melioidosis. **The Lancet**. v. 361, p. 1715-1722, 2003.

WINTON, M.D.; EVERETT, E.D.; DOLAN, S.A. Activities of five new fluoroquinolones against *Pseudomonas pseudomallei*. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v. 32, n. 6, p. 928-929, 1988.

WHITMORE, A. & KRISHNASWAMI, C.S. 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, n. 1, p. 1-34, 1913.

WOODS, D.E.; JONES, A.L.; HILL, P.J. Interaction of insulin with *Pseudomonas pseudomallei*. **Infect. Immun.** v. 61, p. 4045-4049, 1993.

WOODS, D.E. & SONGSIVILAI, S. Species versus Biotype Status. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. 11, p. 3786-3787, 1999.

WOODS, D.E.; DESHAZER, D.; MOORE, R.; BRETT, P.J.; BURTNICK, M.N.; RECKSEIDLER, S.L.; SENKIW, M.D. Current studies on the pathogenesis of melioidosis. **Microb. Infect.** v. 2, p. 157-162, 1999.

WUTHIEKANUN, V.; DANCE, D.; CHAOWAGUL, W.; SUPPUTTAMONGKOL, Y.; WATTANAGOON, Y.; WHITE, N. Blood culture techniques for the diagnosis of melioidosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 9, p. 654-658, 1990a.

WUTHIEKANUN, V.; DANCE, D.A.B.; WATTANAGOON, Y.; SUPPUTTAMONGKOL, Y.; CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice. **J. Med. Microbiol.** v. 33, p. 121-126, 1990b.

WUTHIEKANUN, V.; SMITH, M.D.; WHITE, N.J. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 89, p. 491, 1995.

WUTHIEKANUN, V.; SMITH, M.D.; DANCE, D.A.B.; WALSH, A.L.; PITT, T.L.; WHITE, N.J. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Med. Microbiol.** v. 45, p. 408-412, 1996.

WUTHIEKANUN, V.; SUPPUTTAMONGKOL, Y.; SIMPSON, A.J.H.; KANAPHUN, P.; WHITE, N.J. Value of Throat Swab in Diagnosis of Melioidosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, n. 10, p. 3801-3802, 2001.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* comb. nov. **Microbiol. Immunol.** v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KAWAMURA, Y.; EZAKI, T.; IKEDO, M.; DEJSIRILERT, S.; FUJIWARA, N.; NAKA, T.; KOBAYASHI, K. *Burkholderia uboniae* sp. Nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamensis*. **Microbiol. Immunol.** v.44, p. 303-317, 2000.

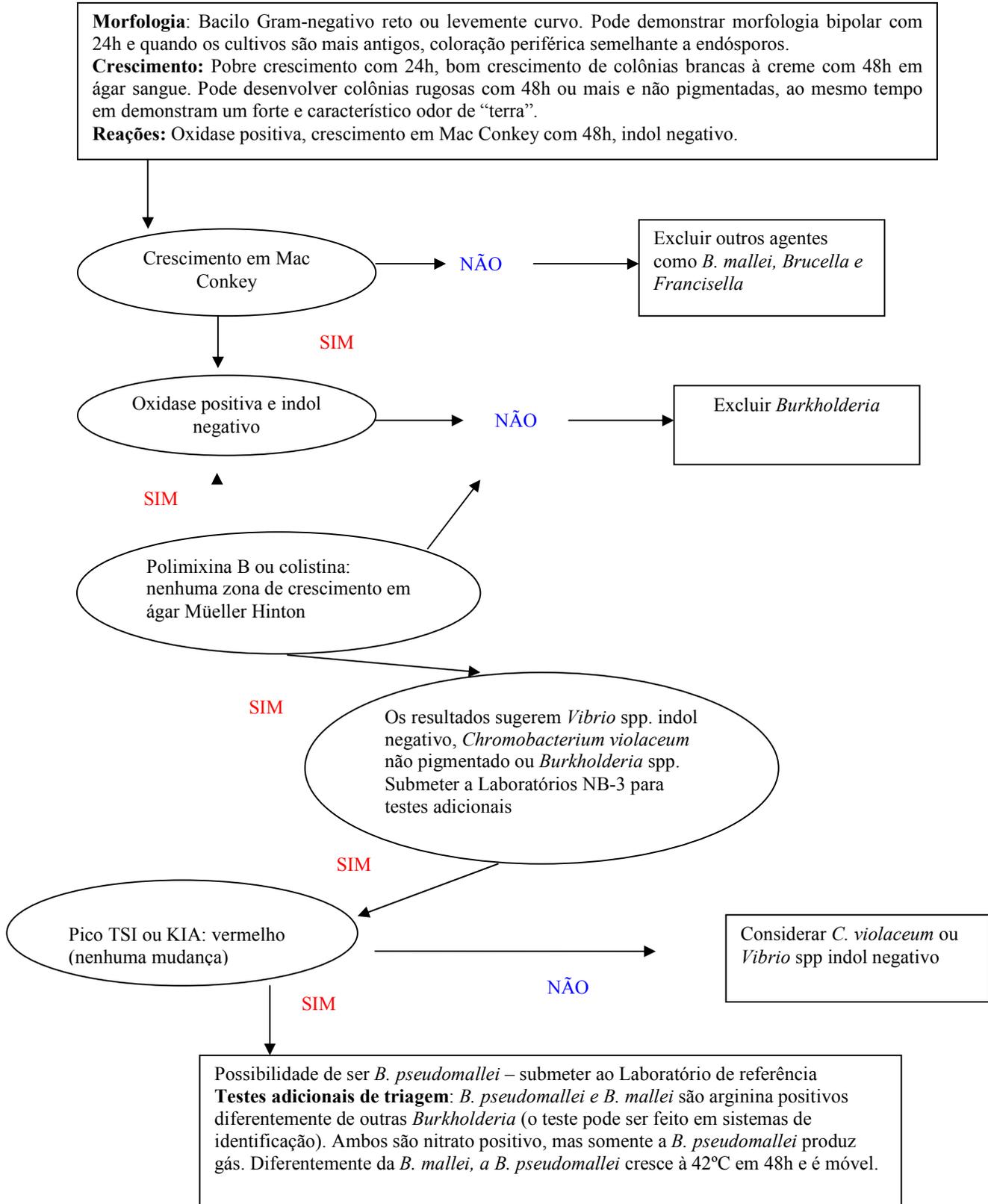
YANG, H.; CHAOWAGUL, W.; SOKOL, P.A. Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. **Infect. Immun.** v. 59, p.776–780, 1991.

YANG, S. Melioidosis research in China. **Acta Trop.** v. 77, p. 157-165, 2000.

YEE, K.C.; LEE, M.K.; CHUA, C.T.; PUTHUCHEARY, S.D. Melioidosis, the great mimicker: a report of 10 cases from Malaysia. **J Trop. Med. Hyg.** v. 91, p. 249-254, 1988.

**ANEXOS**

## ANEXO I

Fluxograma para identificação rápida de *B. pseudomallei*

## ANEXO II

### Testes Bioquímicos, meios de cultura, soluções e reagentes

#### 1. Ágar Ashdown

Objetivo: empregado como meio seletivo para o crescimento de *Burkholderia pseudomallei*

Descrição: é constituído pelos seguintes componentes:

Ágar tripticase soja .....	11
Glicerol .....	4%
Cristal violeta.....	5 mg
Vermelho neutro.....	50 mg
Gentamicina.....	4 mg

Homogeneizar os componentes descritos acima (com exceção da gentamicina) e autoclavar à 121°C por 15 minutos. Deixar esfriar à 50°C e adicionar a gentamicina. Homogeneizar e distribuir em placas de Petri.

#### 2. Ágar Estoque

Objetivo: Empregado na manutenção das amostras bacterianas

Descrição: É constituído dos seguintes componentes por litro de água destilada:

Extrato de carne.....	3.0g
Peptona.....	10.0g
Cloreto de sódio.....	5.0g
Ágar.....	4.0g
Água destilada.....	1000ml

Dissolver todos os componentes em água destilada e aquecer até a liquefação completa do ágar. Distribuir em alíquotas de 3 ml, em tubos de 10x70mm com tampão de algodão e autoclavar à 121°C por 15 minutos. Após o processo de esterilização trocar os tampões de algodão por tampas de borracha estéreis. Estocar à temperatura ambiente.

### 3. Ágar Chocolate

Objetivo: Utilizado como meio de isolamento primário.

Composição:

Meio Columbia estéril.....250ml

Sangue de carneiro desfibrinado.....12,5ml

Preparo:

Misturar o meio Columbia com o sangue de carneiro em um balão de vidro, em seguida aquecer em manta aquecedora à 100°C. Deixar em aquecimento até a mudança de cor do meio, que inicialmente é vermelho e depois muda para marrom (cor de chocolate). Distribuir em placas de Petri previamente esterilizadas.

### 4. Ágar Mac Conkey

Objetivo: utilizado como teste de crescimento

Descrição: o ágar Mac Conkey é um meio sintético pronto, bastando para o seu uso adicionar-se água destilada e esterilizar.

Peptona.....17g

Proteose peptona.....3,0g

Lactose.....10g

Sais de bile no 3.....1,5g

Cloreto de sódio.....5,0

Ágar.....13,5g

Vermelho neutro.....0,03g

Cristal violeta.....0,001g

Água destilada.....1000ml

Pesar 50g da mistura (meio sintético) e adicionar 1000ml de água destilada. Aquecer até a completa liquefação do ágar (evitar aquecimento excessivo). Ajustar o pH à 7,1. Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min. Distribuir em placas de Petri previamente esterilizadas

### 5. Ágar Mueller-Hinton

Objetivo: utilizado na realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer. Este meio de cultura sendo complexo, foi preparado de acordo com as especificações do fabricante (Oxoid).

#### Preparo do meio:

Um total de 38g do meio foi pesado e dissolvido em 1 litro de água destilada, fundido e autoclavado à 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri estéreis.

### 6. Ágar Sais Mínimo (0.2% de carboidrato)

Objetivo: Utilizado como teste de crescimento para verificar a capacidade de assimilação do carboidrato (arabinose ou glicose) contido no meio pela bactéria

#### Preparo do meio:

3 Solução sais mínimo:

Cloreto de amônio.....	2g
Nitrato de amônio.....	0.4g
Sulfato de sódio anidro.....	0.8g
Ortofosfato diidrogênio potássico.....	0.4g
Ortofosfato hidrogênio dipotássico.....	1.2g
Sulfato de magnésio.....	0.04g
Ágar (0,15%).....	0.15g
Água destilada.....	100ml

3 Ágar 2%:

Ágar.....	3g
Água destilada.....	150ml

3 Açúcar:

L-arabinose.....	solução 10%
Glicose.....	solução 10%

Esterilizar separadamente as 3 soluções e então misturá-las ao mesmo tempo:

25 ml da solução sais mínimo + 75 ml ágar + 2 ml do açúcar (concentração final do açúcar) = 0,2 % (cada açúcar separadamente). Distribuir o meio em placas de Petri.

Semear a bactéria em estudo, incubar à 37°C e observar por até 48h a presença ou não de crescimento bacteriano.

Interpretação: o teste é considerado positivo (assimila o carboidrato) na presença de crescimento no meio e negativo na ausência de crescimento no meio.

### **7. Ágar Sangue**

Objetivo: Utilizado como meio de isolamento primário e também como teste bioquímico para observar se a bactéria em estudo produziria hemólise e se esta era parcial ou total. Também foi utilizado para avaliar se a colônia apresentava pigmento e qual a cor desse pigmento.

Meio básico:

Ágar Columbia (Oxoid).....39g  
 Água destilada.....1000ml

Preparo do meio:

Meio Columbia estéril.....100ml  
 Sangue de carneiro desfibrinado.....5ml

Homogeneizar e distribuir em placas de Petri.

### **8. Ágar Soja Trypticase**

Objetivo: Utilizado no cultivo das cepas para a realização do inóculo em salina do Kit API 20NE

Preparo do meio:

O meio utilizado foi um meio sintético pronto (Biolab), bastando para o seu uso dissolver 40g do pó comercial em 1 litro de água destilada e em seguida autoclavar à 121°C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri.

### **8. BHI (Brain Heart Infusion)**

Objetivo: empregado nas diversas etapas de cultivo e repique bacteriano e como inóculo para os testes bioquímicos.

Descrição: o meio BHI é um meio sintético pronto, bastando para o seu uso adicionar-se água destilada. O caldo BHI utilizado foi da Difco.

Preparo do meio final:

Foi pesado 37g e dissolvido em 1l de água destilada, de acordo com as especificações do fabricante e posteriormente distribuído em alíquotas de 2ml em tubos de 10x70mm com tampa de rosca e autoclavado à 121°C por 15 minutos.

### **9. Caldo para redução de nitrato à nitrito e / ou gás**

Princípio: as bactérias reduzem o nitrato pela extração do oxigênio do nitrato para formar nitritos e / ou outros produtos reduzidos, tais como o gás nitrogênio. A presença de nitritos no meio é determinada pela adição de *alfa*-naftilamina e ácido sulfanílico. A formação de gás é vista pela formação de bolhas que se depositam no tubo de Durham.

Composição do meio:

3 Caldo para redução do nitrato:

Peptona.....1.0g  
 Nitrato de potássio (Merck).....0.1g  
 Água destilada.....100ml  
 pH final: 7.3

3 Reagentes de Greiss-Ilosvay:

Reagente A:

*Alfa*-naftilamina (Merck).....0,025g  
 Ácido acético.....5ml  
 Água destilada.....10ml

Reagente B:

Ácido sulfanílico (Merck).....4g  
 Ácido acético.....5ml  
 Água destilada.....10ml

Preparo do meio:

Foram adicionados tubos de Durham invertidos dentro dos tubos de 10x70mm vazios. Caldo foi preparado pela dissolução completa dos componentes e foi distribuído em alíquotas de 3 ml dentro dos tubos. Em seguida foram autoclavados à 121°C por 15 minutos. Com 18 à 24 h após a inoculação da bactéria foram adicionados 1 ml do reagente A e 1 ml do reagente B.

Interpretação após a adição final dos reagentes A e B:

Resultado positivo: o desenvolvimento de cor vermelho-alaranjada indica a presença de nitritos e a formação de bolhas dentro do tubo de Durham, indica a redução do nitrato a gás.

Resultado negativo: não há desenvolvimento de cor vermelha e não há formação de bolhas

**10. Produção de Catalase**

Princípio: esta enzima presente em algumas bactérias hidrolisa o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular

Reagente: peróxido de hidrogênio 3%

Fazer a interpretação após a homogeneização de algumas gotas do reagente com uma colônia isolada

Resultado positivo: uma rápida efervescência indica a produção de oxigênio molecular

**11. Citrato de Simmons**

Princípio: determina a capacidade que determinadas bactérias apresentam para utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono. Este meio é chamado Citrato de Simmons, pois Simmons aperfeiçoou a fórmula original (citrato de Koser) pela adição de ágar e azul de bromotimol. Este meio é sintético e pronto para uso, bastando apenas que seja dissolvido em água destilada.

Composição do meio (Difco):

Fosfato de hidrogênio amoniacal.....	1g
Fosfato dipotássico.....	1g
Cloreto de sódio.....	5g
Citrato de sódio.....	2g

Sulfato de magnésio.....	0,20g
Ágar.....	15g
Azul de bromotimol.....	0,08g
Água destilada.....	1000ml

pH final: 6.9

Preparo do meio:

Pesar 24,2g da mistura acima descrita e dissolver em 1000ml de água destilada. Após 5 a 10 minutos fazer a homogeneização e aquecer suavemente em manta aquecedora com agitação frequente. Deixar atingir a temperatura de ebulição por 1 minuto. Distribuir em alíquotas de 1 ml em tubos de vidro 10x70mm com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos. Deixar solidificar em posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 5 cm de comprimento.

Interpretação:

Resultado positivo: Desenvolvimento de cor azul e /ou crescimento visível ao longo do inóculo. Isto indica a presença de produtos alcalinos liberados da metabolização do citrato.

Resultado negativo: Ausência de cor azul e/ ou ausência de crescimento visível ao longo do inóculo.

## **12. Hidrólise da Esculina para Gram-negativo**

Objetivo: Utilizado para a identificação de enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores.

Composição:

BHI.....	2.5
Esculina.....	0.1
Citrato férrico.....	0.05
Ágar.....	1.6g
Água destilada.....	100ml

Preparo do meio:

Pesar os componentes descritos acima e em seguida adicionar água destilada. Aquecer em manta aquecedora para a completa liquefação do ágar. Distribuir em alíquotas de 1,5ml em tubos de vidro com tampa rosqueável de 13x10mm. Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos.

Deixar solidificar em posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 4 cm. Fechar bem os tubos e guardar em geladeira (4°C) até o momento do uso.

Semear o tubo teste espalhando a cultura na superfície do meio.

Interpretação: A hidrólise da esculina (reação positiva) se caracteriza por enegrecimento do meio, após 24 à 48h de incubação. No teste negativo o meio não muda de cor.

### **13. Produção de gelatinase em meio gelatina de Kohn**

Princípio: Determinar a capacidade de certos microorganismos de hidrolisar a gelatina a peptídeos e aminoácidos, mediante a ação de enzimas específicas denominadas gelatinases.

#### Composição do meio:

Extrato de carne.....3g  
 Peptona.....5g  
 Gelatina.....120g  
 Água destilada.....1000 ml

pH final: 6.8

#### Preparo do meio:

Homogeneizar os componentes acima após a dissolução em água destilada. Distribuir 4 – 5 ml em tubos com tampa de rosca. Autoclavar e deixar esfriar em posição vertical. Manter em refrigeração até o momento do uso. O meio deve estar solidificado.

Semear por punção um inóculo abundante de cultura de 18 – 24 h atravessando o meio a uma profundidade de 2 – 2,5 cm. Empregar um meio controle sem o inóculo para comparar. Incubar à 35°C.

Interpretação: Examinar os tubos diariamente durante 2 semanas. Ao final de cada período de 24 h, colocar os 2 tubos na geladeira durante 1 – 2 h, até que o controle tenha se solidificado; em seguida inclinar para observar se ocorreu liquefação da gelatina. A prova é considerada positiva

quando o tubo inoculado está líquido e o controle sólido. A prova é negativa se os dois tubos permanecerem sólidos.

#### **14. Produção de Indol:**

Princípio: o indol é um dos produtos do metabolismo do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de degradar o triptofano com produção de indol, ácido pirúvico e amônia. O indol é detectado através do desenvolvimento de cor vermelha após a adição do reativo de Kovac (solução de p-dimetilaminobenzaldeído)

##### Composição do meio:

Caldo triptofano (1%):

Peptona (Difco).....	8.4g
Cloreto de sódio.....	2.1g
L-triptofano.....	4.2g
Água destilada.....	420ml

3 Reativo de Kovac:

p-dimetilaminobenzóico.....	1g
n-butanol.....	75ml
HCl concentrado (Reagen).....	25ml

##### Preparo do meio:

Caldo triptofano: Misturou-se todos os componentes e dissolveu-se em água destilada, em seguida ajustou-se o pH à 7.4. distribuiu-se em alíquotas de 2ml em tubos de 70x100mm e autoclavou-se à 121°C por 15 minutos.

Reativo de Kovac: adicionou-se o ácido ao álcool e esperou-se esfriar antes de adicionar o aldeído. Este reagente mantém-se estável por um mínimo de 10 anos à 4°C

Interpretação: adicionou-se 5 gotas do reativo e esperou-se 5 minutos para tirar as conclusões.

Resultado positivo: desenvolvimento de uma cor vermelha na superfície do meio

### **15. Caldo para produção de lisina dihidrolase e arginina descarboxilase**

Princípio: Determina se a bactéria testada produz descarboxilases, que são um grupo de enzimas substrato-específicas capazes de atuar sobre a porção carboxila dos aminoácidos, formando aminas de reação alcalina. Cada enzima descarboxilase é específica para um aminoácido. Os aminoácidos testados foram: lisina e arginina, que deram os produtos de descarboxilação cadaverina e citrulina. Este meio faz uso de um meio básico, que foi o de Moeller acrescido do aminoácido específico. Faz-se uso de um meio controle, ou seja, sem o aminoácido. Os dois tubos são incubados anaerobicamente (os BGNNF descarboxilam aminoácidos em condições anaeróbias, apesar de serem aeróbios estritos). Ao contrário das enterobactérias, o tubo controle dos BGNNF não demonstra metabolização da glicose e portanto, somente o tubo com o aminoácido mostra o desenvolvimento de alguma reação, ou seja, a descarboxilação, formando aminas alcalinas que mudam a cor do meio para púrpura.

#### Composição e preparo do meio:

A base de Moeller é um caldo sintético, bastando adicionar água, o aminoácido específico e autoclavar, que está pronto para o uso. O meio utilizado foi o da Difco e foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

Foi pesado 10.5g da base de Moeller e dissolvido em 1000ml de água destilada. Meio foi dividido em três partes iguais. A cada parte foi adicionado 10g (1%) do L-aminoácido (L-arginina na 1ª porção, L-lisina na 2ª porção e nenhuma adição na 3ª porção [controle]). Agitou-se até a completa dissolução. O pH foi ajustado a 6.0 e distribuiu-se em alíquotas de 2ml em tubos de 70x100mm. Os tubos foram autoclavados à 121°C por 10 minutos. Os aminoácidos utilizados foram da Difco.

Interpretação do resultado positivo: tubo controle = não há mudança da cor do meio original, ou seja, não há desenvolvimento de reação e sim, de crescimento bacteriano. No tubo com o aminoácido há o desenvolvimento de uma cor púrpura

### **16. Motilidade**

3 Lâmina-laminula: Após o crescimento em meio BHI por 24h à 37°C, foi realizada a determinação da motilidade que consistiu na visualização dos bacilos em uma preparação (uma

alçada do caldo BHI) entre lâmina-lamínula. Esta preparação foi visualizada ao microscópio óptico, com aumento de 400x.

Os bacilos foram considerados móveis quando um movimento rápido foi visualizado, notadamente em direção a fonte de oxigênio (bolhas de ar ou extremidades da preparação). Aquelas bactérias sem movimento ou com movimento lento e sem orientação (movimento Browniano) foram consideradas imóveis.

3 Ágar Semi-sólido: Para determinação desta prova utilizou-se ágar MILI (permite realizar 3 provas simultaneamente: motilidade, indol e lisina).

Preparo do meio:

3 Solução A- Púrpura de Bromocresol à 1 %

Composição:

Púrpura de Bromocresol.....0.1g

Etanol P.A.....5ml

Água destilada.....5ml

Preparo da solução:

Pesar a púrpura de Bromocresol e em seguida adicionar os 5ml de etanol. Após a completa dissolução no etanol, acrescentar a água destilada. Deixar em frasco de cor âmbar à 4°C. Usar 0.1ml para cada 100ml de meio.

3 Solução C – Piridoxina à 0.5 %

Composição:

Piridoxina (vitamina B6).....0.05g

Água destilada.....10ml

Preparo da solução:

Pesar a piridoxina e dissolvê-la em água destilada. Distribuir em alíquotas de 2ml em frascos plásticos e estocar em congelador. Usar 0.1ml desta solução para cada 100ml do meio de cultura.

Preparo do meio:

Extrato de levedura.....	3g
Peptona.....	10g
Triptona.....	10g
L-lisina.....	10g
Glicose.....	1g
Ágar.....	2g
Solução A – Púrpura de Bromocresol.....	2ml
Solução C – Piridoxina à 0.5%.....	1ml
Água destilada.....	1000ml

Pesar os 6 primeiros componentes e em seguida dissolvê-los em água destilada. Adicionar as soluções A e C e homogeneizar. Aquecer o meio de cultura em manta aquecedora e depois deixar esfriar até a temperatura de 50°C. Ajustar o pH em 6.5 e distribuir em alíquotas de 4ml em tubos de vidro com tampa rosqueável de 13x100mm. Autoclavar à 121°C por 15 minutos, em seguida deixar solidificar em posição vertical.

Realização do teste: Semeou-se por punção os 4 mm superiores do meio e foi realizada a leitura com 24h. Muitas cepas de BGNNF exibem apenas motilidade na porção superior do meio, o que pode tornar mais difícil a visualização do teste, entretanto devido à categoria de risco em que se enquadra o microorganismo em estudo, é de maior segurança para o microbiologista que o procedimento feito em lâmina-lamínula.

### **17. Oxidação de carboidratos no meio OF**

Princípio: Os BGNNF sacarolíticos degradam os carboidratos através da oxidação. Os ácidos formados desta metabolização são muito fracos e para sua detecção fez-se o uso de um meio básico sensível. O meio utilizado foi o de Hugh-Leifson, também chamado de meio OF. O meio de Hugh–Leifson apresenta menor concentração de peptona, de ágar e maior concentração de carboidrato. A concentração maior de carboidrato permite aumentar a produção de ácidos e a consistência semi-sólida do ágar permite que os ácidos formados sobre a superfície do ágar difundam-se pelo meio facilitando a visualização da viragem do indicador de pH. Este teste permitiu classificar os bacilos Gram negativos em não fermentadores de carboidrato. Os carboidratos utilizados foram: arabinose, glicose, lactose, maltose e manitol. Também foram testados três álcoois: adonitol, dulcitol e eritritol.

Composição do meio:

Base OF de Hugh-Leifson (Difco):

Peptona.....2g  
 Azul de bromotimol.....0.03g  
 Ágar.....2.5g  
 Cloreto de sódio.....5g  
 Fosfato dipotássico.....0.3g  
 Água destilada.....1000ml  
 Carboidrato ou álcool.....1%  
 pH final: 7.1

Preparo do meio:

O meio básico foi dissolvido e autoclavado à 121°C por 15 minutos. Esperou-se que este esfriasse à 50°C e então as solução de carboidratos e álcoois à 1% foram esterilizadas por filtração e adicionados separadamente à base já esterilizada. O meio pronto foi distribuído em alíquotas de 2.5 ml em tubos de 70x1000mm.

## Interpretação:

OF glicose: inoculou-se dois tubos, cobriu-se um dos tubos com uma camada de óleo mineral e o outro foi deixado exposto ao ar. A bactéria foi considerada oxidativa ou OF glicose positivo, quando: a produção de ácido foi visualizada no meio exposto ao ar, através da mudança de cor na superfície do meio de verde para amarelo e quando o meio coberto permaneceu na cor original ou alcalino. A bactéria foi considerada assacarolítica ou OF glicose negativo, quando a produção de ácido não foi visualizada no meio aberto e no meio coberto. Estes resultados podem ser explicados através da tabela 11.

**Tabela 11. Teste de oxidação- fermentação (OF)**

Sem óleo	Com óleo	Metabolismo	
Reação ácida (amarelo)	Reação alcalina (verde)	oxidativo	BGNMF

Reação alcalina (verde)	Reação alcalina (verde)	assacarolítico	
Reação ácida (amarelo)	Reação ácida (amarelo)	fermentativo	

OF carboidratos e álcoois: foi feito apenas o tubo aberto, ou seja, o meio exposto ao ar. O resultado foi considerado positivo quando observou-se o desenvolvimento de ácido, ou melhor, quando houve a mudança da cor do meio de verde para amarelo.

### 18. Hidrólise do ONPG

Princípio: o ortonitrofenil galactosídeo (ONPG) é estruturalmente semelhante à lactose e através da enzima  $\beta$ -galactosidase, o ONPG (composto incolor) é hidrolisado à lactose e ortonitrofenil (composto amarelo). As bactérias que metabolizam a lactose, possuem duas enzimas: lactose permease e  $\beta$ -galactosidase. A permease é necessária para a molécula da lactose penetrar na célula bacteriana onde a  $\beta$ -galactosidase pode desdobrar a ligação galactosídica, produzindo glicose e galactose. As bactérias não oxidativas da lactose são destituídas de ambas as enzimas e são incapazes de produzir ácido a partir da lactose. Algumas bactérias são consideradas lactose negativa, por não terem a lactose permease, mas possuem a  $\beta$ -galactosidase e assim dão ONPG positivo. Este teste permitiu avaliar os BGNNF que são de fato lactose positivo.

O teste foi realizado inoculando-se uma suspensão bacteriana em escala 0.5 de Mc Farland em sistema comercial Bactray (Laborclin) e após 24h de incubação observou-se a ausência de cor para resultado negativo e presença de cor amarela para resultado positivo.

### 19. Produção de Oxidase

Princípio: É um teste preliminar para distinguir alguns BGNNF de enterobactérias. Este teste possui sensibilidade na determinação da enzima citocromo oxidase existente nas bactérias oxidativas. Quanto à especificidade, a presença desta enzima no papel de transportador de elétrons é limitada, podendo estar presente ou não nos BGNNF.

Para detecção da enzima foi utilizado o reativo N,N,N,N, tetrametil- $\rho$ -fenilenodiamino (Laborclin), que na função de acceptor de elétrons substitui o oxigênio.

A formação do azul de indofenol, como produto da redução da substância  $\rho$ -fenilenodiamino, na presença da enzima e oxigênio atmosférico é detectada pela coloração azul escuro assumida pelo reativo.

Uma colônia selecionada do crescimento em ágar Mac Conkey foi colocada em contato com o papel de filtro embebido com o reativo e previamente umedecido com solução salina estéril à 0.9 %. Após 10 a 60 segundos o teste foi lido e interpretado. Quando o papel de filtro contendo o corante desenvolveu uma cor escura, o resultado foi considerado positivo; não havendo alteração de cor, o resultado do teste foi interpretado como negativo.

## 20. Resistência a Polimixina

Objetivo: usada na identificação dos BGNNF

Procedimento:

Uma placa de ágar Mueller Hinton era inoculada com a suspensão bacteriana em escala 0.5 de Mc Farland e o disco contendo a polimixina era colocado sobre o ágar. Esta placa era então incubada à 35°C por 18 à 24h. Após decorrido este tempo, era observado se havia ou não halo de inibição do crescimento bacteriano e caso houvesse era realizada a medição deste e considerados os parâmetros de acordo com a tabela 12.

**Tabela 12. Diâmetro dos halos de sensibilidade e resistência à polimixina B**

	<b>Sensibilidade</b>	<b>Resistência</b>
Polimixina (Newprov)	$\geq 14$ mm	$\leq 13$ mm

## 21. Solução salina à 0,9%

Objetivo: utilizada para o preparo do inóculo para os testes de sensibilidade à antimicrobianos.

Composição e preparo do meio:

Cloreto de sódio.....0.9g

Água destilada.....100ml

A solução foi distribuída em alíquotas de 1ml e autoclavada à 121°C por 15 minutos.

## 22. Produção de sulfeto de hidrogênio no TSI

Objetivo: utilizado para avaliar a produção de H<sub>2</sub>S e para fornecer o inóculo para o teste da catalase.

Preparo do meio:

Triple Sugar Iron Agar desidratado (Difco).....65g  
 Água destilada.....1000ml

Foi distribuído em alíquotas de 2.5 ml em tubos de 70x100 mm. Autoclavado à 121°C por 15 minutos e foi deixado em posição inclinada para que assim solidificasse.

Interpretação: resultado positivo = enegrecimento do meio

**23. Produção de Urease**

Princípio: a uréia é um sal orgânico que quando hidrolisado pela uréase libera amônia e dióxido de carbono formando o carbonato de amônio que resulta na alcalinização do meio e aumento do pH do meio.

Preparo do meio Uréia de Christensen:

3 Meio base:

Urea Agar Base (Oxoid).....5.04g

Dissolveu-se em 199.5 ml de água destilada. Aqueceu-se até a dissolução completa e em seguida autoclavou-se à 121°C por 15 minutos. Adicionou-se 10.5 ml de solução de uréia à 40%. Homogeneizou-se bem e distribuiu-se em alíquotas de 1 ml em tubos de 70x100mm. Os tubos contendo o meio foram deixados esfriar em posição inclinada.

3 Solução de uréia à 40%:

Pesou-se 4.8g de uréia (Sigma) e dissolveu-se em 12 ml de água destilada. Em seguida esterilizou-se por filtração.

Interpretação: Resultado positivo = desenvolvimento de cor rosa.

**24. Protocolo para o teste de sensibilidade a antibacterianos (TSA)**

1. Foi preparada uma suspensão em salina do inóculo crescido em caldo, equivalente à 0.5 da escala de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  CFU / ml).

2. Submergiu-se na suspensão um swab de algodão e girou-se várias vezes com uma pressão firme contra as paredes do tubo para eliminar o excesso de líquido.

3. Semeou-se a superfície seca de uma placa de ágar Mueller-Hinton, previamente mantida em temperatura ambiente, estriando a amostra 3x sobre toda a superfície (girando a placa 60°). Deixou-se a placa em repouso por 3-5 min, para que a superfície do ágar secasse.
4. Utilizando pinça flambada colocou-se os discos de papel filtro (remover os discos do freezer 1-2 h antes do uso), contendo os agentes antimicrobianos sobre a superfície do ágar.
5. Pressionou-se com cuidado cada disco sobre a superfície do ágar, para que o contato fosse uniforme. Distribuiu-se os discos de maneira uniforme, de modo que a distância entre o centro dos mesmos não fosse menor que 24 mm. Utilizou-se 11 discos para uma placa de 150 mm.
6. Aguardou-se 15 minutos e após inverter as placas, estas foram incubadas em estufa à 37°C por até 24 h.
7. Após o tempo de incubação foi realizada a medição dos halos utilizando régua. Observou-se o reverso da placa com luz emitida contra um fundo negro para que não produzisse reflexão e anotaram-se os resultados

**Tabela 13. Padrões de resistência e sensibilidade das drogas antimicrobianas. NCCLS 2003**

Agente antimicrobiano	Disco (µg)	Diâmetro (mm)			Controle de qualidade (mm)	
		R	I	S	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Piperacilina + tazobactam	100/10	≤ 17	18-20	≥ 21	24-30	25-33
Ticarcilina + ácido clavulânico	75/10	≤ 14	15-19	≥ 20	25-29	20-28
Ceftazidima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	25-32	22-29
Ceftriaxona	30	≤ 13	14-20	≥ 21	29-35	17-23
Cefalotina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	15-21	-

Imipenem	10	$\leq 13$	14-15	$\geq 16$	26-32	20-28
Gentamicina	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$	19-26	16-21
Tetraciclina	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$	18-25	-
Ciprofloxacina	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$	30-40	25-33
Cloranfenicol	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$	21-27	-
Sulfa + trimetoprim	25	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$		

## 25. Utilização do teste API 20NE

### Introdução e objetivo do teste:

O API 20NE é um sistema padronizado para a identificação de bacilos Gram negativos não enterobactérias e não fastidiosos que combina 8 testes convencionais, 12 testes de assimilação e uma base de dados

### Princípio:

A galeria API 20NE comporta 20 microtubos que contém substratos desidratados. Os testes convencionais são inoculados com uma suspensão bacteriana salina que reconstitui os meios. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor espontâneas ou reveladas através da adição de reagentes. Os testes de assimilação são inoculados com um meio mínimo e as bactérias crescem apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura dessas reações faz-se utilizando o quadro de leitura e a identificação é obtida utilizando o catálogo analítico ou um sistema de identificação.

### Amostras:

No teste devem ser apenas utilizadas culturas puras contendo o microorganismo. Os microorganismos a identificar foram repicados para o BHI e após 24h, isolados em meio ágar soja tripticase segundo as técnicas habituais de bacteriologia.

### Preparação do inóculo:

Em cabine de fluxo laminar, foi realizada uma suspensão bacteriana em salina à 0.85%, fornecida pela Bio Mérieux. Em seguida foram coletadas colônias (máximo de 24h) e realizado a diluição em salina até o padrão 0,5 da escala de Mc Farland. A suspensão bacteriana foi utilizada imediatamente após a preparação

Inoculação da galeria:

Foram preenchidos os tubos (e não as cúpulas) dos testes NO<sub>3</sub> a PNPG com a suspensão anterior. Em seguida abriu-se a ampola de API AUX médium (bioMérieux) e para esta foram transferidos 200µl da suspensão anterior e homogeneizou-se com pipeta. Foram preenchidos os tubos e cúpulas dos testes GLU à PAC tendo o cuidado de criar um nível horizontal. Foi preenchido com óleo de parafina as cúpulas dos três testes sublinhados (GLU, ADH e URE) para formar um menisco convexo. Colocou-se as galerias em uma caixa de incubação e incubou-se à 30°C por 24h.

**Tabela 14. Testes e substratos utilizados no sistema API 20NE**

<b>Testes</b>	<b>Componentes ativos</b>	<b>Reações / enzimas</b>
NO <sub>3</sub>	Nitrato de potássio	Redução dos nitratos em nitritos
TRP	L-triptofano	Formação de indol (triptofano)
GLU	D-glucose	Fermentação (glucose)
ADH	L-arginina	Arginina Diidrolase
URE	Uréia	Urease
ESC	Esculina	Hidrólise da esculina
GEL	Gelatina	Hidrólise (protease) gelatina
PNPG	4-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo	β-galactosidase
GLU	D-glucose	Assimilação (GLUcose)
ARA	L-arabinose	Assimilação (ARABinose)
MNE	D-manose	Assimilação (MaNosE)
MAN	D-manitol	Assimilação (MANitol)
NAG	N-acetil-glucosamina	Assimilação (N-acetil-glucosamina)
MAL	D-maltose	Assimilação (MALtose)
GNT	Potássio gluconato	Assimilação (potássio GlucoNaTo)
CAP	Ácido caprato	Assimilação (ácido CAPrato)

ADI	Ácido adipato	Assimilação (ácido ADIpatato)
MLT	Ácido malato	Assimilação (MALato)
CIT	Citrato de trisódio	Assimilação (CITrato de trisódio)
PAC	Ácido fenil-acetato	Assimilação (ácido fenil-Acetato)
OX	tetrametil- $\rho$ -fenilenodiamino	Citocromo-oxidase

#### Leitura da galeria:

Após a incubação a leitura da galeria era feita consultando-se o quadro de leitura e todas as reações espontâneas (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) eram anotadas na ficha de resultados.

Teste NO<sub>3</sub>: Para a revelação do teste NO<sub>3</sub> era adicionada uma gota dos reagentes NIT 1 e NIT 2 na cúpula NO<sub>3</sub>. Após 5 minutos a presença de cor vermelha era indicativa de uma reação positiva e anotada na ficha de resultados.

Teste TRP: Para o teste TRP era adicionada uma gota do reagente JAMES. Uma cor rosa difundida em toda cúpula era indicativa de reação positiva.

Testes de assimilação: Era observado o crescimento bacteriano. Uma cúpula turva era indicativa de reação positiva. Caso fosse necessário (interpretação duvidosa), as galerias poderiam ser re-incubadas por mais 24h.

#### Interpretação:

A identificação era obtida a partir do perfil numérico

#### 3 Determinação do perfil numérico:

Na ficha de resultados, os testes eram separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 era indicado para cada reação positiva. A reação da oxidase constituía o 21º teste e era assinalado com o valor 4 quando positiva. Dessa forma era formado um perfil numérico de 7 dígitos.

Identificação: Era efetuada a partir da base de dados. Podia ser feita com o catálogo analítico, pesquisando o perfil numérico na lista dos perfis ou com o programa de identificação, no qual era introduzido manualmente no teclado o perfil numérico de 7 algarismos.

## ANEXO III

**Tabela 15. Características-chave de *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia***

Teste	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>S. maltophilia</i>
Oxidase	+	V (25)	F+ (93)	-
Motilidade	+	-	+	+
Arginina diidrolase	+	+	-	-
Lisina descarboxilase	-	-	V (80)	+
ONPG	-	-	V (79)	+
Resistência à polimixina	R	R	R	S

+: 90% ou mais de cepas positivas; -: 90% ou mais de cepas negativas; V: 11-89% de cepas positivas, os números entre parênteses indicam a percentagem de cepas com reação positiva; R: resistente; F+: fracamente positivo.

Fonte: Koneman *et al*, 2001.

## ANEXO IV

### Reagentes e Protocolos utilizados em Biologia Molecular

#### 1. Protocolo para extração de DNA de *Burkholderia pseudomallei*

1. Cultivar a *B. pseudomallei* em placa média de ágar Müeller Hintom. Após 24 h raspar as colônias e suspendê-las em 500µl de tampãoTE-triton em tubos com tampa de rosca
2. Selar os tubos com parafilm e levar ao banho-maria à 95°C por 30 min. Esfriar a temperatura ambiente. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 min.
3. Adicionar proteínase K e SDS. Obter concentração final de 500 µg/ ml de proteínase K e 0,5% de SDS. Misturar gentilmente por inversão e incubar a 60°C por 1h. Esfriar à temperatura ambiente.
4. Adicionar 1 µl de RNAse DNase -free e manter por 37°C por 1h.
5. Adicionar ao extrato de DNA um igual volume de mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Misturar gentilmente por inversão e centrifugar à 13.000 rpm por 5 min. Coletar a fase aquosa superior e adicionar 0,5 ml da mesma mistura. Misturar gentilmente por inversão e centrifugar à 13.000 rpm por 5 min. Coletar a fase aquosa superior. Adicionar igual volume de clorofórmio puro. Centrifugar à 13.000 rpm por 5 min. Coletar a fase aquosa superior.
6. Adicionar 1/50 do volume total coletado anteriormente, de NaCl 5M e 2 volumes de álcool etílico (4°C). Misturar gentilmente por inversão até a formação de nuvem de DNA (obs: se não formar nuvem deixar em geladeira por 30 min - 2h p/ ↑ eficiência). Centrifugar à 13.000 rpm por 10 min. Coletar cuidadosamente o sobrenadante (não tocar no sedimento - DNA) com pipeta e desprezar.
7. Lavar o sedimento de DNA 2x com 1 ml de álcool etílico 70% (4°C) e centrifugar à 10.000 rpm por 10min.. Desprezar o sobrenadante cuidadosamente. Deixar os tubos com a tampa aberta para que o etanol evapore naturalmente (máx. 30 min.). Ressuspender o sedimento em 200 µl de Tampão TE.

## 2. Quantificação de ácidos nucléicos

Ácidos nucléicos podem ser quantificados em espectrofotômetro contendo luz ultravioleta (espectro invisível). Neste estudo a quantificação foi realizada no Gene Quant *pro* (Amersham Bioscience). A leitura da absorbância é medida em 260nm, onde 1 unidade de  $A_{260}$  de DNA de fita dupla equivale à 50 $\mu$ g/ml.

Observar que a solução pura de DNA dupla fita apresenta relação de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8. Relações de 1,7 à 2,0 são aceitáveis, mas indicam algum grau de contaminação, que pode levar à inibição de algum procedimento futuro. Para corrigir a contaminação é recomendado re-extrair o DNA com mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.

Fazer diluição 1/50 do estoque de DNA em tampão Tris-HCl. Calcular a concentração usando a fórmula  $(A_{260}) \times (50\mu\text{g/ml}) \times (\text{fator de diluição}) = \text{concentração em } \eta\text{g}/\mu\text{l}$

Preparo da diluição:

Foi feita a diluição do DNA genômico na proporção de 1:50 em um volume total de 200  $\mu$ l, ou seja 4  $\mu$ l de DNA para 196  $\mu$ l de tampão tris-HCl. As diluições foram quantificadas em aparelho Gene Quant *pro* (Amersham Bioscience)

## 3. Soluções utilizadas na extração e manipulação do DNA

### 3.1 Tampão TE (tris-EDTA)

10mM Tris pH 8.0, pH ajustável com HCl – 1,211g

1mM EDTA – 0,37224 g

Água destilada – 1000ml

Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos

### 3.2 Tampão TE - Triton

10mM Tris pH 8.0, pH ajustável com HCl – 1,211g

1mM EDTA – 0,37224g

1 % Triton X-100 – 10ml

Água destilada – 1000ml

Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos

### **3.3 Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X**

Pesar 54g de tris base

27,5g de Ácido Bórico

20 ml de 0,5M de EDTA (pH=8,0)

Obs: a solução de trabalho é 1x, portanto este estoque deve ser diluído 5 vezes

Volume final de 1000ml de água destilada

### **3.4 NaCl 5M**

Pesar 29,25g NaCl

100ml de água destilada.

Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 minutos.

### **3.5 SDS 20%**

Pesar 4g de SDS

20 ml de água destilada.

Aquecer em microondas para dissolver. Autoclavar à 121°C por 15 min.

## **4. Controle de qualidade**

Objetivo: Confirmação da pureza dos cultivos pelo Gram

1. Antes de extrair o DNA retirar um pouquinho da colônia e fazer um leve esfregaço em lâmina.

Deixar secar um pouco (não fixar pela chama);

2. Colocar a lâmina em um frasco com pastilhas de formol com um pouco de água. Fechar o frasco e aguardar 2h;

3. Fixar a lâmina com a chama;

4. Fazer a coloração de Gram e observar ao microscópio se há homogeneidade.

## **5. Preparo do gel de agarose à 1%:**

Objetivo: A agarose é um polissacarídeo purificado derivado do ágar, o qual é obtido comercialmente em pó e dissolve facilmente em líquido fervente. O gel formado é estável, o qual somente dissolverá novamente se a temperatura for elevada até aproximadamente 100°C. O

tamanho do poro do gel pode ser pré-determinado ajustando a concentração da agarose no gel; quanto mais elevada for a concentração menor o tamanho do poro no gel.

3 Modo de preparo:

1. Pesar 0,5 g de agarose e diluir em 49,5 ml TBE 1x
2. Levar a mistura ao microondas por 1 minuto (aguardar fervura)
3. Aguardar que o gel esfrie à 50°C e adicionar Brometo de etídio: 2,5 µl de uma solução estoque de 1% (10 mg/ml) para 50 ml de agarose
4. Colocar na forma (fechada nas laterais com fita crepe) já com o pente para solidificar (deixar o pente a uma distância de aproximadamente 1mm da base). Aguardar 45 minutos.
5. Retirar cuidadosamente o pente e colocar a gel na cuba de eletroforese

3 Tampão de carregamento da amostra de DNA no gel:

0,25% Bromofenol blue

0,25% Xileno cianol FF

30% glicerol em água

Temperatura de estoque: 4°C

✓ Brometo de etídio:

Estocar 10 mg/ ml em água.

Concentração final em uso nos géis e tampões: 0,5 µg/ ml

## 6. Preparo de dNTPs

A= Adenina; G= Guanina; C= Citosina; T= Timina

Solução estoque: 100 mM (cada)

Solução de uso: 10 mM

Fórmula:  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$100 \times ? = 10 \times 250 \mu\text{l}$

$x = 25 \mu\text{l}$

Preparo:

Pipetar 25 µl (C) + 25 (G) µl + 25 µl (T) + 25 µl (A)

Adicionar 150 µl de água Mili Q estéril

Homogeneizar em vórtex à temperatura ambiente

Distribuir em alíquotas de 50 µl e estocar à - 20°C

### 7. Preparo de *primers* a partir do liofilizado:

Fórmula: **nmoles / OD x OD** (impresso na embalagem do *primer*)

Concentração estoque: 500 pmoles / µl

Primer U33 – 19 bases

nmoles/ OD = 4,53

OD = 10,44

nmoles/ OD x OD = 4,53 x 10,44 = 47,293 nmoles

Concentração estoque: 500 pmoles ----- 1µl

47,293 nmoles ----- x

x = 94,58 µl de água mili Q estéril

Primer OL731- 19 bases

nmoles/ OD = 5,71

OD = 10,81

nmoles /OD x OD = 61,72

Concentração estoque: 500 pmoles /µl – adicionar 123,45 µl de água mili Q estéril

Preparo da diluição de uso 50 pmol / µl:

500 pmoles . X = 50 pmoles . 100 µl

X = 10 µl

Retirar 10 µl do estoque e adicionar 90 µl de água mili Q estéril

Modo de preparo do *primer*:

Deixar o material liofilizado à – 20°C por 30 minutos à temperatura ambiente

Centrifugar por 1-2 minutos à 13.000 rpm

Adicionar água Mili Q estéril (volume previamente calculado) para o preparo da solução estoque

Deixar hidratar por 2-15 minutos à temperatura ambiente

Agitar no vórtex por 15 segundos

Deixar à 4°C por 2h ; em seguida à – 20°C

Somente após 24h fazer a diluição de uso.

## ANEXO V

Seqüência nucleotídica do gene 16S de RNAr de *Burkholderia pseudomallei***Burkholderia\_pseudomallei\_chromosome\_1\_subsequence\_1430827-1432845**

gaatcatgtatcgggtccacgcgagcacggggattgcgacgaggagcgcttcgtatggct  
 tgccgtcgtgctcgaccgacagggattcgctgtgctctcggccatgctcggcgagcgcgc  
 cataggcgtccgggtgattctgctggagatgatcgagcgcggcgtcgagcgtggctctggc  
 tgccgttgccgacgatctttgagcaagggcgtcgagcttggtctccagaagcgatctt  
 cgacgcggctgccggacgcaaacagcgcgagcgcagaccgacgagtttgctggcatcgg  
 gagggagggcttagcggttcgctggcgcatagattgacatgggttgatgaggaacct  
 gtcattttagtcggtccgagattggtcagcggtttgctggccttcggcagtcacctct  
 atggaaaataggcgcgagcgcgttcgggtatggatagagagagcaaaaatatttgcaaac  
 cctcttgccgggtacggagcttatgcctacaatcacgcctcttcgcgctacggcgaacg  
 cggcgcgaagggggaagcgggaggtttcgccgctcgggcggtagcggcggtagaggc  
 ggccgagggcgccgggcggtgatccgggcggtgggcgacgcggtagtaaaaaagttgtg  
 acgcgctgcaataaagtgatcataatctcatttctctgctgctgacaacgcagcgcgctgct  
 gagaaggggtgccgtaagtagtcgaatctctcgccgatatgctcttaacaatgaacagc  
 cgataagtggtggcgcctgatggaagcgggagatcttcggatcgcaagcgaagatcaa  
 gactctcacactaaagtaagtcaggtttatgaagagattcatatacctgtcagctttgag  
 tgagcgaccggttgaaacaaccgaaaacagtaaacaggaattgaactgaagagttgatc  
 ctggctcagattgaacgctggcggcatgccttacacatgc**aagtcgaacggcagcacggg**  
 cttcggcctggtggcgcgagtgccgaacgggtgagtaatacatcggaacatgctcctgtagtg  
 ggggatagcccggcgaagccggattaataaccgcatacgcctgaggatgaaagcggggg  
 accttcgggcctcgcgctatagggttgccgatggctgattagctagttggtggggtaa  
 ggctaccaaggcgcagatcagtagctggtctgagaggacgaccagccacactgggactg  
 agacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaattttggacaatgggcgcaag  
 cctgatccagcaatgccgcgtgtgtgaagaaggccttcgggttgtaaacgacttttgctc  
 ggaaagaaatcattctggctaataaccggagtgatgacggtagcgggaagaataagcacc  
 ggctaactacgtgccagcagccgcggtaacgtaggggtgagcgttaacgggaattac  
 tgggcgtaaaagcgtgcccagggcgggtttgctaagaccgatgtgaaatcccgggctcaacc  
 tgggaactgcattggtgactggcaggctagagatggcagaggggggtagaattccacgt  
 gtagcagtgaaatgcgtagagatgtggaggaaataccgatggcgaaggcagccccctgggc  
 caatactgacgctcatgca**cgaaagcgtggggagcaaa**caggattagataccctggtagt  
 ccacgccctaaacgatgtcaactagttggtggggattcatttccttagtaacgtagctaa  
 cgcgtgaagttgaccgctggggagtagcggcgcgaagattaaaactcaaaggaattgacg  
 gggaccgcacaagcgggtggatgatgtgatttaattcgatgcaacgcgaaaaacctacc  
 tacccttgacatggtcggaaagccgatgagagttgggcgctgctcgaagagaaaccggcgc  
 acaggtgctgcatggctgctcgtcagctcgtgctgtaga

*Primers:* em azul

Produto PCR = ~718bp (localizado entre os *primers*)

**PUBLICAÇÃO**

**PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THREE CLINICAL ISOLATES OF *Burkholderia pseudomallei* IN CEARÁ, BRAZIL**

Camila Gomes VIRGINIO<sup>1</sup> MD, Maria Fátima da Silva TEIXEIRA<sup>2</sup> PhD, Cristiane Cunha FROTA<sup>1</sup> PhD, Vaulice Sales CAFÉ<sup>1</sup>, Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>2</sup> PhD, José Júlio Costa SIDRIM<sup>1</sup> PhD

<sup>1</sup>Department of Pathology and Legal Medicine – Federal University of Ceara, Fortaleza-Ce, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary– Estadual University of Ceara, Fortaleza-Ce, Brazil

Address for correspondence:

Universidade Federal do Ceará – Departamento de Patologia e Medicina Legal

Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM

Rua Monsenhor Furtado, s/n – Rodolfo Teófilo.

Cep: 60.441- 750 - Fortaleza – Ceará

Phone: (55)02185 40098303 Fax: (55) 02185 32441088

e-mail: [camila.virginio@secrel.com.br](mailto:camila.virginio@secrel.com.br)

**ABSTRACT**

*Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis was found in a microutbreak in Tejuçuoca, Ceará, Brazil. Tests were carried out to determine its phenotypic characteristics: colony morphology on Asdown agar, biochemical profile in manual tests and API 20NE, arabinose assimilation and susceptibility testing by disk diffusion comparing with data in the literature. It was also done PCR of the gene 16S rRNA which had shown a product of 718-bp. This study confirmed the presence of *B. pseudomallei* in Brazil and describe its characteristics.

**KEY WORDS:** *Burkholderia pseudomallei*; Melioidosis; Phenotypic characterization; Ceará; Brazil.

## Introduction

Melioidosis is a serious human disease caused by *Burkholderia pseudomallei*. Despite its apparent ubiquity of in the soils of endemic areas of Southeast Asia and Northern of Australia, traditionally areas comprehended between 20°S and 20°N, there is great variability in the incidence of melioidosis in different regions (1). This might be explained by the host susceptibility and differences in occupational exposure to the organism. Differences in bacterial virulence might also contribute to the melioidosis geographic distribution. There was no isolation reported of *B. pseudomallei* in Brazil until 2003 (2).

The organisms are gram negative bacilli, motile, non-spore forming, grows aerobically on most agar, and produces clearly visible colonies whitening 24h at 37°C (3). Ashdown's selective agar is commonly used to culture the organism, which is a simple agar supplemented with crystal-violet, glycerol, and gentamicin. The colonies develop a wrinkled aspect and they take up crystal violet dye from the medium. The organism is oxidase positive, uses glucose by a oxidative pathway, and can be identified reliably from its biochemical profile with manual tests and systems kit based (4;5).

*B. pseudomallei* is found in soil and water. Infection occurs via inhalation of contaminated dust or when contaminated soil comes in contact with disrupted skin, or by ingestion (6).

There are two biotypes of *B. pseudomallei*, characterized by their ability to assimilate the aldopentose L-arabinose. The L-arabinose non assimilators, Ara-, are highly virulent in some animals models and can be isolated from both clinical specimens and the environment. The Ara + assimilators, however, are generally avirulent and found predominantly in the environment. (7).

*B. pseudomallei* is intrinsically resistant to many antibiotics. Generally, it is susceptible to chloramphenicol, tetracyclines, sulfametoxazol + trimethoprim, third generation cephalosporins, carbapenems and amoxicilin-clavulanate (5). Prolonged antimicrobial treatment is imperative, since a short course of antibiotics is associated with high disease relapse rates.

Studies were carried out on melioidosis since its isolation is not common in Brazil and them is little information on the biochemical characteristics and sensibility tests to antimicrobial drugs

The aim of this study was to characterize phenotypically the isolate of *B. pseudomallei*, showing their sensibility profile to drugs and its identification by PCR.

## Materials and methods

**Bacterial strains:** A total of three isolates of *B. pseudomallei* were analyzed. The samples were from a microoutbreak epidemic that happened in Tejuçuoca, localized in State of Ceará, Brazil. The samples were isolated from three patients of the same family, aging 10-15 years old, two died. The patients were classified as septicemic, because the strains of *B. pseudomallei* were isolated from the spleen, liver and lung of two patients and from blood culture of one patient. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as control strains in susceptibility tests. All procedures involving viable cells were performed in a category 3 containment laboratory (8).

**Microbiological diagnosis:** Strains were identified phenotypically according to the criteria described for Gram-negative nonfermentative bacilli (colony morphology, staining reaction, motility, biochemical, and growth characteristics) and by characteristics in Ashdown selective medium (9; 10; 11). The identification of *B. pseudomallei* was confirmed by biochemical tests using the API 20NE system (bioMérieux). The strips were incubated for 48h at 30°C. The results of the API 20NE were transformed into a numerical profile, further interpreted by using the API NE profile index, which provided percentages of identification (4).

**Arabinose assimilation analysis:** All *B. pseudomallei* isolates identified were tested for arabinose assimilation by growth on minimal salts agar containing 0.2 % L-arabinose (12). Isolates without the ability to assimilate arabinose were designated as “Ara -”.

**Antimicrobial agents and susceptibility:** The following antibiotics were used: piperacilin – tazobactam, ticarcilin – clavulanate, ceftazidime, ceftriaxone, cephalotin, imipenem, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol and sulfamethoxazole - trimethoprim. Disk diffusion tests were performed by standard methods (13) in Mueller-Hinton agar. All antibiotics were tested by disk diffusion.

**Preparation of bacterial DNA for PCR:** Bacterial DNAs were extracted by using a modified phenol chloroform technique (14). Briefly, bacterial DNA was extracted from Mueller Hinton agar in a total volume de 500 µl containing 10 mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA, 1% Triton X-100. The tube was incubated at 95°C for 30 min, in order to lise the cell wall bacteria. 500 µg per ml Proteinase K and 0.5 % SDS was additionated and incubated at 60°C for 1h. 1 µl RNase DNase

free was additionated and incubated at 37°C for 1h. The aqueous phase containing DNA was extracted by adding phenol-chloroform-isoamiliic alcohol followed by chloroform. The DNA was precipitated with two volumes of ethanol absolute and 1/50 vol of 5M NaCl and finally suspended in 100 µl of 10mM Tris and 1mM EDTA and stored at 4°C. Bacterial DNA was quantified by spectrophotometer Gene Quant *pro* (Amersham Bioscience) prior the PCR reaction.

**PCR amplification:** 16S rRNA based primers were used by the standard protocol described by Dharakul et al (1996) (15). Reactions (25 µl) were composed of the following: 2.5 µl of 10X PCR buffer with MgCl<sub>2</sub> (15mM, Eppendorf), 0.2 mM dNTP mix (Eppendorf), 2 pmol of the forward and reverse *primers* (Invitrogen), 30 ηg bacterial genomic DNA and 2.5 U of *Taq* DNA polimerase (Eppendorf). The reactions were performed in a Thermal Cyclor Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) with the following conditions: 95°C for 1 min, then 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C. Water miliQ® was used as a negative control. Amplified products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels in TBE buffer and were visualized by ethidium bromide staining under UV light.

## Results

### Characterization phenotypic

The bacteria were short, bipolar Gram-negative bacilli and mobile. All *B. pseudomallei* isolates had characteristic colonial morphology on Ashdown agar, positive oxidase reaction and resistance to polymyxin B. The colonies were smooth, moist, purple color, dome shaped, about 0.8 to 1 mm in diameter, with a putrid odor, on Ashdown agar plates after 24h of incubation at 37°C. On the other hand, the isolate 2 after 7 days of incubation had show purple colonies, wrinkled, with 5 to 6 mm in diameter, which had become centrally umbonated, with radiating ridges on the periphery with a characteristic earthy odor (Fig. 1). The isolates 1 and 3 presented smooth and mucoid colonies. The results of each biochemical reactions are listed in Table 1.

### API 20NE

All the *B. pseudomallei* isolates were identified correctly by API 20NE in 48h. The profile obtained for isolates 1, 2 and 3 were **1556577** (99.1 % correct identification), **1156577** and **1156577** (99.9 % correct identification) respectively. The isolates had shown differences in esculin hydrolysis, positive for isolate 1. The results obtained in individual tests are shown in Table 2.

### Arabinose assimilation

None of the clinical isolates of *B. pseudomallei* could assimilate arabinose, which was demonstrated by absence of growth on minimal salts medium in 48h. The glucose agar used as a growth control demonstrated visible bacterial growth in 48h.

### Susceptibility tests

All three isolates were susceptible to piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanate, ceftazidime, imipenem, tetracycline and chloramphenicol (Table 3). One isolate was susceptible to ceftriaxone. Two isolates were intermediate resistant to ceftriaxone and other was intermediate resistant to ciprofloxacin. All three *B. pseudomallei* isolates were resistant to cefalotin, gentamicin and sulfa-trimethoprim. Two isolates were resistant to ciprofloxacin.

**Identification by PCR**

The identification of the three isolates were confirmed by PCR amplification using *primers* to the gene 16S rRNA. As expected, it was seen a product of 718 bp and no self-amplification in the absence of the target DNA, in accordance with the literature (Fig. 2) (Dharakul et al, 1996).

## Discussion

The methods described in the literature detect *B. pseudomallei* from clinical or environmental samples by isolation and phenotypic characterization (16). The sample 2 showed typical colonial morphology, as wrinkled, purple and dry colonies on Ashdown agar (9). The isolation of mucoid variant strains from clinical specimens is uncommon as described in the literature (17). In accordance with Howard and Inglis (2003) (18) this may reflect inhibitory effect of crystal violet on Ashdown agar. However, this fact not was observed in samples 1 and 3, which were smooth and mucoid. All three isolates exhaled a musty earth odor, result of bacterium metabolism. Moreover, a thick and dry pellicle with a mat surface was seen on the BHI broth cultivation. This pellicle forms at the broth-air possibly because of positive aerotaxis of *B. pseudomallei*. The pellicle formed by *B. pseudomallei* is a type of a multi-cellular organization that resembles a biofilm, what is made when bacteria colonize solid-liquid interfaces, and are common to many environmental Gram-negative species. Biofilm formation is thought to be an important aspect of *B. pseudomallei* ecology and has been proposed as a reason for antibiotic resistance *in vivo*. All three isolates showed characteristic bipolar staining because of intracellular deposits of  $\beta$ -hydroxy butyric acid (17; 19).

In this study, the results of biochemical profile in the OF medium tests with lactose, maltose and mannitol for samples 1 and 3 differ of Gilligan; Whittier (1999) (10), but the percentages are not 100% for all the assimilation tests and may reflect differences in methodology utilized and geographical distribution of the isolates. In API 20NE strips was observed difference in esculin hydrolysis for sample 1. This fact did not interfere in the identification profile, where the esculin hydrolysis is quite variable (10; 11).

Although Ara + *B. pseudomallei* has been reported to cause infection (20), all isolates causing melioidosis in our study were Ara-. Our findings support previous observations described by Vuddhakul and colleagues (1999) (21).

All samples of *B. pseudomallei* were susceptible to piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanate, ceftazidime, imipenem, tetracycline and chloramphenicol. One isolate was susceptible to ceftriaxone. Similar to previous studies, the isolates tested in this study were resistant to cefalotin, gentamicin, sulfa-trimethoprim and two isolates were resistant to ciprofloxacin. Several recent investigations have explained the genetic mechanisms involved in the resistance to penicillin derived drugs, being identified the class A and D of beta-lactamase genes (22; 23).

In general the Brazilian samples presented a similar profile to those of other world regions, this study confirms the high level of antibiotic resistance in *B. pseudomallei*. The resistance profiles appear to be independent of the origin of isolates. These results remain consistent with the current recommendations for the treatment of melioidosis (24).

PCR reactions have varied in identifying from trace amounts of DNA to  $10^4$  cells, therefore, it is a useful technique to detect *B. pseudomallei* in both clinical and soil samples (15; 25). A PCR-based detection method for *B. pseudomallei* based on the conserved regions of the 16S gene has been reported, however this method cannot distinguish *B. pseudomallei* from *B. mallei*, *B. cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. (15). Motility tests are used to differentiate *B. pseudomallei* from *B. mallei* (*B. mallei* is non motile), in addition the epidemiology and ecology of the two are entirely different (26). Regarding differentiation of *B. pseudomallei* from *B. cepacia*, it can be used the determination of arginine dihydrolase (ADH), lysine decarboxylase (LDC), ortho-nitrophenyl-gamma-D-galactopyranosidase (ONPG) and reduction from nitrate to nitrite (NIT). *B. pseudomallei* is ADH and NIT positive, and LDC and ONPG negative, whereas *B. cepacia* is ADH and NIT negative, but LDC and ONPG positive. The *S. maltophilia* is oxidase negative, lysine positive, ONPG positive and susceptible to polymyxin B, where *B. pseudomallei* is oxidase positive, lysine negative, ONPG negative and resistant to polymyxin B (11). In table 4 is shown the main biochemical characteristics of the species described above.

Data here reported confirms the presence of *B. pseudomallei* in Brazil, which was confirmed by biochemical and molecular techniques. The biochemical profile of our isolates are similar to isolates of other countries described in the literature.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank Universidade Federal do Ceará (Department of Microbiology, Faculty of Medicine- UFC) for technical support.

## References

1. 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, 2000.
2. MIRALLES, I.S.; MACIEL, M.C.A.; ANGELO, M.R.F.; GONDINI, M.M.; FROTA, L.H.F.; REIS, C.M.F.; HOFER, E. *Burkholderia pseudomallei*: A case report of a human infection in Ceará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 46, n. 1, p. 51-54, 2004.
3. WALSH, A.L. & WUTHIEKANUN, V. The laboratory diagnosis of melioidosis. **Brit. J. Biomed. Sci.** v. 53, p. 249-253, 1996.
4. DANCE, D.A.B.; WUTHIEKANUN, V.; NAIGOWIT, P. et WHITE, N.J. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. **J. Clin. Pathol.** v. 42, p. 645-648, 1989.
5. WHITE, N.J. Melioidosis. **The Lancet.** v. 361, p. 1715-1722, 2003.
6. ELLIS, J.F.; TITBALL, R.W. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. **Infect. Dis. Rev.** v. 1, n.3, p. 174-181, 1999.
7. SMITH, M.D.; ANGUS, B.J.; WUTHIEKANUN, V.; WHITE, N.J. Arabinose Assimilation Defines a Nonvirulent Biotype of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.** v. 65, n. 10, p. 4319-4321, 1997.
8. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Categorization of pathogens according to categories of containment, no.17. Her Majesty's Stationery Office, London, 1990.
9. ASHDOWN, L.R. An improved screening for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. **Pathol.** v. 11, p. 293-297, 1979.
10. GILLIGAN, P.H.; WHITTIER, S. Miscellaneous Gram-Negative Bacteria. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology.** 7<sup>th</sup>- Ed. American Society for Microbiology. p. 526-538, 1999.
11. KONEMAN, E.W.; ALLEN, M.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In:\_\_\_ Diagnóstico Microbiológico, 5<sup>a</sup> Ed. Medsi. p. 263-329, 2001.
12. WUTHIEKANUN, V.; SMITH, M.D.; DANCE, D.A.B.; WALSH, A.L.; PITT, T.L.; WHITE, N.J. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Med. Microbiol.** v. 45, p. 408-412, 1996
13. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test.** 8<sup>a</sup> ed. Wayne, 2003. (approved standard M2-A8).
14. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. Molecular cloning: laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.

15. DHARAKUL, T.; SONGSIVILAI, S.; VIRIYACHITRA, S.; LUANGWEDCHAKARN, V.; TASSANEETRITAP, B.; CHAOWAGUL, W. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in Patients with Septicemic Melioidosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 34, n. 3, p. 609-614, 1996.
16. WUTHIEKANUN, V.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; SIMPSON, A.J.H.; KANAPHUN, P.; WHITE, N.J. Value of Throat Swab in Diagnosis of Melioidosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, n. 10, p. 3801-3802, 2001.
17. 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.
18. HOWARD, K. & INGLIS, T.J.J. Novel Selective Medium for Isolation of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 7, p. 3312-3316, 2003.
19. SPRAGUE, L.D.; NEUBAUER, H. Melioidosis in Animals: A Review on Epizootiology, Diagnosis and Clinical Presentation. **J. Vet. Med.** v. 51, p. 305-320, 2004.
20. LERTPATANASUWAN, N.; SERMSRI, K.; PETKASEAM, A.; TRAKULSOLBOON, S.; THAMLIKITKUL, V.; SUPUTTAMONGKOL. Arabinose-Positive *Burkholderia pseudomallei* Infection in Humans: Case Report. **Clin. Infect. Dis.** v.28, p. 927-928, 1999.
21. VUDDHAKUL, V.; THARAVICHITKUL, P.; NA-NGAM, N.; JITSURONG, S.; KUNTHAWA, B.; NOIMAY, P.; BINLA, A.; THAMLIKITKUL. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 60, n. 3, p. 458-461, 1999.
22. CHEUNG, T.K.; HO, P.L.; WOO, P.C.; YUEN, K.Y.; CHAU, P.Y. Cloning and expression of class A beta-lactamase gene blaA (BPS) in *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, p. 1132-1135, 2002.
23. NIUMSUP, P.; WUTHIEKANUN, V. Cloning of class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and-resistant strains. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 50, p. 445-455, 2002.
24. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory Exposure to *Burkholderia pseudomallei*—Los Angeles, California, 2003. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 53, n.42, p. 988-990, 2004.
25. WONGRATANACHEEWIN, S.; KOMUTRIN, K.; SERMSWAN, R.W. Use of a multiplex PCR patterns as genetic markers for *Burkholderia pseudomallei*. **Acta Trop.** V.74, p.193-199, 2000.
26. SHORT, B.H. Melioidosis: an important emerging infectious disease – a military problem ?. **ADF Health.** v. 3, p. 13-21, 2002.

**Table 1**Phenotypic characteristics of three isolates of *B. pseudomallei* isolated in Ceará, Brazil

Biochemical test	Results		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Growth on Mac Conkey agar	+	+	+
Growth at 42°C	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Indole	-	-	-
Motility on semisolid gar	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+
Lisine descarboxilase	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+
Nitrate to gas	+	+	+
Catalase	+	+	+
ONPG	-	-	-
Citrate Simmons	+	+	+
Esculin	+	+	+
Gelatin	+	+	+
Urea	-	-	-
Polymyxin B resistance	+	+	+
OF medium:			
Adonitol	+	+	+
Dulcitol	+	+	+
Erythritol	+	+	+
Lactose	-	+	-
Maltose	-	+	-
D-Mannitol	-	+	-
D-Glucose	+	+	+

Abbreviations: +: Reaction positive; -: Reaction negative;

**Table 2**API 20NE characteristics of three isolates of *B. pseudomallei* after 48h incubation

Test	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Nitrate reduction	+	+	+
Índole (TRP)	-	-	-
Glucose fermentation	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+
Urease	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	-	-
Gelatinase	+	+	+
$\beta$ -galactosidase	-	-	-
Assimilation of:			
D-glucose	+	+	+
L-arabinose	-	-	-
D-mannose	+	+	+
D-mannitol	+	+	+
N-acetyl- glucosamine	+	+	+
D-maltose	-	-	-
Gluconate	+	+	+
Caprate	+	+	+
Adipate	+	+	+
Malate	+	+	+
Citrate	+	+	+
Phenyl-acetate	+	+	+

Abbreviations: +: Reaction positive; -: Reaction negative

**Table 3**Antibiotic susceptibility patterns of three isolates of *B. pseudomallei* determined by disk diffusion

Antimicrobial agent	Disk ( $\mu\text{g}$ )	Diameter (mm)			Result (mm)					
		R	I	S	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Piperacillin-tazobactam	100/10	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$	32	S	31	S	32	S
Ticarcillin - clavulanate	75/10	$\leq 14$	15-19	$\geq 20$	27	S	26	S	29	S
Ceftazidime	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	26	S	24	S	28	S
Ceftriaxone	30	$\leq 13$	14-20	$\geq 21$	20	I	16	I	26	S
Cefalotin	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$	-	R	-	R	-	R
Imipenem	10	$\leq 13$	14-15	$\geq 16$	34	S	32	S	39	S
Gentamicin	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$	-	R	-	R	-	R
Tetracycline	30	$\leq 14$	15-18	$\geq 19$	26	S	26	S	20	S
Ciprofloxacin	5	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$	16	I	15	R	14	R
Chloramphenicol	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$	22	S	20	S	19	S
Sulfa + trimethoprim	25	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$	-	R	-	R	-	R

Abbreviations: R= resistant; I= intermediate; S= susceptible

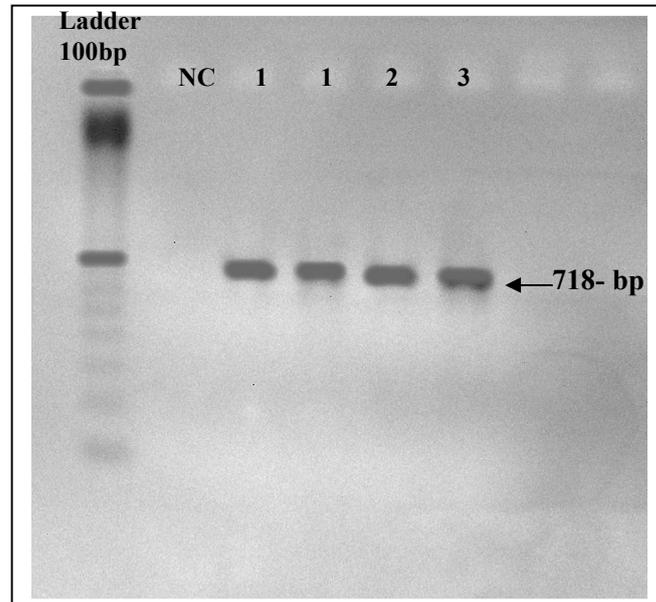
**Table 4**Key Characteristics of *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*

Test	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>S. maltophilia</i>
Oxidase	+	V (25)	W+ (93)	-
Motility	+	-	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	-
Lisine descarboxilase	-	-	V (80)	+
ONPG	-	-	V (79)	+
Polymyxin resistance	R	R	R	S

Abbreviations: +: 90% or more strains are positive; -: 90% or more strains are negative; V: 11-89% of strains are positive; R: resistant; S: susceptible; W+: weak positive.



Figure 1. Growth of *Burkholderia pseudomallei* (sample 2) on Ashdow's agar plate after 7 days at 37°C. Note the appearance wrinkled and dry, and the purple coloration.



Abbreviations: NC: negative control; 1: sample 1;  
2: sample 2 and 3: sample 3

Figure 2. PCR amplification of the three isolates of *B. pseudomallei* with *primers* specific to the 16S rRNA gene.

PCR was carried out on chromosomal DNA isolated from the three samples. A no-DNA control (NC) was also included. PCR products of 718 bp were separated by electrophoresis through a 2% agarose gel and the size of the specific product was determined by comparing the mobility of the DNA molecular size markers 100 bp.

# 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](#)