

BACTERIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

CYSTIC FIBROSIS BACTERIOLOGY

Larissa Lutz¹, Fernanda de-Paris², Maria Izoete Vieira¹, Elizabeth de Andrade Marques³, Afonso Luis Barth^{4*}

RESUMO

O exame bacteriológico é um dos principais parâmetros que auxiliam o diagnóstico e manuseio da infecção respiratória dos pacientes com Fibrose Cística (FC). Os microrganismos que colonizam e infectam o paciente fibrocístico determinam o tratamento, a qualidade de vida, as perspectivas para o transplante e a sua sobrevida global. A identificação precisa de patógenos respiratórios é essencial para o tratamento da infecção, seja como guia para o uso adequado de antibióticos por longos períodos para os pacientes com infecção bacteriana crônica ou para a aplicação adequada de medidas de controle de infecção. Embora exista um espectro limitado de patógenos respiratórios classicamente associados à doença respiratória na FC, um número crescente de microrganismos vem sendo reconhecido como potenciais agentes patogênicos. O espectro de patógenos em FC varia com a idade do paciente, mas, de uma forma geral, é bem estabelecido na literatura que existem quatro bactérias "clássicas": *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e o complexo *B. cepacia* (CBC). A maior sobrevida dos pacientes fibrocísticos, os quais são submetidos a ciclos repetidos de antibióticos, bem como o uso de novas metodologias de diagnóstico microbiológico contribuíram para o reconhecimento de patógenos emergentes ou "não-clássicos", como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e micobactérias não-tuberculosas (NMT) além de outros (*Ralstonia* sp, *Cupriavidus* sp, *Pandora* sp, *Inquilinus limosus*, *Aspergillus* sp, etc.). A principal bactéria envolvida com a doença respiratória em FC é a *P. aeruginosa* a qual durante o curso da infecção crônica pode apresentar variações fenotípicas peculiares aos pacientes fibrocísticos (crescimento em forma mucóide e em biofilme, hipermutabilidade, perda de flagelo, etc.). Portanto é necessário monitorar o surgimento de cepas de patógenos clássicos e não-clássicos principalmente aqueles mais resistentes aos antibióticos, como *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) e *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. Além disso é importante avaliar, através do exame bacteriológico, possíveis reduções de carga microbiana pulmonar, especialmente de *P. aeruginosa* e CBC, visto que a erradicação total destes patógenos é, invariavelmente, impossível em FC.

Palavras-chave: Exame bacteriológico; fibrose cística

ABSTRACT

The bacteriological culture is one of the main parameters that support the diagnosis and management of the respiratory infection in patients with cystic fibrosis (CF). The microorganisms that colonize and infect CF patients determine the treatment, quality of life, the lung transplant possibility and their overall survival. The accurate identification of respiratory pathogens is essential for the treatment of infection, either to guide the appropriate use of antibiotics for long periods to patients with chronic bacterial infection or to the proper implementation of infection control measures. Although there is a limited spectrum of respiratory pathogens classically associated with the respiratory disease in CF, an increasing number of microorganisms has been recognized as potential pathogens. The spectrum of pathogens in CF varies with the patients age but, in general, it is well established in the literature that there are four "classic" pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* and the *B. cepacia* complex (Bcc). The longer survival of CF patients who undergo repeated cycles of antibiotics and the use of new methods of microbiological diagnosis contributed to the recognition of emerging or "non-classical" pathogens, such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, and nontuberculous mycobacteria (NMT) and other (*Ralstonia* sp, *Cupriavidus* sp, *Pandora* sp, *Inquilinus limosus*, *Aspergillus* sp, etc.). The main bacteria involved in respiratory disease in CF is *P. aeruginosa* which during the course of the chronic infection may present phenotypic variations peculiar to patients with cystic fibrosis (growth in the mucoid form and in biofilm, hypermutation, loss of flagella, etc.). Therefore it is necessary to monitor the emergence of classic and non-classical pathogens especially those resistant to antibiotics, such as *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA) and *P. aeruginosa* resistant to carbapenems. Furthermore it is important to evaluate through the bacteriological examination, possible reductions in the pulmonary microbial load, especially *P. aeruginosa* and the Bcc, since the total eradication of these pathogens is invariably impossible in CF.

Keywords: Bacteriological culture; cystic fibrosis

Rev HCPA 2011;31(2):168-184

1. Unidade de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2. Unidade de Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, HCPA.

3. Laboratório de Bacteriologia, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

4 Serviço de Patologia Clínica, HCPA, UFRGS.

Contato: Afonso Luis Barth. E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br (Porto Alegre, RS, Brasil).

EVOLUÇÃO DA MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA - BREVE INTRODUÇÃO

A realização de exame bacteriológico do material respiratório de indivíduos com Fibrose Cística é extremamente relevante como apoio no diagnóstico e manuseio da doença infecciosa dos pacientes fibrocísticos.

Os microrganismos que infectam o paciente fibrocístico irão determinar o tratamento, a qualidade de vida, as perspectivas para o transplante e a sua sobrevivência global. A exata identificação de patógenos respiratórios é essencial para o tratamento da infecção, seja como guia para o uso adequado de antibióticos por longos períodos para os pacientes com infecção bacteriana crônica, bem como para a aplicação adequada de medidas de controle de infecção. A microbiologia da FC é complexa e desafiadora: embora exista um espectro limitado de patógenos respiratórios classicamente associados à doença respiratória há, também, um número crescente de microrganismos que vem sendo reconhecidos como potenciais agentes patogênicos (1).

A FC é uma doença multissistêmica que afeta a função normal de diversos órgãos do corpo humano, mas é a disfunção pulmonar que desempenha papel principal na morbidade e mortalidade dos pacientes fibrocísticos (2-4). Apesar do pulmão do paciente com FC ser histologicamente normal no nascimento (5), infiltrados respiratórios podem ser vistos durante o período neonatal. Com o passar do tempo, o ambiente único das vias aéreas se torna propício

à colonização bacteriana e a grande maioria dos pacientes desenvolve doença pulmonar supurativa, obstrutiva e progressiva; a qual é a maior causa de morte nesses pacientes (6-8). Portanto, grande parte do tratamento do paciente fibrocístico se baseia na manutenção da função pulmonar (3).

Há uma sequência de eventos nas vias aéreas dos pacientes fibrocísticos que se inicia com a mutação no gene da FC e, invariavelmente, culmina em falência respiratória (9). A proteína CFTR altera o equilíbrio eletrolítico na mucosa das vias aéreas, levando a uma excessiva absorção de água pelo lúmen, resultando em um decréscimo de água na superfície fluida das vias aéreas, afetando as propriedades viscoelásticas do muco respiratório. Essas alterações nas propriedades viscoelásticas do muco levam, consequentemente, ao comprometimento das funções mucociliares de limpeza, principal fator que contribui para o início da colonização bacteriana nas vias aéreas dos pacientes fibrocísticos (10). Os produtos do metabolismo bacteriano causam danos nas mucosas respiratórias e, com o tempo, a resposta inflamatória do hospedeiro também contribui para a doença respiratória (11-15). Além disso, deve-se considerar que as bactérias na infecção respiratória em FC se desenvolvem e colonizam/infectam o tecido pulmonar na forma de biofilme – células bacterianas que se agregam e formam comunidades bacterianas que, em última instância ficam mais protegidas da ação de antibióticos e da resposta imune (figura 1).

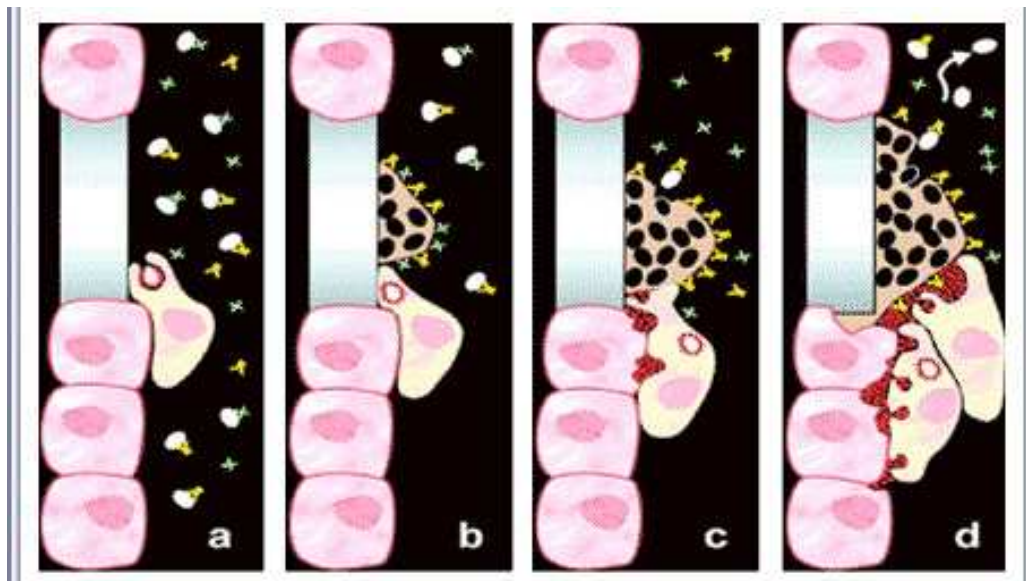


Figura 1 - Mecanismo de formação de biofilme bacteriano.

a) bactérias em forma planctônica (esferas brancas) e a ação de antibióticos ("X" em verde) e anticorpos ("Y" em amarelo); b) aderência de bactérias em uma superfície (esferas pretas) e formação da matriz exopolissacarídica (camada rosa); c) proteção do biofilme bacteriano contra a ação de antibióticos (x em verde), anticorpos (Y em amarelo) e de enzimas fagocitárias (pontos vermelhos) e d) enzimas fagocitárias causando dano celular e dispersão de células bacterianas do biofilme (esferas brancas).

Apesar de uma grande variedade de espécies microbianas ser isolada das secreções respiratórias de pacientes com FC (16-23), é amplamente aceito que apenas algumas espécies desempenham papel importante na colonização/infecção das vias aéreas dos pacientes fibrocísticos (6;9;24-26). A fibrose cística apresenta um conjunto de bactérias que são frequentemente adquiridas em uma sequência idade-dependente (figura 2) (27).

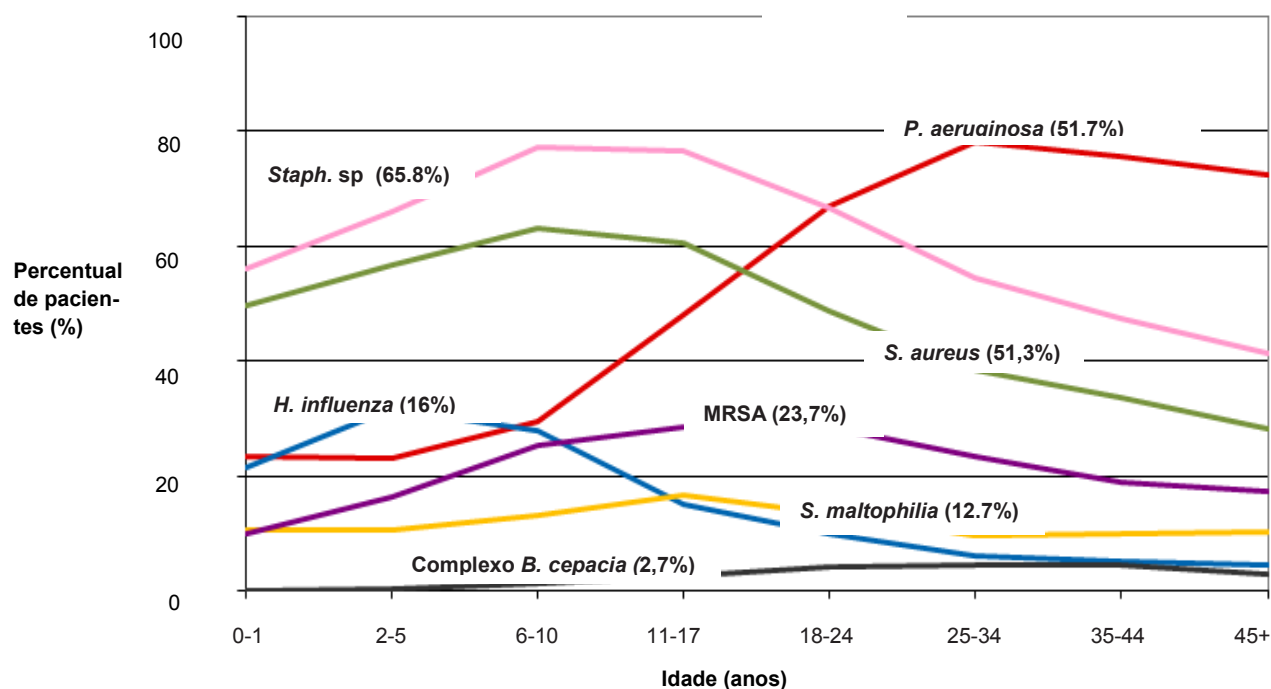


Figura 2 – Distribuição de espécies bacterianas por idade (27).

Em crianças, as colonizações mais frequentes são por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Mais tarde surgem os patógenos oportunistas, mais frequentemente a *Pseudomonas aeruginosa*, que muitas vezes coexiste com o *S. aureus* (28-30). Estima-se que mais de 80% dos adultos fibrocísticos são eventualmente infectados por *P. aeruginosa* e, uma vez colonizados cronicamente, a sua erradicação dificilmente ocorre (28;29). As bactérias do complexo *B. cepacia* (CBC) são igualmente consideradas patógenos clássicos em FC. Além disso, o papel das infecções virais na patogênese da doença pulmonar da FC tem sido cada vez mais reconhecido.

O uso de ciclos repetidos de antibióticos bem como a utilização de novas metodologias de diagnóstico microbiológico, tais como o uso de meios de cultura mais seletivos e de técnicas de biologia molecular tem contribuído para maior sobrevivência dos pacientes com FC e o reconhecimento de um número também crescente de patógenos emergentes ou “não clássicos” como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* bem como micobactérias (em especial as micobactérias não tuberculosas) – que serão citados nesta revisão – embora muitos outros microrganismos (espécies de *Ralstonia*

sp, *Cupriavidus* sp, *Pandoraea* sp, *Inquilinus limosus*, *Aspergillus* sp, entre outros) também tenham sido relatados com certa frequência em FC (21;29-37).

Nem sempre é claro se um patógeno é verdadeiramente emergente, ou se o aumento da prevalência está relacionado com a detecção melhorada por novas técnicas de biologia molecular e aumento da vigilância. Ainda não está elucidado também se e como esses patógenos irão influenciar na progressão da doença pulmonar na FC e como deve ser empregada a antibioticoterapia contra estes microrganismos (30;37).

A prevalência das bactérias em material respiratório de pacientes com FC tende a ser relativamente constante, embora existam variações em diferentes centros de tratamento de pacientes com FC. Dados de prevalência de patógenos isolados de material do trato respiratório encaminhados à Unidade de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), provenientes de pacientes fibrocísticos atendidos no Centro de Fibrose Cística do HCPA, avaliados no período de outubro de 2010 a abril de 2011, indicam que *S. aureus* e *P. aeruginosa* são as bactérias mais frequentes (figura 3).

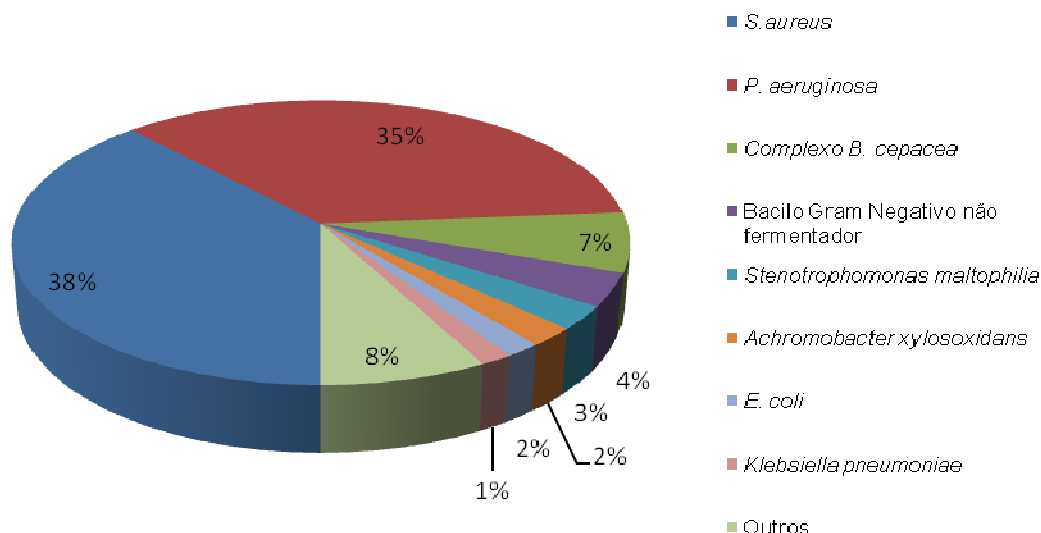


Figura 3 - Prevalência de 737 microrganismos isolados de 489 amostras do trato respiratório de 209 pacientes fibrocísticos atendidos no Centro de Fibrose Cística do HCPA, no período de outubro de 2010 a abril de 2011.

Tem sido observado nos últimos anos que a antibioticoterapia intensa contra infecções bacterianas das vias aéreas é uma das condutas que mais dramaticamente aumenta a expectativa de vida do paciente fibrocístico (3;29). Contudo, o uso frequente de antibióticos por pacientes com FC leva ao aumento da resistência bacteriana sendo que *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenênicos têm sido descritos em FC (3). Portanto, se torna cada vez mais necessário que o exame bacteriológico seja feito de forma qualificada para permitir o isolamento e identificação dos patógenos clássicos e emergentes ("não-clássicos") em FC. Além disso, há a necessidade da realização de testes acurados de suscetibilidade aos antimicrobianos e, talvez, mais aplicados às peculiaridades da infecção respiratória (como o teste em biofilme) no sentido de fornecer informações mais precisas para o tratamento com antimicrobianos na FC (4).

PATÓGENOS CLÁSSICOS EM FIBROSE CÍSTICA

Staphylococcus aureus

O *S. aureus* é frequentemente o primeiro patógeno isolado de cultura do trato respiratório de crianças com FC (6;9;20;26;28;38). No primeiro levantamento de dados sobre FC em 1938, quando a média de vida não ultrapassava dois anos, todos os pacientes que sobreviviam mais que uma semana, eventualmente faleciam devido a complicações pulmonares nas quais *S. aureus* estava envolvido (5). De fato, antes dos anos 50, infecção por *S. aureus* foi a maior causa de falência respiratória em uma população de pacientes com FC que não chegava a atingir os 10 anos de idade (38).

A predileção seletiva do *S. aureus* nas infecções respiratórias em FC não está necessariamente elucidada. O aumento da viscosidade das secreções das vias aéreas e a alteração na mucociliaridade podem ser significativos (14). Há evidências de que a aderência de *S. aureus* às células epiteliais brônquicas é maior em amostras de pacientes com FC do que pacientes não fibrocísticos. Além disso, foi observado que *S. aureus* de pacientes com FC se aderem mais intensamente às células ciliares, nasais escamosas e bucais epiteliais. Estes dados sugerem que algumas cepas de *S. aureus* apresentam aumento de afinidade às células fibrocísticas e não o oposto, de que células fibrocísticas adquirirem receptores seletivos para *S. aureus* (39). Somada à aderência, *S. aureus* apresenta uma variedade de outros fatores de virulência, tais como produção de leucocidinas, hemolisinas, catalase, coagulase, proteína A e muitas outras toxinas que contribuem para a sua patogenicidade e que permitem sua evasão do sistema imune do hospedeiro (40).

É importante que o laboratório de microbiologia utilize meio de cultura seletivo para *Staphylococcus* (como o ágar manitol) para aumentar as chances de detecção de *S. aureus* em amostras respiratórias de FC (41-44). Placas contendo meios seletivos para *S. aureus* devem ser incubadas a 35-37°C em atmosfera ambiente e já podem ser examinadas após uma noite de incubação. No entanto, antes do laboratório reportar resultado de ausência de crescimento de *S. aureus* as placas devem ser incubadas por, pelo menos, mais 24 horas. A presença de *S. aureus* em material respiratório de pacientes com FC deve ser sempre informada ao clínico, independentemente da quantidade. Amostras de *S. aureus* devem ser sempre avaliadas quanto ao seu perfil de suscetibilidade, pois amostras

sequenciais de um mesmo paciente podem apresentar diferença de suscetibilidade a um mesmo antimicrobiano.

No Reino Unido, profilaxia antibiótica antiestafilocócica contínua é recomendada para todas as crianças com FC inferior a três anos de idade (1). O desenvolvimento de antibióticos antiestafilococos efetivos e o aumento da sobrevivência dos pacientes com FC podem ter contribuído para a queda de *S. aureus* nas infecções pulmonares. Uma evidência disso é um levantamento *post-mortem* de culturas entre 1939 e 1945 que mostrou que *S. aureus* era prevalente em 92% (12 de 13) casos, em contraste com 22% em 1976 (45), 28% em 1990 (25).

Embora a terapia antiestafilocócica tenha sido, originalmente, efetiva contra *S. aureus*, o uso de antibióticos permite a seleção de microbiota mais resistente visto que a prevalência geral de infecção do trato respiratório inferior com MRSA entre as pessoas com FC parece estar aumentando (1). Na população inglesa de FC, a prevalência de MRSA aumentou consideravelmente de 2,1% em 1996 (46) para 23,7% em 2009.

Os pacientes fibrocísticos, devido ao processo infeccioso de suas vias aéreas, são frequentemente hospitalizados para tratamento das exacerbações da doença. Portanto, entram em contato com cepas hospitalares altamente resistentes e isso pode ser um fator de risco para aquisição destas cepas. Já foi demonstrado em estudos utilizando métodos tradicionais e moleculares que pode haver transmissão de cepas de *S. aureus* entre pacientes com e sem FC (47-49).

Haemophilus influenzae

Haemophilus influenzae é uma bactéria Gram-negativa, imóvel e fastidiosa (nutricionalmente exigente). Algumas cepas desta bactéria possuem uma cápsula constituída por polissacarídeos sendo que as cepas encapsuladas podem ser sorotipadas em seis diferentes grupos (A-F). Porém algumas cepas não possuem esta cápsula e acabam por ser denominadas como *H. influenzae* não tipáveis ("nontypeable" *H. influenzae* – NTHi). O sorotipo tido como o mais virulento é o *H. influenzae* tipo b (Hib). Este sorotipo causa aproximadamente 95% das infecções em crianças e 50% das doenças invasivas em adultos, incluindo meningite, pneumonia, empiema e bacteremia (50). Já as cepas NTHi são agentes comuns em infecções do trato respiratório de adultos, como sinusite aguda e/ou otite (51).

Em pacientes fibrocísticos, as cepas mais encontradas são as NTHi (29). O *H. influenzae* é isolado em amostras do trato respiratório precocemente no curso da FC. Em estudos com amostras clínicas das vias respiratórias de crianças fibrocísticas coletadas durante seu primeiro

ano de vida, o *H. influenzae* foi o agente mais isolado (28;52). Estudos têm mostrado que a prevalência deste patógeno aumentou entre as crianças com FC nos últimos anos. Razvi e colaboradores demonstraram que durante o período de 1995 a 2005 a prevalência de *H. influenzae* aumentou entre as crianças de zero a um ano de idade de 15,2% para 27,1% e na faixa etária de dois a cinco anos o aumento foi de 22,2% para 34,1%. A incidência deste patógeno também aumentou significativamente entre os lactentes e crianças, enquanto diminuiu entre adolescentes e adultos (29). A vacinação contra *Haemophilus* não tem o efeito de prevenir a colonização de pacientes FC e isso ocorre, pois a cepa vacinal é um *H. influenzae* sorotipo b (28).

O papel do *H. influenzae* na infecção e inflamação progressiva das vias aéreas de pacientes com FC não foi claramente demonstrado, embora esta bactéria seja um conhecido agente patogênico de bronquiectasias em pacientes não fibrocísticos (53). Também não foi determinado se as cepas de *H. influenzae* são capazes de persistir por longos períodos colonizando o pulmão de pacientes FC (54). Por outro lado, alguns autores demonstraram que este organismo foi isolado com maior frequência em pacientes fibrocísticos do que em pacientes que sofrem de asma, e que o aumento da taxa de isolamento precedeu o desenvolvimento de exacerbações agudas (55). Em outro estudo, conduzido por Glass et al., demonstrou-se um aumento de proteína C reativa associado com exacerbação aguda em pacientes FC com altas contagens de *H. influenzae* no escarro (26). Assim, o verdadeiro papel do *H. influenzae* nas exacerbações dos pacientes FC ainda deve ser melhor estudado e esclarecido.

Uma variedade de antibióticos pode ser utilizada para o tratamento das infecções por cepas de NTHi (51). Recentemente, macrolídeos, como a azitromicina, têm sido empregados para estas infecções (51;56). Porém, o uso prolongado da terapia com azitromicina em pacientes de FC está sendo associado à resistência aos macrolídeos já demonstrada em *S. aureus* (56).

É importante ressaltar que a identificação de *H. influenzae* no laboratório clínico de rotina exige o uso de meios de cultura enriquecidos. Por ser uma bactéria fastidiosa, seu crescimento requer no meio de cultivo a presença de NAD ("nicotinamida adenina dinucleotídeo") e uma fonte de ferro sob a forma de hemoglobina, hematina ou hemina (50,51). Esta exigência nutricional da bactéria também dificulta a realização dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Assim, quando o antibiograma é realizado pelo laboratório clínico, a escolha do meio e seu controle de qualidade adequado são essenciais. Diferenças interlaboratoriais no isola-

mento e teste de suscetibilidade de *H. influenzae* de pacientes com FC podem ser acentuadas devido às divergências no uso de meios de cultivo diferentes (51).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador ubiqüitário do meio ambiente, mas também está muito associado a infecções nos seres humanos como patógeno oportunista. Em FC, a *P. aeruginosa* é o patógeno mais prevalente sendo que sua prevalência aumenta com a idade. Estima-se que mais de 80% dos pacientes serão eventualmente infectados por este patógeno e a sua aquisição está associada à deterioração clínica (28;36;52;57;58).

Foi demonstrado que os fatores de risco para infecção respiratória por *P. aeruginosa* em pacientes com FC são sexo feminino, genótipo

homozigoto delta F508 e isolamento prévio de *S. aureus* (59). As particularidades do pulmão fibrocístico tornam propícia a colonização por *P. aeruginosa* sendo que após a colonização inicial as propriedades de plasticidade fenotípica e genotípica da espécie viabilizam sua manutenção e adaptação para estabelecer uma infecção persistente. Assim, os isolados de *P. aeruginosa* obtidos do pulmão de pacientes com FC são bastante distintos dos isolados que causam infecções agudas em outros pacientes, apresentando, em particular, um fenótipo mucóide o qual pode estar relacionado a maior resistência aos antibióticos e formação de biofilme (28). Outras características fenotípicas observadas em *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC incluem a perda do flagelo (as cepas perdem a motilidade), a diminuição de versatilidade nutricional (auxotrofia), entre outras características (60-63) (tabela 1).

Tabela 1 - O fenótipo de *P. aeruginosa* em fibrose cística.

Produção de alginato (colônias mucóides)
Crescimento em biofilme
Perda do flagelo
Deficiência nutricional (auxotrofia)
Hipermutabilidade
Perda da fração antigênica do lipopolissacarídeo
Sensibilidade à ação do complemento
Baixa atividade proteolítica

Após o isolamento inicial, a *P. aeruginosa* pode ser encontrada intermitentemente em secreções respiratórias dos pacientes com FC. Alguns centros de referência em FC que têm como prática o uso de antibioticoterapia antipseudomonas empírica, independente da infecção inicial por *P. aeruginosa*, juntamente com medidas para prevenir a infecção cruzada, relatam que é possível retardar o início da infecção por esta bactéria (64,65). Isso é importante porque a infecção crônica está associada a uma deterioração ainda mais rápida na função pulmonar, piora dos escores de raios X do tórax, aumento da internação e uma redução geral da sobrevida. Assim, terapia supressora de longo prazo com antibióticos inalatórios é recomendada para pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* para auxiliar na preservação da função pulmonar e diminuir a necessidade de antibióticos intravenosos adicionais. Exacerbações respiratórias agudas são tratadas geralmente com dois antibióticos intravenosos que têm diferentes mecanismos de ação e que tenha efeito sinérgico, o que pode, também, reduzir o potencial de indução de resistência bacteriana. O

curso padrão do tratamento é de duas semanas embora isso possa variar sendo que alguns pacientes recebem cursos regulares de antibióticos intravenosos como terapia de manutenção (1).

Não há evidências suficientes para sugerir que o uso de um meio seletivo aumenta o rendimento do isolamento de *P. aeruginosa* de secreções respiratórias de pessoas com FC. No entanto, o uso de alguns meios seletivos pode auxiliar na identificação, especialmente no aparecimento de pigmentação e do fenótipo mucóide (66-70). As placas devem ser incubadas a 35-37°C à atmosfera ambiente e examinadas após uma noite de incubação e depois de pelo menos mais 24 horas. A presença de *P. aeruginosa* deve ser sempre indicada, independentemente da quantidade. Assim, bacilos Gram-negativos incapazes de realizar metabolismo fermentativo da glicose (bacilo Gram-negativo não fermentador) que apresentem pigmento verde podem ser identificados como *P. aeruginosa*. Outras provas de identificação como a prova da oxidase positiva e o crescimento a 42°C, corroboram a identificação de

P. aeruginosa. Contudo, para confirmar a identificação de *P. aeruginosa* não pigmentadas recomenda-se utilização de diversas provas bioquímicas e/ou de sistema comercial automatizado ou semiautomatizado (1). Formas atípicas de *P. aeruginosa* podem ser encontradas na infecção crônica e podem ser de difícil identificação, a menos que sejam utilizados métodos moleculares (71).

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (antibiograma) devem ser realizados, pois a *P. aeruginosa* tem sensibilidade variada aos antibióticos. No entanto, a frequência de realização do antibiograma para isolados de *P. aeruginosa* de um mesmo paciente vai variar conforme o centro de referência. Os testes de suscetibilidade devem ser realizados através de um método padronizado e validado como disco-difusão em ágar e/ou microdiluição em caldo conforme recomendação de órgãos internacionais como o "Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI" ou "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST". Testes de suscetibilidade de *P. aeruginosa* de FC utilizando sistemas automatizados não são recomendados (1;72).

Apesar das evidências de que *P. aeruginosa* cresce nas vias respiratórias dos pacientes com FC na forma de biofilme (28,73-76), os métodos laboratoriais disponíveis para determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos em condições de biofilme não são validados, gerando controvérsias sobre a sua utilidade clínica. Biofilmes são comunidades bacterianas que se agregam em superfícies e formam uma matriz exopolissacarídica sintetizada pelas próprias bactérias que é uma barreira protetora para as células bacterianas, pois limita a exposição aos radicais oxidativos, antibióticos e fagócitos (28,77) – Figura 1. Os métodos padronizados de teste de suscetibilidade são aqueles que utilizam as bactérias no estado planctônico. No entanto, este padrão de suscetibilidade pode não ser o mais adequado para guiar o tratamento das bactérias que estão nas vias aéreas na forma de biofilme (78). Assim, tem aumentado o interesse na proposta de modelos metodológicos de determinação da concentração inibitória mínima em biofilmes *in vitro* (79-81).

Algumas características de infecções envolvendo crescimento bacteriano na forma de biofilme são: crescimento lento do microrganismo, estímulo da produção de anticorpos que são ineficazes em inibir a bactéria, resistência aumentada aos antimicrobianos e a inabilidade de erradicar a infecção mesmo em paciente com o sistema imune intacto (78,82-84). Essas são características da infecção respiratória em FC. A presença de *P. aeruginosa* em forma de biofilme nas vias aéreas infectadas de pacientes com FC foi primeiramente sugerida devido aos sinais de

quorum-sensing que este microrganismo produz para indicar a densidade celular dependente de expressão gênica (76). O uso de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura demonstrou a organização da *P. aeruginosa* em forma de biofilme no escarro de pacientes com FC (85).

Ferreira et al. (86) examinaram 40 isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com FC segundo a sua capacidade de formar biofilme e sua resposta *in vitro* aos antimicrobianos de acordo com crescimento na forma planctônica (MIC) e em biofilme (BIC). Todos os isolados mostraram-se capazes de formar biofilme. No entanto, não houve diferença na formação do biofilme de acordo com o fenótipo mucoide e não mucoide entre isolados obtidos em diferentes períodos da infecção crônica. Todos os isolados testados para suscetibilidade antimicrobiana no estado de biofilme (BIC) foram consistentemente mais resistentes aos antibióticos do que o mesmo isolado testado no estado planctônico. Os resultados de valores de MIC e BIC demonstraram que há uma diferença acentuada no perfil de suscetibilidade de acordo com as condições de crescimento da *P. aeruginosa*, sendo que no estado de biofilme os isolados mostraram-se consistentemente mais resistentes aos antibióticos.

Tem sido demonstrada uma ampla distribuição de genótipos (clones) de *P. aeruginosa* em crianças com FC, sugerindo-se aquisição de reservatórios do ambiente e, muito raramente, pacientes com FC compartilham mesmos genótipos, geralmente somente quando são irmãos ou pacientes epidemiologicamente relacionados (1,3,87-89). Contudo, relatos de pacientes colonizados por clones relacionados de *P. aeruginosa* sugerem um importante papel da transmissão entre pacientes. No entanto, associação de infecção por um clone altamente prevalente com desfecho clínico desfavorável ainda é controversa (90,91). A característica de epidemidade relacionada à *P. aeruginosa* de FC é um aspecto relativamente novo. As quatro cepas mais comuns transmissíveis no Reino Unido são as de Liverpool (LES), Manchester (MAN), Clone C e cepas Midlands1 (Mdl1) (92). Portanto, a transmissão de algumas cepas de *P. aeruginosa* pode ocorrer entre pessoas com FC e diretrizes de controle de infecção recomendam uma vigilância regular e utilização de tipagem molecular, como PFGE e sequenciamento de regiões gênicas, para identificar a infecção cruzada em centros de FC (1).

Complexo *Burkholderia cepacia*

O gênero *Burkholderia* é constituído por um grupo diverso de bactérias entre as quais existem patógenos humanos oportunistas causadores de infecções em pacientes fibrocísticos e em outros indivíduos vulneráveis (37,93). Porém, a

habilidade de causar doença destes bacilos Gram-negativos não está limitada a hospedeiros humanos e algumas de suas espécies são relacionadas como patógenos de plantas (94). Inclusive sua primeira descrição foi como fitopatógeno, realizada por Burkholder em 1950, que denominou este bacilo como *Pseudomonas cepacia* (2). Anos mais tarde, estudos do genoma destas bactérias revelaram características bastante distintas das encontradas em espécies de *Pseudomonas* levando a sua reclassificação como gênero *Burkholderia* (37,95). As espécies do gênero *Burkholderia* são nutricionalmente versáteis, podendo utilizar várias fontes de carbono distintas como fonte de energia, o que proporciona a estas bactérias uma variedade de ambientes para sua proliferação (2). Devido a esta versatilidade e pela sua resistência à ação de alguns antissépticos e desinfetantes, espécies de *Burkholderia* têm sido implicadas em surtos resultantes de contaminação em géis de ultrassom, hidratantes e antissépticos bucais (96,97).

Entre as diversas espécies do gênero *Burkholderia* foi identificado um grupo de organismos fortemente relacionados denominado complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) (98). As bactérias do CBC são relatadas como uma causa relativamente comum de infecções do trato respiratório em pacientes fibrocísticos e, algumas espécies do CBC são tidas como causadoras de piora drástica da função pulmonar destes pacientes (99). A taxonomia deste grupo tem sido bastante revisada e alterada recentemente. Assim, neste complexo, inicialmente estavam descritas dez espécies do gênero *Burkholderia*: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*, *B. ubonensis* – denominadas de genomovares (designados pelos números de I a X) (100,101). Porém, atualmente o CBC totaliza 17 espécies, com as novas espécies - *Burkholderia latens*, *Burkholderia diffusa*, *Burkholderia arboris*, *Burkholderia seminalis*, *Burkholderia metallica*, *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia lata* – tendo sido acrescentadas à este complexo bacteriano (102,103). Todas estas espécies do CBC podem ser isoladas como patógenos em seres humanos ou simplesmente isoladas no meio ambiente sem estarem envolvidas em infecções (99) e algumas são transmissíveis entre pacientes com FC, sendo capazes de causar surtos epidêmicos (99,104). As espécies *B. cenocepacia* e *B. multivorans* predominam entre pacientes com FC. Estas duas espécies em conjunto representam aproximadamente 85-97% de todas as infecções por CBC na FC (99). Esta proporção também é encontrada entre os pacientes FC atendidos no HCPA (105).

A emergência de cepas do CBC (originalmente denominadas de *B. cepacia*) em FC foi

notada na década de 80. A transmissão entre os pacientes com FC foi responsável por este aumento da prevalência. Esta transmissão foi documentada não somente em hospitais que tratavam pacientes de FC, mas também em locais destinados ao contato social entre os pacientes, como os acampamentos de verão comuns na América do Norte (37,106,107). A principal consequência desta transmissão foi a adoção de medidas preventivas, como a segregação de pacientes colonizados por CBC nos centros que atendem pacientes fibrocísticos e o desencorajamento do contato social entre estes pacientes (1176;1173;1169;1144). A partir de então, a epidemiologia destas cepas transmissíveis ganhou bastante importância, e no final da década de 90, vários estudos foram focados na espécie *B. cenocepacia*, por esta ser a mais prevalente e a mais transmissível entre os pacientes de FC em todo o mundo (108,109). Assim, pela análise de sequências do gene *recA*, a espécie *B. cenocepacia* (anteriormente denominada genomovar III) foi subdividida em quatro agrupamentos ou *clusters* filogenéticos – IIIA a IIID. A maioria dos isolados de *B. cenocepacia* com relevância clínica são dos *clusters* IIIA ou IIIB (99;109). Uma das cepas mais estudadas e descrita como altamente transmissível é conhecida como ET-12, uma *B. cenocepacia* IIIA que causou infecções devastadoras no Canadá, Reino Unido e populações europeias de pacientes FC (99,110). Além da ET-12, existem também outras cepas, consideradas de alta virulência sendo identificadas localmente por técnicas de tipagem bacteriana em centros que estudam os patógenos relacionados à FC. É o caso, por exemplo, de uma cepa isolada em Praga, denominada de CZI (111). Atualmente também estudos com o uso da técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) estão mapeando globalmente, e não mais localmente, as diferentes cepas de *B. cenocepacia* IIIA circulantes entre pacientes de FC (112). Porém, além deste grande interesse na epidemiologia e distribuição das cepas de *B. cenocepacia*, existe o interesse nos fatores que levam estas bactérias a serem mais agressivas aos pacientes de FC (99). A análise da sequência completa do genoma do isolado J2315, uma *B. cenocepacia* IIIA multirresistente pertencente a linhagem ET-12, revelou que ela continha um número impressionante de ilhas genômicas ocupando 9,3% de seu genoma de 8,06 Mb. Genes de virulência codificando porinas, amidase, sistema *quorum-sensing* e o BCESM (*B. cepacia epidemic strain marker*) estão descritos como integrantes destas ilhas genômicas (113). Além disso, cepas virulentas de *B. cenocepacia* são capazes de produzir proteínas sideróforas (ornibactina e pioquelina) para agirem na captação do ferro favorecendo a adaptação e a sobrevivência destas bactérias a ambientes de baixas concentrações deste íon

(99). Também fatores relacionados à motilidade e aderência destas bactérias têm sido descritos em cepas virulentas de *B. cenocepacia*. O flagelo que esta bactéria possui é importante não somente para sua motilidade, mas serve como uma adesina e facilita a invasão das células hospedeiras pelo patógeno (114).

Com tantos fatores de virulência sendo relatados fica claro o impacto do isolamento de uma bactéria do CBC em secreções respiratórias dos pacientes FC. A primeira descrição deste impacto clínico foi feita em 1984 e reportada como a “síndrome cepacia”, caracterizada por uma grave deterioração da função pulmonar com bacteremia (115). Posteriormente, vários estudos têm demonstrado consistentemente um declínio mais rápido da função pulmonar em pacientes após a infecção por CBC. Em um estudo caso-controle, a mortalidade após um ano foi significativamente maior entre pacientes colonizados quando comparada com a mortalidade nos controles (116). Além disso, em um grande estudo epidemiológico utilizando modelo de sobrevivência em 5 anos, mostrou que pacientes colonizados com CBC tendem a ter um prognóstico pior, com maior morbidade associada (117).

A caracterização das espécies do CBC por técnicas usualmente empregadas em laboratório clínico de rotina é difícil devido à similaridade fenotípica não só entre as espécies como entre outros BGNNF similares. Para o seu isolamento primário é fundamental a utilização de meios seletivos e o mais utilizado em secreções respiratórias de pacientes com FC é o BCSA (*B. cepacia selective ágar-ágar* seletivo para complexo *B. cepacia*) (37,118,119). A utilização de testes fenotípicos comerciais pode levar a identificação errônea de organismos do CBC como sendo, por exemplo, *S. maltophilia*, *Pseudomonas* spp, *Ralstonia* spp e *Achromobacter* spp. (120). Portanto, em isolados identificados através do uso dos sistemas comerciais como um desses microrganismos, devem ser realizadas algumas provas fenotípicas executadas manualmente, como crescimento em BCSA, teste para atividade de descarboxilação de lisina e/ou ornitina, presença de atividade da oxidase e crescimento a 42°C (37), utilização do teste de PYR (atividade da enzima pirrolidonil arilamidase) (121) e a demonstração da resistência à polimixina. Esses testes propiciam a inclusão do microrganismo no CBC, mas não excluem a possibilidade de outras espécies dentro do CBC não serem caracterizadas.

Os testes genotípicos têm sido utilizados para confirmação da identificação de organismos do CBC, especialmente testes baseados em PCR direcionado à sequência do gene *recA* destas bactérias (94). Já a discriminação das diferentes espécies do CBC necessariamente é

feita através de testes genotípicos (94,105,122). Nos centros de acompanhamento de pacientes FC é interessante saber qual a espécie do CBC que coloniza cada paciente para que as medidas de segregação e controle de infecção possam ser adequadamente dimensionadas.

Estudos de genotipagem mostram que a infecção pulmonar crônica de pacientes com FC tipicamente envolve uma única cepa do CBC. Pode ocorrer coinfeção transiente envolvendo duas espécies diferentes do CBC ou duas cepas da mesma espécie, porém este fenômeno é raro e ocorre normalmente no início da infecção (123).

As bactérias do CBC isoladas são intrinsecamente resistentes a aminoglicosídeos e com frequência são multirresistentes. Por isso, a erradicação de cepas do CBC muitas vezes não é bem-sucedida e a terapia é geralmente destinada à diminuição da carga bacteriana durante as exacerbações. As bactérias do CBC podem ser sensíveis aos carbapenêmicos, ceftazidima, quinolonas e trimetoprim-sulfametoxazol (124). Em um estudo realizado com 119 isolados de CBC multirresistentes, combinações de três antibióticos (tobramicina, meropenem e um terceiro antibiótico adicional) mostraram ter a melhor efetividade. Estas combinações foram bactericidas contra 81-93% dos isolados (125). Embora o antibiograma possa ser utilizado para orientar a escolha dos agentes terapêuticos contra CBC, mais estudos são necessários para investigar se esses resultados estão associados com a eficácia clínica (1144).

PATÓGENOS “NÃO CLÁSSICOS” EM FIBROSE CÍSTICA

Stenotrophomonas maltophilia

S. maltophilia é um bacilo Gram-negativo não-fermentador que tem sido isolado em fontes hospitalares como cateteres venosos centrais, nebulizadores e reservatórios de água deionizada, mas também muito encontrada em fontes externas aos hospitais, como água de rios ou poços, solo e plantas. Atualmente, *S. maltophilia* vem sendo considerada um importante patógeno nosocomial, infectando imunodeprimidos e pacientes sob ventilação mecânica (37,126). Este bacilo apresenta resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos, em particular os carbapenêmicos, o que limita significativamente as opções para o seu tratamento (144).

A colonização dos pacientes com FC por *S. maltophilia* parece ser intermitente, diferente do que é observado com outros patógenos clássicos, como a *P. aeruginosa* (37,127). Nos últimos anos, estudos têm mostrado que as taxas de isolamento de *S. maltophilia* em pacientes com FC aumentaram, sugerindo a emergência deste

patógeno (128). Millar et al. demonstraram que, entre os pacientes de FC estudados, o aumento da prevalência de *S. maltophilia* foi significativo, passando de 1% em 1985 para 4% em 2005 (3). Geralmente as taxas de prevalência de *S. maltophilia* são reportadas entre 2-14% (37;129). É importante considerar que este aumento de prevalência pode ser devido, em parte, ao aumento da frequência de cultivo de amostras respiratórias dos pacientes fibrocísticos (37). Outro fator que pode estar relacionado a este aumento de prevalência é o uso frequente de antibióticos em pacientes com FC. Denton et al. em um estudo de caso-controle, concluíram que nos anos que antecederam os primeiros isolamentos de *S. maltophilia*, os pacientes colonizados tinham recebido mais antibióticos para o controle de infecções por *Pseudomonas* spp. (126). Da mesma forma, ao avaliar o efeito da inalação intermitente de tobramicina sobre a microbiologia das secreções respiratórias, Burns et al. observaram que o uso das quinolonas por via oral foi o único fator que aumentou significativamente o número de isolamentos de *S. maltophilia* (130).

S. maltophilia tem sido considerado um potencial patógeno para pacientes FC, mas os estudos ainda mostram resultados controversos sobre seu efeito sobre a deterioração da função pulmonar (37). Alguns estudos de caso-controle e coorte têm mostrado que pacientes colonizados por *S. maltophilia* têm diminuição da função pulmonar, mas o tempo de acompanhamento não parece ter sido suficiente para demonstrar claramente a piora do quadro clínico (126;127;131-133). Isto sugere que *S. maltophilia* seja, provavelmente, um marcador de doença mais grave (37), mas parecem ser necessários mais estudos para estabelecer esta relação entre a presença da bactéria e a piora do estado clínico dos pacientes com FC. Porém, em casos de piora aguda do quadro pulmonar e presença concomitante de *S. maltophilia* o tratamento pode ser justificado. A maioria dos dados sobre o tratamento de *S. maltophilia* é proveniente de relatos clínicos ou estudos realizados *in vitro* (37;134). San Gabriel e colaboradores investigaram o perfil de sensibilidade de 673 isolados de *S. maltophilia* provenientes de pacientes com FC avaliando a ação de dez agentes antimicrobianos individualmente e de algumas combinações. Doxícilina foi o antibiótico mais ativo com ação sobre 80% dos isolados. Entre as combinações, sulfametoxazol-trimetoprim mais ticarcilina-clavulanato teve ação sobre 65% dos isolados enquanto sulfametoxazol-trimetoprim mais piperacilina-tazobactam inibiu crescimento de 64% das bactérias testadas (135). Embora esses estudos *in vitro* possam fornecer diretrizes para o tratamento, ainda são necessários estudos clínicos controlados para determinar

qual antibiótico é mais eficaz no tratamento de *S. maltophilia* de pacientes fibrocísticos (37).

Achromobacter xylosoxidans

A. xylosoxidans é, assim como as bactérias Gram negativas citadas anteriormente: *P. aeruginosa*, Complexo *B. cepacia* e a *S. maltophilia*, um bacilo Gram-negativo não-fermentador ubíquo (presente em diferentes nichos) e oportunista, o qual é reconhecido há muitos anos como patógeno respiratório em FC. No entanto, devido à sua prevalência, embora variada, ser normalmente muito baixa em FC, não tem sido considerado um patógeno clássico (30). *A. xylosoxidans* está associado a diversos tipos de infecções adquiridas por pacientes (não necessariamente com FC) hospitalizados mas não existem evidências consistentes que indiquem a transmissão desta bactéria entre pacientes com FC.

A infecção/colonização de pacientes com FC por *A. xylosoxidans* é, normalmente, transitória. Infecção crônica por diversos anos por esta bactéria em pacientes fibrocísticos pode ocorrer, o que está, frequentemente, associado à persistência de uma mesma cepa na via respiratória (30).

Micobactérias não tuberculosas

Micobactérias não tuberculosas (*Non-tuberculous mycobacteria* - NTM) são amplamente distribuídas no ambiente, sendo encontradas nas fontes de água e solo (136). Mais de cem espécies estão descritas, porém o complexo *M. avium*, *M. kansasii* e *M. abscessus* representam algumas das espécies com maior significância clínica. Em pacientes com FC estas também são as espécies mais frequentemente descritas (37). A prevalência de NMT foi relatada com taxas variando entre 3,8% e 22,6% (137-139). A variação destas taxas de prevalência pode ser explicada em parte pelas dificuldades nas técnicas de isolamento e cultivo destas bactérias no laboratório de microbiologia. O diagnóstico microbiológico das NMT é difícil, especialmente em amostras provenientes de sítios não estéreis. Nestas amostras o crescimento das NMT pode ser sobrepujado pelo restante da flora presente. Por isso, processos de digestão e descontaminação destas amostras devem ser realizados previamente ao cultivo em meios específicos (37).

Existem estudos que sugerem uma relação entre a piora do estado clínico e a presença de NMT em pacientes com FC (140,141), enquanto outros não mostram uma clara associação (142). Porém, um estudo mais recente demonstrou taxas de declínio da função pulmonar em pacientes com FC com infecção crônica por *M. abscessus* (infecção crônica foi definida como 3 ou mais culturas positivas ao

longo de 3 ou mais visitas trimestrais) (143). Estes estudos sugerem que, apesar de NMT nem sempre mostrar um efeito direto sobre o declínio da função pulmonar, o aumento de patologia pulmonar é possível, justificando a triagem e constante acompanhamento de pacientes com culturas positivas para NMT, incluindo o uso de exames de imagem para detectar alterações das características pulmonares (37).

Assim, muitos autores sugerem o acompanhamento de pacientes com FC colonizados com NMT. Por exemplo, Oliver e colaboradores propõem que os pacientes com FC apresentando culturas repetidamente positivas para NMT devem ser monitorados para a progressão de alterações pulmonares por exames de tomografia. Caso haja detecção de alterações, terapia antimicrobiana para estes agentes deveria ser ministrada (140). A terapia antimicrobiana contra NMT tem sido estudada principalmente em pacientes com HIV/AIDS e os tratamentos para pacientes com FC têm sido adaptados destes estudos (37). Para o tratamento de pacientes colonizados com o complexo *M. avium* têm sido recomendados esquemas terapêuticos iniciais agregando macrolídeos (claritromicina, por exemplo), etambutol e rifampicina. Dependendo da extensão das alterações pulmonares ou se já houve um tratamento anterior, aminoglicosídeos como a estreptomicina ou amicacina, podem ser acrescentados ao esquema de tratamento. Já a erradicação de *M. abscessus* conta com poucas estratégias terapêuticas. Os isolados de *M. abscessus* mostram-se resistentes aos agentes normalmente utilizados e a terapia com macrolídeos não é eficiente. Terapias combinadas utilizando amicacina e cefoxitina ou imipenem por 2-4 meses podem melhorar o estado clínico, porém agregando morbidade e alto custo a este tratamento (144). Linezolida, uma droga mais recente e pertencente a classe das oxazolidinonas mostra algum potencial. Cerca de 50% dos isolados *M. abscessus* mostraram suscetibilidade total ou intermediária a linezolida em testes *in vitro* (144). Cremades et al. investigaram, também *in vitro*, a associação de claritromicina e linezolida e encontraram boa atividade antimicrobiana contra isolados de *M. abscessus*, sugerindo que esta droga também pode ser útil para uso em associações (145).

PERSPECTIVAS

Durante os últimos 20 anos, as técnicas utilizadas para a identificação microbiológica têm melhorado, incluindo o uso de novos meios de cultivo e o refinamento de procedimentos laboratoriais para ajudar no isolamento dos 'novos' patógenos respiratórios, como por exemplo, espécies do CBC, *S. maltophilia* e *A.*

xylosoxidans. A identificação fenotípica tem melhorado com o uso de sistemas fechados e automatizados e as técnicas de biologia molecular têm sido agregadas ao laboratório de microbiologia clínica para a identificação e separação das diferentes espécies bacterianas de interesse clínico. Apesar destas novas técnicas, a prevalência dos patógenos não tem aumentado significativamente e o que tem ocorrido é a identificação de um número cada vez maior de "patógenos" emergentes (3). A importância destes diferentes patógenos em pacientes com FC é de difícil avaliação não só pela sua casuística baixa mas por coexistirem nas secreções respiratórias com patógenos clássicos.

O tratamento com antibióticos tem sido muito importante no aumento da sobrevida dos pacientes com FC; no entanto, deve-se acompanhar eventuais surgimentos de cepas (de patógenos clássicos e não clássicos) mais resistentes aos antibióticos, tais como MRSA, *S. maltophilia* e NMT. Reduzir a carga microbiana pulmonar, especialmente de *P. aeruginosa* e CBC, continuará a ser um objetivo primário no cuidado de pacientes FC, combinando a atenção para minimizar a contaminação cruzada entre pacientes, a vigilância microbiológica e tratamento precoce e intensivo.

REFERÊNCIAS

1. Laboratory Standard for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. 2010. Cystic Fibrosis Trust. 6-11-2010.
2. Barth AL, Pitt TL. Microbial Pathogens Associated With Cystic Fibrosis: Special Focus on *Pseudomonas aeruginosa*. Braz J Infect Dis. 1998 Apr;2(2):43-61.
3. Millar FA, Simmonds NJ, Hodson ME. Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. J Cyst Fibros. 2009 Dec;8(6):386-91.
4. Paixao VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, Reis JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. Braz J Infect Dis 2010 Aug;14(4):406-9.
5. Andersen DH. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. Am J Dis Child 1938;56:344-99.
6. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 1991;4(1):35-51.
7. Wood RE, Boat TF, Doershuk CF. Cystic Fibrosis: state of the art. Am Rev Respir Dis 1976;113:533-78.

8. Mylett J, Johnson L, Knowles M. Alternate therapies for cystic fibrosis. *Sem Respir Crit Care Med*. 1994;15:426-33.
9. Marshall BC. Pathophysiology of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Sem Respir Crit Care Med*. 1994;15:364-74.
10. Surgress JM, Turner JAP. Immotile cilia syndrome. In: Chernick V, Kending EL, editors. *Kending's disorders of the respiratory tract in children*. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p. 675-82.
11. Jackowski JT, Szeplafusi Z, Wanner DA, Seybold Z, Sielczak MW, Lauredo IT, et al. Effects of *Pseudomonas aeruginosa*-derived bacterial products on tracheal ciliary function: role of O₂ radicals. *Am J Physiol*. 1991;260:61-7.
12. Kanthakumar K, Taylor G, Tsang KW, Cundell DR, Rutman A, Smith S, et al. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat *in vitro*. *Infect Immun*. 1993;61:2848-53.
13. Ramphal R, Pyle M. Adherence of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to acid-injured tracheal epithelium. *Infect Immun*. 1983;41:345-51.
14. Marks MI. Staphylococcal aspects of cystic fibrosis. *Infection*. 1990;18:53-6.
15. Ramphal R, Small PM, Shands JW Jr, Fischschweiger W, Small PJr. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. *Infect Immun*. 1980;27:614-9.
16. Seidmon EJ, Mosovich LL, Neter E. Colonization by Enterobacteriaceae of the respiratory tract of children with cystic fibrosis of the pancreas and their antibody response. *J Pediatr*. 1975;87:528-33.
17. Maccone AB, Pier GB, Pennington JE, Matthews WJ, Goldmann DA. Mucoid *Escherichia coli* in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1981;304:1445-9.
18. Stroombant J. Viral infection in cystic fibrosis. *J Roy Soc Med*. 1986;79:19-22.
19. Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Hörl G, Jungwirth R, Petermuller C, et al. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*. 1987;15:270-7.
20. Rosenfeld M, Ramsey B. Evolution of airway microbiology in the infant with cystic fibrosis: Role of nonpseudomonal and pseudomonal pathogens. *Semin Respir Infect*. 1992;7:158-67.
21. Gladman G, Connor PJ, Williams RF, David TJ. Controlled study of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1992;67:192-5.
22. Hjelt K, Hojlyng N, Howitz P, Illum N, Munk E, Valerius NH, et al. The role of mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) in patients with cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis*. 1994;26:569-76.
23. Romano L, Tubino B, Manno G, Pelegrini M, Marazzi MG, Minicucci L, et al. Role of *Alcaligenes xylosoxidans xylosoxidans* as a pathogen in cystic fibrosis. 19th European Cystic Fibrosis Conference. 1994.
24. Hodson ME. Cystic Fibrosis: the disease. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1993;48(6):647-52.
25. Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*. 1993;341:1065-9.
26. Govan JRW, Glass S. The microbiology and therapy of cystic fibrosis lung infection. *Rev Med Microbiol*. 1990;1:19-28.
27. Cystic Fibrosis Foundation. Patient registry. Annual data report 2009. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation. 2010.
28. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15;168(8):918-51.
29. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*. 2009 Dec;136(6):1554-60.
30. LiPuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):299-323.
31. Przyklenk B, Bauernfeind A, Hörl G, Emminger G. Serologic response to *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *Infection*. 1987;15:308-10.
32. Elborn JS, Shale DJ, Britton JR. Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax*. 1991;46:881-5.
33. Marty N, Chatelut M, Dournes J, Chabanon G. RAPD and genotyping techniques to differentiate the colonization of cystic fibrosis patients with *Xanthomonas maltophilia*. 19th European Cystic Fibrosis Conference. 1994.
34. Roussey M, Lamarre A, Marcotte JE, Gerif S, Lapierre JG, Spier S. Log-term colonisation with *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* and *Xanthomonas maltophilia* in cystic fibrosis. 19th European Cystic Fibrosis Conference. 1994.
35. Brueton MJ, Ormerod LP, Shah KJ, Anderson CM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis complicating cystic fibrosis in childhood. *Arch Dis Child*. 1980;55:348-53.
36. Damas C, Amorim A, Gomes I. [Cystic fibrosis: review]. *Rev Port Pneumol*. 2008 Jan;14(1):89-112.
37. de Vrankrijker AM, Wolfs TF, van der Ent CK. Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2010 Dec;11(4):246-54.
38. Mearns MB. Natural history of pulmonary infection in cystic fibrosis. In: Sturgess JM, editor. *Perspectives in cystic fibrosis*. Toronto: Canadian Cystic Fibrosis Foundation; 1980. p. 325-35.
39. Schwab UE, Wold AE, Carson JL, Leigh MW, Cheng PW, Gilligan PH, et al. Increased

- adherence of *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis lungs to airway epithelial cells. *Am Rev Respir Dis*. 1994;148:365-9.
40. Cohen ML. *Staphylococcus aureus*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr*. 1986;108(2):796-9.
 41. Sparham PD, Lobban DI, Speller CE. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sputum in cystic fibrosis. *J Clin Pathol*. 1978;31:913-8.
 42. Sharp SE, Searcy C. Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec;44(12):4545-6.
 43. Flayhart D, Lema C, Borek A, Carroll KC. Comparison of the BBL CHROMagar Staph aureus agar medium to conventional media for detection of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug;42(8):3566-9.
 44. D'Souza HA, Baron EJ. BBL CHROMagar Staph aureus is superior to mannitol salt for detection of *Staphylococcus aureus* in complex mixed infections. *Am J Clin Pathol*. 2005 Jun;123(6):806-8.
 45. Hoiby N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr Scand. Suppl* 1982;301:33-54.
 46. Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Oct 15;178(8):814-21.
 47. Goering RV, Bauernfeind A, Lenz W, Przyklenk B. *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis: an epidemiological analysis using a combination of traditional and molecular methods. *Infection*. 1990 Jan;18(1):57-60.
 48. Branger C, Fournier JM, Loulergue J, Bouvet A, Gouillet P, Boutonnier A, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Epidemiol Infect*. 1994 Jun;112(3):489-500.
 49. Nunes R, Barth AL, Abreu F. Estudo sobre resistência aos antibióticos e tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com Fibrose Cística Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
 50. Kilian M. *Haemophilus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC.: ASM Press; 2007.
 51. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Apr;20(2):368-89.
 52. Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, et al. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2001 Nov;32(5):356-66.
 53. Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med*. 2002 May 2;346(18):1383-93.
 54. Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Horl G, Jungwirth R, Petermuller C, et al. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*. 1987 Jul;15(4):270-7.
 55. Rayner RJ, Hiller EJ, Ispahani P, Baker M. *Haemophilus* infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1990;65:255-8.
 56. Roberts MC, Soge OO, No DB. Characterization of macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated from children with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jan;66(1):100-4.
 57. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Aug;34(2):91-100.
 58. Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol*. 1995 Aug;48(8):1041-9.
 59. Maselli JH, Sontag MK, Norris JM, MacKenzie T, Wagener JS, Accurso FJ. Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2003 Apr;35(4):257-62.
 60. Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax*. 2000 Sep;55(9):795-7.
 61. Barth AL, Pitt TL. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from prototrophic wild-type strains in respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:37-40.
 62. Barth AL. Nutritional requirements of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Ph.D. thesis, University of London. 1995.
 63. Barth AL, Pitt TL. The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 1996;45:110-9.
 64. Lee TW, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*. 2004 Feb;37(2):104-10.
 65. Lebecque P, Leal T, Zylberberg K, Reyckler G, Bossuyt X, Godding V. Towards zero prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2006 Dec;5(4):237-44.
 66. Fonseca K, MacDougall J, Pitt TL. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis by selective media. *J Clin Pathol*. 1986 Feb;39(2):220-2.

67. Pugashetti BK, Metzger HM, Jr., Vadas L, Feingold DS. Phenotypic differences among clinically isolated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Clin Microbiol.* 1982 Oct;16(4):686-91.
68. Doern GV, Brogden-Torres B. Optimum use of selective plated media in primary processing of respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1992 Oct;30(10):2740-2.
69. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 1996 Sep;60(3):539-74.
70. Laine L, Perry JD, Lee J, Oliver M, James AL, De La Foata C, et al. A novel chromogenic medium for isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from the sputa of cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009 Mar;8(2):143-9.
71. Wellinghausen N, Kothe J, Wirths B, Sigge A, Poppert S. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4070-5.
72. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, et al. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1818-22.
73. Baltimore RS, Christie CD, Smith GJ. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Dec;140(6):1650-61.
74. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:435-64.
75. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* 2002 Apr 18;416(6882):740-3.
76. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):762-4.
77. Hach RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Apr 1;42(4):974-7.
78. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999 May 21;284(5418):1318-22.
79. Rogers GB, Hoffman LR, Whiteley M, Daniels TW, Carroll MP, Bruce KD. Revealing the dynamics of polymicrobial infections: implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol.* 2010 Aug;18(8):357-64.
80. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson JC, Gibson RL, Burns JL. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Nov;56(5):879-86.
81. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):1915-22.
82. Nickel JC, Wright JB, Ruseska I, Marrie TJ, Whitfield C, Costerton JW. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro. *Eur J Clin Microbiol.* 1985 Apr;4(2):213-8.
83. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001 Dec;183(23):6746-51.
84. Prince AS. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med.* 2002 Oct 3;347(14):1110-1.
85. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* 2001 Sep;183(18):5395-401.
86. Ferreira AG, Leao RS, Carvalho-Assef AP, Folescu TW, Barth AL, Marques EA. Influence of biofilm formation in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from Brazilian patients with cystic fibrosis. *APMIS.* 2010 Aug;118(8):606-12.
87. Romling U, Fiedler B, Bosshammer J, Grothues D, Greipel J, von der HH, et al. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1994 Dec;170(6):1616-21.
88. Jensen ET, Giwerzman B, Ojienyi B, Bangsberg JM, Hansen A, Koch C, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment. *J Hosp Infect.* 1997 Jun;36(2):117-22.
89. Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Oct 1;166(7):988-93.
90. Jones AM, Dodd ME, Morris J, Doherty C, Govan JR, Webb AK. Clinical outcome for cystic fibrosis patients infected with transmissible *Pseudomonas aeruginosa*: an 8-year prospective study. *Chest* 2010 Jun;137(6):1405-9.
91. Al-Aloul M, Crawley J, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax* 2004 Apr;59(4):334-6.
92. Fothergill JL, Upton AL, Pitt TL, Hart CA, Winstanley C. Diagnostic multiplex PCR assay for

- the identification of the Liverpool, Midlands 1 and Manchester CF epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Cyst Fibros* 2008 May;7(3):258-61.
93. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997 Oct;47(4):1188-200.
 94. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 2000 Sep;38(9):3165-73.
 95. Yabuuchi E, Kosaka Y, Oyaizu H. Proposal of *Burkholderia* gen.nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb.nov. *Microbiol Immunol* 1992;36:1251-75.
 96. Hutchinson J, Runge W, Mulvey M, Norris G, Yetman M, Valkova N, et al. *Burkholderia cepacia* infections associated with intrinsically contaminated ultrasound gel: the role of microbial degradation of parabens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004 Apr;25(4):291-6.
 97. Kutty PK, Moody B, Gullion JS, Zervos M, Ajluni M, Washburn R, et al. Multistate outbreak of *Burkholderia cenocepacia* colonization and infection associated with the use of intrinsically contaminated alcohol-free mouthwash. *Chest* 2007 Dec;132(6):1825-31.
 98. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 2003 Sep;5(9):719-29.
 99. (99) Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect* 2010 Jul;16(7):821-30.
 100. Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol* 2005 Oct;43(10):5136-42.
 101. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* 2008 Jun;104(6):1539-51.
 102. Vanlaere E, LiPuma JJ, Baldwin A, Henry D, De BE, Mahenthiralingam E, et al. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008 Jul;58(Pt 7):1580-90.
 103. Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De BE, LiPuma JJ, et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009 Jan;59(Pt 1):102-11.
 104. Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003 Nov 7;228(1):57-62.
 105. Leite F, Barth AL. Variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística no Hospital de Clínicas de Porto Alegre Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
 106. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, et al. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* 1995 Nov;50(11):1194-8.
 107. Govan JRW, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993;342:15-9.
 108. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, III, Liu L, Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Jul 1;164(1):92-6.
 109. Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* 2001 Nov 1;33(9):1469-75.
 110. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 2002 Feb;8(2):181-7.
 111. Drevinek P, Vosahlikova S, Cinek O, Vavrova V, Bartosova J, Pohunek P, et al. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 2005 Jul;54(Pt 7):655-9.
 112. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MC, Govan JR, et al. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2005 Sep;43(9):4665-73.
 113. Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdano-Tarraga AM, et al. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol* 2009 Jan;191(1):261-77.

114. Tomich M, Herfst CA, Golden JW, Mohr CD. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. Infect Immun 2002 Apr;70(4):1799-806.
115. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: An emerging problem. J Pediatr 1984;104:206-10.
116. (116) Lewin LO, Byard PJ, Davis PB. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonization on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. J Clin Epidemiol 1990;43(2):125-31.
117. Liou TG, Adler FR, FitzSimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. Am J Epidemiol 2001 Feb 15;153(4):345-52.
118. (118) Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. J Clin Microbiol 1997 Mar;35(3):614-9.
119. Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 2001 Oct;39(10):3427-36.
120. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, et al. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996 Apr;34(4):886-91.
121. Bombicino KA, Almuzara MN, Famiglietti AM, Vay C. Evaluation of pyrrolidonyl arylamidase for the identification of nonfermenting Gram-negative rods. Diagn Microbiol Infect Dis 2007 Jan;57(1):101-3.
122. McDowell A, Mahenthiralingam E, Moore JE, Dunbar KE, Webb AK, Dodd ME, et al. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2001 Dec;39(12):4247-55.
123. Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ. Simultaneous coinfection by multiple strains during *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2006 Feb;54(2):95-8.
124. LiPuma JJ. *Burkholderia* and emerging pathogens in cystic fibrosis. Semin Respir Crit Care Med 2003 Dec;24(6):681-92.
125. Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, MacDonald NE. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. Am J Respir Crit Care Med 2000 Apr;161(4 Pt 1):1206-12.
126. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev 1998 Jan;11(1):57-80.
127. Demko CA, Stern RC, Doershuk CF. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. Pediatr Pulmonol 1998 May;25(5):304-8.
128. Talmaciu I, Varlotta L, Mortensen J, Schidlow DV. Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2000 Jul;30(1):10-5.
129. Duarte S, Lutz L, Barth AL. Avaliação de métodos de identificação, prevalência e perfil de suscetibilidade de *Stenotrophomonas maltophilia* de amostras clínicas provenientes de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Curso de Especialização em Análises Clínicas - Faculdade de Farmácia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
130. Burns JL, Van Dalfsen JM, Shawar RM, Otto KL, Garber RL, Quan JM, et al. Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1999 May;179(5):1190-6.
131. Valdezate S, Vindel A, Maiz L, Baquero F, Escobar H, Canton R. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. Emerg Infect Dis 2001 Jan;7(1):113-22.
132. Marchac V, Equi A, Le Bihan-Benjamin C, Hodson M, Bush A. Case-control study of *Stenotrophomonas maltophilia* acquisition in cystic fibrosis patients. Eur Respir J 2004 Jan;23(1):98-102.
133. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahl A, Gielen J, Bartheimer H, et al. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2005 Mar;4(1):41-8.
134. Krueger TS, Clark EA, Nix DE. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. Diagn Microbiol Infect Dis 2001 Sep;41(1-2):71-8.
135. San GP, Zhou J, Tabibi S, Chen Y, Trauzzi M, Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 2004 Jan;48(1):168-71.
136. Falkinham JO, III. Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin Chest Med 2002 Sep;23(3):529-51.
137. Torrens JK, Dawkins P, Conway SP, Moya E. Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. Thorax 1998 Mar;53(3):182-5.
138. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr., Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, et al. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003 Mar 15;167(6):828-34.
139. Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, et al. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. Emerg Infect Dis 2008 Mar;14(3):378-84.

140. Olivier KN, Weber DJ, Lee JH, Handler A, Tudor G, Molina PL, et al. Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Mar 15;167(6):835-40.
141. Cullen AR, Cannon CL, Mark EJ, Colin AA. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Feb;161(2 Pt 1):641-5.
142. Kilby JM, Gilligan PH, Yankaskas JR, Highsmith WE, Jr., Edwards LJ, Knowles MR. Nontuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 1992 Jul;102(1):70-5.
143. Esther CR, Jr., Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010 Mar;9(2):117-23.
144. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Feb 15;175(4):367-416.
145. Cremades R, Santos A, Rodriguez JC, Garcia-Pachon E, Ruiz M, Royo G. *Mycobacterium abscessus* from respiratory isolates: activities of drug combinations. *J Infect Chemother* 2009 Feb;15(1):46-8.

Recebido: 01/05/2011

Aceito: 19/06/2011