



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
MÉDICA

LÍVIA GURGEL DO AMARAL VALENTE

**IDENTIFICAÇÃO DE MELANINA EM CEPAS  
CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE *Burkholderia  
pseudomallei* E ATIVIDADE *IN VITRO* DO  
FARNESOL COMO INIBIDOR DE  
 $\beta$ -LACTAMASES**

FORTALEZA-CEARÁ

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
MÉDICA

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**IDENTIFICAÇÃO DE MELANINA EM CEPAS  
CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE *Burkholderia  
pseudomallei* E ATIVIDADE *IN VITRO* DO  
FARNESOL COMO INIBIDOR DE**

**β-LACTAMASES**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Profa. Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira

Mestranda: Lívia Gurgel do Amaral Valente

FORTALEZA

2012

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

IDENTIFICAÇÃO DE MELANINA EM CEPAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE  
*Burkholderia pseudomallei* E ATIVIDADE *IN VITRO* DO FARNESOL COMO  
INIBIDOR DE  $\beta$ -LACTAMASES

LÍVIA GURGEL DO AMARAL VALENTE

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.

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

Aos amigos Rita Amanda Chaves, Joyce Fonteles Ribeiro, Juliana Fernandes Pereira, João Jaime Giffoni Leite, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, demais colegas do CEMM e do mestrado, pela contribuição direta ou indireta, pela convivência, incentivo, apoio e amizade durante todo o curso.

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

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

Ao meu companheiro, José Gerardo da Silva Sá Filho, pelas inúmeras vezes que pude contar com seu apoio, dedicação e carinho.

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

## RESUMO

*Burkholderia pseudomallei* é um bacilo Gram-negativo causador da melioidose, uma doença infecciosa severa e geralmente fatal, a qual pode ser adquirida através da inoculação, inalação e ingestão do microrganismo que se encontra distribuído no ambiente. No Brasil, a melioidose é considerada uma doença emergente descrita pela primeira vez em 2003 no Nordeste brasileiro. O presente estudo consistiu em identificar o gene *hppD*, que codifica a produção de um precursor importante na síntese de melanina, e avaliar fenotipicamente a produção do pigmento em cepas de *B. pseudomallei* através de meios contendo substratos fenólicos. Aliado ao estudo foi realizada a comparação do perfil de sensibilidade e curva de morte entre cepas melanizadas e não melanizada ante ao imipenem além da avaliação da possível ação do sesquiterpeno farnesol como um inibidor de  $\beta$ -lactamases. Os isolados utilizados no estudo pertencem ao Laboratório de Patógenos Reemergentes e Emergentes-LAPERE UFC. Para o cumprimento da metodologia, as cepas foram recuperadas do estoque, realizado a extração de DNA e a identificação do gene *hppD* através de reação de PCR. A expressão fenotípica de melanina foi avaliada através de subcultivos em meio *Brain Heart infusion* (BHI) acrescido de ácido caféico. O teste de sensibilidade com cepas melanizadas e não melanizadas foi realizado utilizando-se o teste de microdiluição em caldo padronizado pelo CLSI, segundo documento M07-A8. A curva de morte foi realizada a partir da incubação do inóculo com imipenem no intervalo de 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 1 e 2 horas, seguida da contagem das colônias. A avaliação do farnesol como um possível inibidor de  $\beta$ -lactamases foi realizada através da combinação *in vitro* do farnesol com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina, ampicilina, oxacilina, imipenem, amoxicilina-ácido clavulânico, utilizando-se o teste de microdiluição em caldo. O gene *hppD* foi detectado em todas as cepas de *B. pseudomallei* testadas, além da produção de pigmento em meios contendo substratos fenólicos. Em relação ao perfil de sensibilidade, as cepas não melanizadas e melanizadas apresentaram o mesmo valor de CIM, porém as cepas melanizadas demonstraram maior capacidade de sobrevivência quando em contato com a droga do que as cepas não melanizadas. Em relação ao farnesol, todas as cepas testadas foram inibidas por este composto com CIM variando de 75 a 150 $\mu\text{M}$ . Dentre as combinações dos  $\beta$ -lactâmicos testadas com farnesol, todas as drogas apresentaram redução estatisticamente significativa: amoxicilina ( $p=0,0001$ ), amoxicilina-ácido clavulânico ( $p=0,0005$ ), ampicilina ( $p=0,0026$ ), oxacilina ( $p=0,0001$ ) e imipenem ( $p=0,0105$ ). Por fim, as combinações com amicacina e gentamicina não apresentaram redução estatisticamente significativa, pois os aminoglicosídeos praticamente repetiram seus valores quando combinados com farnesol. Esse estudo abre perspectivas acerca de um novo fator de virulência, melanina, ainda não descrita para *B. pseudomallei*, além do sesquiterpeno farnesol como um possível inibidor de  $\beta$ -lactamases nessa espécie.

Palavras chaves: *Burkholderia pseudomallei*, melanina, sensibilidade, farnesol,  $\beta$ -lactâmicos.

## ABSTRACT

*Burkholderia pseudomallei* is a Gram-negative causes melioidosis, an infectious disease, severe and often fatal, which can be gained by injection, inhalation, and ingestion of the microorganism which is distributed in the environment. In Brazil, melioidosis is considered an emerging disease first described in 2003 in the northeastern Brazilian. The present study was to identify the *hppD* gene which codes for the production of a precursor in the synthesis of melanin, and phenotypically identifying the pigment production in strains of *B.pseudomallei* through media containing phenolic substrates. Allied to the study was conducted to compare the sensitivity profile and curve of death and non-melanized strains melanized compared to imipenem. Associated with the sensitivity study, we evaluated the possible action of the sesquiterpene farnesol as an inhibitor of  $\beta$ -lactamases. The isolates used in this study belong to the Laboratory of Emerging and Reemerging Pathogens-LAPERRE. For the fulfillment of the methodology, the strains were recovered from stock held DNA extraction and identification of the *hppD* gene via PCR. Phenotypic expression of melanin was evaluated by means of repetition in brain heart infusion (BHI) supplemented with caffeic acid. The sensitivity test with melanized and non melanized strains was performed using the broth microdilution test standardized by the CLSI document M07-A8 seconds. The curve of death was carried out incubating the inoculum with imipenem in the range of 0.125 mg / mL to 0.5 mg / mL for 1 and 2 hours, followed by counting of colonies. The evaluation of farnesol to a potential inhibitor of  $\beta$ -lactamases was performed by combining in vitro farnesol with  $\beta$ -lactam antibiotics (amoxicillin, ampicillin, oxacillin, imipenem, amoxicillin, clavulanic acid, using the broth microdilution test. The *hppD* gene was detected in all strains of *B. pseudomallei* tested, besides the production of pigment in media containing phenolic substrates. In relation to susceptibility, the non-melanized and melanized strains showed the same MIC value, but the melanized strains demonstrated increased survivability when exposed to the drug than the strains not melanized. Regarding farnesol, all strains tested were inhibited by farnesol isolated with MICs ranging from 75 to 150 $\mu$ M. Among the combinations of  $\beta$ -lactams tested farnesol, all drugs showed a statistically significant reduction amoxicillin (p = 0.0001), amoxicillin-clavulanate (p = 0.0005), ampicillin (p = 0.0026), oxacillin (p = 0.0001) and imipenem (p = 0.0105). Finally, the combinations with amikacin and gentamicin showed no statistically significant reduction, since aminoglycosides almost repeated their values when combined with farnesol. This study opens new perspectives on a virulence factor, melanin, not yet described for *B. pseudomallei*, and the sesquiterpene farnesol as a possible inhibitor of  $\beta$ -latamases this species.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, melanin, susceptibility, farnesol,  $\beta$ -lactamics.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ANEXO .....	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Aspectos históricos.....	15
2.2 Epidemiologia .....	16
2.3 Ecologia.....	18
2.4.3 Fatores de virulência .....	19
2.5 Aspectos clínico .....	22
2.5.1 Formas de infecção.....	22
2.5.2 Aspectos clínicos.....	23
2.6 Diagnóstico laboratorial .....	24
2.6.1 Diagnóstico microbiológico .....	24
2.6.2 Diagnóstico sorológico.....	27
2.6.3 Diagnóstico molecular.....	28
2.7 Tratamento e perfil de sensibilidade .....	28
2.8 Novas estratégias terapêuticas.....	30
3 PERGUNTA DE PARTIDA .....	33
4 HIPÓTESES .....	33
5 OBJETIVOS .....	34
5.1 Objetivo geral.....	34
5.2 Objetivos específicos.....	34
6.0 CAPÍTULO I.....	35

7.0 CAPÍTULO II .....	38
8.0 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXOS .....	64



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Vias de formação de melanina em bactérias.

**Figura 2.** Esfregaço de material purulento aspirado de gânglio mediastinal corado pelo Gram apresentando bacilos Gram-negativos bipolares com aspecto semelhante a broche de segurança.

**Figura 3.** Crescimento de *B. pseudomallei* em ágar-sangue(1) apresentando colônias com aspecto seco de tonalidade branco-acinzentada, em ágar-MacConkey(2) ) colônias com aspecto ligeiramente rugoso e coloração púrpura e em ágar BPSA mostrando colônias rugosas de coloração púrpura (3).

### CAPITULO II:

**Figure 1:** Representative gel of the amplification of the gene *hppD*, demonstrating 300bp fragments. M: 100 bp marker; 1 to 9: samples of *B. pseudomallei*; NC: negative control.

**Figure 2:** Fontana-Masson staining showing the production of melanin, after growth of a) *B. pseudomallei*; b) *Cryptococcus neoformans* and c) *Candida albicans* on BHI agar supplemented with caffeic acid.

**Figure 3.** Death dynamics of melanized and non-melanized strains of *B. pseudomallei* 1 and 2 hours after exposure to imipenem. \*p= 0.0001 and \*\* p= 0.0025.

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I:

**Table 1.** Increased antimicrobial susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* and MRSA strains treated with farnesol.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATCC** – American Type Culture Collection

**BHI** – *Brain Heart Infusion*

**BPSA**–*Burkholderia pseudomallei* Selective Ágar

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

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CLSI** – *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

**CLED**- Cistina-lactose-eletrólito-deficiente

*flicC*– gene flagelina C

**ELISA**- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**HGA** – Ácido Homogentísico

**ITS** – *Internal Transcribed Spacer*

**LAPERRE** – Laboratório de Patógenos reemergentes e emergentes

**LPS** – lipopolissacarídeo

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina

**NB3** – Nível de Biossegurança 3

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

*rspU*– gene da subunidade protéica ribossomal 21S

**SNP**– *single nucleotide polymorfism*

**TSI** – *Triplice Sugar Iron*

**TTS3** – Sistema de secreção do tipo III

**TTS4**– Sistema de secreção do tipo IV

## **LISTA DE ANEXO**

**ANEXO I** – Materiais e Métodos

**ANEXO II** – Protocolo para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas.

**ANEXO III** – Protocolo para o preparo do meio BHI acrescido de ácido caféico.

**ANEXO IV** – Protocolo da coloração Fontana-Masson

**ANEXO V** – Tabela com concentração inibitória mínima das drogas testadas.

**ANEXO VI** – Tabela com as concentrações inibitórias mínimas para as drogas testadas em combinação com farnesol

**ANEXO VII** – Análise estatística da combinação de drogas com Farnesol

## 1 INTRODUÇÃO

*Burkholderia pseudomallei* é um bacilo Gram-negativo que se encontra distribuído no ambiente e pode causar uma doença infecciosa severa e geralmente fatal: a melioidose.

*B. pseudomallei* vem apresentando resistência a muitos antimicrobianos utilizados no tratamento de quadros de melioidose. Diante desse fato, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e novas drogas eficazes para o tratamento de melioidose são de extrema necessidade, principalmente nas zonas onde o bacilo é reconhecido como endêmico.

A melanina é um pigmento importante para a proteção do microrganismo contra o estresse oxidativo *in vivo*, além da proteção contra o estresse ambiental e radiação ultravioleta. Esse pigmento já foi descrito em cepas de *Burkholderia cenocepacia*, não sendo descrito na literatura a presença de melanina em cepas de *B. pseudomallei*.

O presente trabalho buscou demonstrar a presença de melanina em cepas de *B. pseudomallei*, destacando-a, neste microrganismo, como possível fator de virulência ainda não descrito na literatura. Avaliou-se também a capacidade de sobrevivência de cepas melanizadas e não melanizadas frente ao imipenem. Além de investigar a atividade antimicrobiana do farnesol isolado e em combinação com drogas antimicrobianas ante as cepas de *B. pseudomallei*.

Aliado aos estudos, a sensibilidade seguiu-se no pressuposto que as cepas de *B. pseudomallei* são intrinsecamente resistentes a muitos antibióticos, notadamente penicilina e outros  $\beta$ -lactâmicos, eritromicina, gentamicina e rifampicina. Os antimicrobianos atualmente recomendados para tratar melioidose são ceftazidima, imipenem, meropenem, amoxicilina/clavulanato, cefoperazona/sulbactam,

trimetoprim/sulfametoxazol, doxiciclina e cloranfenicol. O desenvolvimento de resistência de *B. pseudomallei* a estes antimicrobianos tem sido reconhecido, o que reforça a necessidade da busca por novos antimicrobianos efetivos contra *B. pseudomallei*. O farnesol é um sesquiterpeno que possui atividade antimicrobiana já comprovada frente a fungos e bactérias, além da possível capacidade de agir como inibidor de  $\beta$ -lactamase em cepas de *Staphylococcus aureus*. Diante dessa atividade do farnesol, este trabalho buscou, por fim, avaliar *in vitro* a capacidade do farnesol de inibir  $\beta$ -lactamase de *B. pseudomallei* através da combinação do farnesol com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos históricos

A melioidose causada pelo bacilo Gram-negativo saprófita do solo, *B. pseudomallei*, foi primeiramente descrito por Whitmore e Krishnaswami em 1912. Este isolamento inicial foi realizado a partir de biopsias de mendigos e viciados em morfina nas ruas de Rangoon (atualmente Yangon) em Mianmar (WHITMORE; KRISHNASWAMI, 1912; WHITMORE, 1913).

O termo melioidose foi proposto por Stanton e Fletcher em 1925, devido às similaridades clínicas e patofisiológicas com o mormo, doença causada pela *Burkholderia mallei* em equinos. A palavra melioidose deriva do grego *melis* que significa enfermidade de jumentos e *eidos* significa semelhante (STANTON; FLETCHER, 1921). A bactéria foi originalmente conhecida como *Bacillus whitmori*, e posteriormente por *Bacillus pseudomallei*. Desde sua identificação vários nomes foram propostos para o microrganismo: *Loeffarella* ou *Loeffarella whitmori* e *Malleomyces pseudomallei*. A bactéria foi classificada como *Pseudomonas pseudomallei* baseado em características de crescimento, motilidade e características metabólicas. Em 1992 uma reclassificação baseada na seqüência da região 16S-RNA, homologia DNA-DNA, composição dos lipídeos e ácidos graxos celulares e características fenotípicas foi realizada, sendo então chamada de *Burkholderia pseudomallei* (YABUUCHI et al., 1992; WHITE, 2003).

Casos de melioidose, fora das regiões endêmicas, foram descritos após os períodos de guerras, como em 1941, durante a Guerra do Pacífico (INGLIS, et. al., 2006), na Indochina, entre 1948-1954, onde ocorreram 100 casos de melioidose entre soldados das tropas francesas ( DANCE, et. al., 2000). E em 1973, durante a Guerra do Vietnã foram notificados 343 casos de melioidose entre as tropas americanas (CHENG; CURRIE, 2005). A incidência de melioidose também pode aumentar após catástrofes naturais, como ocorreu em 2004 após o tsunami no sudeste da Tailândia. Após esse episódio, foi observado o aumento da incidência de culturas positivas para *B. pseudomallei* de 0,7 para 70 em 100.000 casos por ano (CHIERAKUL, et. al., 2004)

Em 1955, a relação da melioidose com solos contaminados foi reconhecida a primeira vez, quando um bacteriologista cultivou *B. pseudomallei* proveniente de amostras de solo e água barrenta na Indochina francesa (CHAMBON, 1955). A bactéria foi isolada no Brasil por pesquisadores franceses em 1977, no solo de duas cidades do interior da Bahia (São Félix e Santo Antonio). Há também relatos de tentativas frustradas de se isolar o microrganismo da água em São Paulo (PESTANA DE CASTRO et al., 1973).

No Brasil, casos de melioidose foram descritos a primeira vez apenas em 2003, quando um surto acometeu uma família de quatro irmãos no município de Tejuçuoca. No ano seguinte, foi descrito outro caso da doença na região rural no município de Banabui em uma mulher de 39 anos, que costumava lavar roupa agachada em um rio nas proximidades de sua residência. Em 2005 foi descrito outro caso no município de Aracoiaba, onde ocorreu um acidente automobilístico cuja vítima, um homem de 30 anos, caiu em um rio e aspirou água contaminada (ROLIM, et. al., 2009). No mesmo ano, outro caso de melioidose foi notificado pelo Governo holandês por se tratar de um turista que veio a falecer no seu país de origem, após retornar do Brasil, precisamente do Estado do Ceará. (AARDEMA et al, 2005). Em 2008, um jovem de 17 anos, portador de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) após visita a cachoeiras e grutas em Ubajara foi internado com quadro de pneumonia aguda e faleceu em apenas 48 horas ( Couto, et al.,2009). Sidrim et. al., (2010) descreveram um caso de aneurisma micótico com cultura de sangue positiva para *B. pseudomallei* em um paciente fazendeiro no município de Granja, interior do Ceará. Em 2012, Macedo e colaboradores, relataram um caso de co-infecção de melioidose e dengue em um caminhoneiro de 28 anos do município de Pacoti.

## 2.2 Epidemiologia

*B. pseudomallei* está classificada taxonomicamente, segundo o manual Bergey em:

Reino - *Bacteria*,

Filo – *Proteobacteria*,



Classe - *Beta Proteobacteria*,

Ordem - *Burkholderiales*,

Família - *Burkholderiaceae*,

Gênero - *Burkholderia*

Espécie - *Burkholderia pseudomallei*.

(BRENNER et al., 2005)

*Burkholderia pseudomallei* é um microrganismo saprófita amplamente distribuído no solo e na água em regiões tropicais e subtropicais numa latitude de 20°N e 20°S na linha do equador. Embora o microrganismo não esteja estritamente confinado à região equatorial, a probabilidade de adquirir melioidose fora dessa delimitação geográfica é extremamente baixa (DANCE et al., 2000).

Casos esporádicos têm sido relatados fora das regiões endêmicas, como China, Coreia, Filipinas, Indonésia, Índia e oeste da África. Os casos que ocorreram em regiões não endêmicas estão relacionados com viagens para regiões endêmicas (DANCE et al., 1999; WHITE, et. al., 2003).

Os locais onde *B. pseudomallei* é considerada como patógeno bacteriano mais importante para os seres humanos são algumas províncias do Nordeste da Tailândia e do Norte da Austrália. A melioidose é considerada nessas regiões como a terceira causa de morte por doença infecciosa depois da aids e tuberculose, além de ser responsável por 20% dos casos de septicemia adquirida na comunidade. Na região Norte da Austrália a melioidose foi a causa mais comum de pneumonia fatal adquirida na comunidade. (CHENG; CURRIE, et. al., 2005). Em estudo realizado no Nordeste da Tailândia, por Limmathurotsakul e colaboradores (2010) foi observado que a melioidose é mais freqüente em pacientes do sexo masculino e a maior incidência da doença está na faixa etária de 55 a 64 anos de idade.

A melioidose é uma doença potencialmente fatal de difícil diagnóstico, além ser uma doença infecciosa emergente com sérias implicações no ambiente internacional e um problema de saúde pública. Segundo Limmathurotsakul et al. (2010), as altas taxas de mortalidade da doença justificam que a mesma seja considerada de alta prioridade de Agências de Fomento e Orgãos de Saúde Globais. A verdadeira incidência da doença, na maioria dos países, ainda é desconhecida, esse fato está relacionado com a dificuldade no diagnóstico da doença e com a carência de laboratórios bem equipados para identificação desse microrganismo (CHENG; CURRIE, 2005).

## 2.3 Ecologia

*B. pseudomallei* é um microrganismo saprófita do solo que pode ser encontrado em nichos ambientais, como águas estagnadas e solos úmidos (DRAPER, et. al., 2010). Há muitas variáveis que podem influenciar na distribuição do microrganismo no solo, incluindo fatores climáticos como temperatura, chuvas, luminosidade e composição do solo (física, química e biológica), sendo o período chuvoso, ou logo após as chuvas, comumente descrito como o preferido para a aquisição da doença em regiões endêmicas. A estação chuvosa pode estar associada a até 75% e 85% dos casos da doença na Tailândia e Austrália, respectivamente (DANCE, 2000; INGLIS et al., 2001; CURRIE, 2003).

O agente pode ser encontrado em diferentes tipos de solo, entretanto estudos descrevem a preferência da bactéria por solos úmidos argilosos numa profundidade de 25 a 120 cm. (INGLIS, et. al., 2001; SPRAGUE, NEUBAUER, 2004; ROLIM, et. al., 2009). *B. pseudomallei* pode multiplicar-se no solo em pH de 4-8, em altas concentrações de sal, em uma umidade mínima de 10-15% e em temperaturas de 4 a 42°C (COENYE, VANDAMME, 2003; ROBERTSON, et. al., 2010). A bactéria possui ainda uma notável capacidade de multiplicar-se e persistir em uma ampla variedade de líquidos ambientais, tal condição é determinante para ameaça ambiental de infecção por *B. pseudomallei* (ROBERTSON, et. al., 2010).

O agente etiológico da melioidose pode sobreviver em ambientes sem nutrientes e ainda persistir viável em água destilada à temperatura ambiente por até 3 anos. Pumpuang e colaboradores (2011) relataram a sobrevivência do microrganismo por até 16 anos em água destilada à 25 °C. Em água barrenta *B. pseudomallei* pode sobreviver por até 7 meses e no solo em laboratório por até 30 meses. A bactéria é ainda particularmente resistente à radiação ultravioleta ou luz solar quando comparada a outras bactérias. *B. pseudomallei* foi inativada após 7,75 min de exposição a 4,65 W/m<sup>2</sup> de radiação UV a um comprimento de onda de 254 nm (THOMAS, et. al., 1981; INGLIS, et al., 2001; SPRAGUE, NEUBAUER, 2004; MOORE, et. al., 2008). Keith e colaboradores (2007) descreveram a presença de melanina na espécie *B. cenocepacia* e a relação desse pigmento com o aumento da resistência ao estresse oxidativo.

Um estudo ambiental realizado em duas áreas acometidas pela doença no Nordeste do Brasil mostrou o isolamento ambiental da bactéria no solo e na água nos municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, durante a estação seca, sendo estes isolados encontrados em regiões com baixos índices pluviométricos e temperaturas que não variam significativamente ao longo do ano. Essas condições de temperatura, índices pluviométricos e umidade são diferentes dos índices encontrados em outras regiões endêmicas (ROLIM, 2005; ROLIM et al., 2009).

### **2.4.3 Fatores de virulência**

O gênero *Burkholderia* contém mais de 40 espécies, onde os membros reconhecidos como patogênicos são *B. pseudomallei* e *B. mallei* e, em certas situações clínicas, *B. cenocepacia* pode atuar como patógeno oportunista, como relatado em pacientes portadores de fibrose cística (MOORE, et. al., 2004; LEITE, et. al., 2011).

Diversos estudos têm mostrado que a virulência de *B. pseudomallei in vivo* está relacionada com características intrínsecas do microrganismo, com notável variabilidade intraespecífica de cada cepa. A bactéria produz e secreta uma variedade de fatores que contribuem para a sua sobrevivência e manutenção, como, proteases, catalases, peroxidases, superóxido dismutase, lipases, fosfolipase C, hemolisinas e sideróforos. Adicionalmente, o microrganismo é um patógeno intracelular facultativo, sendo capaz de invadir, sobreviver e multiplicar-se em células epiteliais e fagocíticas. Vários estudos têm demonstrado que a bactéria é capaz de escapar dos vacúolos endocíticos e penetrar nas células do hospedeiro e gerar infecção (WIERSINGA, et. al., 2006; CHRISTOPHER, et. al., 2011).

Winstanley et. al., (1999) introduziram as pesquisas sobre os genes responsáveis pelo sistema de secreção do tipo III (TTS3), um dispositivo molecular que permite a translocação de moléculas efetoras para o interior das células hospedeiras, os quais provavelmente foram transferidos horizontalmente entre diferentes microrganismos e estão associados a uma ilha de patogenicidade em *B. pseudomallei* (WINSTANLEY et al, 1999). Em outro trabalho, publicado em 2000, estes pesquisadores apresentaram um estudo baseado na detecção de um único *locus* pela utilização da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase), relatando uma ligação entre a presença de genes do sistema de secreção do tipo III e o fenótipo arabinose negativo, associando este alvo à

virulência de *B. pseudomallei* (WINSTANLEY et. al., 2000). Em 2002, quando então reconhecida a espécie *B. thailandensis* (que assimila arabinose), foi confirmado que os genes do TTS3 estão presentes apenas em *B. pseudomallei* e *B. mallei* (RAINBOW, et al, 2002). Além do sistema de secreção tipo III, autores citam o sistema de secreção tipo IV (TTS6) como fator determinante para virulência de *B. pseudomallei* e sua capacidade de causar infecção (CHENG, et. al., 2011).

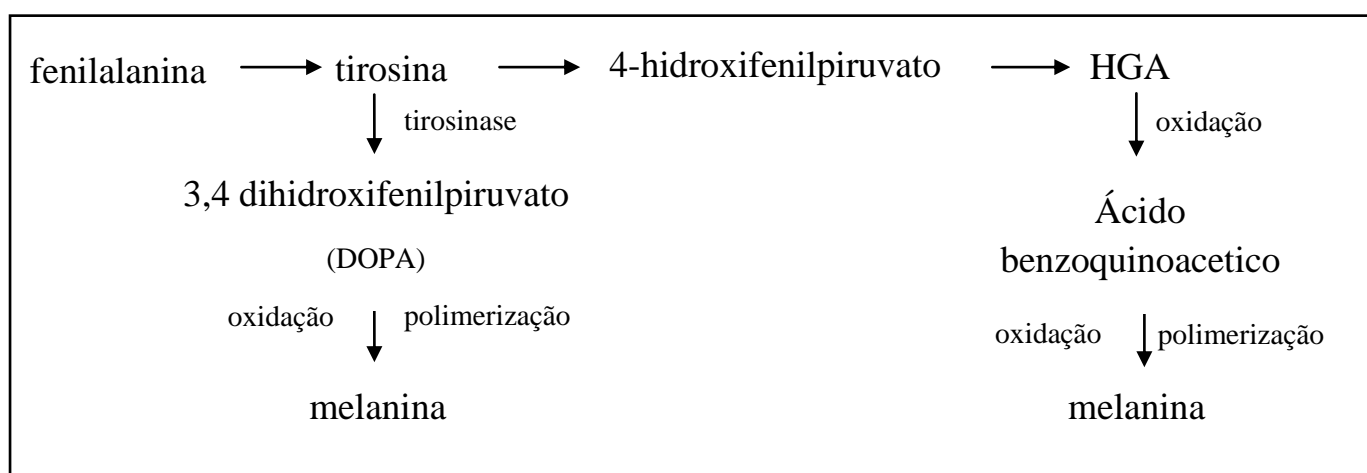
Outro importante fator de virulência em *B. pseudomallei* é a produção de cápsula polissacarídica relacionada com proteção ambiental, adesão, colonização, evasão do sistema imune e ligação a células ambientais. Essa cápsula permite a bactéria a formação de microcolônias em um ambiente protegido, no qual os organismos são fenotipicamente alterados, caracterizando a formação de biofilme. Estudos têm demonstrado que cepas de *B. pseudomallei* quando em biofilme são resistentes a muitos antimicrobianos (SAWASDIDOLN, et. al., 2010; LEE, et. al., 2010).

Um fator de virulência interessante relatado para o gênero *Burkholderia* é a capacidade de produzir melanina. A melanização é considerada importante na patogênese bacteriana, pois tem sido associada com a virulência em muitos microrganismos, tais como, fungos, bactérias e helmintos (FRASES, et. al., 2007). Embora a melanina não seja essencial para sobrevivência do microrganismo, ela aumenta sua sobrevivência através da inibição da degradação do biofilme, age contra enzimas hidrolíticas, protege o DNA e outras moléculas da luz ultravioleta. (NOSANCHUK; CASADEVAL, 2006).

A melanina é uma molécula hidrofóbica, carregada negativamente de alto peso molecular, de coloração escura e resistente ao branqueamento por soluções oxidantes e soluções ácidas (WHITE, 1958; NOSANCHUK; CASADEVAL, 2006) Uma definição mais rigorosa da melanina ainda não é possível, devido às técnicas bioquímicas e biofísicas serem incapazes de prever a estrutura química desse complexo polímero. Algumas técnicas como ressonância de spin eletrônico e degradação química parcial da melanina em microanálise em HPLC estão sendo utilizadas para estudar a molécula (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CASADEVALL, et. al., 20012).

A produção de melanina em bactérias está relacionada com enzimas tirosinases, embora estudo realizado com cepas depositadas em banco de dados

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) demonstraram a presença da enzima lacase em algumas espécies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Yersinia pestis*, *Campylobacter jejuni*, *Bordetella pertussis* e *Mycobacterium* spp (ALEXANDRE;ZHULIN, 2000; NOSANCHUK; CASADEVAL, 2003). O metabolismo da tirosina que leva a formação de melanina envolve duas vias: formação de melanina através do intermediário hidroxifenilalanina que requer a atividade da enzima tirosinase e o catabolismo da tirosina em ácido homogentísico (HGA) como mostrado do figura 1. O HGA é o principal intermediário p-difenólico do catabolismo da tirosina em animais e bactérias, esse composto se auto-oxida formando pigmento marrom avermelhado chamado piomelanina (CARREIRA, et. al., 2001;VALERU, et. al., 2009).



**Figura1. Vias de formação de melanina em bactérias.**

Foi demonstrado que cepas de *B. cenocepacia* são capazes de produzir um pigmento marrom semelhante à melanina capaz de atenuar o estresse oxidativo em linhagens de monócitos humanos (ZUGHAIER et. al; 1999). Outros estudos demonstraram que a *B. cenocepacia* é capaz de produzir um precursor essencial para formação da melanina a partir de um intermediário (HGA). A mutação no gene *hppD* que codifica a produção desse pigmento, resulta em uma cepa não pigmentada. Além disso, foi observado que a ausência deste pigmento levou o aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo *in vitro* e reduziu a sobrevivência intracelular da bactéria em uma linhagem celular de murinos. Porém, ainda não é conhecido o mecanismo de biossíntese desse pigmento (KEIHT, et. al., 2007).

## 2.5 Aspectos clínico

### 2.5.1 Formas de infecção

Três formas de aquisição são reconhecidas para *B. pseudomallei*: inoculação, ingestão e inalação. Como em outras doenças infecciosas, a carga do inóculo é fator determinante para perfil e gravidade da doença. A infecção humana ocorre após exposição ao solo e água contaminados por inalação e/ou aspiração de partículas de poeira ou gotículas de água, por ingestão ou por inoculação em pele não íntegra e mucosas (CHENG; CURRIE, 2005).

Trabalhos mostram o aumento do número de casos da doença em locais onde ocorram terremotos, ventanias, tempestades e locais onde ocorra poeira gerada por helicópteros (CHENG, et. al., 2008). Inglis et al., (2011) relatam casos esporádicos de melioidose em regiões não endêmicas após tempestades tropicais e ciclones durante o verão.

A inoculação é citada na literatura como uma forma de aquisição freqüente de melioidose cutânea em agricultores, os quais se contaminam com lama e água durante o período de cultivo e colheita de arroz. (Chaowagul et. al., 1989)

Embora a inoculação e a inalação sejam consideradas como as rotas primárias de infecção por melioidose, evidências clínicas indicam a ingestão como uma rota alternativa de infecção (OESTE et. al., 2010) Rolim et al., (2009) citam um caso de melioidose por afogamento após acidente automobilístico, no município de Aracoiaba, interior do estado do Ceará.

Formas menos comum têm sido descritas na literatura, tais como transmissão pessoa para pessoa, transmissão sexual e vertical. Além disso, foi descrita a transmissão de *B. pseudomallei* experimentalmente através de artrópodes, com o mosquito *Aedes aegypti* (DANCE, et. al., 2000; CHENG; CURRIE, 2005).

O período de incubação da doença é variável, sendo que nos casos agudos o período costuma ser curto. Estudos mostram que o período de incubação pode variar de 1 a 21 dias, apresentando média de 9 dias (STEVENS, GALYOV, 2004). A infecção

também pode ser recorrente ou permanecer latente por vários anos, já tendo sido descrito manifestação da doença 62 anos após a contaminação (NGAUY, 2005).

### **2.5.2 Manifestações clínicas**

Nas infecções por *B. pseudomallei*, como nas infecções por outros microrganismos, as interações parasito-hospedeiro dependem, principalmente, da virulência da cepa, carga do inóculo e da resposta da imunidade do hospedeiro. Além desses fatores, outro fator importante para o desenvolvimento da melioidose é a existência de fatores de risco. A *diabetes mellitus* é citada na literatura com o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da melioidose, seguido por uso de álcool, doença pulmonar crônica e doença renal crônica, leucemia, linfomas e talassemias (HASSAN, et. al., 2010).

A doença apresenta um complexo e amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo infecções latentes, lesões cutâneas locais, pneumonia subaguda, abscesso, infecções músculo-esquelético e pneumonia fulminante letal (WHITE, et. al., 2003; CHENG, CURRIE, 2005; HASSAN, et. al., 2010).

A manifestação clínica mais freqüente é a septicemia, comumente associada com pneumonia e disseminação bacteriana de sítios distantes, como em abscessos hepáticos e esplênicos. A bacteremia e pneumonia acontecem em aproximadamente 50% dos pacientes com melioidose. Abscesso hepatoesplênico é relatado em 25% dos pacientes com melioidose na Tailândia, enquanto que nos pacientes da Austrália é relatado em apenas 6% dos pacientes (INGLIS, et. al., 2006; LIMMATHUROTSAKUL, et. al., 2010; PEACOCK, et. al., 2011).

Infecção por *B. pseudomallei* pode gerar osteomielite e artrite séptica, além disso, pústulas superficiais, abscessos subcutâneos e piomiosite são manifestações relativamente comuns, citadas na literatura, ocorrendo em aproximadamente 15-25% dos casos (CHENG, CURRIE, 2005).

Infecções do trato geniturinário são manifestações comuns da melioidose na Austrália, ocorrendo abscesso prostático em 18% dos pacientes do sexo masculino. É citado na literatura um caso de abscesso pélvico em paciente do sexo feminino e um

caso de aneurisma micótico causado por *B. pseudomallei* no Brasil (ROLIM, et. al., 2009; SIDRIM, et. al., 2010).

## 2.6 Diagnóstico Laboratorial

O isolamento e identificação de *B. pseudomallei* de espécimes clínicos continuam sendo a técnica padrão ouro para diagnóstico da melioidose. Inúmeras técnicas têm sido empregadas para reduzir o tempo de diagnóstico da doença, como detecção de antígenos e anticorpos a partir do espécime clínico e de culturas, além de técnicas moleculares.

Para manipulação de *B. pseudomallei* são recomendadas medidas de contenção de biossegurança 3, quando existe potencial risco de aerossolização do patógeno por causa do elevado risco de infecção adquirida em laboratório (LEE et al., 2007). A bactéria está incluída na categoria B de agentes críticos publicada em 2001 pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*).

### 2.6.1 Diagnóstico microbiológico

#### 2.6.1.1 Características morfológicas

*B. pseudomallei* é um bacilo Gram-negativo que mede 5  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura com extremidades arredondadas, é móvel, levemente curvo e não formador de esporos. A bactéria possui uma coloração bipolar, é vacuolizado e descrito com aparência de ``- alfinete de segurança -'' como mostrado na figura 2 (ASHDOWN, 1979; WUTHIEKANUM, et. al., 1996).

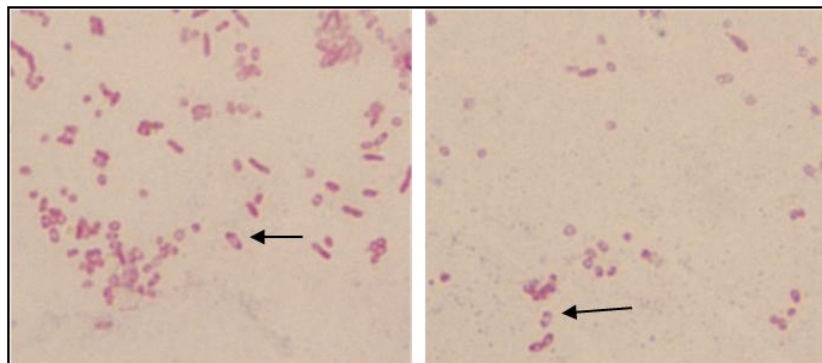
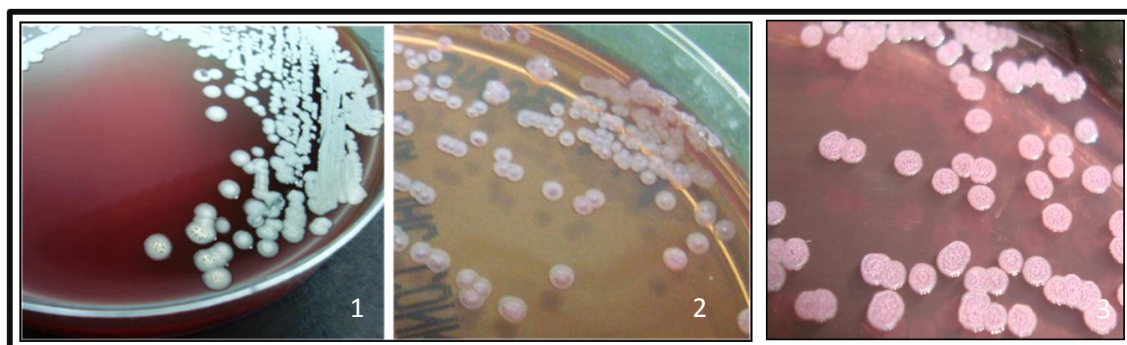


Figura 2. Esfregaço de material purulento aspirado de gânglio mediastinal corado pelo Gram apresentando bacilos Gram-negativos bipolares com aspecto semelhante a broche de segurança. Fonte: LAPERE 2010.



A bactéria possui crescimento rápido e capacidade de crescer em diferentes meios de cultura não seletivos e seletivos. As colônias podem variar de rugosa a mucóide, e a coloração é bastante variável, dependendo do meio de cultivo. Nos meios ágar sangue e chocolate as colônias apresentam coloração creme, e em ágar Ashdown, BPSA (meio seletivo para *Burkholderia pseudomallei*) e Mac Conkey as colônias apresentam coloração púrpura (VIRGÍNIO, 2005) como mostrado na figura 3. As colônias de *Burkholderia pseudomallei* apresentam um odor característico de “terra” (DANCE, et al., 1989).



**Figura 3** Crescimento de *B. pseudomallei* em ágar-sangue(1) apresentando colônias com aspecto seco de tonalidade branco-acinzentada, em ágar-MacConkey(2) ) colônias com aspecto ligeiramente rugoso e coloração púrpura e em ágar BPSA mostrando colônias rugosas de coloração púrpura (3). Fonte: LAPERE, 2011.

### 2.6.1.2 Características bioquímicas

A capacidade adaptativa de *B. pseudomallei* está relacionada com o seu grande potencial metabólico, sendo capaz de utilizar uma variedade de substratos, incluindo açúcares como, lactose, glicose, maltose e manitol (INGLIS, et., 2006).

*B. pseudomallei* é um microrganismo aeróbico, mas possui capacidade de realizar respiração anaeróbica, podendo sobreviver em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, e ainda utilizar nitratos para crescer sob condições anaeróbicas através de fosforiliação oxidativa (KANAI, et. al., 1994).

As espécies de *Burkholderia* são classificadas como não-fermentadoras de glicose, sendo os principais testes para identificá-las dentro do grupo de não-fermentadores: KIA (*Kliger Iron Agar*) ou TSI (*Triplíce Sugar Iron Agar*), com visualização de pico e fundo alcalinos para *B. pseudomallei* em ambos os meios, além da utilização da glicose em meio Oxidação-Fermentação (OF), redução de nitrato e

citocromo oxidase, tendo o microrganismo perfil bioquímico positivo para os testes citados (KONEMAN, 2001).

*B. pseudomallei* tem sido distinta em dois biótipos diferentes relacionados com a sua capacidade de assimilar oxidativamente a L- arabinose. Os biótipos capazes de assimilar a L-arabinose (ara +) são considerados avirulentas, sendo isolados predominantemente em amostras ambientais. Já os biótipos que não são capazes de assimilar a L-arabinose são considerados virulentos, sendo isolados em amostras clínicas e ambientais. Devido às diferenças no genótipo, fenótipo e patogenicidade, foi proposto que o biótipo avirulento (ara+) fosse denominado como uma nova espécie, *Burkholderia thailandensis*, devido à alta taxa de isolamento desse microrganismo em solos tailândenses . No Nordeste da Tailândia, onde a melioidose é freqüente, 75% dos isolados do solo são incapazes de assimilar a L-arabinose (ara-), enquanto na região central, onde a melioidose é incomum, a maioria dos isolados são avirulentas (ara+) (SMITH, et. al., 1997; INGLIS, et. al., 2001; WIERSINGA, et. al., 2006).

O isolamento do microrganismo pode ser realizado em meios de cultura, como ágar sangue, CLED (Cistina-lactose-eletrólito-deficiente), ágar chocolate e Mac Conkey, embora os meios Ashdown e BPSA sejam os meios seletivos para *B. pseudomallei*. O meio Ashdown é constituído por soja caseína, glicerol, cristal violeta e gentamicina, sendo os dois últimos agentes seletivos inibidores de microrganismos Gram-positivos, além do vermelho neutro que é incorporado às colônias em crescimento conferindo a cor púrpura característica das colônias neste meio. O BPSA (meio seletivo para *Burkholderia pseudomallei*) desenvolvido por Howard e Inglis (2006) é um meio seletivo para *B. pseudomallei* e inibe o crescimento de muitos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. (ASHDOWN, 1979; DANCE, et. al., 1989; WUTHIEKANUN, et. al., 1996; LIMMATHUROTSAKUL, et. al., 2010).

Além das características das colônias e as provas bioquímicos existem os sistemas semi-automatizados (API 20E, API 20NE) e automatizados (Vitek 2) que permitem a identificação de *B. pseudomallei* (DANCE, et. al., 1989; KOONEMAN, 2001).

A identificação de *B. pseudomallei* fora das regiões endêmicas é um grande desafio, podendo ocorrer identificação errônea do microrganismo. Isso se deve ao fato

de *B. pseudomallei* ser uma espécie estreitamente relacionada com outras espécies de *Burkholderia* em espécimes clínicos não-estéreis, além de algumas cepas *B. pseudomallei* apresentarem morfologia atípica de colônias. (INGLIS et al., 2005).

### 2.6.2 Diagnóstico sorológico

Os métodos imunológicos para identificação de *B. pseudomallei* podem ser divididos em dois grupos: os que detectam anticorpos e os que detectam antígenos. Os testes utilizados incluem ensaio de hemaglutinação indireta, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), imunocromatografia e ensaio de imunofluorescência. Vale ressaltar que o valor diagnóstico sorológicos é questionável em áreas endêmicas, devido à alta soropositividade da população saudável, além da ocorrência de reações cruzadas com outros microrganismos (CHENG, et. al., 2011;. NUTI, et. al., 2011; PEACOCK, et. al., 2011).

Inquérito sorológico realizado por Rolim e colaboradores (2011) em dois municípios cearenses acometidos por melioidose, mostraram alta soropositividade em indivíduos que vivem nestas áreas. Anticorpos IgM e IgG contra *B. pseudomallei* foram encontrados em 51,27% e 58.49%, respectivamente, de um total de 317 amostras.

Antígenos também podem ser pesquisados nas colônias suspeitas de *B. pseudomallei* isoladas de espécimes clínicos para uma rápida identificação, como o teste de aglutinação em látex com anticorpos monoclonais contra a proteína 30kDa de *B. pseudomallei* (PONGSUNK et al., 1999). Testes para detecção direta de antígenos foram desenvolvidos em laboratórios de pesquisa na Tailândia para serem usados em espécimes clínicos, tais como escarro, urina ou secreções purulentas (ISMAIL et al., 1987). Para detecção de antígenos em espécimes clínicos, a imunofluorescência, é uma das metodologias empregadas com uma sensibilidade e especificidade, comparadas à cultura como padrão ouro, de 66% e 99,5%, respectivamente. Apesar dos estudos publicados sobre a detecção de antígenos de *B. pseudomallei*, não existem, até hoje, kits comerciais disponíveis para este fim, sendo utilizados apenas em laboratórios de referência (SPRAGUE; NEUBAUER, 2004).

### 2.6.3 Diagnóstico molecular

O diagnóstico precoce de melioidose é fundamental para sobrevivência do paciente, e os atrasos no diagnóstico são responsáveis pelas altas taxas de mortalidade. Técnicas moleculares, como a PCR, são métodos rápidos, simples e específicos, que envolvem a amplificação de sequências específicas de DNA de regiões conservadas (MERRIT, et. al., 2006; GRISHKINA, SAMYGIN, 2010).

Reações de PCR são descritas para identificação de *B. pseudomallei*, onde os principais alvos são 16S do DNA ribossômico nuclear (DNAr), 23S DNAr, região intergênica 16S-23S DNAr (também denominada de ITS - *internal transcribed spacer*), o gene flagelina C (*flicC*), o gene da subunidade protéica ribossomal 21S (*rspU*), o gene da síntese de lipopolissacarídeos tipo II (LPS), um SNP (*single nucleotide polymorphism*) e genes que codificam o sistema de secreção do tipo III em *B. pseudomallei*. (GAL, et. al., 2005). Couto e colaboradores (2009) reportaram o diagnóstico de *B. pseudomallei* diretamente de um lavado broncoalveolar por PCR através da detecção de um espaçador 16-23S.

A técnica de PCR em tempo real tem demonstrado vantagens quanto à sensibilidade e rapidez em relação à técnica de PCR convencional. Por conta disso, essa técnica está sendo cada vez mais utilizada por diversos autores para detecção molecular de *B. pseudomallei*, onde o principal alvo citado na literatura é o sistema de secreção tipo III (SUPAPRON, et. al., 2007).

### 2.7 Tratamento e perfil de sensibilidade

A terapia com antimicrobianos adequados deve ser iniciada na suspeita de melioidose, visto que terapias inadequadas ou não instituídas rapidamente são responsáveis por altas taxas de mortalidade da doença. As cepas de *B. pseudomallei* são intrinsecamente resistentes a muitos antibióticos, notadamente penicilina e outros  $\beta$ -lactâmicos, eritromicina e gentamicina. Além de possuir resistência relativa à quinolonas e macrolídeos, limitando as opções terapêuticas para o tratamento da melioidose. Os antimicrobianos atualmente recomendados para tratar melioidose são ceftazidima, imipenem, meropenem, amoxicilina/clavulanato, cefoperazona/sulbactam,

sulfametoxazol/trimetoprim, doxiciclina e cloranfenicol (GALYOV, et al., 2010; LIMMATHUROTSAKUL, et. al., 2010; PEACOCK, et. al., 2011).

O tratamento da melioidose é dividido em duas fases: a fase inicial intravenosa, que pode durar de 10 a 14 dias ou até o aparecimento de resposta clínica e a fase oral, que pode durar de dois a seis meses. Os antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) ou a ceftazidima são reconhecidos como o tratamento de escolha para melioidose. A terapia oral consiste na administração de sulfametoxazol/trimetoprim isolado ou em combinação com doxiciclina. A amoxicilina combinada com ácido clavulânico pode ser uma alternativa para pacientes com intolerância a sulfametoxazol/trimetoprim, além de ser a terapia de primeira escolha para crianças e mulheres grávidas na Tailândia, apesar de existir um risco aumentado de recaídas quando comparado ao tratamento com sulfametoxazol/trimetoprim (LEELARAMASE, 2004; WUTHIEKANUN, et. al., 2005).

*B. pseudomallei* não só é resistente à terapia com muitos antibióticos, mas clinicamente falha em responder às drogas em que é susceptível *in vitro*. É citado na literatura casos de resistência a antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose, como a ceftazidima e sulfametoxazol/trimetoprim. A resistência a ceftazidima é citada como sendo causa a produção de  $\beta$ -lactamases da classe A e D (HO, et. al., 2002). O sequenciamento do genoma de *B. pseudomallei* revelou a presença de genes de  $\beta$ -lactamase de classe A, C e D, e que a resistência a  $\beta$ -lactâmicos desenvolvida em cepas de *B. pseudomallei* está relacionada com mutações nos genes *pen A* e *oxa* relacionados com a produção de  $\beta$ -lactamases da classe A e D (CHING SAM, et al., 2009; KUNG, et. al., 2010; ESTES, et. al., 2010; RHOLL, et al, 2011).

Maior atenção tem sido focada para o papel dos biofilmes na proteção de *B. pseudomallei* contra a ação dos antibióticos. Sawasdidoln e colaboradores (2010) citam que as *B. pseudomallei* pode ser até 200 vezes mais resistentes quando em biofilme do que quando na forma planctônica. Combinações de antibióticos contra *B. pseudomallei* em biofilmes tem-se mostrado efetivas, como: ciprofloxacina-claritromicina, ciprofloxacina-azitromicina e imipenem-azitromicina. Contudo, a relevância clínica desses tratamentos ainda não é bem conhecida (CHENG; CURRIE, 2005; SAWASDIDOLN, et. al., 2010

A sensibilidade bacteriana a antimicrobianos pode ser avaliada *in vitro* por métodos laboratoriais qualitativos e quantitativos. Dentre essas técnicas, podemos citar o método de difusão em disco, uma técnica qualitativa que se baseia na inibição bacteriana ao longo do gradiente de difusão da droga em ágar-Mueller-Hinton a partir do disco de papel impregnado com droga a ser testada. As técnicas quantitativas incluem a microdiluição e a macrodiluição em caldo. A microdiluição em caldo é uma técnica que utiliza placas estéreis de 96 poços com o fundo em formato de “U”, na qual concentrações seriadas da droga serão testadas, sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo considerado como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A técnica de macrodiluição em caldo possui o mesmo princípio da técnica de microdiluição, a diferença é que a primeira é realizada em tubos (CLSI, 2009).

O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) é uma organização responsável pela criação de normas de referência que garantem a padronização técnica dos testes de sensibilidade a microrganismos, tratando de assuntos como a seleção e preparação dos agentes antifúngicos, a interpretação dos testes, bem como, o uso de testes de controle de qualidade, facilitando assim a comunicação e padronização entre os diversos laboratórios na utilização dessas técnicas. O CLSI padroniza a técnica de microdiluição em caldo através documentos M7-A8 de 2009.

## **2.8 Novas Estratégias Terapêuticas**

O desenvolvimento de resistência de *B. pseudomallei* a antibióticos utilizados na prática clínica está sendo cada vez mais constante, por isso é necessário a busca de novas drogas para complementar o arsenal terapêutico para tratamento da melioidose.

Alguns trabalhos vêm demonstrando a atividade *in vitro* de drogas sob cepas de *B. pseudomallei*, como o doripenem o qual demonstrou uma atividade antimicrobiana comparável a atividade obtida por drogas já utilizadas no tratamento da melioidose, como o imipenem e meropenem. Outras drogas como, ertapenem, tigeciclina estão apresentando atividade *in vitro* contra *B. pseudomallei*, porém não existe ainda um *break point* para essas drogas (THAMLIKITKUL; TRAKULSOMBOON, 2009; SAM, et. al., 2010; HARRIS, et. al., 2011).

A atividade antimicrobiana de peptídeos contra *B. pseudomallei* é citada na literatura como uma promissora alternativa terapêutica contra microrganismos resistentes (SIM, et. al., 2011). Kanthawong e colaboradores (2011) demonstraram que os peptídeos LL-37 e LL-31 possuem atividade antimicrobiana contra cepas de *B. pseudomallei*.

O farnesol é um álcool sesquiterpeno presente em muitos óleos essenciais de plantas, como por exemplo, *Pucea dioscorides* e *Pittosporum undulatum*, possivelmente para proteger do ataque de predadores (GRACE, 2002; MEDEIROS, et. al., 2003). Este composto é capaz de inibir *in vitro* alguns microrganismos, como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Paracoccidioides brasilienses*, sinalizando o seu potencial antimicrobiano (KOO et al., 2002; INOUE, et al., 2004; JABRA-RIZK, et al., 2006; DERENGOWSKI, et al., 2009).

Alguns estudos têm demonstrado a capacidade do farnesol em aumentar a sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, indicando uma possível ação como coadjuvante terapêutico, além da sua atividade antimicrobiana contra bactérias em biofilme (JABRA-RIZK, et.al., 2006; UNNANUNTANA et. al., 2009). Cugini e colaboradores (2007) relataram a ação do farnesol de redução da produção do sinal de quinolona pseudomanas (PQS) em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Kuroda e colaboradores (2007) avaliaram a combinação do farnesol com antimicrobianos frente a cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) e MSSA (*S. aureus* sensíveis a meticilina), além de avaliar a influência do farnesol sobre a expressão das PBPs (proteínas de ligação a penicilinas) e a produção de  $\beta$ -lactamases. Os autores observaram redução de 256 vezes do CIM quando ampicilina foi combinada com o farnesol em cepas de *S. aureus* produtoras de  $\beta$ -lactamases, enquanto o CIM reduziu apenas 24 vezes em cepas de *S. aureus* não produtoras de  $\beta$ -lactamases. Os autores observaram ainda a maior produção de  $\beta$ -lactamases em cepas que foram incubadas com farnesol através da quantificação da enzima por meios colorimétricos, efeito este que não foi observado em cepas incubadas na ausência do farnesol.

Akiyama e colaboradores (2002) observaram a ação inibitória do farnesol sobre cepas de *S.aureus* e sua ação coadjuvante quando combinado com  $\beta$ -lactâmicos. O

álcool sesquiterpeno foi capaz de diminuir a concentração dos  $\beta$ -lactâmicos em até dez vezes quando combinadas com o farnesol.

Além da ação antibacteriana do farnesol, o composto atua como potente agente antifúngico frente ao fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Derengowski et al., 2009), e ainda possui efeito citotóxico em *Candida albicans*, em determinadas concentrações e condições ambientais (LANGFORD ET al., 2010). O composto atua como precursor na via de biossíntese de esteróis isoprenóides em *Candida albicans* (HORNBY et al., 2001; CHO et al., 2008). Estudos revelaram que este atua como uma molécula *quorum-sensing* estando envolvido na inibição da filamentação (HORNBY et al., 2001; CHO et al., 2008), na formação de biofilmes (GORDON et al., 2002; JABRA-RIZK et al., 2006) e, mais recentemente, foi demonstrado que este composto também apresenta papel importante na resistência ao estresse oxidativo (DEVEAU et al., 2010). Acredita-se que essa característica desempenhe um papel importante em *C. albicans* na redução da competição de outros microrganismos (SEMIGHINI et al., 2006).

Navarathna e colaboradores(2007) através de estudos *in vivo* demonstraram que a administração de farnesol teve efeito tóxico insignificante sobre os ratos, independentemente da via de administração ou concentração do farnesol, não houve diarreia ou mortalidade. Além disso, não houve diferenças significativas no ganho de peso ou consumo de água, durante em um período de observação de 14 dias.



### **3 PERGUNTAS DE PARTIDA**

1. *B. pseudomallei* possui a capacidade de produzir melanina *in vitro*?
2. O composto farnesol isoladamente e em combinação com antimicrobianos possuem atividade inibitória *in vitro* frente as cepa de *B. pseudomallei*?

## 4.0 HIPÓTESES

1. Cepas de *B. pseudomallei* produzem melanina *in vitro* quando submetidas a meios contendo substratos fenólicos,
2. O farnesol e suas combinações com antimicrobianos possuem atividade inibitória *in vitro* frente às cepas de *B. pseudomallei*.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de melanina em cepas de *B. pseudomallei*, analisando a sensibilidade de cepas melanizadas e não melanizadas frente a antimicrobiano *in vitro*, assim como determinar a sensibilidade de cepas de *B. pseudomallei* frente ao farnesol e suas combinações com antimicrobianos.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Verificar a presença do gene *hppD* que codifica a produção de um precursor da melanina em cepas clínicas e ambientais de *B. pseudomallei*;
2. Verificar o padrão fenotípico de cepas clínicas e ambientais de *B. pseudomallei* frente aos meios de cultura contendo substratos fenólicos, tais como BHI (*Brain Heart Infusion*) adicionado de ácido caféico e ágar semente de Niger;
3. Avaliar a sensibilidade de cepas de *B. pseudomallei* melanizadas e não melanizadas frente ao imipenem e realizar curva de morte;
4. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do farnesol frente a cepas de *B. pseudomallei*;
5. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do farnesol em combinação com agentes  $\beta$ -lactâmicos frente a cepas de *B. pseudomallei*.

## 6.0 CAPÍTULO I

### Artigo aceito para publicação pelo periódico Antimicrobial

#### Agents and Chemotherapy:



## Sesquiterpene Farnesol Contributes to Increased Susceptibility to $\beta$ -Lactams in Strains of *Burkholderia pseudomallei*

R. S. N. Brilhante,<sup>a</sup> L. G. A. Valente,<sup>a</sup> M. F. G. Rocha,<sup>a,b</sup> T. J. P. G. Bandeira,<sup>a</sup> R. A. Cordeiro,<sup>a</sup> R. A. C. Lima,<sup>a</sup> J. J. G. Leite,<sup>a</sup> J. F. Ribeiro,<sup>a</sup> J. F. Pereira,<sup>a,b</sup> D. S. C. M. Castelo-Branco,<sup>a</sup> A. J. Monteiro,<sup>c</sup> and J. J. C. Sidrim<sup>a</sup>

Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil<sup>a</sup>; Veterinary School, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil<sup>b</sup>; and Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil<sup>c</sup>

This study aimed to evaluate the *in vitro* combination of farnesol and  $\beta$ -lactams against *Burkholderia pseudomallei*. A total of 12  $\beta$ -lactamase-positive strains were tested according to CLSI standards. All strains were inhibited by farnesol, with MICs ranging from 75 to 150  $\mu$ M. The combination of this compound with  $\beta$ -lactams resulted in statistically significant  $\beta$ -lactam MIC reduction ( $P \leq 0.05$ ). This study provides new perspectives for the use of farnesol combined with  $\beta$ -lactam antibiotics against strains of *B. pseudomallei*.

*Burkholderia pseudomallei* is a Gram-negative bacillus that causes melioidosis, a severe and potentially fatal disease endemic to Southeast Asia and hyperendemic to northern Australia (2, 17).

Some antibiotics currently recommended for the treatment of melioidosis are ceftazidime, imipenem, meropenem, amoxicillin-clavulanate, cefoperazone-sulbactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, doxycycline, and chloramphenicol (17). However, *B. pseudomallei* has developed resistance to these drugs (14, 15, 17, 18); hence, it is necessary to search for new agents that are effective against this microorganism.

The sesquiterpene alcohol farnesol is present in many essential oils of plants, such as *Pluchea dioscoridis* and *Pittosporum undulatum*, possibly to protect against attack by predators (5, 12). Farnesol has also been detected in the supernatant of *Candida albicans* broth cultures, as it is a quorum-sensing molecule of this fungal species (11).

Moreover, farnesol is able to inhibit some microorganisms, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Paracoccidioides brasiliensis*, indicating its potential antimicrobial activity (4, 6–9), which has also been demonstrated against bacterial bio-

concentration ranges were from 0.25 to 128 mg/ml for amoxicillin (Roche, Brazil), from 0.25/0.125 to 128/64 mg/ml for amoxicillin-clavulanate (Roche, Brazil), from 0.0312 to 16 mg/ml for imipenem (Roche, Brazil), and from 2 to 1,024 mg/ml for ampicillin (Ariston, Brazil) and oxacillin (Ariston, Brazil) (3). The aminoglycosides gentamicin and amikacin (Roche, Brazil) were tested in the ranges of 64 to 0.125 mg/ml and were used as controls. For farnesol (*E,E*-farnesol; Sigma-Aldrich, Brazil), a concentration of 0.585 to 300  $\mu$ M was used for all samples. The inocula were prepared with saline solution after 24 h of colony growth in Mueller-Hinton agar, and they were adjusted to 0.5 on the McFarland scale and diluted to 1:100, resulting in  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Plates were read after 24 h of incubation. The MIC was defined as the lowest concentration able to inhibit 100% of growth (3). After obtaining the MICs of the individual drugs, the antibiotics were combined with farnesol. For the combination assay, sub-MIC concentrations of farnesol and antibacterial drugs were used. The initial concentration of drugs in combination was the MIC obtained for each individual isolate. Then, successive drug dilutions were performed, reaching a final concentration that was 256 times lower than the final concentration of the drug alone. Statistical analysis was per-

films (16). Some studies have shown the ability of farnesol to increase the susceptibility of microorganisms to antimicrobials, indicating possible applicability as an adjuvant drug (7). Brehm-Stecher et al. (1) reported increased susceptibility of *S. aureus* to ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, and vancomycin, as well as of *Escherichia coli* to polymyxin B, when these drugs were combined with farnesol. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* activity of farnesol, alone and in combination with  $\beta$ -lactams, against strains of *B. pseudomallei*.

We used 12 strains of  $\beta$ -lactamase-producing *B. pseudomallei*, stored in the Laboratory of Emerging and Reemerging Pathogens (LAPERE) of the Federal University of Ceará. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and  $\beta$ -lactamase-negative *S. aureus* were used as experimental controls. Susceptibility testing was performed by the broth dilution method, as standardized by CLSI, described in document M07-A8 (3). The medium used was Mueller-Hinton broth (Difco, USA), and the

formed using Student's *t* test for paired samples, with 5% significance.

In this study, all tested *B. pseudomallei* strains were susceptible to farnesol, with MICs ranging from 75 to 150  $\mu$ M. To our knowledge, the antimicrobial activity of farnesol against *B. pseudomallei* has not been reported previously, although studies have confirmed the inhibitory effect of farnesol on the growth of different microorganisms (4, 6–9, 13). Despite the high virulence of *B. pseudomallei*, the farnesol MICs found in this study are lower than those reported for other bacteria, such as *S. aureus*, which was

Received 9 October 2011 Returned for modification 6 November 2011

Accepted 15 January 2012

Published ahead of print 30 January 2012

Address correspondence to R. S. N. Brilhante, brilhante@ufc.br.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05885-11

TABLE 1 Increased antimicrobial susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* and MRSA strains treated with farnesol<sup>a</sup>

Strain	MIC ( $\mu$ g/ml) without/with farnesol (fold ratio of increased susceptibility by farnesol) for:						
	AMOX	AMOX + CLA	OXA	AMP	IMI	AMI	GEN
<i>B. pseudomallei</i>							
03-6-033	>128/16 (>8)	8/4, 1/0.5 (8)	256/64 (4)	64/16 (4)	0.25/0.125 (2)	16/16	32/32
03-6-034	>128/16 (>8)	32/16, 0.5/0.25 (64)	256/64 (4)	128/32 (4)	0.5/0.25 (2)	32/32	32/32
03-6-035	64/16 (4)	8/4, 0.5/0.25 (16)	64/16 (4)	64/16 (4)	0.5/0.25 (2)	32/32	32/32
03-6-036	>128/16 (>8)	8/4, 0.5/0.25 (16)	128/64 (2)	128/64(2)	0.5/0.25 (2)	32/32	32/32
03-6-037	128/16 (8)	8/4, 1/0.5 (8)	128/32 (4)	128/64 (2)	0.5/0.25 (2)	32/32	32/32
03-6-038	128/16 (8)	16/8, 2/1 (8)	1,024/16 (64)	1,024/128 (8)	1/1	32/32	32/32
05-3-008	64/16 (4)	8/4, 1/0.5 (8)	1,024/16 (64)	1,024/256 (4)	0.25/0.25	16/16	16/16
05-3-009	64/16 (4)	4/2, 0.5/0.25 (8)	1,024/16 (64)	1,024/256 (4)	0.5/0.5	16/16	32/32
05-3-010	128/16 (8)	16/8, 1/0.5 (16)	256/8 (32)	256/256 (1)	0.5/0.5	64/64	64/64
03-6-039	128/32(4)	8/4, 2/1 (4)	1,024/64 (16)	1,024/256 (4)	0.25/0.25	32/32	8/8
03-6-040	>128/32 (>4)	8/4, 2/1 (4)	512/32 (16)	512/256 (2)	0.5/0.5	128/128	8/8
03-6-041	128/8 (16)	8/4, 2/1 (4)	1,024/128 (8)	1,024/512 (2)	1/1	16/16	16/16
MRSA	1,024/32(32)	32/16, 16/8 (2)	1,024/32 (32)	1,024/64 (16)	1,250/1,250		
$\beta$ -Lactamase-negative <i>S. aureus</i>	2/2	0.5/0.25, 0.5/0.25	0.25/0.25	0.25/0.125 (2)	4/4		

<sup>a</sup> AMOX, amoxicillin; CLA, clavulanic acid; OXA, oxacillin; AMP, ampicillin; IMI, imipenem; AMI, amikacin; GEN, gentamicin.

shown to be susceptible to farnesol at concentrations equal to or greater than 1,000  $\mu$ M (1).

Another important finding of this study was a statistically significant reduction in the MICs for amoxicillin ( $P = 0.0001$ ), ampicillin ( $P = 0.0026$ ), and oxacillin ( $P = 0.0001$ ), when combined with farnesol, which decreased the MICs up to eight times for amoxicillin and up to three times for ampicillin and oxacillin. The triple combination of amoxicillin-clavulanate ( $P = 0.0005$ ) and farnesol resulted in MIC reductions of up to five times. The combination of farnesol and imipenem ( $P = 0.0105$ ) showed a more discrete reduction compared to the other  $\beta$ -lactams, possibly because imipenem already has strong antimicrobial activity against strains of *B. pseudomallei* and its association with other drugs contributes little to its effectiveness. In contrast, the MIC values of the aminoglycosides amikacin and gentamicin against *B. pseudomallei* did not change when they were combined with farnesol. Additionally, the combination of farnesol with  $\beta$ -lactams against the MRSA strains resulted in reductions of up to six times in the MICs of amoxicillin and oxacillin and up to five times in the MICs of ampicillin. On the other hand, there was no reduction in  $\beta$ -lactam MICs after combination with farnesol against strains of  $\beta$ -lactamase-negative *S. aureus*.

*domallei*, but it is necessary to perform further *in vivo* studies to evaluate the effectiveness of these combinations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel - CAPES (PNPD process no. 2103/2009).

#### REFERENCES

- Brehm-Stecher BF, Johnson EA. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3357–3360.
- Cheng AC, Currie BJ. 2005. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:383–416.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. CLSI document M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Derengowski LS, et al. 2009. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8:13.
- Grace MH. 2002. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. *Phytother Res.* 16:183–185.

#### *B. pseudomallei* negative control

Regarding the mechanism of action of farnesol against *B. pseudomallei*, these results show that it may act by inhibiting the secretion of  $\beta$ -lactamases or impairing their activity or by interfering with the synthesis of cell wall, as demonstrated by Kuroda et al. (10). These authors observed a lower production of  $\beta$ -lactamases by MRSA strains previously incubated with farnesol. Additionally, they also demonstrated the effects of farnesol on the bacterial cell wall, in which the compound interferes with the biosynthesis of peptidoglycan by inhibiting the synthesis of a lipid carrier (undecaprenyl-C55) responsible for the transport of murein, which is a peptidoglycan monomer precursor (10). Therefore, through the interference with cell wall biosynthesis, farnesol may potentiate the effect of  $\beta$ -lactams, requiring lower antibacterial concentrations to promote cell death.

This study provides new perspectives for the use of farnesol combined with  $\beta$ -lactam antibiotics against strains of *B. Pseu-*

6. Inoue Y, et al. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 237:325–331.
7. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirliff ME. 2006. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1463–1469.
8. Jabra-Rizk MA, Shirliff M, James C, Meiller T. 2006. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res.* 6:1063–1073.
9. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1302–1309.
10. Kuroda M, Nagasaki S, Ohta T. 2007. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to  $\beta$ -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:425–432.
11. Langford ML, Kenneth SH, Nickerson W, Atkin AL. 2010. Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:940–942.

#### Increased $\beta$ -Lactam Susceptibility in *B. pseudomallei*

12. Medeiros JR, Campos LB, Mendonça SC, Davin LB, Lewis NG. 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pitopsis undulatum*. *Phytochemistry* 64:561–565.
13. Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD. 2006. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol. Microbiol.* 59:753–764.
14. Thamlikitkul V, Trakulsomboon S. 2009. *In vitro* activity of doripenem against *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3115–3117.
15. Thibault FM, Hernandez E, Vidal DR, Girardet M, Cavallo JD. 2004. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:1134–1138.
16. Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirliff ME, Greenfield EM. 2009. The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. *J. Bone Joint Surg. Am.* 91:2683–2692.
17. White NJ. 2003. Melioidosis. *Lancet* 361:1715–1722.
18. Wuthiekanun V, et al. 2005. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:1029–1031.



## 7.0 CAPÍTULO II

### Artigo submetido ao periódico *Microbiology*.

#### Detection of the gene *hppD* in strains of *Burkholderia pseudomallei* from Ceará state, Brazil

R.S.N. Brilhante<sup>1,2,3\*</sup>, L.G.A. Valente<sup>1,3</sup>, M.F.G. Rocha<sup>1,3,4</sup>, T.J.P.G.Bandeira<sup>1,3,5</sup>, A.J. Monteiro<sup>6</sup>, R.A. Cordeiro<sup>1,2,3</sup>, R.A.C. Lima<sup>1,3</sup>, J.J.G. Leite<sup>1,2</sup>, J.F.Pereira<sup>1,2</sup>, J.F. Ribeiro<sup>1,3</sup>, D.S.C.M. Castelo-Branco<sup>1,3</sup> and J.J.C. Sidrim<sup>1,2,3</sup>..

1] Specialized Medical Mycology Centre, Postgraduate Programme in Medical Microbiology, Federal University of Ceará

2] Postgraduate Programme in Medical Sciences, Federal University of Ceará

3] Postgraduate Programme in Medical Microbiology, Federal University of Ceará

4] Postgraduate Programme in Veterinary Science, State University of Ceará,

5] LabPasteur Laboratory and Health, Fortaleza, Ceará Brazil.

6] Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará

**Running title:** Melanin production by *B. pseudomallei*

Corresponding author. Mailing address: Rua Barão de Canindé, 210, Montese. CEP: 60.425-540 Fortaleza CE, Brazil. Phone: 55 [85] 3214-2853. Fax: 55 [85] 3295-1736. E-mail: brilhante@ufc.br.

## **Abstract**

*Burkholderia pseudomallei* is a Gram-negative bacillus with a variety of virulence factors that allow its persistence *in vivo* and contributes for the development of melioidosis. These factors are intrinsic to the microorganisms and vary remarkably among different strains. This study detected the gene *hppD*, responsible for the production of the melanin precursor HGA (4-hydroxy-phenylpyruvic acid dioxygenase), in *B. pseudomallei* strains, and evaluated the production of this pigment by these microorganisms, when grown on a medium containing phenolic substrates. Furthermore, the antimicrobial susceptibility to imipenem, the drug of choice for the treatment of melioidosis, and the death dynamics of melanized and non-melanized strains were compared. The gene *hppD* was detected in all *B. pseudomallei* strains and melanin production was observed in the medium containing phenolic substrates. The non-melanized and melanized strains showed no differences between the MICs, but the melanized strains demonstrated greater survivability when in contact with the drug.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, melanin, gene *hppD*, susceptibility, imipenem, virulence.

## **Introduction**

*Burkholderia pseudomallei* is a Gram-negative bacillus that causes melioidosis, a severe and often fatal infectious disease. It can be caused by inoculation, inhalation and ingestion of the microorganism that is widely distributed in the environment (Cheng & Currie, 2005).

Melioidosis has been reported in the tropics between the latitude of 20 °N and 20 °S, mainly covering Southeast Asia, Northeast Thailand and Australia (Inglis et al., 2006). In Brazil, melioidosis is considered an emerging disease, that was first described in 2003 in the Northeastern part of the country in the State of Ceará (Rolim et al., 2003; Sidrim et al., 2011).

*B. pseudomallei* has an arsenal of virulence factors that allow its escape from the hosts' defense mechanisms contributing for its *in vivo* survival (Galyov et al., 2010). Several studies have shown that these factors are intrinsic to the microorganisms and



vary remarkably among different strains. Recently, the ability to produce melanin was reported as an important virulence factor of *B. cenocepacia* species, as it was shown to increase resistance to oxidative stress and the intracellular survivability of the organism. Melanin production in *B. cenocepacia* is associated with the synthesis of 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase (HGA), an essential precursor of this pigment in this bacterial species, which is encoded by the gene *hppD* (Keith et al., 2007). Melanization is considered important in microbial pathogenesis and it has been associated with virulence in many microorganisms, such as fungi, bacteria and helminths (Frasces et al., 2007). Although melanin is not essential for microbial survival, it increases their survivability by inhibiting biofilm degradation, acting against hydrolytic enzymes and protecting DNA and other molecules from ultraviolet light, which ensures survival in the environment (Nosanchuk et al., 2006).

In this study, we investigated the presence of the *hppD* gene, which encodes the melanin precursor HGA in strains of *B. pseudomallei* and also the phenotypical expression of melanin in a medium containing phenolic substrates. Furthermore, we evaluated the susceptibility of melanized and non-melanized *B. pseudomallei* strains to imipenem and the resulting death dynamics.

## **Materials and Methods**

**Microorganisms:** Twenty strains of *B. pseudomallei* (ten environmental isolates and ten clinical isolates) were used. All strains were stored in the bacterial collection of the Laboratory of Emerging and Re-emerging Pathogens (LAPERRE) of the Federal University of Ceará. The strain of *Candida albicans* ATCC 10231 was used as negative control and the strain *Cryptococcus neoformans* CEMM 05-2-076 as positive control for the evaluation of the *in vitro* production of melanin and its staining.

***hppD* gene amplification by PCR:** The following primers were used: 2379 (5'-AAAATCTAGAGTCGGCACCGACGGCTTC3') and 2380 (5'-AAAATCTAGAGGATGTTTCAGCTCCATCGGG-3'). The reaction was conducted in a final volume of 10  $\mu$ L, containing 1  $\mu$ L of DNA (100 ng/ $\mu$ L), 2.5 mL of 10X reaction buffer (New England Biolabs, UK), 1 mmol/L of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA), 50 pmol of each primer 2379 and 2380 (Invitrogen, USA), 10 mmol/L of each

deoxyribonucleotide and 1 U Taq DNA polymerase (New England Biolabs, UK). The gene amplification was performed in an *hppD* MultiGene thermocycler (Labnet, USA), performing a touchdown PCR reaction with initial denaturation step at 95 °C, for 2 minutes, annealing at 62 °C for 1 minute and extension at 72 °C for 1 minute, followed by touchdown to 65 °C to -1 °C/cycle for a total of 10 cycles, continuing with 21 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute, annealing at 55 °C, for 1 minute and extension at 72 °C for 1 minute. Finally, a final extension at 72 °C for 8 minutes was carried out. After amplification, the product was stored at -20 °C until the time of running on 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide and was displayed on a transilluminator (Keith et al., 2007).

**Detection of melanin by phenotypical methods:** The strains of *B. pseudomallei* were placed on BHI agar supplemented with caffeic acid (Difco, USA). Müller Hinton agar (Difco, USA) was used as a negative control because it has no precursor for melanin production. The plates were incubated at 37 °C for 10 days to demonstrate the presence or absence of pigment (Keith et al., 2007; Teixeira et al., Tendolkar et al., 2003).

**Fontana-Masson staining for melanin demonstration.** Smears of *B. pseudomallei*, *C. albicans* and *C. neoformans* obtained from the media containing phenolic substrates and Müller Hinton agar were stained by the Fontana-Masson method to evidence the presence of melanin, as described by Fontana-Masson (CLSI, 2009; Known-Chung et al., 1981). We used the *Cryptococcus neoformans* CEMM 05-2-076 strain as positive control and the *Candida albicans* ATCC 10231 strain as negative control.

**Evaluation of antimicrobial susceptibility against the melanized and non-melanized strains:** The melanization of the strains was performed in BHI supplemented with caffeic acid and the non-melanized strains were used as controls and placed on Müller Hinton agar. The melanized and non-melanized cultures were incubated at 35 °C for 24, 48 and 72 hours. At each interval the broth microdilution test was performed, as described by the document M100-S19 from the CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). Imipenem was used for the test at a concentration ranging from 0.625 to 32 mg/mL. The microdilution plates were read after 24 hours of incubation (Duin et al., 2002).

**Death dynamics induced by imipenem of melanized and non-melanized strains:** In order to evaluate the death dynamics after exposure to imipenem, we used 12 randomly chosen strains of *B. pseudomallei*. The previously melanized and non-melanized strains were exposed to imipenem at three different concentrations (0.5, 0.25 and 0.125 mg/mL), through broth microdilution methodology, as mentioned above. The cultures were incubated with the drug for 1 to 2 hours at 35 °C. After this period, aliquots of the bacterial suspensions were plated on Müller Hinton agar with a calibrated bacteriological loop of 0.01 µL and incubated at 35 °C for 24 hours in order to perform UFC counting (Duin et al., 2002).

**Statistical analysis:** The results obtained for the melanized and non-melanized strains against imipenem were statistically analyzed through the Student-t test.

## **Results**

The *hppD* gene was found in all 20 strains of *B. pseudomallei* used in the present study. Fragments of approximately 300 bp were observed (Figure 1).

Pigment production was noted in the *B. pseudomallei* strains on BHI agar supplemented with caffeic acid. As for the control strains *Cryptococcus neoformans* CEMM 05-2-076 and *Candida albicans* ATCC 10231, the brownish pigment was present and absent, respectively.

The bacillus presented a brown color in the strains of *B. pseudomallei* that were subcultured on BHI agar supplemented with caffeic acid. This was not observed when they were subcultured on Müller Hinton agar, which was used as negative control (Figure 2).

No difference was observed between the MICs of imipenem against the melanized and the non-melanized strains. MICs values ranged from 0.25 to 1 µg/mL. The average cell count of the melanized strains, after 1 hour in contact with the drug, was  $3.48 \times 10^6$  cells, whereas the average count for the non-melanized cells was  $1.47 \times 10^6$  cells. Similar result was observed after 2 hours, with an average melanized count of  $4.12 \times 10^6$  cells and the average non-melanized count of  $2.43 \times 10^6$  cells. The Student-t test for paired samples showed that the number of non-melanized cells was smaller than the number of melanized cells, after 1 (P=0.0001) or 2 (P=0.0025) hours of exposure to imipenem (Figure 3).

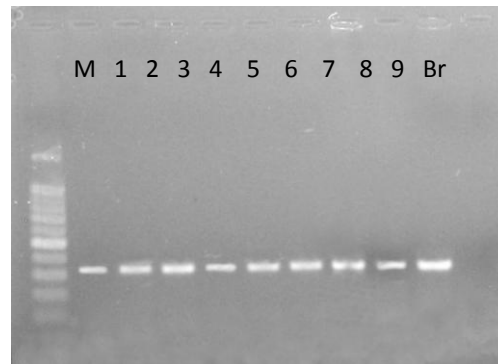


Figure 1. Representative gel of the amplification of the gene *hppD*, demonstrating 300bp fragments. M: 100 bp marker; 1 to 9: samples of *B. pseudomallei*; NC: negative control.

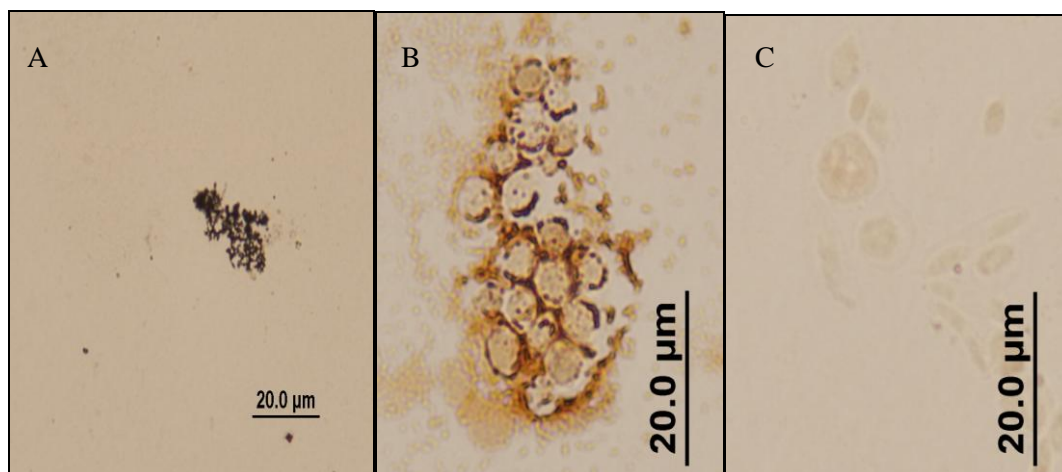


Figura 2. Fontana-Masson staining showing the production of melanin, after growth of a) *B. pseudomallei*; b) *Cryptococcus neoformans* and c) *Candida albicans* on BHI agar supplemented with caffeic acid.

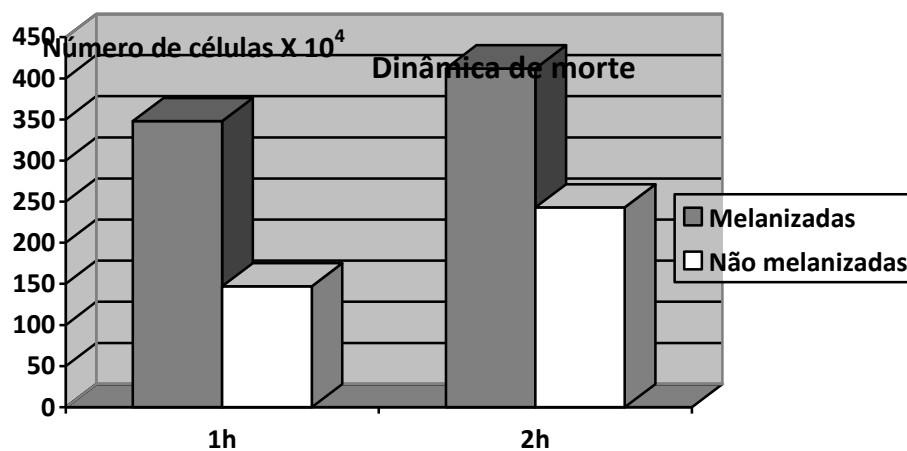


Figure 3. Death dynamics of melanized and non-melanized strains of *B. pseudomallei* s1 and 2 hours after exposure to imipenem. \*P= 0.0001 and \*\* P= 0.0025.

## **Discussion**

The *hppD* gene found in the strains of *B. pseudomallei* used in the study is responsible for conversion of 4-hydroxypyruvate into HGA, which is an oxidized polymer that produces the characteristic brown pigment melanin (Keith et al., 2007). Melanin plays an important role in protecting organisms against oxidative stress *in vivo*, as demonstrated in strains of *B. cenocepacia*, where the pigment is able to attenuate the oxidative stress within human monocytes (Zughaier et al., 1999). The production of this pigment has been reported in many fungi isolated from soil, including pathogenic fungi to humans, and it has been postulated that the pigment can protect organisms from environmental stress and UV light (Nosanchuk et al., 2006). Agodi et al. (1996) demonstrated the production of a melanic pigment by *Proteus mirabilis* from the L-forms of various aromatic amino acids through a modified Fontana-Masson assay.

Melanin has not been described in strains of *B. pseudomallei* and this pigment may be associated with virulence. Melanization has been considered important in bacterial pathogenesis, since it is related to the virulence of many microorganisms (Nosanchuk et al., 2006). It is likely that this pigment is also related to the high capacity *B. pseudomallei* to remain viable for long periods in the environment under adverse conditions.

Melanin production in bacteria usually occurs through catabolism via tyrosine or 3,4 dihydroxypyruvate HGA (L-DOPA). In *B. cenocepacia*, it has been shown that melanin is produced via HGA, which is encoded by the *hppD* gene (Keith et al., 2007). Since this gene is also present in *B. pseudomallei*, most likely, this also represents the route of melanin production in this microorganism.

Although melanized and non-melanized strains presented the same MIC values in this study, the melanized strains showed greater survivability after exposure to imipenem, when compared to the non-melanized strains. This finding shows that the presence of melanin decreases the antimicrobial susceptibility of *B. pseudomallei* to imipenem. Duin et al. (2002) observed a similar phenomenon with strains of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* against antifungal agents.

This study detected the gene *hppD* in strains of *B. pseudomallei* and demonstrated that this microorganism produces melanin, when grown on media containing phenolic substrates. The identification of this pigment in *B. pseudomallei* contributes to the elucidation of mechanisms related to virulence and survival in the environment and the host.

### **Acknowledgments**

This work was financially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel - CAPES (PNPD process number 2103/2009).

### **References**

1. **Agodi, A., Stefani, S., Corsaro, C., Campanile, F., Gribaldo, S. & Siche, G.** (1996). Study of a melanic pigment of *Proteus mirabilis*. *Res. Microbiol* **147**:167–174.
2. **Cheng, A.C. & Currie, B.J.** (2005). Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev* **18**:383-416.
3. **CLSI – Clinical Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, Document M7-A8, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. (ISBN 1-56238-586-0). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.
4. **Duin, D.V., Casadevall, A. & Nosanchuk, J.D.** (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrob. Agent Chemoter* **46**:3394-3400.
5. **Frases, S., Salazar, A., Dadachova, E. & Casadevall, A.** (2007). *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol* **73**:615-621.

6. Inglis, T.J.J., Rolim, D.B. & Sousa A.Q. (2006). Melioidosis in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **75**:947-54.
7. Galyov, E.E., Brett, P.j. & Deshazer J. (2010). Molecular Insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol* **64**:495-517.
8. Keith, K.E., Killip, L., He, P., Moran, G.R. & Valvanoet, M.A. (2007). *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *J. Bacteriol* **189**: 9057–9065.
9. Known-Chung, K.J., Hill, W.B. & Bennet, J.E. (1981). New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol* **13**:383-387.
10. Moore, R.A., Reckseidler-Zenteno, S., Kim, H., Nierman, W., Yu, Y., Tuanyok, A., Warawa, J., Deshazer, D. & Woods, D.E. (2004). Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Infect. Immun* **72**:4172-4187.
11. Nosanchuk, J.D. & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother* **50**:3519–3528.
12. Rolim, D.B., Vilar, D.C., Sousa, A.Q., Miralles, I.S., Oliveira, D.C., Harnett, G., O'Reilly, L., Howard, K., Sampson, I. & Inglis T.J. (2005). Melioidosis, northeastern Brazil. *Emerg. Infec. Dis* **11**:1458-60.
13. Rolim, D.B., Rocha, M.F.G., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Leitão-Jr, N.P., Inglis, T.J. & Sidrim J.J.C. (2009). Environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceará state, northeastern Brazil. *Appl. Environ. Microbiol* **75**:1215-1218.

14. **Texeira, P.A., De Castro, R.A., Ferreira, F.R., Cunha, M.M., Torres, A.P. Penha, C.V., Rozental, S. & Lopes-Bezerra, L.M.** (2010). L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med. Mycol* **48**:687-695.
15. **Tendolkar, U., Taiwala, S., Jog, S. & Mathur, M.** (2003). Use of a new medium: Tobacco Agar for production pigment *Cryptococcus neoformas*. *Indian J. Med. Microbiol* **21**:277-279.
16. **Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F., Bandeira, T.J.P.G., Cordeiro, R.A., Carvalho, B.M., Grangeiro, T.B., Holanda, M.A., Lima, R.A.C., Valente, L.G., Costa, A.K.F. & Brilhante, R.S.N.** (2011). Mycotic aneurysm caused by *Burkholderia pseudomallei*: report of a Brazilian strain genetically related to Thai strains. *Clin. Microbiol. Infect* **17**:719-21.
17. **Zughaier, S.M., Ryley, H.C. & Jackson, S.K.** (1999). A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocytic respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. *Infec. Immun* **67**:908–913.



## 8.0 CONCLUSÕES

Todas as cepas de *B. pseudomallei* testadas possuem o gene *hppD* responsável pela formação do precursor 4-hydroxy-phenylpyruvic acid dioxygenase essencial na síntese de melanina e foram capazes de produzir melanina *in vitro* quando semeadas em meio ágar BHI acrescido de ácido caféico. As cepas de *B. pseudomallei* foram sensíveis *in vitro* ao farnesol isolado e a suas combinações com  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina e oxacilina) apresentando redução estatisticamente significativa dos CIMs, não sendo observado o mesmo para as drogas: amicacina e gentamicina, sinalizando uma possível ação do farnesol como inibidor de  $\beta$ -lactamase. Esse trabalho, portanto, demonstrou um novo fator de virulência, melanina, ainda não citado na literatura para *B. pseudomallei*, além de propor a ação do sesquiterpeno farnesol como um possível inibidor de  $\beta$ -lactamase.

## REFERÊNCIAS

AKIYAMA, H.; OONO, T.; HUH, W.K.; YAMASAKI, O.; OGAWA, S.; KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, H.; IWATSUKI, K. . Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. **Chemother.** v. 48,p. 122-128, 2002.

ALEXANDRE, G. AND ZHULIN, I.B. Laccases are wide-spread in bacteria. **Trends Biotechnol.** v. 18, p. 41–42, 2000.

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

BURTNICK, M. N.; BRETT, P. J.; NAIR, V.;WARAWA, J. M.; WOODS, D. E.; FRANK, C. GHERARDINI. *Burkholderia pseudomallei* Type III Secretion System Mutants Exhibit Delayed Vacuolar Escape Phenotypes in RAW 264.7 Murine Macrophages. **Infect. and Immun.** v. 76, p. 2991–3000, 2008.

CASADEVALL, A.; NAKOUZI, A.; CRIPPA, P.R.; EISNER, M. Fungal melanins differ in planar stacking distances. **PLoS One.** v.7. Epub 2012 16 de fevereiro

CHAMBON L. Isolement du bacille de Whitmore a partir du milieu exterieur. **Ann Inst Pasteur.** v.89, p.229-235,1955.

CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J.; DANCE, D.A.; WATTANAGOON, Y.; NAIGOWIT, P.; DAVIS, T.M.; LOOAREESUWAN, S.; PITAKWATCHARA, N. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. **J. Infect. Dis.** v.159, p.890–899,1989.

CHEN, Y.; WONG, J.; SUN, G.W.; LIU, Y.; TAN, G.Y.; GAN, Y.H. Regulation of type VI secretion system during *Burkholderia pseudomallei* infection. **Infectar Immun.** v.79, p.3064-73, 2011.

CHING SAM, I.; SEE, K. H.; PUTHUCHEARY, S. D. Variations in Ceftazidime and Amoxicillin-Clavulanate Susceptibilities within a Clonal Infection of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin. Microbiol.** v. 47, p. 1556–1558, 2009.

CHRISTOPHER, T. F.; ISABELLE, J. T.; TING-HSIANG, W.; TARA, T.; SHANNON, M. B.; WAYNE, W.; MINGHSUN, L.; IMKE, S.; PEI-YU, C.; MICHAEL, A. T.; JEFF, F. M. Dissection of the *Burkholderia* intracellular life cycle using a photothermal nanoblade. **Proc Natl Acad Sci EUA A.** v. 108, p.12095-100, 2011 .

CARREIRA, A.; FERREIRA, L. M.; LOUREIRO, V. Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67,p:3463–3468, 2001.

CHETCHOTISAKD, P.; ANUNNATSIRI, S.; KIATCHOOSAKUN, S.; KULARBKAEW, C. Melioidose pericardite imitando pericardite tuberculosa. **Clin. Infect. Dis.** v.51, p.46-49, 2010.

CHIERAKUL, W.; RAJANUWONG, A.; WUTHIEKANUN, V.; TEERAWATTANASOOK, N.; GASIPRONG, M.; SIMPSON, A.; CHAOWAGUL, W.; WHITE, N.J. The changing pattern of bloodstream infections associated with the rise in HIV prevalence in northeastern Thailand. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.98, p.678-86, 2004.

CHO, T.; AOYAMA, T.; TOYODA, M.; NAKAYAMA, H.; CHIBANA, H.; KAMINISHI, H.; CALDERONE, R.A. Farnesol as a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.** v.49, p.281-286, 2008.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. CLSI document M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environ. Microbiol.** v. 5, P. 719-29, 2003.

COUTO, M.S.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M.F.; GRANGEIRO, T.B.; LEITÃO JUNIOR, N.P.; BANDEIRA, T.J.; SIDRIM, J.J.; BRILHANTE, R.S. A diagnosis of *Burkholderia pseudomallei* directly in a bronchoalveolar lavage by polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, p. 73–75, 2009.

CUGINI, C.; CALFEE, M.W.; FARROW, J.M.; TERCEIRO MORALES, D.K.; PESCI, C.E.; HOGAN, D. A. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**. v. 65, p.896-906, 2007.

CURRIE, B. J.; JACUPS, S. P. Intensity of rainfall and severity of melioidosis, Australia. **Emerg. Infect. Dis**, V.9, p. 1538–1542, 2003.

CHENG, A. C.; CURRIE, B. J. Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. **Clin Microb Rev**. v. 18, p. 383–416, 2005.

DANCE, D. A. B. Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. **Acta Trop**. v. 74, p.159-68, 2000.

DANCE, D. A. B.; WUTHIEKANUN, T. V.; NAIGOWIT, P.; 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.

DANCE, D. A.B.; SMITH, M. D.; AUCKEN, H. M.; PITT, T. L. Imported melioidosis in England and Wales. **Lancet**. v.353, p. 208, 1999.

DEVEAU A.; , PIISPANEN, A. E.; JACKSON, A. A.; HOGAN, D. A. Farnesol Induces Hydrogen Peroxide Resistance in *Candida albicans* Yeast by Inhibiting the Ras-Cyclic AMP Signaling Pathway. **Eukaryot Cell**. v.9, p. 569-577, 2010.

DERENGOWSKI, L.S.; SOUZA-SILVA, C.; BRAZ, S. V.; SOUSA, T. M. M.; BÁO, S. N.; KYAW, C. M.; PEREIRA, I. S. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. v.8, p.13, 2009.

DUIN, D.V.; CASADEVAL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrob. Agent Chemoter.** v.46, p.3394-3400, 2002.

ESTES, D.M.; DOW, S.W.; SCHWEIZER, H.P.; TORRES, A.G. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 8, p.325-38, 2010.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Appl. Environ Microbiol.** v. 73, p.615–621, 2007.

FRENCH, C. T.; TOESCA, I.J.; WU, T.H.; TESLAA, T.; BEATY, S.M; WONG, W.; LIU, M.; SCHRÖDER, I.; CHIOU, P.Y.; TEITELL, M.A.; MILLER, J.F .Dissection of the *Burkholderia* intracellular life cycle using a photothermal nanoblade. **Proc Natl Acad Sci EUA A.** v. 108, p.12095-100, 2011.

GAL, D.; MAYO, M.; SPENCER, E.; CHENG, A. C.; CURRIE, B. Short Report: Application of A Polymerase Chain Reaction To Detect *Burkholderia pseudomallei* In Clinical Specimens From Patients With Suspected Melioidosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n.6,p. 1162–1164, 2005.

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

GALYOV, E.E.; BRETT, P.J.; DESHAZER, D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 64 , p.495-517, 2010.

GRACE, M.H. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. **Phytother Res.** v.16, p.183-5, 2002

GRISHKINA, T.A.; SAMYGIN, V.M. Molecular methods of detection and identification of pathogenic *Burkholderia*. **Zh Mikrobiol Immunobiol Epidemiol.** v.5, p.98-105, 2010.

HASSAN, M. R. A.; PANI, S. P.; PENG, N. P.; VORALU, K.; VIJAYALAKSHMI, N.; MEHANDERKAR, R.; AZIZ, N. A.; MICHAEL, E. Incidence, risk factors and clinical epidemiology of melioidosis: a complex socio-ecological emerging infectious disease in the Alor Setar region of Kedah, Malaysia. **BMC Infectious Diseases.** v. 10, p. 302, 2010.

HARRIS, P.; ENGLER, C.; NORTON, R. Comparative in vitro susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* to doripenem, ertapenem, tigecycline and moxifloxacin. **Int J agentes Antimicrob.** v.37, p.547-9, 2011.

HO, P. L.; CHEUNG, T. K.; YAM, W. C.; YUEN, k. Y. Characterization of a laboratory-generated variant of BPS beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei* that hydrolyses ceftazidime. **J. Antimicrob. Chemother.** v.50, p.723–726, 2002.

HORNBY, J.M.; JENSEN, E.C.; LISEC, A.D.; TASTO, J.J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; PATRICK, D.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol.** v.67, p.2982–2992, 2001.

HOWARD, K.; INGLIS, T. J. J. Novel Selective Medium for Isolation of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microb.** v.41, p. 3312-3316, 2003.

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

INGLIS, T.J.J.; ROLIM, D.B.; SOUSA, A.Q. Melioidosis in the Americas. **Am. J. Trop. Med Hyg.**,v. 75, p. 947-954, 2006.

INGLIS, T. J. J.; SOUSA, A. P. The public health implications of melioidosis. **Braz J Infect Dis** . v.13, p.59-66, 2009.

INGLIS, T.J.; O'REILLY, L.; MERRITT, A.J.; LEVY, A.; HEATH, C. The aftermath of the Western Australian melioidosis outbreak. **Am J Trop Med Hyg.** v. 84, p.851-857, 2011.

INOUE, Y.; SHIRAISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiol Lett.** v. 237, p.325-31, 2004.

ISMAIL, G.; NOOR EMBI, M.; OMAR, O.; ALLEN, J.C.; SMITH, C.J. A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin. **J. Med. Microbiol.** v. 23, p. 353–357, 1987.

JABRA-RIZK, M.A.; MEILLER, T. F.; JAMES, C. E.; SHIRTLIFF, M. E. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, p. 501463-9, 2006.

KANAI, K.; KONDO, E. Recent advances in biomedical science of *Burkholderia pseudomallei*. **Japanese J Medical Sci Biol.** v. 47, p. 1-45, 1994.

KANTHAWONG, S.; NAZMI, K.; WONGRATANACHEEWIN, S.; BOLSCHER, J.G.; WUTHIEKANUN, V.; TAWEECHASUPAPONG, S. In vitro susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* to antimicrobial peptides. **Int J Antimicrob agentes** . v. 34, p.309-14, 2009.

KEITH, K.E.; KILLIP, L.; HE, P.; MORAN, G.R.; VALVANO, M.A. *Burkholderia cenocepacia* C5424 Produces a Pigment with Antioxidant Properties Using a Homogentisate Intermediate. **J Bacteriol.** v.189, p. 9057–9065, 2007.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, p.1302-9, 2002.

KEIHT, K.E.; KILLIP, L.; HE, P.; MORAN, G.R.; VALVANO, M.A. *Burkholderia cenocepacia* C5424 Produces a Pigment with Antioxidant Properties Using a Homogentisate Intermediate. **J Bacteriol.** v.189, p. 9057–9065, 2007.

KNOWN- CHUNG K.J.; HILL, W.B.; BENNET, J.E. New, special strain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. **J Clin Microbiol.** v.13, p.383-387, 1981.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, M.D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In:\_\_\_ **Diagnóstico Microbiológico**, 5<sup>a</sup> Ed. Medsi. p. 263-247, 2001.

KUNG, C.T.; LEE, C.H.; LI, C.J.; LU, H.I.; KO, S.F.; LIU, J.W. Development of ceftazidime resistance in *Burkholderia pseudomallei* in a patient experiencing melioidosis with mediastinal lymphadenitis. **Ann Acad Med Singapore.** v. 39, p.945-3, 2010.

KURODA M.; NAGASAKI, S.; OHTA, T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of themurein monomer precursor contributing to increased susceptibility to  $\beta$ -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 59, p:425-32, 2009.

LANGFORD, M.L.; HASIM, S.; NICKERSON, K.; ATKIN, A.L. Activity and Toxicity of Farnesol towards *Candida albicans* Are Dependent on Growth Conditions. **Antimicrob. Agent Chemother.**v.54, n.2, p.940-942, 2010.

LEE, S. H.; GU, F.; CHING, S. M.; LAM, Y.; CHUA, K. M. CdpA Is a *Burkholderia pseudomallei* Cyclic di-GMP Phosphodiesterase Involved in Autoaggregation, Flagellum Synthesis, Motility, Biofilm. **Infec. and Immunity**, v.78, p. 1832–1840, 2010.

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



LEITE, F. C.; MACHADO, A.B.M.P. ; LUTZ, L.; VIEIRA, M. I. ; BARTH, A. L. Molecular identification of *Burkholderia cepacia* complex and species distribution among cystic fibrosis patients seen at the reference center in southern brazil. **Revista HCPA** (Online), v. 31, p. 138-144, 2011

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

LIMMATHUROTSAKUL, D.; WONGRATANACHEEWIN, S.; TEERAWATTANASOOK, T.; WONGSUVAN, G.; CHAISUKSANT, S.; CHETCHOTISAKD, P.; CHAOWAGUL, W.; DAY, N.P.J.; PEACOCK, S.J. Increasing Incidence of Human Melioidosis in Northeast Thailand. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, p. 1113-1117, 2010.

MACEDO, R. N.; ROCHA, F. A.; ROLIM, D. B.; VILAR, D. C. L. F.; ARAÚJO, F. M. C. VIEIRA, N. N.; TEIXEIRA, J. R.; CARVALHO, M. C.; OLIVEIRA, F. G.; M.CAVALCANTI, L. P. G. Severe coinfection of melioidosis and dengue fever in Northeastern Brazil: first case report Coinfecção grave de melioidose e dengue no Nordeste do Brasil: primeiro caso. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.45, p.132-133, 2012.

MEDEIROS, J.R.; CAMPOS, L. B.; MENDONÇA, S. C.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. **Phytochemistry.** v.64, p.561-5, 2003.

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

MOORE, R. A.; RECKSEIDLER-ZENTENO S.; KIM, H.; NIERMAN, W.; YU, Y.; TUANYOK, A.; WARAWA. J.; DESHAZER, D.; WOODS, D. E. Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Infec. Immun.**, v. 72, p. 4172-87, 2004.

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

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

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents Chemother**. v. 50, p.3519–3528, 2006.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**. v. 5, p. 203–223, 2003.

NOVAK, R. T.; GLASS, M. B.; GEE, J. E.; GAL, D.; MAYO, M. J.; CURRIE, B. J.; WILKINS, P.P. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay Targeting the Type III Secretion System of *Burkholderia pseudomallei*. **J Clin Microbiol**. v. 44, p. 85-90, 2006.

NUTI, D.E.; CRUMP, R.B; DWY HANDAYANI, D. F.; CHANTRATITA, N.; PEACOCK, S.J.; BOWEN, R.; FELGNER, P.L .; HUW DAVIES, D .; WU, T.; LYONS, C.R.; BRETT, P.J .; BURTNICK, M.N.; KOZEL, T.R.; AUCOIN, DP. Identification of circulating bacterial antigens by in vivo microbial antigen discovery. **MBiO**. v. 2, n.4. doi: 10.1128/mBio.00136-11, 2011.

OESTE , T.E.; MYERS, N.D.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; LIGGITT, D.; CHANTRATITA, N.; PEACOCK, S.J.; SKERRETT, S.J. Pathogenicity of high-dose enteral inoculation of *Burkholderia pseudomallei* to mice. **Am J Trop Med Hyg**. v. 83, p.1066-9, 2010.

PEACOCK, S.J.; CHENG, A.C.; CURRIE, B.J.; DANCE, D.A . The use of positive serological tests as evidence of exposure to *Burkholderia pseudomallei*. **Am J Trop Med Hyg**. v. 84, p.:1021-2, 2011.

PEACOCK, S.J.; SCHWEINZER, H.P.; DANCE, D.A.B; SMITH, T.L.; GEE, J.E.; WUTHIEKANUM, V.; DESHAZER, D.; STEINMETZ, I.; TAN, P.; CURRIE, B.J. Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **Emerg Infect Dis.** v.14, p. 2, 2008.

PESTANA DE CASTRO, A. F.; CAMPEDELLI FILHO, O.; GIORGI, W.; SANTA ROSA, C. A. Considerações sobre a melioidose e seu agente causal *Pseudomonas pseudomallei*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 15, p. 43-49, 1973.

PONGSUNK, S.; THIRAWATTANASUK, N.; PIYASANGTHONG, N.; EKPO, P. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by a monoclonal antibody assay. **J Clin Microb**, v. 37, n. 11, p. 3662 – 3667, 1999.

PUCHUCHEARY, S. D.; VADIVELU, J. Human melioidoses. **Singapura University press.** Sigapura, 2002.

PUMPUANG, A.; CHANTRATITA, N.; WIKRAIPAT, C.; SAIPROM, N.; DIA N.P.; PEACOCK, S.J.; WUTHIEKANUN, V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2011.

ROBERTSON J.; LEVY, A.; SAGRIPANTI, J. L.; INGLIS T. J. J. The Survival of *Burkholderia pseudomallei* in Liquid Media. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 82, n. 1, p. 88–94, 2010.

RAINBOW, L. C.; HART, C.A.; WINSTANLEY, C. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. **J. Med. Microbiol.** v. 51, p. 374–384, 2002.

ROLIM, D.B.; ROCHA, M.F.G.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; LEITÃO-JUNIOR, N.P.; INGLIS, T.J.J.; SIDRIM, J.J.C. Environmental Isolates of *Burkholderia pseudomallei* in Ceara State, Northeastern Brazil. **Appl Environ Microb.** v. 75, p. 1215–1218, 2009.

ROLIM, D.B.;VILAR, D.C.F.L.; SOUSA, A.Q.; MIRALLES, I.S.;OLIVEIRA, D. C. A.; HARNETT, G.; O'REILLY, L.; HOWARD, K.;SAMPSON, I.; INGLIS, T.J.J. Melioidosis,NortheasternBrazil. **Emerg Infect Dis.** v.11, p.1458-60, 2005.

RHOLL, D.A.; PAPP-WALLACE, K.M.; TOMARAS, A.P.; VASIL, M.L.; BONOMO, R.A.; SCHWEIZER, H.P. Molecular Investigations of PenA-mediated  $\beta$ -lactam Resistance in *Burkholderia pseudomallei*. **Microbiol frente.** v. 2, p.139, 2011.

SAM, I.C.; SEE, K.H.; PUTHUCHEARY, S.D. Susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* to tigecycline and other antimicrobials. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 67, p.308-9, 2010.

SAWASDIDOLN, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; SERMSWAN, R.W.; TATTAWASART, U.; TUNGPRADABKUL, S.; WONGRATANACHEEWIN, S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. **PLoS One**, v. 5, p. 9196, 2010.

SAWASDIDOLN, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; SERMSWAN, R.W.; TATTAWASART, U. TUNGPRADABKUL, S.; WONGRATANACHEEWIN, S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in Biofilm Stimulating Conditions Significantly Induces Antimicrobial Resistance. **PLoS ONE**, v. 12,P 9196, 2011.

SEMIGHINI, C.P.; HORNBY, J.M.; DUMITRU R, NICKERSON KW, HARRIS SD. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Molecular microbiology*; v.59, n.3 , p.753-764, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; CARVALHO, B. M.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. A.; LIMA, R. A. C.; VALENTE, L. G. A.; COSTA, A. K. F.; BRILHANTE, R. S. N. Mycotic aneurysm caused by *Burkholderia pseudomallei*: report of a Brazilian strain genetically related to Thai strains. **Clin Microbiol Infect.** v.17, p.719-21, 2010.

SIM, S.H.; LIU, Y.; TAN, J.; THONG, T.W.; WANG, D.; OOI, E.E.; TAN, G. Antimicrobial activity of cathelicidin peptides against *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis. **Int J Antimicrob Agents**. v.38, p.:270-1, 2011.

SMITH, M.D.; ANGUS, B.J.; WUTHIEKANUN, V.; WHITE, N.J. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderiapseudomallei*. **Infection and Immunity**. v. 65, p. 4319 – 4321, 1997.

SPRAGUE, L. D., NEUBAUER, H. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. **J. Vet. Med. B.**, v. 51, n. 7, p. 305 – 320, 2004.

STANTON, A. T.; FLETCHER W. Melioidosis, a new disease of the tropics. **Trans. 4<sup>th</sup> Cong. Ass. Trop. Med.**, v. 2, p.196–198, 1921.

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

SUPRAPOM, C.; WANG, D.; LEELAYUWAT, C.; THAEWPIA, W.; SUSAENGRAT, G.; KOH, V.; OOI, E.E.; LERTMEMOGKOLCHAI, G.; LIU, Y. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. **J Clin Microbiol**. v. 45, n. 9, p. 2894–2901, 2007.

TEXEIRA, P.A.; DE CASTRO, R.A.; FERREIRA, F.R.; CUNHA, M.M.; TORRES, A.P.; PENHA, C.V.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L.M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Med Mycol**. v.48, p.687-695, 2010.

THOMAS, A., AND J. C. FORBES-FAULKNER. Persistence of *Pseudomonas pseudomallei* in soil. **Aust. Vet. J.**v. 57, p.535–536, 1981.

VALERU, S.P.; ROMPIKUNTAL, P. K.; VAITKEVICIUS, T. I.; SJOOLING, A.; DOLGANOV, N.; ZHU, J.; SCHOOLNIK, G.; WAI, S. N. Role of Melanin Pigment in

Expression of *Vibrio cholerae* Virulence Factors. **Infect Immun.** v. 77, p. 935–942, 2009.

SUPRAPOM, C.; WANG, D.; LEELAYUWAT, C.; THAEWPIA, W.; SUSAENGRAT, G.; KOH, V.; OOI, E.E.; LERTMEMOGKOLCHAI, G.; LIU, Y. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. **J Clin Microbiol.** v. 45, p. 2894–2901, 2007.

TENDOLKAR, U.; TAIWALA, S.; JOG, S. Use of a new medium: Agar Tabaco for production pigment *Cryptococcus neoformans*. **Indian J Med Microbiol.**v. 21, p.277-279, 2003.

TEXEIRA, P.A.; DE CASTRO, R.A.; FERREIRA, F.R.; CUNHA, M.M.; TORRES, A.P.; PENHA, C.V.; ROZENTAL, S.; LOPES-BEZERRA, L.M. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. **Med Mycol.** v.48, p.687-695, 2010.

THAMLIKITKUL, V.; TRAKULSOMBOON, S. In Vitro Activity of Doripenem against *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v.53, p. 3115–3117, 2009.

URÁN, M.E.; NOSANCHUK, J.D.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A.J.; GÓMEZ, B.L.; CANO, L.E. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* melanin: in vitro and in vivo studies during infection. **Clin Immunol de Vacinas.** 2011.

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

WANG, R.; WANG, H.; ZHOU, H.; WANG, Y.; YUE, J.; DIAO, B.; KAN, B. Characters of homogentisate oxygenase gene mutation and high clonality of the natural pigment-producing *Vibrio cholerae* strains. **BMC Microbiol.** 2011.

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

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

WHITE, L.P. Melanin: a naturally occurring cationexchange material. **Nature.** v.182, p. 1427–1428, 1958.

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

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

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

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

WUTHIEKANUN, V.; CHENG, A. C.;CHIERAKUL, W.;AMORNCHAI, P.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; CHAOWAGUL, W. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Antimicrob. Chemother.** v.55, p.1029–1031, 2005.

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

UNNANUNTANA, A.; BONSIGNORE, L.; SHIRTLIFF, M. E.; GREENFIELD, E. M. The Effects of Farnesol on *Staphylococcus aureus* Biofilms and Osteoblasts. **J Bone Joint Surg Am.** v.91, p.2683-92, 2009.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, T.; 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* (Palleroni and Holmes 1981). **Microbiol. Immunol.** v.36, p.1251–1275, 1992.



## **ANEXOS**

## ANEXO I

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Biossegurança

Todos os procedimentos envolvidos na manipulação dos microrganismos foram realizados em capela de fluxo laminar II/B em medidas de contenção de biossegurança nível 3, conforme o preconizado para *B. pseudomallei* (PEACOCK et al., 2008).

#### Microrganismos

Foram utilizadas 20 cepas de *Burkholderia pseudomallei* (10 isolados ambientais e 10 isolados clínicos) identificadas através do VITEK, reações de PCR utilizando *primers* específicos Bp1 (CGATGATCGTTGGCGCTT) e Bp4 (CGTTGTGCCGTATTCCAAT) (Merrit, et. al., 2006) e seqüenciamento da região 16S e ITS. Todas as cepas estavam estocadas em meio mínimo e pertencem a bacterioteca do Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes- LAPERE da Universidade Federal do Ceará (**tabela 1**). Foram utilizadas como controle *Candida albicans* ATCC 10231 e *Cryptococcus neoformans* CEMM 05-2-076 para os testes fenotípicos. Para os testes de sensibilidade foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (*MRSA*).

Tabela 1 Origem dos isolados clínicos e ambientais de *B. pseudomallei*.

Cepas	Origem	Local
03-6-033	Clínica	Tejuçuoca
03-6-034	Clínica	Tejuçuoca
03-6-035	Clínica	Tejuçuoca
03-6-036	Clínica	Ubajara
03-6-037	Clínica	Aracoiaba
03-6-038	Clínica	Granja
05-3-008	Clínica	Itapáje
05-3-009	Clínica	Ubajara
05-3-010	Clínica	Pacoti
05-3-011	Clínica	Ocara
03-6-039	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-040	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-041	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-042	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-043	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-044	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-045	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-046	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-047	Ambiental	Tejuçuoca
03-6-048	Ambiental	Tejuçuoca

## **Deteccão de melanina**

### **Deteccão de melanina por métodos fenotípicos**

As cepas clínicas e ambientais de *B. pseudomallei* foram semeadas em Agar semente de Niger (Pastlbor, Brasil), Agar BHI suplementado com ácido caféico (Difco, USA) e Agar Muller Hinton (Difco, USA) usado como controle. As placas foram incubadas a 37 °C por até dez dias, sendo as mesmas observadas diariamente quanto à formação de pigmento (TENDOLKAR et al., 2003.; KEIHT, et. al., 2007; TEXEIRA, et. al., 2010). As cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 e *Cryptococcus neoformans* foram utilizadas como controle negativo e positivo respectivamente para produção de melanina.

### **Coloração para melanina**

Os esfregaços obtidos das culturas crescidas nos meios BHI acrescido de ácido caféico, ágar semente de Niger e em ágar Muller Hinton foram corados pelo método de Fontana-Masoni específico para melanina (Kown-Chung, et. al., 1981).

### **Avaliação da sensibilidade antimicrobiana frente às cepas melanizadas e não melanizadas**

A melanização das cepas foi realizada em BHI acrescido de ácido caféico e as cepas não melanizadas utilizadas como controles foram semeadas em ágar Muller Hinton. As culturas melanizadas e não melanizadas utilizadas foram incubadas a 35°C por 24, 48 e 72 horas (Duin et. al., 2002). Após a cada período de crescimento, foi realizado o teste de microdiluição em caldo baseado no documento M7-A8 do CLSI (Clinical Laboratory Standart Institute). A droga utilizada para o ensaio foi o imipenem no intervalo de 0,03125-32 µg/µL . A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 35 °C. O CIM foi considerado a concentração a qual foi capaz de inibir 100 % do crescimento bacteriano (**figura 5**) (CLSI, 2009)

### **Curva de morte de cepas melanizadas e não melanizadas frente ao imipenem**

As cepas previamente melanizadas e não melanizadas como descrito anteriormente foram inoculadas em 3 ml de salina e ajustada para a escala 0,5 de McFarland. A partir dessa solução foram realizadas diluições para conter  $5 \times 10^5$

UFC/mL (CLSI, 2009). Para realização do teste foi utilizado imipenem em três concentrações diferentes 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,125 µg/mL. Em seguida as culturas foram incubadas com a droga por 1 e 2 horas, após esse período alíquotas das culturas foram semeadas em Agar Muller Hinton utilizando alças descartáveis calibradas de 0,01µl e incubadas a 35 °C por 24 horas para realização da contagem das colônias. Os resultados obtidos para cepas melanizadas e não melanizadas foram analisados estatisticamente através do teste de Student (Duin, 2002).

### **Extração de DNA genômico a partir de culturas de *B. pseudomallei***

O DNA genômico foi extraído pela utilização do sistema comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para o procedimento, os 20 isolados de *B. pseudomallei* estocados foram inicialmente cultivados em ágar sangue a 37 °C por 48 horas. Feito isso, uma única colônia foi então repicada para caldo BHI e incubada a 37 °C por 24 horas e feita a coloração de Gram para checar a pureza dos cultivos (Couto, 2009).

O protocolo do kit para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas encontra-se descrito no **Anexo 3**. Alíquotas de DNA obtidas após o primeiro tratamento com o tampão de lise foram incubadas em caldo BHI a 37 °C por 7 dias. A ausência de qualquer crescimento garantiu a segurança do procedimento. Após o término desta etapa as amostras de DNA genômico foram estocadas a 4 °C.

### **Amplificação do gene *hppD* por PCR**

Foram utilizados os seguintes iniciadores: 2379 (5'-AAAATCTAGAGTCGGCACCGACGGCTTC-3') e 2380 (5'-AAAATCTAGAGGATGTTCAGCTCCATCGGG-3'). A reação foi conduzida em um volume final de 10µl, contendo 1µl de DNA (100ng/µl), 2,5 µL de tampão de reação 10X (New England Biolabs, Reino Unido), 1 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA), 50 pmol de cada iniciador 2379 e 2380 (Invitrogen, USA), 10 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo e 1U de Taq DNA polimerase (New England Biolabs, Reino Unido). A amplificação do gene *hppD* foi realizada em termociclador Multigene

(Labnet, USA), sendo realizada reação de PCR *touch down* com etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguida de touch down a 65°C com -1°C/ciclo num total de 10 ciclos, continuando com 21 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim extensão final a 72°C por 8 minutos. Após a amplificação, o produto foi armazenado a -20°C até a realização da corrida em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml (KEIHT, et. al., 2007).

## **Testes de sensibilidade de *B. pseudomallei* ante o farnesol isolado e em combinações com β-lactâmicos:**

### **Agentes antimicrobianos**

Para os testes de sensibilidade foram utilizados o farnesol, β-lactâmicos: amoxicilina (Roche, Brasil), amoxicilina-ácido clavulânico (Roche, Brasil), ampicilina (Ariston, Brasil) e oxacilina (Ariston, Brasil) e imipenem (Roche, Brasil) e os aminoglicosídeos amicacina (Roche, Brasil), gentamicina (Roche, Brasil) como controles.

Para o preparo das soluções estoques na concentração de 1mg/mL, foi utilizada água destilada estéril como diluente para as drogas: ampicilina, oxacilina, amicacina e gentamicina. Para diluição do imipenem foi utilizado tampão fosfato 0,01 mol/L a pH 7,2. Para amoxicilina e ácido clavulânico foi utilizado tampão fosfato pH 0,01 mol/L pH 6,0 como descrito no documento M7- A8 (CLSI, 2009). Para o farnesol foi utilizado o DMSO (dimetilsulfóxido) como diluente. Todas as soluções foram agitadas em vórtex até a completa dissolução das drogas. A partir das soluções estoques foram preparadas as soluções de uso, as quais foram preparadas numa concentração quatro vezes maior do que a concentração inicial utilizada no ensaio. Para as drogas em combinação, a solução de uso foi preparada oito vezes maior. Os intervalos de concentração para as drogas utilizadas estão descritas na **tabela 2** (CLSI,2009). Em seguida as drogas foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento do uso.

**Tabela 2. Intervalo de drogas antimicrobianos utilizadas no teste de microdiluição em caldo.**

Drogas	Intervalo
Farnesol ( $\mu\text{M}$ )	1,172-600
Amoxicilina ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,25-128
Amoxicilina + Ac. Clavulânico ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,25/0,125-128/64
Imipenem ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,312-16
Ampicilina ( $\mu\text{g/mL}$ )	2-1024
Oxacilina ( $\mu\text{g/mL}$ )	2-1024
Amicacina ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,125-64
Gentamicina ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,125-64

### **Preparo do inóculo para o teste de sensibilidade**

Para confecção do inóculo bacteriano, as cepas de *B. pseudomallei* foram repicadas em ágar Muller Hinton e incubadas por 24 horas em estufa a 35 °C. Em seguida, usando uma alça bacteriológica foi tocado em duas ou três colônias de *B. pseudomallei* e dissolvidas em 3 ml de solução salina estéril. Posteriormente, foi ajustada a turvação da suspensão na escala 0,5 de McFarland através de espectrofotometria e diluída na proporção de 1: 100 de M. Hinton caldo para conter  $5 \times 10^5$  UFC/ mL ( CLSI, 2009).

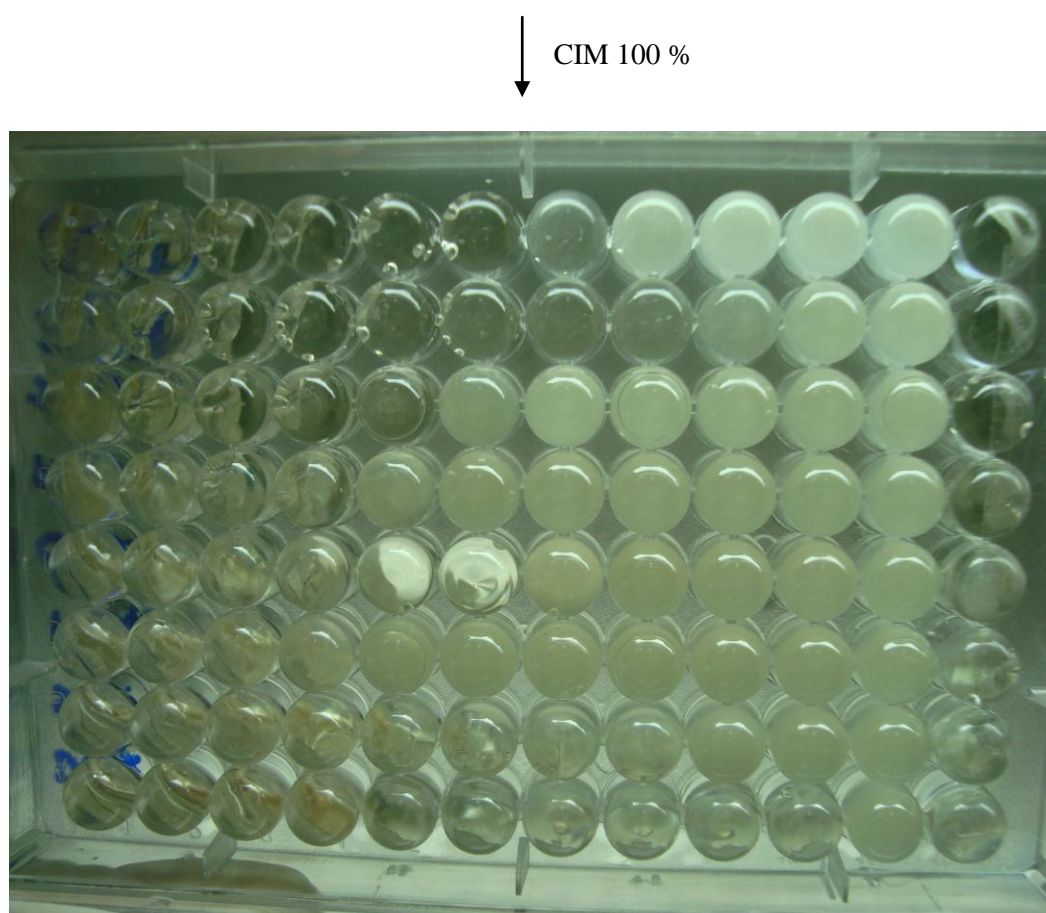
### **Ensaio de microdiluição *in vitro***

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo descrito no documento M07-A8 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2009). Para o ensaio de microdiluição, foi utilizada uma placa plástica estéril de microtitulação contendo 96 poços com fundo arredondado em forma de U. Com o auxílio de um pipetador automático, foi distribuído em cada um dos micropoços 0,1 mL do meio Muller Hinton caldo. Em seguida, 0,1 mL de droga foi adicionado nos primeiros poços, a partir dos quais a droga foi diluída de forma seriada

até os poços da décima coluna. Por fim, 0,1 mL do inóculo bacteriano foi distribuído em cada poço. Controles positivos de crescimento e esterilidade foram incluídos para cada observação testada. Os procedimentos foram realizados em duplicata. A leitura visual dos resultados para a determinação das CIMs foi realizada após 24 horas de incubação a 35 °C.

A concentração inibitória mínima das drogas utilizadas no ensaio foi determinada como a menor concentração capaz de impedir 100% do crescimento bacteriano (**figura 1**) (CLSI, 2009).

Para a realização do controle de qualidade das drogas, foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922, como recomendado pelo CLSI, documento M100-S20 (CLSI, 2010).



**Figura 1. Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM).**

### **Ensaio de combinações de drogas *in vitro***

Após a determinação do efeito inibitório das drogas isoladas, foi avaliada a



atividade antibacteriana das combinações: Farnesol +  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, imipenem, ampicilina e oxacilina). Como controle foi realizado a combinação do farnesol com aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina). Para a realização dos testes de sensibilidade, foi seguido o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Os valores de CIM de cada droga isolada foram utilizados como a maior concentração para o preparo das drogas em combinação. A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas antimicrobianas em combinação foi definida como a menor concentração da associação de drogas capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano (CLSI, 2009).

### **Análise estatística**

Para avaliação da redução da Concentração Inibitória Mínima, com a utilização do Farnesol, foi realizada análise estatística utilizando o teste t-Student para amostras pareadas. O nível de significância adotado para afirmações conclusivas foi 5%.

## ANEXO II

### **Protocolo: Produção fenotípica de melanina em meio BHI + ácido caféico**

1. Pesar 5,2 g de Agar BHI e dissolver em 100 ml de água destilada. Ferva para dissolver o meio completamente.
2. Pesar 0,018g de ácido caféico e 0,002g de citrato férrico p/ 100 ml de meio de cultura. Dispensar em frasco e autoclavar.
3. Armazenar em geladeira. Distribuir o meio em placas de Petri, repicar as cepas de *B. pseudomallei*. Incubar em estufa a 37°C e observar a formação de pigmento.

## ANEXO III

### PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

WIZARD<sup>®</sup> GENOMIC DNA PURIFICATION KIT (Promega, Estados Unidos).

#### PROCEDIMENTO:

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

## ANEXO IV

### Coloração Fontana-Masson

#### Soluções e Reagentes:

##### 1. Solução de nitrato de prata

Pesar 10g de nitrato de prata e dissolver em 100ml de água destilada

##### 2. Solução de nitrato de prata Fontana ( NPF)

Em 25 ml da solução de  $\text{AgNO}_3$  10% adicionar gota-a-gota de hidróxido de amônio até ficar claro e formar precipitado. Armazenar em frasco âmbar e deixar em repouso overnight.

##### 3. Solução de trabalho nitrato de prata

Em um balão de 100ml adicionar 25ml da solução NPF e completar o volume para 100ml.

##### 4. Solução de trabalho cloreto de ouro

Preparar solução de cloreto de ouro 1%. Diluir 10 ml dessa solução em 40 ml de água destilada.

##### 5. Solução de tiosulfato de sódio 5%

Pesar 5g de tiosulfato de sódio para 100ml de água destilada.

#### Procedimento:

1. Preparar um esfregaço com o material com o material biológico
2. Colocar a lâmina em um becker e aquecer por 2 horas à  $56^\circ\text{C}$  imerso na solução de trabalho NPF
3. Lavar 3 vezes com água destilada
4. Colocar a lâmina em contato com a solução de cloreto de ouro por 1min
5. Lavar com água destilada

6. Colocar a Lâmina em contato com solução de tiosulfato de sódio de sódio % por 1 min
7. Lavar com água destilada
8. Secar e limpar o lado contrário da lâmina
9. Observar ao microscópio na objetiva de imersão

**ANEXO V: Concentrações inibitórias mínimas para todas as drogas testadas isoladamente**

Cepas	Farnesol μM/mL	Amicacina μg/mL	Gentamicina μg/mL	Amoxicilina μg/mL	Amoxicilina/Ac.Clav μg/mL	Ampicilina μg/mL	Oxacilina μg/mL	Imipenem μg/mL
03-6-033	150	16	64	>128	8/4	64	256	0,5
03-6-034	150	32	32	>128	32/16	128	256	0,25
03-6-035	150	32	32	64	8/4	64	64	0,25
03-6-036	150	32	32	>128	8/4	128	128	0,25
03-6-037	150	32	32	128	8/4	128	128	0,25
03-6-038	150	32	32	128	16/8	1024	64	1
05-03-008	150	16	16	64	8/4	1024	64	0,25
05-03-009	150	16	32	64	4/2	1024	64	0,5
05-03-010	150	64	64	128	8/4	256	64	0,5
05-03-011	150	64	4	128	8/4			0,125
03-6-039	150	32	8	>128	8/4	1024	128	0,25
03-6-040	150	128	8	128	8/4	512	64	0,5
03-6-041	150	16	16	128	8/4	1024	256	1
03-6-042	150	64	32	128	16/8	-	-	1
03-6-043	75	64	32	>128	32/16	-	-	0,25
03-6-044	150	16	16	>128	4/2	-	-	0,5
03-6-045	150	16	8	64	8/4	-	-	1
03-6-046	75	<0,5	1	2	1/0,5	-	-	1
03-6-047	150	<0,5	<0,5	2	8/4	-	-	0,5
03-6-048	150	128	32	128	8/4	-	-	1

LEGENDA: -: Não testado

**ANEXO VI: Concentrações inibitórias mínimas para as drogas testadas em combinação com farnesol**

Cepas	Farnesol μM/mL	Amicacina μg/mL	Gentamicina μg/mL	Amoxicilina μg/mL	Amoxicilina/Ac.Clav μg/mL	Ampicilina μg/mL	Oxacilina μg/mL	Imipenem μg/mL
03-6-033	18,75	16	32	16	0,5	16	64	0,125
03-6-034	18,75	32	32	16	0,25	32	64	0,25
03-6-035	18,75	32	32	16	0,25	16	16	0,25
03-6-036	18,75	32	32	16	0,25	64	64	0,25
03-6-037	18,75	32	32	16	0,5	64	32	0,25
03-6-038	18,75	32	32	16	1	128	16	1
05-03-008	18,75	16	16	16	0,5	256	16	0,25
05-03-009	18,75	16	32	16	0,25	256	16	0,5
05-03-010	18,75	64	64	16	0,5	256	8	0,5
05-03-011	18,75	64	4	16	-	-	-	-
03-6-039	9,375	32	8	8	1	256	64	0,25
03-6-040	37,5	128	8	32	1	256	32	0,5
03-6-041	37,5	16	16	32	1	512	128	1
03-6-042	75	64	32	64	-	-	-	-
03-6-043	75	64	32	64	-	-	-	-
03-6-044	37,5	16	16	32	-	-	-	-
03-6-045	37,5	16	8	32	-	-	-	-
03-6-046	37,5	16	32	32	-	-	-	-
03-6-047	37,5	16	32	32	-	-	-	-
03-6-048	37,5	128	32	32	-	-	-	-

LEGENDA: -: Não testado

## ANEXO VII

### Análise estatística da combinação de drogas com Farnesol

#### Redução na Concentração Inibitória Mínima (CIM), com a utilização do Farnesol

Droga	n	Correlação	p-valor	t	p-valor
Amoxicilina ( $\mu\text{g/mL}$ )	20	0,096	0,6884	10,305	0,0000
Amoxicilina\ Clavulanato( $\mu\text{g/mL}$ )	12	0,150	0,6424	4,492	0,0005
Ampicilina ( $\mu\text{g/mL}$ )	12	0,727	0,0074	3,483	0,0026
Imipenem ( $\mu\text{g/mL}$ )	12	0,915	0,0000	2,691	0,0105
Oxacilina( $\mu\text{g/mL}$ )	12	0,832	0,0008	5,209	0,0001



