

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Thaís Regina y Castro

**DESCRIÇÃO DE ISOLADO CLÍNICO DE *Bordetella trematum* POR
SEQUENCIAMENTO DE GENOMA TOTAL**

Santa Maria, RS
2019

Thaís Regina y Castro

**DESCRIÇÃO DE ISOLADO CLÍNICO DE *Bordetella trematum* POR
SEQUENCIAMENTO DE GENOMA TOTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^ª Dra. Priscila de Arruda Trindade

Santa Maria, RS
2019

y Castro, Thaís Regina

Descrição de isolado clínico de Bordetella trematum por sequenciamento de genoma total / Thaís Regina y Castro.- 2019.

75 p.; 30 cm

Orientadora: Priscila de Arruda Trindade

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Bordetella trematum 2. Úlcera de pé diabético 3. Resistência a antimicrobianos 4. Fatores de virulência 5. Sequenciamento de genoma total I. Trindade, Priscila de Arruda II. Título.

Thaís Regina y Castro

DESCRIÇÃO DE ISOLADO CLÍNICO DE *Bordetella trematum* POR SEQUENCIAMENTO DE GENOMA TOTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 18 de julho de 2019:



Priscila de Arruda Trindade, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)



Silvia Figueiredo Costa, Dra. (USP) – Videoconferência

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Certamente palavras não são suficientes para expressar o sentimento de gratidão que tenho por todas as experiências e ensinamentos que os dois anos de desenvolvimento deste projeto me proporcionaram. Dessa forma, saliento aqui o agradecimento a todos os que foram imprescindíveis para que a concretização do trabalho ocorresse:

- Minha orientadora Priscila de Arruda Trindade, pela oportunidade concedida. É por tua insistência em não se contentar com o pouco e o usual que hoje alcanço resultados que jamais esperei alcançar. Obrigada pelo exemplo, pela paciência e humanidade ao entender minhas limitações, teimosias e imaturidade, por depositar tamanha confiança em mim e permitir que nosso ambiente de trabalho seja tão leve e descontraído. Que tu te conserves forte e motivada para abrir horizontes para outras pessoas assim como abriu para mim.

- O Laboratório de Investigação Médica em Protozoologia, Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana (LIM/49) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial as doutoras Anna Sara Shafferman Levin, Silvia Figueiredo Costa, Roberta Cristina Ruedas Martins e doutor Lauro Vieira Perdigão Neto. Obrigada pela parceria que possibilitou de fato a realização deste projeto.

- O Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria e o Laboratório de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelas contribuições neste trabalho.

- Minha família, sobretudo meus pais Rogério e Nair e irmã Débora pelo estímulo para buscar sempre ir mais longe e darem todo o suporte necessário para isso. É na ânsia de orgulhar vocês que procuro fazer o meu melhor. Obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim. Eu amo vocês!

- Ao professor Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo pelas valiosas contribuições.

- A banca avaliadora, doutor Sydney Hartz Alves e doutora Silvia Figueiredo Costa pelo aceite em avaliar este trabalho.

- As colegas de “dry-lab”, Andressa, Viviane e Bruna, aos amigos Grazielle e Fallon, bem como aos demais amigos e colegas, obrigada pelo apoio e companheirismo nesta trajetória.

- Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelo auxílio.

- A Deus, por me conceder boa saúde e permitir que pessoas tão boas tenham cruzado o meu caminho.

EPÍGRAFE

“It is like a voyage of discovery into unknown lands, seeking not for new territory but for new knowledge. It should appeal to those with a good sense of adventure.”

(Frederick Sanger)

RESUMO

DESCRIÇÃO DE ISOLADO CLÍNICO DE *Bordetella trematum* POR SEQUENCIAMENTO DE GENOMA TOTAL

AUTORA: Thaís Regina y Castro

ORIENTADORA: Dra. Priscila de Arruda Trindade

Bordetella trematum é um cocobacilo Gram-negativo encontrado em feridas, úlceras de pé diabético, otite, peritonite e bacteremia. Usualmente não causa infecções em humanos, visto que há poucos relatos de casos descritos na literatura, acometendo sobretudo pacientes imunocomprometidos. A patogenicidade, ciclo de vida, reservatório e mecanismos de resistência aos antimicrobianos de *B. trematum* são pouco elucidados. Os fatores de virulência (FV) de uma bactéria são fundamentais para o estabelecimento de uma infecção. Sua identificação possui importância no esclarecimento da patogênese bacteriana e interação com o hospedeiro. Já o conhecimento acerca dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos tem papel fundamental na escolha da antibioticoterapia adequada a ser administrada ao paciente, o que pode contribuir para um desfecho clínico favorável. Os objetivos desse trabalho consistiram em relatar um caso raro de *B. trematum* em úlcera de pé diabético e apresentar os casos já descritos por outros autores, comparando aos dados obtidos; pesquisar e descrever a função de possíveis genes codificadores de fatores de virulência; pesquisar e descrever a função de possíveis genes de resistência aos antimicrobianos, bem como avaliar o fenótipo de resistência aos antimicrobianos do isolado clínico, correlacionando-o ao genótipo. O isolado foi identificado pelo sistema VITEK 2, tendo sua identificação confirmada por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) no sistema VITEK MS. Após, foi submetido a sequenciamento do genoma total (*Whole Genome Sequencing- WGS*) pela tecnologia Illumina MiSeq, com posterior análise bioinformática. A pesquisa dos genes de virulência e resistência aos antimicrobianos foi realizada pela ferramenta ABRicate nas bases de dados *Virulence Factors Database* (VFDB) e *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD). A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada por microdiluição em caldo. Foram encontrados dezesseis genes codificadores de fatores de virulência, *cheA*, *cheW*, *cheY*, *fliI*, *fliN*, *fliQ*, *fliC*, *bplA*, *bplB*, *bplC*, *bplD*, *iroN*, *mgtA*, *relA*, *mtrD* e *brkB*. Esses genes estão envolvidos em diversas funções na célula bacteriana, como quimiotaxia, motilidade, biossíntese do lipopolissacarídeo (LPS), aquisição de ferro e magnésio, no remodelamento do metabolismo bacteriano, na expressão de bombas de efluxo e na resistência à morte celular mediada pelo sistema complemento. Mais estudos são necessários para avaliar a expressão e funcionalidade desses genes. Na análise de resistência, foram encontrados os genes *macB*, *mdsB*, *mexI* e *ceoB*, relacionados a bombas de efluxo. No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA), apenas o aztreonam apresentou concentração inibitória mínima (CIM) elevada (>16µg/mL). A ausência do gene *ftsI*, que codifica a proteína de ligação a penicilina 3 (*penicillin-binding protein 3- PBP3*), alvo de ação do aztreonam, pode estar relacionada a esse fenótipo. As bombas de efluxo encontradas não estão relacionadas à resistência aos β-lactâmicos. São necessários estudos adicionais para determinar o impacto da ação dessas bombas de efluxo na resistência aos antimicrobianos em *B. trematum*.

Palavras-chave: *Bordetella trematum*. Úlcera de pé diabético. Resistência a antimicrobianos. Fatores de virulência. Sequenciamento de genoma total.

ABSTRACT

DESCRIPTION OF CLINICAL ISOLATE OF *Bordetella trematum* BY WHOLE GENOME SEQUENCING

AUTHOR: Thaís Regina y Castro
ADVISOR: Dra. Priscila de Arruda Trindade

Bordetella trematum is a Gram-negative coccobacillus found in wounds, diabetic foot ulcers, otitis, peritonitis and bacteremia. Usually it does not cause infections in humans. There are few case reports described in the literature, mainly affecting immunocompromised patients. The pathogenicity, life cycle, reservoir and antimicrobial resistance mechanisms of *B. trematum* are poorly elucidated. Virulence factors are critical to the establishment of the infection. Identifying them is crucial to understand bacterial pathogenesis and interaction with the host. Information about antimicrobial resistance mechanisms plays a key role in the choice of appropriate therapy which may contribute to a favorable clinical outcome. The aims of this work were to report a rare case of *B. trematum* in diabetic ulcer and to present the cases already described by other authors; to investigate and describe the function of possible genes encoding virulence factors; to investigate and describe the function of possible antimicrobial resistance genes, as well as to evaluate the antimicrobial resistance phenotype of the clinical isolate, correlating it to the genotype. The isolate was identified by the VITEK 2 system, whose identification was confirmed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the VITEK-MS system. Afterwards, it was submitted to whole genome sequencing by the Illumina MiSeq technology, with subsequent bioinformatic analysis. The virulence and antimicrobial resistance genes were investigated using the ABRicate tool in the Virulence Factors Database (VFDB) and Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD). The antimicrobial susceptibility was evaluated by broth microdilution. Sixteen genes encoding virulence factors were found, *cheA*, *cheW*, *cheI*, *fliI*, *fliN*, *fliC*, *bplA*, *bplA*, *bplB*, *bplC*, *bplD*, *iroN*, *mgtA*, *relA*, *mtrD* and *brkB*. These genes are involved in several functions in the bacterial cell, such as chemotaxis, motility, lipopolysaccharide biosynthesis, iron and magnesium acquisition, remodeling of bacterial metabolism, expression of efflux pumps and resistance to complement-mediated cell death. Further studies are needed to evaluate the expression and functionality of these genes. In the resistance analysis, the *macB*, *mdsB*, *mexI* and *ceoB* genes related to efflux pumps were found. In the antimicrobial susceptibility test, only aztreonam had a high inhibitory concentration (>16 µg/mL). The absence of the *ftsI* gene, which encodes the penicillin-binding protein 3 (PBP3), targeting aztreonam, may be related to this phenotype. The efflux pumps found are not related to beta-lactam resistance. Additional studies will be needed to determine the impact of these efflux pumps on antimicrobial resistance in *B. trematum*.

Keywords: *Bordetella trematum*. Diabetic foot ulcer. Antimicrobial resistance. Virulence factors. Whole genome sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP- binding cassette</i>
CARD	<i>Comprehensive antibiotic resistance database</i>
CDT	<i>Cytolethal distending toxin</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeo
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FV	Fatores de virulência
IM	<i>Inner membrane</i>
IMP	<i>Inner membrane protein</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MALFI-TOF MS	<i>Matrix associated laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry</i>
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFP	<i>Membrane fusion protein</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
OM	<i>Outer membrane</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
PBP3	<i>Penicillin-binding protein 3</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-nodulation division</i>
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
TSA	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
VFDB	<i>Virulence factors database</i>

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	9
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1.1	O gênero <i>Bordetella</i>	11
1.1.2	A espécie <i>Bordetella trematum</i>	13
1.1.3	Identificação laboratorial de <i>Bordetella trematum</i>	18
1.1.4	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	19
1.1.5	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	23
1.1.6	Fatores de virulência em <i>Bordetella sp.</i>	27
1.1.7	A técnica de sequenciamento.....	29
1.1.8	Análise bioinformática.....	31
1.2	PROPOSIÇÃO.....	33
1.2.1	Objetivo geral.....	33
1.2.2	Objetivos específicos.....	33
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2	RESULTADOS	35
2.1	MANUSCRITO 1.....	35
2.2	MANUSCRITO 2.....	41
3	DISCUSSÃO	60
4	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	GLOSSÁRIO	70
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	71

1 APRESENTAÇÃO

O gênero *Bordetella* é composto atualmente por dezesseis espécies que habitam os mais diversos nichos ecológicos, sendo que algumas são capazes de causar infecções em animais e humanos (SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017). Uma das espécies que constitui esse gênero é *Bordetella trematum*, um cocobacilo Gram-negativo isolado inicialmente a partir de feridas e infecções de ouvido (VANDAMME et al., 1996). Na literatura, existem apenas 10 relatos de casos acerca deste microrganismo, que incluem infecções em úlceras de pé diabético (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013), bacteremia (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HALIM et al., 2014; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015), peritonite (TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017) e osteomielite (ALMUZARA et al., 2015). A interpretação clínica acerca de sua participação nesses casos por vezes foi prejudicada, devido ao caráter polimicrobiano das infecções (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; DAXBOECK et al., 2004; HALIM et al., 2014; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013). Nos casos relatados, a maioria dos pacientes apresentava comorbidades que predispunham a formação de feridas e/ou imunocomprometimento, como diabetes mellitus, doenças vasculares e renais (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016). Apenas em um relato de bacteremia que acometeu uma paciente hígida a fonte da infecção não pode ser presumida (SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015).

Metodologias utilizadas na rotina laboratorial, como MALDI-TOF MS e identificação automatizada pelo Sistema VITEK 2 (bioMérieux) foram capazes de identificar este microrganismo (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). Já a galeria API 20NE (bioMérieux) levou a achados discordantes e de baixa confiabilidade nos resultados obtidos (ALMUZARA et al. 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013). O método de referência para identificação de *B. trematum* consiste no sequenciamento do gene 16S rRNA (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015).

Apesar de estudos descreverem resistência de *B. trematum* aos antimicrobianos, os mecanismos pelos quais ocorre essa resistência não estão relatados (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; DAXBOECK et al., 2004;

DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HALIM et al., 2014; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017). Diversos são os mecanismos que possibilitam que bactérias se tornem resistentes aos antimicrobianos, como alteração nos alvos de ligação dos fármacos na célula bacteriana (MUNITA; ARIAS, 2016), modificação química ou hidrólise do antimicrobiano (BLAIR et al., 2014; MUNITA; ARIAS, 2016) e redução da permeabilidade de membrana (DELCOUR, 2019). Além destes, há também as bombas de efluxo, que tem potencial de transportar antibióticos e antissépticos do citosol da célula bacteriana para o exterior, impedindo a ação dessas substâncias (BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014).

Apesar de *B. trematum* causar infecções em humanos, os FV desta espécie estão pouco elucidados (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015). O conhecimento a respeito da virulência mostra-se importante no entendimento dos possíveis meios que esse microrganismo utiliza para causar danos ao hospedeiro (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; COOTE, 2001). Nesse sentido, o WGS, possibilitado pelo advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*- NGS), consiste em uma abordagem necessária para a compreensão da virulência devido ao seu potencial de identificar genes que codifiquem FV (DEURENBERG et al., 2017; LIU et al., 2012). O WGS é aplicável a diversas áreas devido a sua capacidade de gerar informações sobre do DNA em uma única corrida (KULSKI, 2016). Também permite que informações adicionais de diversas características do microrganismo sejam descritas, como a presença de genes e identificação de mutações que conferem resistência aos antimicrobianos (DEURENBERG et al., 2017).

Em função da quantidade limitada de informações acerca de *B. trematum*, evidencia-se a necessidade de mais estudos para esclarecer aspectos a respeito da relevância clínica deste microrganismo. A elucidação acerca da virulência é importante para a predição da gravidade de doenças. Já o conhecimento do perfil de resistência aos antimicrobianos auxilia na escolha correta da antibioticoterapia, que pode contribuir para um desfecho clínico favorável (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015). Nesse sentido, o WGS e a análise bionfornática tem papel fundamental por possibilitar a avaliação de múltiplos genes por meio de ferramentas *online* (DEURENBERG et al., 2017).

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 O gênero *Bordetella*

O gênero *Bordetella*, pertencente à família *Alcaligenaceae*, é composto atualmente por dezesseis espécies. São elas: *B. ansorpii*, *B. avium*, *B. bronchialis*, *B. bronchiseptica*, *B. flabilis*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. muralis*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. petrii*, *B. pseudohinzii*, *B. sputigena*, *B. trematum*, *B. tumbae* e *B. tumulicula*. Estes microrganismos podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos, como solo, água, sedimentos e plantas. Também podem ser isolados a partir de animais e humanos, sendo capazes de causar infecções em diversos sítios nestes hospedeiros (SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017; TAZATO et al., 2015).

B. pertussis, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, espécies clássicas do gênero, são os patógenos de maior importância na medicina humana e veterinária, devido a sua capacidade de causar infecções no trato respiratório. Enquanto *B. pertussis* é um patógeno restrito aos seres humanos, causando a coqueluche, *B. parapertussis* possui duas linhagens, o que permite que esse microrganismo infecte humanos e ovinos. *B. bronchiseptica*, por possuir maior capacidade adaptativa, dissemina-se nos mais diversos hospedeiros. Por meio de comparações genômicas e análises filogenéticas, foi demonstrado que *B. pertussis* e *B. parapertussis* adaptaram-se ao hospedeiro humano devido à evolução independente a partir de um ancestral de *B. bronchiseptica* (DIAVATOPOULOS et al., 2005; LINZ et al., 2016; PARKHILL et al., 2003; SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017).

As demais espécies pertencentes ao gênero *Bordetella* são filogeneticamente distintas das três espécies clássicas (LINZ et al., 2016; SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017). *B. bronchialis*, *B. flabilis* e *B. sputigena* foram isoladas em espécimes do trato respiratório de pacientes portadores de fibrose cística (SPILKER et al., 2014; VANDAMME et al., 2015). *B. avium* é o agente causador de bordetelose (traqueobronquite), uma doença altamente contagiosa que acomete aves selvagens e domésticas, como perus e galinhas. Este microrganismo já foi isolado a partir de amostras clínicas de hospedeiros humanos portadores de doenças respiratórias e fibrose cística (HARRINGTON et al., 2009; MCLAUGHLIN et al., 2017). *B. hinzii*, assim como *B. avium*, causa infecções respiratórias em aves. Em raras ocasiões foi encontrada em roedores. Em humanos, há relatos de infecções pulmonares e digestivas, além de bacteremia e endocardite acometendo pacientes imunocomprometidos, indicando ser um patógeno oportunista (FABRE et al., 2015; GONZÁLEZ et al., 2019;

VANDAMME et al., 1995). Descrita recentemente, *B. pseudohinzii* foi encontrada apenas em camundongos (IVANOV et al., 2016).

Com apenas dois casos relatados, *B. ansorpii* foi isolada a partir de exsudato purulento de cisto epidérmico (KO et al., 2005) e hemoculturas de um paciente portador de leucemia (FRY et al., 2007). Já *B. holmesii* é responsável por causar infecções respiratórias, como a coqueluche (FONG et al., 2018; MIR-CROS et al., 2017), infecções osteoarticulares (HUMPHREY et al., 2015; NADJI et al., 2018) e invasivas como bacteremia e endocardite, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (FISHBAIN et al., 2015; WEYANT et al., 1995).

B. petrii, a primeira espécie ambiental descrita para o gênero *Bordetella*, foi isolada inicialmente a partir de culturas de um biorreator de remoção de cloro enriquecido com sedimento fluvial (VON WINTZINGERODE et al., 2001). Também foram encontradas cepas deste microrganismo em outras amostras ambientais como membros de comunidades microbianas em raízes de gramíneas (CHOWDHURY et al., 2007) e esponjas marinhas (SFANOS et al., 2005). Ainda, há cepas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como benzeno e naftaleno (BIANCHI et al., 2005; WANG et al., 2007), o que gera possibilidade de aplicação biotecnológica deste microrganismo para tratamento de efluentes (GROSS et al., 2008; HINGURAO; NERURKAR, 2018; SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017). Além das fontes ambientais, *B. petrii* foi isolada de pacientes em casos de osteomielite mandibular (FRY et al., 2005), mastoidite supurativa (STARK et al., 2007), artrite séptica e osteomielite (NOGI; BANKOWSKI; PIEN, 2015), fratura óssea (KWON et al., 2016) e sinusite (NAGATA et al., 2015). Também acometeu pacientes portadores de fibrose cística (BIEDERMAN et al., 2015; SPILKER; LIWIENSKI; LIPUMA, 2008) e bronquiectasia (BLANCO et al., 2016; LE COUSTUMIER et al., 2011), o que sugere uma ampla adaptabilidade desta espécie bacteriana. Novas espécies ambientais foram descritas, denominadas *B. muralis*, *B. tumulicula* e *B. tumbae*, encontradas na superfície de uma parede de gesso do túmulo Takamatsuzuka, localizado no Japão. Este isolamento pode indicar uma possível ação biodeteriorante destas bactérias (TAZATO et al., 2015).

B. trematum é mais uma das espécies constituintes do gênero *Bordetella*. Foi descrita pela primeira vez em 1996, em um estudo com cepas atípicas ou não classificadas provenientes de feridas e otites que acometeram humanos. A realização de análises genotípicas e fenotípicas destas cepas resultou na identificação e classificação taxonômica desta espécie (VANDAMME et al., 1996).

1.1.2 A espécie *Bordetella trematum*

Este microrganismo não é encontrado frequentemente em espécimes clínicos, dados os raros relatos de casos existentes na literatura (Quadro 1). Em alguns casos, foi considerado como um agente colonizador transitório (HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013), não havendo necessidade de tratamento farmacológico. Em outro, foi considerado a causa da infecção (MAJEWSKI et al., 2016). A interpretação clínica acerca de sua participação em quadros infecciosos por vezes foi prejudicada, devido ao caráter polimicrobiano das infecções das quais o microrganismo foi isolado (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; DAXBOECK et al., 2004; HALIM et al., 2014; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013).

Está tipicamente associado a infecções em úlceras de tecidos, particularmente em paciente diabéticos, portadores de vasculopatias e insuficiência renal (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013). Em outras ocasiões, foi recuperado a partir de hemocultura de pacientes com comorbidades como diabetes mellitus, doença renal e doença arterial (MAJEWSKI et al., 2016) e câncer (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018). A bacteremia ocorreu, ainda, em um caso de queimadura torácica por gás butano (HALIM et al., 2014) e um caso de uma paciente hígida de sete meses de idade, em que a fonte da infecção não pôde ser estabelecida (SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). Um isolamento de *B. trematum* a partir de cultura de uma biópsia óssea de um paciente com histórico de artrite séptica de quadril também foi relatado (ALMUZARA et al., 2015), bem como de um caso de peritonite secundária a perfuração de apêndice (TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017). Contudo, pode não ser um microrganismo estrito a seres humanos, pois uma estirpe já foi encontrada no rúmen de bovinos coreanos (CHANG et al., 2015).

Quadro 1- Relatos de casos associados à *Bordetella trematum*

(Continua)

Autor(es)	Informações clínicas	Intervenções e desfecho clínico	Microrganismos isolados
Daxboeck et al. (2004)	Homem, 82 anos, portador de diabetes mellitus tipo 2, com úlcera infectada em pé esquerdo	Tratamento inicial com 10 dias de amoxicilina-ácido clavulânico e ciprofloxacino por via oral; persistência de úlcera, com presença de secreção e inflamação de tecido circundante; como não houve melhora clínica, optou-se por suspender o tratamento com antimicrobianos; ocorreram infecções recorrentes; dois anos depois houve cicatrização quase por completo da ferida sem intervenção cirúrgica	Cultura de swab de úlcera de pé esquerdo: <i>Bordetella trematum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Infecções intermitentes: <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp.
Hernández-Porto et al. (2013)	Mulher, 76 anos, diabética, portadora de insuficiência renal e doença vascular periférica, úlceras nas extremidades inferiores	Tratamento com vancomicina por duas semanas; após persistência da lesão, a paciente foi tratada por 21 dias com cotrimoxazol e 14 dias com ceftazidima, evoluindo favoravelmente	Cultura de material da úlcera de membro inferior: <i>Corynebacterium</i> spp. Após persistência da lesão: <i>B. trematum</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> Após duas semanas sem tratamento: <i>A. xylosoxidans</i>
Halim et al. (2013)	Homem, 60 anos, sem histórico de patologias, apresentando queimadura no tórax por acidente doméstico com gás butano	Tratamento antimicrobiano com imipenem, netilmicina e colistina; após seis dias de hospitalização em unidade de terapia intensiva, o paciente foi a óbito devido a choque séptico	Cultura de material proveniente da queimadura: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Acinetobacter baumannii</i> Hemocultura: <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>B. trematum</i>
Almagro-Molto, Eder, Schubert (Caso 1) (2015)	Homem, 65 anos, portador de diabetes mellitus, doença vascular periférica e úlcera de pé diabético	Após desbridamento e tratamento por sete dias com ciprofloxacino, houve pouca melhora clínica, com deterioração da úlcera após uma semana; paciente recusou medicação e hospitalização, persistindo a infecção	Cultura do material de desbridamento da úlcera: <i>B. trematum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Morganella morganii</i> Após piora clínica: <i>B. trematum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>A. faecalis</i>
Almagro-Molto, Eder, Schubert (Caso 2) (2015)	Mulher, 72 anos, suspeita de osteomielite, defeitos ósseos nos pés e tornozelos, desordem venosa, função renal debilitada, úlcera em ambos os pés	Tratamento com ciprofloxacino por 14 dias e terapia de compressão; apesar de melhora clínica, ambos os membros foram amputados após 3 semanas e foi iniciado tratamento por sete dias com piperacilina-tazobactam seguido de sete dias de meropenem; não ocorreu nova infecção	Cultura de material de úlcera: <i>B. trematum</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>A. faecalis</i> Após amputação de membros inferiores: <i>B. trematum</i> , <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA), <i>A. faecalis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Quadro 1- Relatos de casos associados à *Bordetella trematum*

(Continuação)

Autor(es)	Informações clínicas	Intervenções e desfecho clínico	Microrganismos isolados
Saksena, Manchanda, Mittal (2015)	Menina, sete meses de idade, febril, apresentando vômitos, movimentos anormais nas mãos, choro ao urinar, diminuição do volume urinário, atraso no desenvolvimento, além de palidez grave, suspeita clínica de bacteremia	Início da terapia empírica com ceftriaxona por cinco dias; continuidade da febre levou a troca de tratamento para piperacilina-tazobactam e ampicilina; no 12º dia terapia foi modificada para ciprofloxacino e azitromicina; fonte de infecção sistêmica não foi estabelecida; paciente evoluiu favoravelmente	Hemocultura inicial estéril após 48h Hemocultura após 5 dias de internação: <i>B. trematum</i> Hemocultura após troca de antibioticoterapia: estéril
Almuzara et al. (2015)	Homem, 14 anos, febril e hemodinamicamente instável, apresentando artrite séptica no quadril esquerdo, não responsiva ao tratamento causada por <i>Staphylococcus aureus</i> . Diagnóstico de osteomielite crônica	Realização de múltiplas curetagens e higienizações dos ossos do quadril, com implantação de pinos e tração esquelética; antibioticoterapia foi realizada com meropenem e sulfametoxazol-trimetoprim por seis meses; após esse período, paciente recebeu alta hospitalar e o tratamento foi modificado para minociclina	Biópsia óssea: <i>B. trematum</i> e <i>Escherichia coli</i>
Majewski et al (2016)	Homem transgênero (identificado como sexo feminino), 61 anos com amputações abaixo do joelho em ambos os membros inferiores, portadora de diabetes mellitus, doença renal crônica estágio IV e doença arterial coronariana, apresentando fratura de cabeça do fêmur direito após queda, dificuldade respiratória, choque séptico e piora de ferida em perna esquerda após hospitalização	Paciente foi submetida à intubação e uso de medicamentos vasopressores; foi aplicada antibioticoterapia empírica com piperacilina-tazobactam e vancomicina; devido à piora da infecção na ferida da perna esquerda, o tratamento foi alterado para ciprofloxacino intravenoso; clindamicina também foi acrescentada devido a possibilidade de fasciíte necrosante; com a persistência do quadro de septicemia, tobramicina via intravenosa foi adicionada ao tratamento; apesar de culturas da lesão não apresentarem crescimento de microrganismos, a ferida foi presumida como foco primário da infecção; a paciente foi a óbito sete dias após hospitalização	Hemocultura: <i>B. trematum</i>
Tena, Medina, Sáez-Nieto (2017)	Mulher, 54 anos, apresentando dor abdominal, febre, náusea e vômito, sem histórico prévio de patologias. Diagnóstico de peritonite secundária à apendicite perfurada	Realizada cirurgia para ressecção de apêndice cecal e limpeza da cavidade abdominal; administração de amoxicilina-ácido clavulânico como profilaxia cirúrgica; antibioticoterapia empírica foi realizada com piperacilina-tazobactam por cinco dias; após esse período foi modificada para ciprofloxacino por mais cinco dias; não houve recorrência dos sintomas	Cultura de fluido peritoneal: <i>B. trematum</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>Xanthobacter</i> sp.

Quadro 1- Relatos de casos associados à *Bordetella trematum*

(Conclusão)

Autor(es)	Informações clínicas	Intervenções e desfecho clínico	Microrganismos isolados
Desurmont-Dupas et al. (2018)	Mulher, 65 anos, portadora de câncer de mama estágio IV, apresentando sangramento torácico espontâneo em lesão neoplásica	Realizada troca de cateter central de inserção periférica; administração de antibioticoterapia com piperacilina-tazobactam por três semanas; a paciente evoluiu favoravelmente	Frasco de hemocultura 1: <i>B. trematum</i> e <i>A. faecalis</i> Frasco de hemocultura 2: <i>A. faecalis</i> Hemocultura após terapia: estéril

Fonte: autora.

1.1.3 Identificação laboratorial de *B. trematum*

Morfológicamente, *B. trematum* apresenta-se na forma de cocobacilos Gram-negativos encapsulados e móveis, não formadores de esporos, medindo de 0,5 a 0,6 µm de largura e 1 a 1,8 µm de comprimento. Cresce em meios de cultura convencionais, sem requisitos de fatores de crescimento adicionais. Gera colônias circulares convexas de cor branca a cinza no ágar sangue (Figura 1). É capaz de crescer a temperatura de 42°C, tendo crescimento reduzido a 25°C. Apesar de aeróbio, pode crescer em microaerofilia (VANDAMME et al., 1996).

Figura 1- Morfologia das colônias de isolado de *Bordetella trematum* em ágar sangue



Fonte: autora.

Não fermenta glicose, possui reações de urease e lisina descarboxilase negativas, catalase e citrato positivas e redução de nitrato variável (VANDAMME et al., 1996). Discordâncias ocorrem acerca do teste da oxidase, visto que alguns autores relatam o resultado do teste como positivo (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HALIM et al., 2014; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), enquanto outros o trazem como negativo (DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; VANDAMME et al., 1996).

Mesmo com a identificação sendo possibilitada em equipamentos utilizados na rotina de laboratórios, a literatura reporta apenas 10 casos, conforme descrito anteriormente. As técnicas de identificação que foram utilizadas nestes casos consistiram em sistema VITEK 2 (HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015),

MALDI-TOF MS (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; MAJEWSKI et al., 2016), e API 20 NE (bioMérieux), que identificou o achado como *B. avium*, pois na base de dados para identificação não havia *B. trematum* (DAXBOECK et al., 2004; HALIM et al., 2014; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013). Em outro caso, também utilizando API 20 NE, *B. trematum* foi identificada como *Achromobacter denitrificans/Bordetella bronchiseptica*. Segundo os autores, isso pode ter ocorrido porque o teste de redução de nitrato foi variável e o reagente utilizado no teste da oxidase foi diferente do utilizado por outros pesquisadores, levando a um achado discordante e baixa confiabilidade nos resultados obtidos (ALMUZARA et al., 2015).

A confirmação da identificação em alguns casos foi feita por sequenciamento do gene 16S rRNA (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; DAXBOECK et al., 2004; HALIM et al., 2014; MAJEWSKI et al., 2016; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), que consiste no método de referência para identificação de *B. trematum* (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015). A análise da sequência do gene 16S rRNA permite a identificação da espécie bacteriana pois este é constitutivo e apresenta porções altamente variáveis, o que confere características moleculares únicas para determinado gênero/espécie (JANDA; ABBOTT, 2007).

1.1.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos casos descritos, foram utilizadas metodologias como E-test (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), disco-difusão (HALIM et al., 2014; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016), microdiluição em caldo (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; MAJEWSKI et al., 2016), e sistema VITEK 2 (ALMUZARA et al., 2015; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). Contudo, não existem diretrizes específicas publicadas pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para realização de teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para essa espécie. Desta forma, os autores relatam a utilização de critérios de interpretação para Não-*Enterobacteriaceae* disponíveis no CLSI e critérios de interpretação para *Enterobacteriaceae* para antibióticos como ampicilina e cefalotina (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015;

HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos casos relatados estão demonstrados no quadro 2.

Foi relatada resistência para amicacina (HALIM et al., 2014; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015), amoxicilina-ácido clavulânico (HALIM et al., 2014), ampicilina (TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), aztreonam (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013), cefepime (TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), cefotaxima (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), ceftazidima (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; HALIM et al., 2014; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015), ceftriaxona (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018), cefuroxima (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016), ciprofloxacino (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013), cefalotina (HALIM et al., 2014), colistina (SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015), ertapenem (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015), fosfomicina (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018), gentamicina (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; HALIM et al., 2014; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015), meropenem (SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017), sulfametoxazol-trimetoprim (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018) e tobramicina (HALIM et al., 2014).

Quadro 2- Perfis de susceptibilidade de *B. trematum* frente aos antimicrobianos

(Continua)

Antibiótico	Daxboeck et al. (2004)	Hernández-Porto et al. (2013)	Halim et al. (2014)	Almagro-Molto, Eder, Schubert (Caso 1) (2015)	Almagro-Molto, Eder, Schubert (Caso 2) (2015)	Saksena, Manchanda, Mittal (2015)	Almuzara et al. (2015)	Majewski et al. (2016)	Tena, Medina, Sáez-Nieto (2017)	Desurmont-Dupas et al. (2018)
Amicacina	S	S (CIM 16 mg/L)	R	S	S	R (CIM 64 µg/ml)	S (CIM 16 µg/ml)	S (18 mm)	S (CIM 6 µg/ml)	-
Amoxicilina-clavulanato	S	S (CIM 2mg/L)	R	S	S	-	-	S (23 mm)	S (CIM 2 µg/ml)	CIM 1 µg/ml
Ampicilina	-	-	-	S	S	-	I ¹ (CIM 16 µg/ml)	-	R (CIM>32 µg/ml)	-
Ampicilina-sulbactam	-	-	-	-	-	S (CIM 8 µg/ml)	I ¹ (CIM 16 µg/ml)	-	-	-
Azitromicina	-	-	-	-	-	CIM 2µg/ml	-	-	-	-
Aztreonam	-	R (CIM>32mg/L)	-	-	-	-	-	-	-	R
Cefepime	-	-	-	S	S	I ¹ (CIM 16 µg/ml)	S (CIM 4 µg/ml)	-	R (CIM>16 µg/ml)	-
Cefotaxima	S	R (CIM>32mg/L)	R	R	R	-	I ¹ (CIM 32 µg/ml)	I ¹ (CIM 16 µg/ml)	R (CIM>32 µg/ml))	-
Cefoxitina	-	-	-	R	R	-	-	-	-	R
Ceftazidima	S	S (CIM 8 mg/L)	R	R	R	R (CIM 64 µg/ml)	S (CIM 4 µg/ml)	S (CIM 8 µg/ml)	-	-
Ceftriaxona	-	-	-	-	-	I ¹	-	-	-	R
Cefuroxima	R	R (CIM 4mg/L)	-	R	R	-	-	R	-	R
Ciprofloxacino	R	R (CIM 4mg/L)	S	R	R	S (CIM 1 µg/ml)	I ¹ (CIM 2 µg/ml)	S (CIM 0,008 µg/ml)	S (CIM 0,75 µg/ml)	CIM 0,75 µg/ml
Claritromicina	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-
Cefalotina	-	-	R	-	-	-	S (CIM 8 µg/ml)	-	-	-
Colistina	-	-	S	-	-	R (CIM 16 µg/ml)	S (CIM ≤ 0,5µg/ml)	-	-	-

Quadro 2- Perfis de susceptibilidade de *B. trematum* frente aos antimicrobianos

(Conclusão)

Antibiótico	Daxboeck et al. (2004)	Hernández-Porto et al. (2013)	Halim et al. (2014)	Almagro-Molto, Eder, Schubert (Case 1) (2015)	Almagro-Molto, Eder, Schubert (Case 2) (2015)	Saksena, Manchanda, Mittal (2015)	Almuzara et al. (2015)	Majewski et al. (2016)	Tena, Medina, Sáez-Nieto (2017)	Desurmont-Dupas et al. (2018)
Doxiciclina	-	-	S	-	-	-	-	-	S (CIM 0,5 µg/ml)	-
Ertapenem	-	-	-	R	I ¹	-	-	-	S (CIM 0,008 µg/ml)	-
Fosfomicina	-	-	-	R	R	-	-	-	-	R
Gentamicina	S	S (CIM 4 mg/L)	R	S	S/R*	R (CIM 16 µg/ml)	S (CIM 4 µg/ml)	R (11 mm)	S (CIM 2 µg/ml)	-
Imipenem	S	S (CIM 0,5 mg/L)	S	S	S	S (CIM 1 µg/ml)	S (CIM ≤1 µg/ml)	S (CIM 0,25 µg/ml)	S (CIM 0,25 µg/ml)	-
Levofloxacino	-	-	-	S	S/I*	I (CIM 4 µg/ml)	-	S (CIM 0,03 µg/ml)	S (CIM 0,75 µg/ml)	-
Meropenem	-	S (CIM 0,125 mg/L)	-	S	S	R (CIM 16 µg/ml)	S	-	R (CIM 0,023 µg/ml)	-
Minociclina	-	-	S	S	S	-	-	-	-	-
Netilmicina	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-
Piperacilina	-	-	-	S	S	I (CIM 64 µg/ml)	-	-	-	-
Piperacilina-tazobactam	S	S (CIM 1 mg/L)	-	S	S	S (CIM 8 µg/ml)	CIM ≤4 µg/ml	S (CIM 2 µg/ml)	S (CIM 1 µg/ml)	-
Sulfametoxazol - trimetoprim	-	S (CIM 0,5mg/L)	-	S	S	S (CIM 20 µg/ml)	S (CIM 2 µg/ml)	-	-	R
Tigeciclina	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-
Tobramicina	-	-	R	S	S	I	-	S (15 mm)	S (CIM 1,5 µg/ml)	-
Metodologia do TSA	E-test	E-test Disco-difusão	Disco-difusão	E-test Microdiluição em caldo	E-test Microdiluição em caldo	E-test VITEK 2	VITEK 2	Disco-difusão Microdiluição em caldo	E-test	E-test

Fonte: autora.

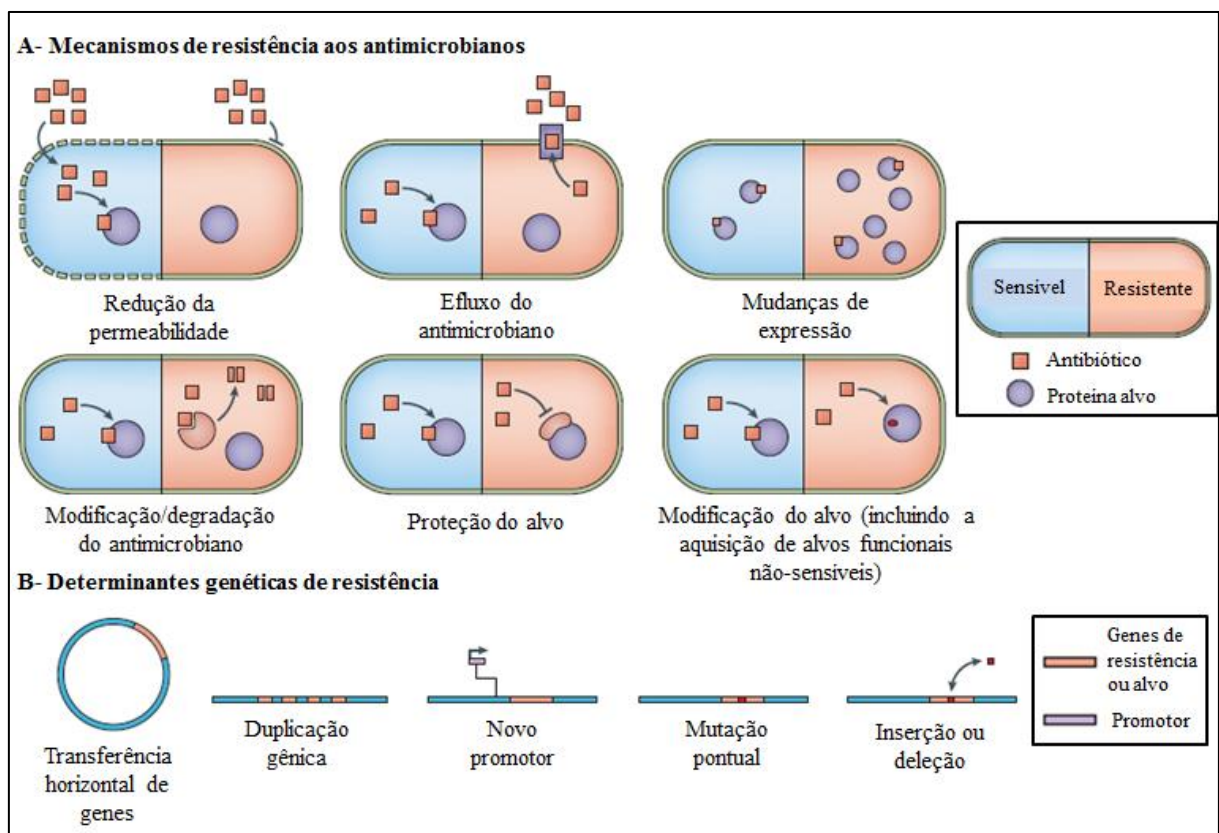
Legenda: S- Sensível; R- Resistente; I- Intermediário; CIM- concentração inibitória mínima; *Mudança no perfil de susceptibilidade no segundo isolado.

¹Intermediário é uma categoria que inclui isolados com concentração inibitória mínima (CIM) ou diâmetros dentro de uma faixa que aborda níveis de fármacos normalmente alcançáveis em sangue e tecidos para os quais as taxas de resposta podem ser mais baixas do que para isolados susceptíveis, implicando em eficácia clínica em locais do corpo onde a droga é fisiologicamente concentrada ou quando uma dosagem maior que o habitual pode ser utilizada. Esta categoria também inclui uma zona tampão, a fim de evitar que pequenos fatores técnicos causem grandes discrepâncias nas interpretações, especialmente para medicamentos com margens estreitas de farmacotoxicidade (CLSI, 2019).

1.1.5 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Diversos são os mecanismos pelos quais as bactérias podem apresentar resistência aos antimicrobianos (Figura 2A). Essa resistência pode dar-se de forma intrínseca, adaptativa ou adquirida. A resistência intrínseca refere-se às propriedades inerentes de um microrganismo limitar a ação de antimicrobianos. Pode ocorrer devido à ausência do alvo da droga, barreira de permeabilidade da membrana externa da célula bacteriana e bombas de efluxo expressas constitutivamente. Já a resistência adaptativa consiste na capacidade de um organismo de se adaptar e sobreviver a condições de estresse, alterando rapidamente seu transcriptoma em resposta a estímulos ambientais. A resistência adquirida ocorre quando um organismo sensível a antibióticos se torna resistente por meio da aquisição de genes ou como resultado de mutações (Figura 2B) (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

Figura 2- Mecanismos de resistências aos antimicrobianos



Fonte: adaptado de BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019.

Um dos mecanismos pelos quais se dá a resistência é a redução da permeabilidade de membrana celular. A membrana externa (*outer membrane*- OM) das bactérias Gram-negativas desempenha o papel crucial de fornecer uma camada extra de proteção ao organismo, sem comprometer a troca de material necessária para sustentar a vida. Esta membrana é constituída por uma bicamada lipídica altamente hidrofóbica juntamente com proteínas formadoras de poros, que permitem a entrada de determinadas substâncias na célula bacteriana. Como a ação da maioria dos antimicrobianos é essencialmente direcionada a processos intracelulares, e dessa forma dependem da penetração na célula, modificações na composição lipídica ou proteica da OM podem prejudicar o mecanismo de ação dos fármacos (DELCOUR, 2019).

Também pode ocorrer a modificação direta do antibiótico, em que as bactérias conseguem destruir ou alterar a estrutura dos antimicrobianos, impedindo dessa forma sua ação. Pode ocorrer devido à hidrólise catalisada por enzimas bacterianas, como no caso das β -lactamases. Outro mecanismo consiste em promover modificações como a adição de grupos químicos na molécula de antibiótico, impedindo dessa forma sua ligação à proteína alvo como resultado de obstrução estérica (BLAIR et al., 2014; FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; MUNITA; ARIAS, 2016).

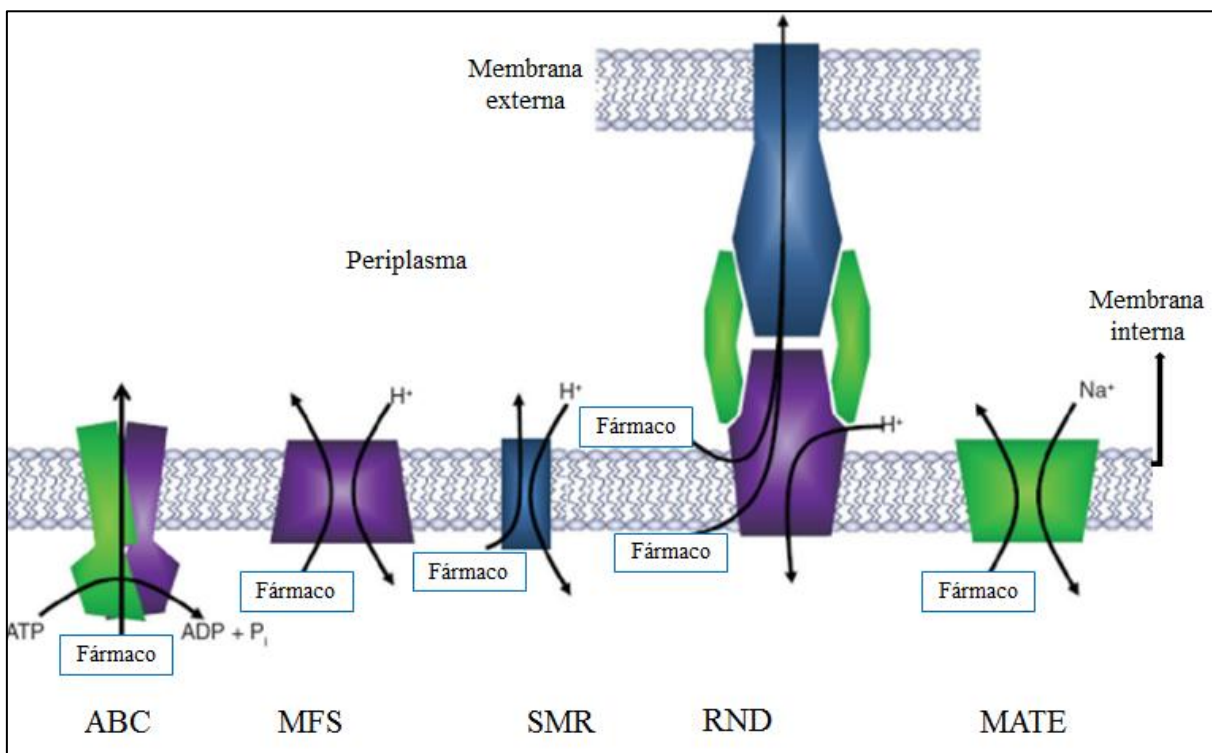
A modificação do alvo de ligação do fármaco consiste em uma forma de resistência. A maioria dos antibióticos se liga especificamente aos seus alvos com alta afinidade, prejudicando a atividade normal do alvo. Quando ocorrem alterações nessas estruturas, como mutações pontuais, impede-se que o antibiótico se ligue de forma eficiente, diminuindo sua potência, sem afetar a função fisiológica do alvo. Também pode ocorrer devido à aquisição de genes homólogos ao alvo original, que são funcionais, mas não permitem a ligação dos antibióticos. Já no caso da proteção por modificação do alvo, pode ocorrer a adição de um grupo químico na proteína alvo, o que impede a ligação do antibiótico, sem alterar a sequência do gene que codifica essa proteína (MUNITA; ARIAS, 2016).

Outro mecanismo pelo qual os microrganismos evadem da ação dos antimicrobianos é por meio da expressão de bombas de efluxo. Essas estruturas medeiam o transporte ativo de moléculas e fármacos para o exterior do microrganismo. As bombas podem ser específicas para um substrato ou transportar compostos de diferentes estruturas, como antibióticos de múltiplas classes. Nestes casos, denominam-se bombas de efluxo multidroga resistentes (*multidrug resistance*- MDR) (WEBBER; PIDDOCK, 2003). Com a ação de efluxos, a concentração do fármaco torna-se insuficiente para inibir as funções celulares da bactéria, acarretando em resistência antimicrobiana (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

Alguns genes que codificam a expressão de bombas de efluxo podem ser encontrados em plasmídeos e, dessa forma, ser transferidos entre as bactérias, disseminando o mecanismo de resistência (BLAIR et al., 2014). Ademais, mutações que levam à superexpressão das bombas de efluxo constitutivas podem selecionar microrganismos resistentes sem a aquisição de novo material genético (WEBBER; PIDDOCK, 2003).

As bombas de efluxo em bactérias podem ser classificadas em cinco grandes famílias, de acordo com sua relação filogenética: *ATP Binding Cassette* (ABC), *Resistance-Nodulation Division* (RND), *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Small Multidrug Resistance* (SMR) e *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015; POOLE, 2007)(Figura 3).

Figura 3- Localização dos diferentes tipos de bombas de efluxo na célula bacteriana



Fonte: adaptado de BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014.

Legenda: O influxo de fármacos através da membrana externa pode ocorrer por até três vias: porinas, proteínas que formam canais específicos e regiões da bicamada lipídica. Após a sua entrada no espaço periplasmático, as moléculas do fármaco penetram na membrana interna através de difusão. No entanto, essas drogas podem ser extrusadas da célula por bombas de efluxo. Enquanto as bombas ABC, MFS, SMR e MATE expulsam substâncias do citosol para o periplasma, bombas RND capturam seus substratos tanto do interior da célula quanto do periplasma, expulsando-os para o meio externo. Dessa forma, pode conferir um aumento muito mais pronunciado na CIM quando comparados a transportadores de efluxo ABC, MFS, SMR e MATE.

Sistemas de efluxo da família ABC caracterizam-se pelo uso e hidrólise de ATP como fonte de energia para fazer o transporte dos antimicrobianos para fora da célula bacteriana. Possuem um transportador que é composto por dois domínios hidrofóbicos e dois domínios hidrofílicos localizados na interface do citoplasma. Essa classe tem grande especificidade por substratos que contenham em sua composição moléculas como açúcares, complexos de ferro, vitaminas, aminoácidos, cátions metálicos e fármacos antimicrobianos (LYNCH, 2006). Um dos transportadores de fármacos da família ABC é a proteína MacB, que funciona em conjunto com outras proteínas: o adaptador periplasmático MacA e o canal da membrana externa TolC. O sistema MacAB-TolC eleva a CIM de macrolídeos quando superexpresso. Fisiologicamente, pode estar envolvido da exportação do LPS ou seus intermediários biossintéticos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

Aa bombas de efluxo pertencentes à família RND tem como característica serem tripartite. São formadas por uma proteína de membrana externa (*Outer Membrane Protein-OMP*), uma proteína de membrana interna (*Inner Membrane Protein-IMP*) e uma proteína de fusão de membrana (*Membrane Fusion Protein-MFP*) (LLOYD; NAZARET; BARKAY, 2019). Funcionam devido ao antiporte de íons H^+ , expulsando antissépticos, detergentes, desinfetantes, ácidos graxos, sais biliares, corantes e solventes (POOLE, 2007). Também podem expelir antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, quinolonas e fluorquinolonas, além de outros fármacos como cloranfenicol, ácido fusídico, novobiocina, polimixina B, rifampicina, sulfametoxazol, tetraciclina, tigeciclina, trimetoprim, vancomicina e clindamicina (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Esse sistema de bombas é eficiente em conferir resistência detectável aos antimicrobianos, pois as moléculas são exportadas diretamente para o meio externo, conforme demonstrado na figura 3. Dessa forma, dificultam o retorno da droga para a célula bacteriana, impedindo-a de exercer sua ação (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

Efluxos da classe MFS estão envolvidos no transporte de vários substratos, como íons essenciais, metabólitos, nutrientes e fármacos (SAIER JR., 2007). Localizam-se na membrana interna da célula bacteriana e exportam drogas do citosol para o espaço periplasmático (Figura 3). Como a maioria dos fármacos atinge o citosol por difusão livre através da bicamada da membrana, os mesmos conseguem penetrar novamente na bactéria. Devido a isso, esse mecanismo não confere alto nível de resistência aos antimicrobianos. No entanto, se bombas de efluxo do tipo RND estiverem presentes, podem capturar essas moléculas de droga do periplasma e, assim, aumentar sinergicamente a atividade das bombas MFS na produção de resistência (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

Na família SMR, as bombas de efluxo tem sua estrutura formada por quatro hélices transmembranares que funcionam como dímeros (MITCHELL; STONE; DEBER, 2019). Nesse sistema, o transporte de drogas para o exterior ocorre por meio de gradiente eletroquímico. Dessa forma, a bomba precisa de prótons para o seu funcionamento e há troca de íons H^+ pelo bombeamento de compostos (BAY; ROMMENS; TURNER, 2008). Dentre as substâncias que são exportadas por esse efluxo quando superexpresso estão detergentes, antissépticos e uma ampla gama de antibióticos, como β -lactâmicos (MIRIAGOU et al., 2004; VOURLI et al., 2003) e aminoglicosídeos (CHANG et al., 2004).

Transportadores MATE usam um diferencial eletroquímico de Na^+ e H^+ como força motriz de efluxo e podem reconhecer substâncias como compostos catiônicos e antibióticos, como aminoglicosídeos, fluorquinolonas (KURODA; TSUCHIYA, 2009) e cefalexina (ZHANG; CHERRINGTON; WRIGHT, 2007). A bomba de efluxo MATE também consegue expelir a clorexidina, um antisséptico amplamente utilizado (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

1.1.6 Fatores de virulência em *Bordetella* sp.

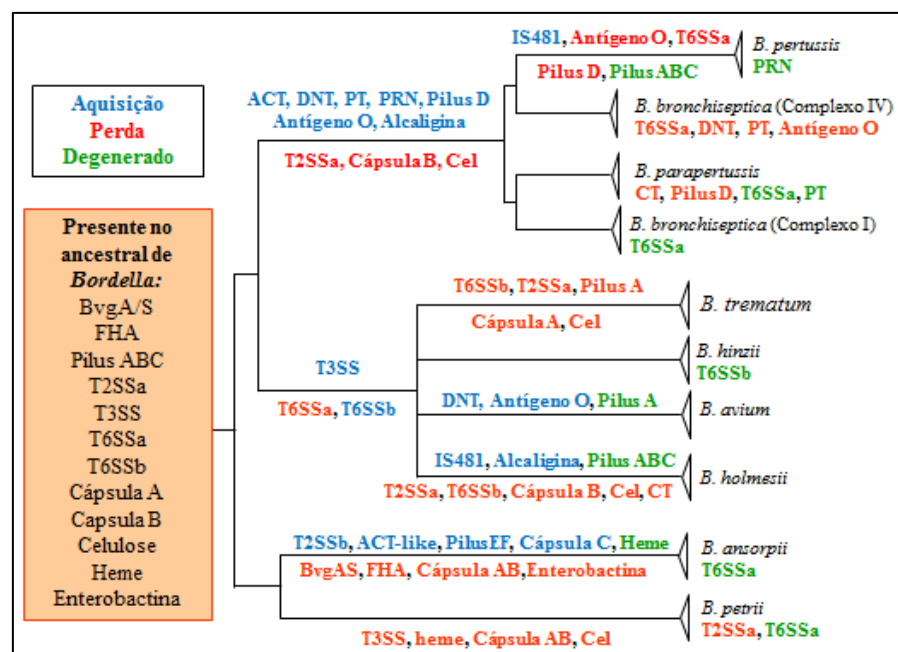
O termo “virulência” se refere à medida da patogenicidade de um microrganismo ou a capacidade deste causar infecção em um hospedeiro (CHEN et al., 2005; WEISS, 2002). Para estabelecer um processo infeccioso, um dos pontos cruciais consiste na capacidade de adaptação do patógeno aos mais variados ambientes, bem como aquisição de nutrientes para sua multiplicação. Os FV são essenciais para possibilitar a adesão do microrganismo às células do hospedeiro, evadir frente à resposta imune e persistir no meio ambiente (COOTE, 2001). A ocorrência de sintomas clínicos e a sobrevivência no hospedeiro dependem dos FV, que podem atuar isoladamente ou em associação nos diferentes estágios da infecção (CHEN et al., 2005, 2016; WU; WANG; JENNINGS, 2008; ZHENG et al., 2012).

A presença ou não de um gene relacionado à codificação de FV é um ponto a ser levado em consideração, pois permite inferências sobre uma possível relação entre a bactéria e o hospedeiro. O processo evolutivo pode contribuir na modificação do conteúdo genético, como perda ou aquisição de genes, inativação gênica, rearranjos e deleções (LINZ et al., 2016). Dessa forma, Soumana, Linz e Harvill (2017) realizaram um estudo baseado nas sequências dos genes 16S rRNA de *Bordetella* sp. para determinação da relação filogenética entre cepas isoladas de vários ambientes, como solo, água e plantas, e cepas de referência das espécies do gênero. As informações obtidas no estudo e a filogenia indicaram uma provável origem ambiental do gênero *Bordetella*. Algumas espécies patogênicas foram capazes de se

proliferar no solo e alguns isolados ambientais tiveram uma relação direta com espécies patogênicas. Tais dados sugerem que as espécies patogênicas podem ser descendentes de espécies ambientais por meio de aquisição de FV, sendo capazes de se adaptar e afetar hospedeiros humanos e animais. Assim, o solo pode ser um reservatório para o gênero *Bordetella*, implicando na permanência e dissipação dessas bactérias, explicando sua distribuição variada e surtos infecciosos que não apresentam fonte definida.

Diferentes fatores de virulência foram identificados para o gênero *Bordetella*. Sua distribuição é variável nas diferentes espécies desse gênero (LINZ et al., 2016), conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4- Esquematização da perda e aquisição de fatores de virulência durante a evolução e especiação do gênero *Bordetella*



Fonte: adaptado de LINZ et al., 2016.

Legenda: A evolução do gênero *Bordetella* em três cladogramas foi acompanhada de perda e/ou degeneração e/ou aquisição de fatores associados à patogenicidade. O ganho ou perda de genes indicados nos ramos da árvore afetou todo o clado ou a espécie. Eventos indicados abaixo do nome da espécie afetaram linhagens individuais. BvgAS: regulação da expressão de fatores de virulência e formação de biofilme; FHA (hemaglutinina filamentosa): adesão; Pilus ABCDEF: adesão; T2SSa (sistema de secreção tipo 2), T3SS (sistema de secreção tipo 3), T6SSa e T6SSb (sistema de secreção tipo 6): transporte de moléculas provenientes de células bacterianas, como adesinas e toxinas, do citoplasma para o meio extracelular e para as células hospedeiras; Cápsula ABC: ação anti-complemento; Celulose: biossíntese de polímero semelhante a celulose; Heme, Enterobactina e Alcaligina: aquisição de ferro, auxiliando na sobrevivência e no crescimento dos patógenos; ACT (adenilato ciclase): interfere com AMP cíclico, inibindo quimiotaxia e fagocitose; IS481: sequência de inserção, pode ativar a expressão gênica; DNT (toxina dermonecrótica): efeito vasoconstritor; PT (toxina pertussis): imunogênica, interfere na função leucocitária, produz hemólise, ativa AMPc, fator de sensibilização de histamina, fator promotor de linfocitose e proteína ativadora de ilhotas pancreáticas; PRN (pertactina): adesão; CT (quimiotaxia).

Apesar de *B. trematum* causar infecções em humanos, os FV desta espécie estão pouco elucidados. Há apenas o relato a respeito da estirpe HR18 de *B. trematum*, em que foram encontrados dois genes que codificam a toxina distensora citoletal (*Cytolethal distending toxin*- CDT), uma genotoxina produzida por gama proteobactérias mucocutâneas patogênicas, sendo requeridas mais investigações a esse respeito (CHANG et al., 2015). CDT também é produzida por bactérias Gram-negativas patogênicas como *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Helicobacter cinaedi*. Em células humanas, a exposição à CDT conduz a uma citotoxicidade associada a distensão celular e interrupção do ciclo celular dependente de resposta ao dano de DNA, desencadeada por quebras na dupla fita. O dano não reparado pode levar à morte celular. Em contrapartida, reparos inadequados podem permitir que a célula retome o ciclo celular e induzir instabilidade genética, uma característica do câncer (BEZINE; VIGNARD; MIREY, 2014).

A identificação de genes codificadores de FV se mostra importante para descrever possíveis meios que o microrganismo utiliza para causar danos ao hospedeiro (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015). Nesse sentido, o sequenciamento de genoma total consiste em uma abordagem necessária para a compreensão dos FV (DEURENBERG et al., 2017; LIU et al., 2012).

1.1.7 A técnica de sequenciamento

O sequenciamento é uma ferramenta utilizada para determinar as bases nitrogenadas (adenina- A; timina- T; guanina- G; citosina- C) de um DNA e sua sequência correta. A técnica de sequenciamento foi desenvolvida em 1977 por Frederick Sanger (sequenciamento de Sanger ou primeira geração) e se baseia no princípio de terminação de cadeia com didesoxirribonucleotídeo trifosfato (ddNTPS: ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTTP). Esse método consiste numa reação enzimática onde são adicionados a amostra desoxirribonucleotídeos (dNTPs), ddNTPs, oligonucleotídeos (*primers*), DNA polimerase e tampão de reação. Após uma etapa de desnaturação, ocorre a hibridização inicial do DNA da amostra com os *primers* e a fita complementar é sintetizada após a adição dos quatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Porém, quando são inseridos os ddNTPs a formação da fita complementar é interrompida. Quatro reações são feitas separadas, uma para cada ddNTP. Posteriormente, as amostras são desnaturadas e visualizadas em gel de poliacrilamida (SANGUER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Uma variação do método de Sanger, onde os ddNTPs estão ligados a fluoróforos de cores diferentes, possibilitou a automação das reações de sequenciamento de DNA. Nesse processo, os quatro ddNTPs são adicionados juntos na mesma reação para interromper a formação da fita dupla e gerar os fragmentos. Estes são separados por eletroforese capilar. O fluoróforo de cada ddNTP é excitado por um laser que passa por todo o capilar, emite luz em comprimento de onda específico, conforme o fluoróforo utilizado e assim é identificada a sequência correta (SMITH et al., 1986). A primeira automação do método de Sanger foi introduzida no mercado pela Applied Biosystem Instruments (ABI), tornando o sequenciamento mais rápido e preciso (LIU et al., 2012).

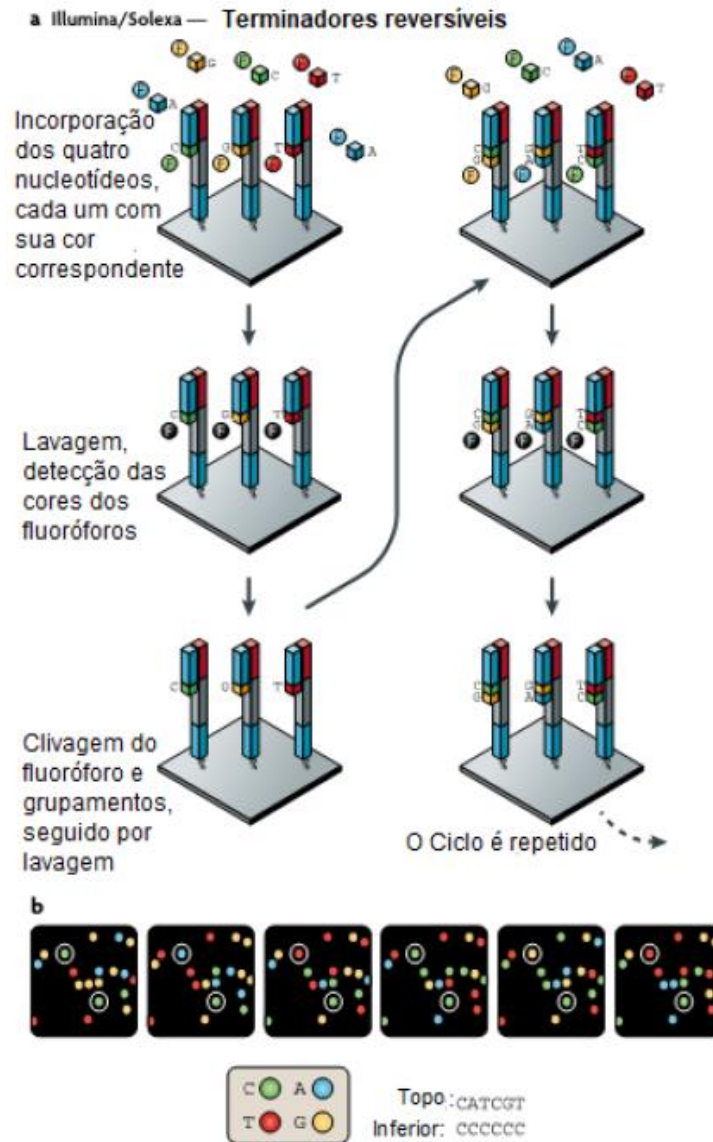
Posteriormente, buscando fazer análises paralelas em massa, aumentar o rendimento e reduzir custos para acessibilizar o sequenciamento do genoma, surgem novas estratégias, conhecidas como sequenciamento de nova geração (NGS) (LIU et al., 2012). O sequenciamento do genoma total (WGS) foi possibilitado com a introdução do NGS. Existem diferentes plataformas que realizam o sequenciamento, e a metodologia é variável dependendo da tecnologia utilizada. O WGS é aplicável a diversas áreas da pesquisa em campos da biologia, indústria e cuidados em saúde, por gerar informações a respeito do DNA em uma única corrida (KULSKI, 2016).

Antes do sequenciamento, o genoma precisa ser fragmentado, pois há um comprimento máximo de pares de base que cada plataforma consegue utilizar. Devido a isso, é necessária a preparação de uma biblioteca de DNA, em que os fragmentos de material genético são fundidos a adaptadores e códigos de barras para que as amostras sejam corretamente distinguidas após o sequenciamento (DEURENBERG et al., 2017). Atualmente, a tecnologia de sequenciamento de maior utilização no mercado consiste nas plataformas da Illumina HiSeq e MiSeq (BESSER et al., 2018; KULSKI, 2016).

A tecnologia Illumina faz uso de uma célula de fluxo (*flow-cell*) preenchida com oligonucleotídeos, que hibridizam com as extremidades de fragmentos de DNA previamente preparados. Cada fragmento de material genético é amplificado em um processo denominado PCR em ponte (*bridge PCR*), formando assim conjuntos de fragmentos iguais (*clusters*). Após esta etapa, iniciadores (*primers*) são ligados aos adaptadores e dão início a ciclos de adição de nucleotídeos terminadores reversíveis, que possuem marcação com diferentes fluoróforos. Apenas um nucleotídeo é adicionado à fita molde a cada ciclo de sequenciamento. Após a incorporação, o fluoróforo ligado ao nucleotídeo é excitado por um laser, gerando um sinal luminoso específico. Uma vez que este ciclo esteja concluído, o fluoróforo e o grupo funcional terminador do nucleotídeo são removidos, iniciando-se um novo ciclo (Figura 5).

MiSeq é uma plataforma da Illumina que permite leituras mais longas, de até 300 pares de base de comprimento (METZKER, 2010).

Figura 5- Representação esquemática do sequenciamento por terminação cíclica reversível



Fonte: adaptado de METZKER, 2010

Legenda: a) Etapas da reação de sequenciamento por terminação cíclica; b) Imagem de quatro cores destacando os dados de sequenciamento de dois fragmentos amplificados clonalmente.

1.1.8 Análise bioinformática

Com os dados provenientes do sequenciamento, são realizadas as análises bioinformáticas, que consistem num passo limitador da tecnologia de NGS, no que se refere

tanto ao armazenamento dos dados, bem como análise e interpretação destes. A bioinformática é um campo de pesquisa interdisciplinar que aplica metodologias da ciência da computação, matemática aplicada e estatística para o estudo de fenômenos biológicos. O primeiro passo é a geração das leituras (*reads*) por meio do sequenciamento, convertendo os sinais brutos em pequenas sequências de nucleotídeos (*base calling*), que possuem escores de qualidade associado (*Phred*). A maioria dos sequenciadores modernos gera seus dados de sequenciamento em arquivos do tipo FASTQ (CARRIÇO et al., 2018; KULSKI, 2016).

A partir disso, é feito o alinhamento e montagem (*assembly*) das *reads* em sequências maiores (*contigs* e *scaffolds*), que pode ser feita por meio do mapeamento (*mapping*) com um genoma de referência ou procedendo a montagem das *reads* que se sobrepõe (*de novo assembly*). Ambos os métodos podem ser sobrepostos para que a precisão da montagem seja confirmada ou melhorada, diferenciando erros de variantes verdadeiras, como são os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP). A montagem por *de novo assembly* usualmente fornece arquivos em formato FASTA, que contém informações para identificação da amostra e a sequência montada de nucleotídeos. A qualidade da montagem costuma ser avaliada por múltiplos parâmetros como N50, número de *contigs*, tamanho médio dos *contigs*, tamanho do genoma, entre outros. Para a etapa de mapeamento, o arquivo de saída é gerado em formato *sequence alignment map* (SAM). Tais arquivos são utilizados em análises subsequentes (CARRIÇO et al., 2018; KULSKI, 2016).

A terceira etapa consiste na anotação dos genes, integração dos dados e visualização da sequência montada. A quarta etapa é a junção dos dados obtidos em uma única saída bioinformática coerente, para que seja aplicada a ferramentas e bases de dados de interesse (CARRIÇO et al., 2018; KULSKI, 2016). Os dados gerados podem ser depositados em bancos de dados como *GenBank* (BENSON et al., 2013) e *European Nucleotide Archive* (ENA) (LEINONEN et al., 2011).

Os resultados das análises bioinformáticas podem ser aplicados em estudos epidemiológicos, investigações em saúde pública, bem como para rastreamento e monitoramento de surtos de patógenos multirresistentes. Ainda, possuem aplicação na caracterização de bactérias, como o perfil de virulência, importante para a predição da gravidade de doenças. Também auxiliam na detecção de genes de resistência e na elucidação de seus mecanismos. Além disso, possibilitam a avaliação de múltiplos genes por meio de ferramentas *online*, afirmando a importância futura do WGS no conhecimento para manejo de pacientes, prevenção de infecções e estudos evolutivos (DEURENBERG et al., 2017).

1.2 PROPOSIÇÃO

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar um isolado clínico de *Bordetella trematum* por sequenciamento de genoma total.

1.2.2 Objetivos específicos

- Relatar um caso raro de *Bordetella trematum* em úlcera diabética e apresentar os casos já descritos por outros autores, comparando aos dados obtidos;
- Pesquisar e descrever a função de possíveis genes codificadores de fatores de virulência;
- Pesquisar e descrever a função de possíveis genes de resistência aos antimicrobianos;
- Avaliar o fenótipo de resistência aos antimicrobianos do isolado clínico, correlacionando-o ao genótipo.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos que fazem parte dessa dissertação estão apresentados na forma de dois manuscritos. O manuscrito 1 foi aceito para publicação no periódico *BMC Infectious Diseases*, em 29 de abril de 2019, e encontra-se disponível em <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4046-8>. O manuscrito 2 será submetido para avaliação no periódico *Scientific Reports*. Os itens “Resultados e Discussão” e “Referências” encontram-se nos respectivos manuscritos.

2 RESULTADOS

2.1 MANUSCRITO 1

y Castro et al. *BMC Infectious Diseases* (2019) 19:485
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4046-8>

BMC Infectious Diseases

CASE REPORT

Open Access

Bordetella trematum infection: case report and review of previous cases



Thaís Regina y Castro¹, Roberta Cristina Ruedas Martins², Nara Lúcia Frasson Dal Forno³, Luciana Santana⁴, Flávia Rossi⁴, Alexandre Vargas Schwarzbald¹, Sílvia Figueiredo Costa² and Priscila de Arruda Trindade^{1,5*}

Abstract

Background: *Bordetella trematum* is an infrequent Gram-negative coccobacillus, with a reservoir, pathogenesis, a life cycle and a virulence level which has been poorly elucidated and understood. Related information is scarce due to the low frequency of isolates, so it is important to add data to the literature about this microorganism.

Case presentation: We report a case of a 74-year-old female, who was referred to the hospital, presenting with ulcer and necrosis in both legs. Therapy with piperacillin-tazobactam was started and peripheral artery revascularization was performed. During the surgery, a tissue fragment was collected, where *Bordetella trematum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Enterococcus faecalis* were isolated. After surgery, the intubated patient was transferred to the intensive care unit (ICU), using vasoactive drugs through a central venous catheter. Piperacillin-tazobactam was replaced by meropenem, with vancomycin prescribed for 14 days. Four days later, levofloxacin was added for 24 days, aiming at the isolation of *S. maltophilia* from the ulcer tissue. The necrotic ulcers evolved without further complications, and the patient's clinical condition improved, leading to temporary withdrawal of vasoactive drugs and extubation. Ultimately, however, the patient's general condition worsened, and she died 58 days after hospital admission.

Conclusions: Despite being a rare finding, *B. trematum* is typically associated with the clinical manifestation of disorders that predispose to ulcer development, which can be infected by microorganisms. The combination of antibiotic therapy and surgical debridement plays a key role in preventing systemic infections. Monitoring the appearance of new cases of *B. trematum* is essential, since it can be an emerging microorganism. Isolating and defining the clinical relevance of unusual bacteria yields a more accurate perspective in the development of new diagnostic tools and allows for assessment of proper antimicrobial therapy.

Keywords: Foot ulcer, diabetic, *Bordetella* infection, Antimicrobial, Susceptibility breakpoint determination

Background

Bordetella trematum is an infrequent gram-negative coccobacillus [1], typically related to tissue infections. Related information is scarce due to the low frequency of isolates [2]. As laboratories gain greater access to technologies for accurate and specific bacterial identification, rare microorganisms can arise. It is essential to understand the clinical significance of these unusual findings

and the need for treatment. We reviewed the published case reports and will be discussing a new one here.

Case presentation

A 74-year-old female patient attended the vascular surgery outpatient clinic and was referred to the hospital for revascularization of the distal arteries. She had necrotic ulcers in both legs, worse in the right. She reported pain, signs of local infection and myiasis on the lateral side of the ankle, tendon exposure, edema, and dry skin, but no signs of acute ischemia. Her underlying diseases were difficult to control: systemic arterial hypertension for 20 years; type II diabetes mellitus (DM) for 13 years; hypothyroidism; a stroke 6 years ago, chronic renal failure class IV; peripheral arterial occlusive disease, and

* Correspondence: priscila.trindade@gmail.com

¹Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, RS CEP 97105-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

postmenopausal osteoporosis. The patient referred to previous angioplasty performed 1 year earlier on the lower right leg due to peripheral arterial occlusive disease. Upon hospital admission, several sites of infection other than skin and soft tissue were discarded. Laboratory tests showed a normal leukocyte count and reactive C protein of 3.98 mg/dL (reference value: < 0.30 mg/dL). Empiric treatment with piperacillin-tazobactam (4.5 g IV 6/6 h) was initiated, which was prescribed for 5 days.

Two days after admission, surgical debridement was performed. Limb amputation was discussed, but rejected by the patient and family members. During the surgery, a fragment of the ulcer tissue was collected and sent to the hospital's microbiology laboratory. In the staining procedure, a few gram-positive cocci and gram-negative bacilli were observed. The specimen was submitted for enrichment in the brain-heart infusion broth for 24 h/37 °C and later seeded in 5% sheep blood agar and MacConkey agar, incubated for 37 °C, and presented growth after 24 h. VITEK 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) identified *Enterococcus faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *B. trematum*. The isolate was subsequently identified as *B. trematum*, using VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and confirmed by 16S rRNA gene sequencing with Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). The oxidase test was negative. MICs were determined by Sensititre gram-negative MIC plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (Table 1).

After surgery, the intubated patient was transferred to the ICU, using vasoactive drugs through a central venous catheter. Three days later, she presented a worsening clinical condition. Oxacillin-resistant *Staphylococcus hominis* was isolated from a blood culture drawn through a peripheral vein. Piperacillin-tazobactam was replaced by meropenem (500 mg IV 24/24 h) and vancomycin (1 g IV 24/24 h), prescribed for 14 days. Four days later, levofloxacin (750 mg IV 24/24 h) was added for 24 days aiming at *S. maltophilia* isolated from the ulcer tissue.

The necrotic ulcers evolved without further complication and the patient's clinical condition improved, leading to temporary withdrawal of the vasoactive drugs and extubation. However, the patient's general condition and kidney function worsened, probably due to the severity of her underlying diseases, and she died from sepsis of cutaneous origin 58 days after hospital admission. Autopsy was not performed. Figure 1 shows a timeline of the events.

Discussion and conclusions

B. trematum was described in 1996, isolated from human wounds and ear infections [1]. Information about its reservoir, life cycle and pathogenesis remain unknown. Regarding virulence, little is known [5]. Typically associated with tissue infections in diabetic patients, and generally occurs

in polymicrobial infections, which further complicates its clinical interpretation [2]. In our case, where *E. faecalis* and *S. maltophilia* were isolated with *B. trematum* in the ulcer, the role of *B. trematum* in the patient's prognosis became unclear. However, as this microorganism was previously reported as a causative agent of bloodstream infection [4, 6, 8], its interpretation and implication in disease was challenging and required integration of clinical, epidemiological, and microbiological issues.

When first described, *B. trematum* presented the following phenotypic characteristics: non-glucose metabolizer, grown on MacConkey agar, motile, with variable nitrate reduction, catalase and citrate positive, urease, oxidase and lysine decarboxylase negative [1]. Methodologies such as MALDI-TOF MS and VITEK 2 system were efficient in identifying *B. trematum*. However, there are reports that demonstrate problems regarding microorganism misidentification by API 20 NE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), due to the absence of *B. trematum* in its identification database [2]. In another case, also using API 20 NE, *B. trematum* was misidentified as *Achromobacter denitrificans*/*Bordetella bronchiseptica*. This may have occurred because the nitrate reduction test was variable, and the oxidase test reagent was different from the one used by other researchers [7]. In some cases, the confirmation of the microorganism identification was carried out by 16S rRNA gene sequencing [3–5, 7, 8]. In our case, the isolate was correctly identified by the VITEK 2 system and MALDI-TOF MS and confirmed by 16S rRNA gene sequencing. Even with credible identification by using routine laboratory instruments, the available literature only reports a few cases, as summarized in Table 1.

There is no standardized methodology by the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) or the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing that performs an antimicrobial susceptibility test, specifically for *B. trematum*. Some authors have used the CLSI manual as an interbreeding source [2, 5–8], cited as the MIC interpretative standards for other *Non-Enterobacteriaceae* and MIC interpretative standards for *Enterobacteriaceae*, along with the use of antibiotics such as ampicillin and cephalothin.

Analyzing antimicrobial susceptibility tests performed by other authors (Table 1), *B. trematum* has always shown sensitivity to piperacillin-tazobactam, which was initially used as an empirical therapy. Indeed, for this antimicrobial, we obtained the same MIC ($\leq 8/4 \mu\text{g/mL}$) as reported by Saksena et al. (2015), which may have been a contributing factor to the favorable outcome of the surgical wound. Cefotaxime showed MIC $32 \mu\text{g/mL}$ in other studies [2, 7], as it is considered to be an intermediate resistant. The MIC in our study ($8 \mu\text{g/mL}$) was lower than that described by other authors. However, it is not possible to define whether this MIC represents susceptibility. The problems with MIC

Table 1 Case reports associated with *Bordetella trematum*

Case report	Clinical information	Infection isolate(s)	Susceptibility profile of <i>B. trematum</i> ^{a,b}	Therapy ^a	Outcome
Daxboeck et al. (2004) [3]	Male, 82-year-old, with type 2 diabetes mellitus (DM), and infected ulcer on left foot.	<i>Bordetella trematum</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Susceptible to AMI, AMC, CTX, CAZ, GEN, IMI, TZP. Resistant to CXM and CIP.	10-day treatment of AMC and CIP; without clinical improvement; the antimicrobial treatment was discontinued.	Favorable
Hernández-Porto et al. (2013) [2]	Female, 76-year-old, with DM, renal failure, peripheral vascular disease, and ulcers in lower extremities	<i>B. trematum</i> and <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Susceptible to AMI (16 µg/mL), AMC (2 µg/mL), CAZ (8 µg/mL), GEN (4 µg/mL), IMI (0.5 µg/mL), MEM (0.125 µg/mL), TZP (1 µg/mL) and SXT (0.5 µg/mL) Resistant to ATM (> 32 µg/mL), CTX (> 32 µg/mL), CXM (4 µg/mL) and CIP (4 µg/mL).	21 days with SXT and 14 days with CAZ (initiated 2 weeks after positive culture for <i>B. trematum</i>).	Favorable
Halim et al. (2014) [4]	Male, 60-year-old, no history of pathologies, presenting thorax burns by butane gas	<i>B. trematum</i> and <i>Enterobacter cloacae</i> in blood culture	Susceptible to CIP, CLA, CL, DOX, IMI, MIN and NET. Resistant to AMI, AMC, CTX, CAZ, CF, GEN, and TOB.	IMI, NET, and CL.	Death
Almagro-Schubert (Case 1) (2015) [5]	Male, 65-year-old, with DM, peripheral vascular disease and foot ulcer	<i>B. trematum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> and <i>Morganella morganii</i>	Susceptible to AMI, AMC, AMP, CPM, GEN, IMI, LVX, MEM, MIN, PP, TZP, SXT, TGC, and TOB. Resistant to CTX, FOX, CAZ, CXM, CIP, ETP, and FOS.	Debridement and 7-day course of CIP	Persistence of infection
Almagro-Molto, Eder, Schubert (Case 2) (2015) [5]	Female, 72-year-old, suspected of osteomyelitis, bone defects in the feet and ankles, venous disorder, impaired renal function, ulcer in both feet	<i>B. trematum</i> , <i>P. vulgaris</i> and <i>A. faecalis</i> in both feet ulcer exudate samples; <i>B. trematum</i> , MRSA, <i>A. faecalis</i> and <i>S. maltophilia</i> in the surgical sample of ulcer of both feet	Susceptible to AMI, AMC, AMP, CPM, GEN ^c , IMI, LVX ^c , MEM, MIN, PP, TZP, SXT, TGC, and TOB. Intermediate to ETP and LVX ^c Resistant to CTX, FOX, CAZ, CXM, CIP, FOS, and GEN ^c	Compression therapy and 14-day course of CIP; despite clinical improvement, both limbs were amputated after 3 weeks; antimicrobial therapy with TZP (7 days) followed by MEM (7 days)	Favorable
Saksena, Manchanda, Mittal (2015) [6]	Young girl, 7-month-old, febrile, presenting vomiting; provisional diagnosis of infantile tremor syndrome with protein energy malnutrition and developmental delay	<i>B. trematum</i> in blood culture	Susceptible to AMS (8 µg/mL), CIP (1 µg/mL), IMI (1 µg/mL), TZP (8 µg/mL) and SXT (20 µg/mL) Intermediate to CPM (16 µg/mL), CRO (32 µg/mL), LVX (4 µg/mL), PP (64 µg/mL) and TOB (8 µg/mL) Resistant to AMI (64 µg/mL), CAZ (64 µg/mL), CL (16 µg/mL), GEN (16 µg/mL), MEM (16 µg/mL)	Empirical therapy with CRO for 5 days; then the treatment switched to TZP and AMI on the 12th day, therapy was modified to CIP and AZM (5 days)	Favorable
Almuzara et al. (2015) [7]	Male, 14-year-old, febrile and hemodynamically unstable, presenting left hip septic arthritis. Diagnosis of chronic osteomyelitis (<i>S. aureus</i>)	<i>Escherichia coli</i> and <i>B. trematum</i> in bone biopsy	Susceptible to AMI (16 µg/mL), CPM (4 µg/mL), CAZ (4 µg/mL), CF (8 µg/mL), CL (≤ 5 µg/mL), GEN (4 µg/mL), IMI (≤ 1 µg/mL), MEM (≤ 0.25 µg/mL) and SXT (≤ 2 µg/mL) Intermediate to AMP (16 µg/mL), AMS (16 µg/mL), CTX (32 µg/mL) and CIP (2 µg/mL)	Multiple surgical debridement, antimicrobial treatment with MEM and SXT for 6 months; MIN later	Favorable
Majewski et al. (2016) [8]	Transgender male, 61-year-old, with below-knee amputations in both lower limbs, DM, stage IV chronic kidney disease, and coronary artery disease, with a right femur fracture after a fall, respiratory distress, septic shock and worsening of left leg wound	<i>B. trematum</i> in blood culture	Susceptible to AMI, AMC, CAZ (8 µg/mL), CIP (0.008 µg/mL), IMI (0.25 µg/mL), LVX (0.03 µg/mL), TZP (2 µg/mL) and TOB Intermediate to CTX (16 µg/mL) Resistant to CXM and GEN	Empirical treatment with TZP and VAN; the left lower limb infection worsened, treatment switch to CIP; due to necrotizing fasciitis probability CLI was added; persistence of septic shock, TOB added	Death

Table 1 Case reports associated with *Bordetella trematum* (Continued)

Case report	Clinical information	Infection isolate(s)	Susceptibility profile of <i>B. trematum</i> ^{a,b}	Therapy ^a	Outcome
Current report	Female, 74-year-old, with necrotic ulcers in both legs, presenting signs of local infection, systemic arterial hypertension; DM; hypothyroidism; peripheral arterial occlusive disease; stage IV chronic kidney disease	<i>B. trematum</i> , <i>E. faecalis</i> and <i>S. maltophilia</i> in a tissue fragment	MIC ≤0.25 µg/mL to TGC, CLI and PB; MIC 0.5 µg/mL to DOR; MIC 1 µg/mL to CIP, LVX, IMI and MEM; MIC 2 µg/mL to DOX, GEN, MIN, TOB and CPM; MIC 4 µg/mL to AMI and CAZ; MIC 8 µg/mL to CTX; MIC 4/2 µg/mL to AMS; MIC 8/4 µg/mL to TZP; MIC 9.5/4.5 µg/mL to SXT; MIC 16/2 µg/mL to TIM; MIC > 16 µg/mL to ATM	Empirical treatment with TZP and surgical debridement; treatment switch to VAN and MEM due to septic shock; LVX added aiming <i>S. maltophilia</i>	Death

^aAMI amikacin, AMC amoxicillin-clavulanic acid, AMP ampicillin, AMS ampicillin-sulbactam, AZM azithromycin, ATM aztreonam, CPM cefepime, CTX ceftaxime, FOX cefoxitin, CAZ ceftazidime, CRO ceftroxone, CXM cefuroxime, CIP ciprofloxacin, CLA clarithromycin, CLI clindamycin, CP cephalosporin, CL colistin, DOR doripenem, DOX doxycycline, ETP erapipenem, FOS fosfomicin, GEN gentamicin, IMI imipenem, LIX levofloxacin, MEM meropenem, MIN minocycline, NET netilmicin, PB polymyxin B, PIP piperacillin, PIP piperacillin-tazobactam, SXT sulfamethoxazole-trimethoprim, TGC tigecycline, TOB tobramycin, VAN vancomycin, MIC minimum inhibitory concentration, MISA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

^bMethodology for susceptibility testing was the E-test [2, 3, 5, 6]; disk-diffusion [2, 4, 8]; broth microdilution [3, 6]; VITEK 2 [5, 7]

^cAfter amputation of lower limbs, change was seen in susceptibility profile in the second isolate

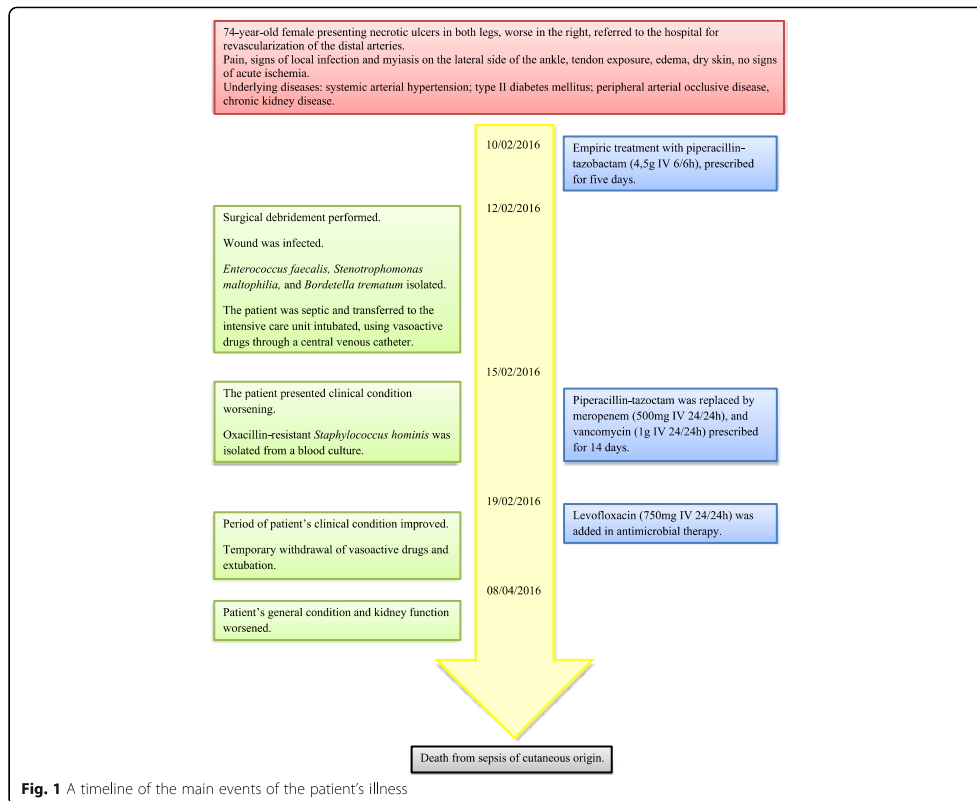


Fig. 1 A timeline of the main events of the patient's illness

interpretation are probably due to lack of in vitro/in vivo susceptibility correlation or breakpoints [6].

Since *B. trematum* infection/colonization occurs primarily in wounds, debridement is essential for treatment, because it removes pathogens from nonviable tissues and reduces recurrence of the infection. Debridement associated with the correct use of antibiotics can lead to a favorable outcome [5]. However, there were no further cultures to determine whether *B. trematum* was actually eradicated.

The pathogenicity of this microorganism is not well-established, so it is unclear what the contribution of *B. trematum* was to the patient's infection and outcome. Despite being a rare finding, *B. trematum* is typically associated with clinical manifestations of disorders that predispose to the development of ulcers that can become infected by microorganisms. The combination of antibiotic therapy and surgical debridement plays a key role in the cure, preventing systemic infections. Monitoring the appearance of new cases of *B. trematum* is essential, as it could be an emerging microorganism. Isolating and defining the clinical relevance of

unusual bacteria facilitates an overall perspective towards the development of new diagnostic tools and allows for assessment of proper antimicrobial therapy.

Abbreviations

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute; MIC: Minimal Inhibitory Concentration

Acknowledgments

We are grateful to the Microbiology Section of the Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria for the isolation and initial identification of *Bordetella trematum*. We also thank the Microbiology Laboratory of the Central Laboratory Division at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and the Laboratory of Bacteriology LIM-54 linked to the Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo for confirming the microorganism by MALDI-TOF MS and sequencing the 16S rRNA gene, respectively.

Funding

Thais R. y Castro received a Master's degree grant provided by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, Process Number 1740547. CAPES is a Governmental Agency that provides grants for graduate students.

Availability of data and materials

Data sharing is not applicable to this article, since no datasets were generated or analyzed during the current study.

Authors' contributions

TC, PAT and AVS were major contributors in writing the manuscript and analyzing the patient records; RCRM and SFC performed 16 s rRNA sequencing, NLFDF, LS, and FR performed laboratory phenotypic identification of the isolate. All authors have approved the revisions and the submitted version. We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

Ethics approval and consent to participate

The study was reviewed and approved by the National Ethical Committee in Human Research, Brazil (Deliberation number 59563316.6.0000.5346).

Consent for publication

As the patient had already died, written consent to publish was obtained from her son.

Competing interests

Dr. Schwarzbold reports grants from Merck Co., Astellas, Gilead, outside of the submitted work. All other authors have no conflict of interest to disclose.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil. ²Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ³Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, Brazil. ⁴Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, RS CEP 97105-900, Brazil.

Received: 9 October 2018 Accepted: 29 April 2019

Published online: 30 May 2019

References

- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsen E, et al. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and tan 1983. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:849–58.
- Hernández-Porto M, Cuervo M, Miguel-Gómez MA, Delgado T, Lecuona M. Diabetic leg ulcer colonized by *Bordetella trematum*. *Rev Esp Quimioter*. 2013;26:72–3.
- Daxboeck F, Goerzer E, Apfalter P, Nehrt M, Krause R. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet Med*. 2004;21:1247–8.
- Halim I, Ihibane F, Belabbes H, Zerouali K, El Mdaghri N. Isolement de *Bordetella trematum* au décours d'une bactériémie. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014;72:612–4. Available from: https://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/isolement_de_bordetella_trematum_au_decours_dune_bacteriemie_302630/article.phtml
- Almagro-Molto M, Eder W, Schubert S. *Bordetella trematum* in chronic ulcers: report on two cases and review of the literature. *Infection*. 2015;43:489–94.
- Saksena R, Manchanda V, Mittal M. *Bordetella trematum* bacteremia in an infant: a cause to look for. *Indian J Med Microbiol*. 2015;33:305–7. Available from: <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2015;volume=33;issue=2;page=305;epage=307;aulast=Saksena>.
- Almuzara M, Barberis C, Traglia G, Sly G, Procopio A, Vilches V, et al. Isolation of *Bordetella* species from unusual infection sites. *JMM case rep*. 2015;1–7. Available from: <https://jmmcr.microbiologyresearch.org/content/journal/jmmcr/10.1099/jmmcr.0.000029>.
- Majewski LL, Nogi M, Bankowski MJ, Chung HH. *Bordetella trematum* sepsis with shock in a diabetic patient with rapidly developing soft tissue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86:112–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889316301572>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



2.2 MANUSCRITO 2

Genomic insights on *Bordetella trematum* strain CBM01 isolated from a patient with a soft tissue infection

Thaís Regina y Castro, Bachelor of Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil;

Andressa de Almeida Vieira, Bachelor of Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil;

Viviane Drescher Somavilla, Student of Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil;

Roberta Cristina Ruedas Martins, Bachelor of Biological Sciences, PhD, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo, Bachelor of Biological Sciences, PhD, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil;

Anna Sara Schafferman Levin, Bachelor of Medicine, PhD, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

Silvia Figueiredo Costa, Bachelor of Medicine, PhD, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

Priscila de Arruda Trindade*, Bachelor of Pharmacy, PhD, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil;

*Corresponding author. Postal Address: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil; phone number: +555532208464; E-mail: priscila.trindade@ufsm.br

ABSTRACT

Bordetella trematum is a motile, aerobic, non-glucose metabolizer gram-negative cocobacillus species firstly described in 1996 associated with human wounds and ear infections. A restricted number of infection cases in humans have been reported and not much information is available to fully describe the pathogenesis strategy of infection and potential mechanisms of resistance. In this article, we report a draft genome from a clinical isolate *B. trematum* associated with soft tissue infection and provide *in silico* investigation of virulence factors and antibiotic resistance genes. *B. trematum* was isolated from a fragment of a patient's ulcer tissue. We sequenced the bacterial genome by Illumina Miseq and tested its antimicrobial susceptibility by broth microdilution. Using bioinformatics tools, sixteen putative genes encoding of virulence factors were identified, including *cheA*, *cheW*, *cheY*, *fliI*, *fliN*, *fliQ*, *fliC*, *bplA*, *bplB*, *bplC*, *bplD*, *iron*, *mgtB*, *relA*, *mtrD* and *brkB*. Four putative genes encoding antimicrobial resistance associated with efflux pumps were identified: *macB*, *mdsB*, *mexI* and *ceoB*. Looking at minimum inhibitory concentrations for all drugs tested, we found that only aztreonam had a high value that surely would be considered as resistant. However, we did not find any specific resistance gene to this drug nor the efflux pumps related to resistance to β -lactams. The analysis of the isolate CBM01 showed a multiplicity of virulence factors involved in several pathogenic processes, demonstrating its infection potential. Regarding antimicrobial resistance, it was demonstrated that the isolate has different efflux pumps and lacked a gene required for aztreonam activity.

KEYWORDS: Whole genome sequencing. Antimicrobial resistance. Efflux pumps. Virulence.

INTRODUCTION

Bordetella trematum is a motile, aerobic, non-glucose metabolizer gram-negative coccobacillus species firstly described in 1996 associated with human wounds and ear infections. The species was established based on integrated genotypic and phenotypic analyses on 10 strains of unclassified bacteria deposited in a laboratory collection (VANDAMME et al., 1996). A restricted number of infection cases in humans have been reported, including four cases of soft tissue infections (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; Y CASTRO et al., 2019), four cases of bacteremia (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN, BONNET, 2018; HALIM et al., 2014; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015), one case of osteomyelitis (ALMUZARA et al., 2015), and one case of secondary peritonitis due to perforated appendicitis (TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017).

The major risk factors that cause or predispose *B. trematum* infections are usually related to clinical conditions that leads to wounds development such as diabetes *mellitus*, venous and renal disorders, cancer, septic arthritis, and skin burn. There is only one unique case of bacteremia that the source of infection could not be established (SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). *B. trematum* could be also isolated from rumens of Korean native cattle and was found to be the first member of genus *Bordetella* found in a cattle milieu (CHANG et al., 2015). Therefore, some reports believe that *B. trematum* could be an opportunistic pathogen (DAXBOECK et al., 2004; HALIM et al., 2004). Solely nine genome sequences of *B. trematum* are available in the GenBank: three of them are complete genomes (accession numbers: LT546645, CP018898, and CP016340), and six are drafts (accession numbers: NZ_AWNL000000000 ; NZ_JPQP000000000; NZ_UAQO000000000; NZ_UFUJ000000000; NZ_FKBT000000000; and NZ_FKBR000000000). Indeed, not much information is available to fully describe the pathogenesis strategy of infection and potential mechanisms of resistance. In fact, pathogen genomics may bring light to the understanding of host-pathogen interaction and point to strategies of infection and co-species evolution. In this article, we report a draft genome from a clinical isolate *B. trematum* associated with soft tissue infection and provide *in silico* investigation of virulence factors and antibiotic resistance genes.

MATERIALS AND METHODS

Strain and culture conditions

B. trematum CBM01 was isolated from a fragment of a patient's ulcer tissue (Y CASTRO et al., 2019). The specimen was submitted for enrichment in brain-heart infusion broth for 24 h/37⁰C and later seeded on 5% sheep blood agar and MacConkey agar plates, incubated for 37⁰C. The strain of *B. trematum* grew after 24 h along with *Stenotrophomonas maltophilia* and *Enterococcus faecalis*. The isolates were identified using VITEK 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The *B. trematum* CBM01 isolate was stored at -80°C for further study. The species identification was confirmed by VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and by 16S rRNA sequencing. The isolate is registered in the SISGEN platform under the registration code AB09ECF. SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) is a national registration system of Brazilian biological material.

DNA extraction and whole genome sequencing

Whole genome DNA (gDNA) was extracted using Illustra Bacteria GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences). gDNA was sequenced using an Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA) after Nextera XT (Illumina Inc., San Diego, CA) library preparation.

Assembly, annotation, and bioinformatics analyses

Sequencing fastq raw data files were quality controlled by FastQC v. 0.11.3 (Brabham Institute, Cambridge, UK) and Trimmomatic v. 0.38 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Genome *de novo* assembly was performed using SPAdes v. 3.13.0 (BANKEVICH et al., 2012). The contigs were ordered by Abacas v. 1.3.1 (ASSEFA et al., 2009) using the strain H044680328 as a reference sequence (accession number: NZ_LT546645). Genome annotation was performed by NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (TATUSOVA et al., 2016). DNA sequence visualization and manual gene curation were conducted on Geneious Prime v. 2019.1.1 (Biomatters Limited) (KEARSE et al., 2012). The virulence and antimicrobial resistance genes were predicted using ABRicate v. 0.8.13 (<https://github.com/tseemann/abricate>). The *B. trematum* CBM01 phylogeny was inferred from the 16S MAFFT alignment v. 7.388 (KATOH et al., 2002) containing sequences of sixteen species of *Bordetella* from GenBank (*B.*

bronchiseptica NR_025949; *B. parapertussis* NR_025950; *B. pertussis* NC_002929; *B. holmesii* NR_029173; *B. ansorpii* NR_115279; *B. petrii* NR_025369; *B. muralis* LC053648; *B. tumbae* NR_145921; *B. tumulicola* NR_145922; *B. bronchialis* NR_137341; *B. sputigena* NR_137343; *B. flabilis* NR_137342; *B. avium* NC_010645; *B. hinzii* NR_027537; *B. pseudohinzii* NZ_CP016440; *B. trematum* NZ_LT546645). Two other *B. trematum* were also included (NZ_CP016340 and NZ_CP018898). The alignment was subjected to the Geneious Tree Builder method (KEARSE et al., 2012) with default parameters. The tree was analyzed and prepared in FigTree viewer (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). As outgroups, 16S sequence from *Burkholderia pseudomallei* NCTC 13179 (accession number: CP003976) and *Ralstonia solanacearum* YP-01 (accession number: FJ494776) were set (SOUMANA; LINZ; HARVILL, 2017).

Antimicrobial susceptibility test

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution using Sensititre gram-negative MIC plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 were used as controls. The MICs were replicated twice. Interpretation criteria from CLSI table 2B-5 were used (CLSI, 2019).

Deposition of genome sequences

The genome sequence of CBM01 isolate was deposited in the GenBank database (accession number CP036357). The BioProject designation for this project is PRJNA523013. BioSample accession number is SAMN10962613.

RESULTS AND DISCUSSION

Genomic properties

From the Illumina Miseq sequenced libraries, 1,737,460 paired-end reads were obtained. After genome assembly, a draft circular chromosome of 47 linear contigs was identified with an N50 of 194,394 and assembled into a circular contig of 4,518,493 bp.

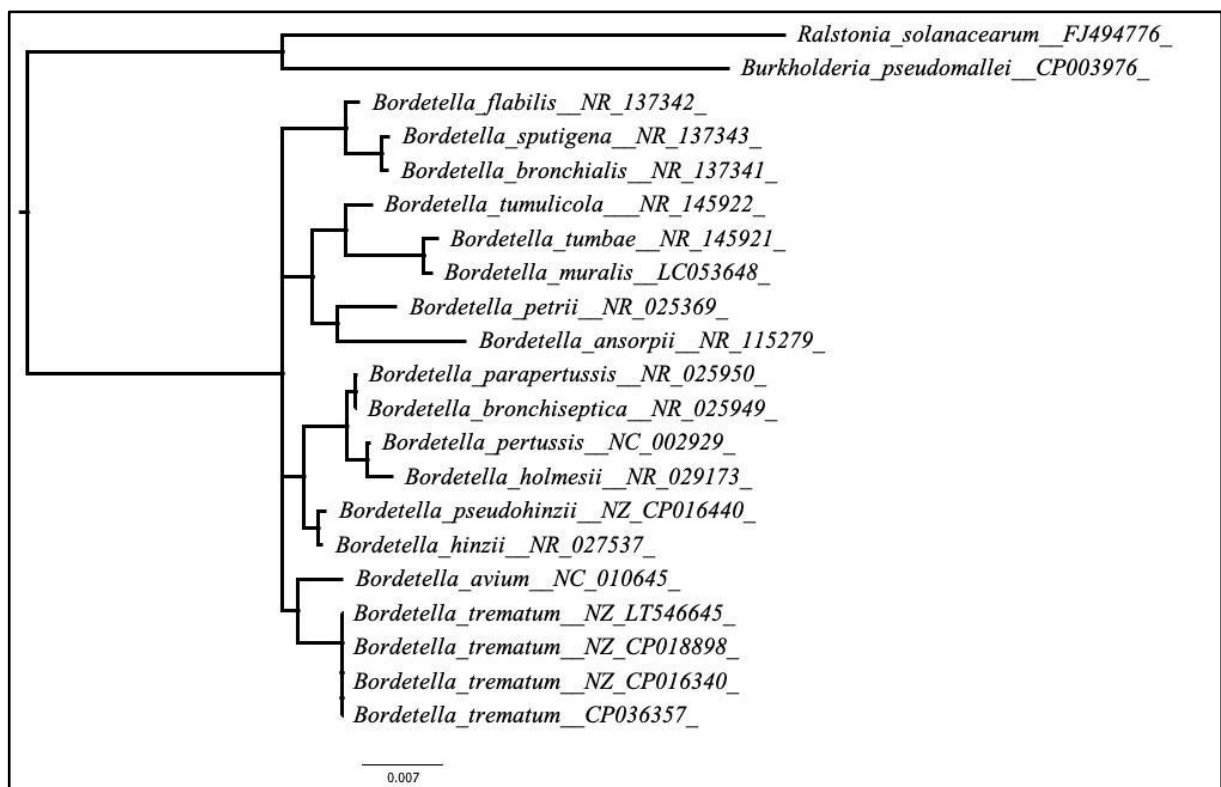
The circular assembled genome was found to be covered 58.3-fold. The G+C content was 65.8%, consistent with those found in other *B. trematum* isolates, as well as the range of predicted genome size (Table 1). We annotated 3.910 genes on the circular chromosome, including 3.841 coding sequences (CDSs) and 3.792 coding genes, 69 RNA coding genes of

which 62 were for tRNA, three for complete rRNA, and four non-coding RNA (ncRNA), and 49 pseudogenes. No plasmid was assembled from the Illumina data.

Phylogenetic placement of *B. trematum*

Placement of the 16S rRNA sequence of *B. trematum* CBM01 isolate into a phylogenetic tree (figure 1) showed a close relationship of this strain to the other isolates of *B. trematum* included in the analysis. In this study, the 16S rRNA sequences provided enough resolution to differentiate all the species of *Bordetella*. However, a research conducted using a large set of isolates containing sequences of type strains, isolates and uncultured sequence data has shown some limitations to resolve *Bordetella* species. The authors found that *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* were not resolved (BADAMCHI; PAPIZADEH, 2017).

Figure 1. Phylogenetic relationship of *B. trematum* strain CBM01 to other *Bordetella* species*



*The genetic placement was based on 16S rRNA. Alignment of 16S rRNA sequences was performed using MAFFT and was subject to the Geneious Tree Builder method with default settings for statistical node support. As outgroups, 16S rRNA sequences from *Burkholderia pseudomallei* NCTC 13179 (CP003976) and *Ralstonia solanacearum* YP-01 (FJ494776) were used.

Virulence factors

Using bioinformatics tools, sixteen putative genes encoding of virulence factors were identified, including *cheA*, *cheW*, *cheY*, *fliI*, *fliN*, *fliQ*, *fliC*, *bplA*, *bplB*, *bplC*, *bplD*, *iroN*, *mgtB*, *relA*, *mtrD* and *brkB*. All genes presented high pairwise identity (>75%) with the reference genes sequences.

In our analysis, *cheA*, *cheW* and *cheY* were found, close to the *cheB*, *cheR* and MCP genes (figure 2). These genes are considered central components of the chemotaxis system and target of resistance selection. Regarding auxiliary proteins related to virulence factors (WUICHET; ZHULIN, 2012), CheZ and CheD were identified in genome of *B. trematum* strain CBM01. *cheZ* was positioned at the same locus as central components. The *cheD* gene is also present in the study genome, localized distant from the other chemotaxis genes. Orthologous proteins of the chemotaxis system have been identified by genomic analysis in *Bordetella* spp., but genetic manipulations of *Bordetella* spp. are scarce. To the best of our knowledge, there are no studies investigating the mechanisms of chemotaxis and its role in pathogenesis of this microorganism. Chemotaxis is an alternative that allows the bacteria to avoid a detrimental environment or move to a favorable one. To achieve this purpose, bacteria developed a complex and robust machinery, the best-studied is *E. coli*, which is composed by transmembrane receptor methyl-accepting chemotaxis proteins (MCP), a histidine protein kinase (CheA), an adaptor protein (CheW), a response regulator (CheY, named CheY-P when phosphorylated), two adaptation proteins, CheB and CheR, and a CheY-P-specific phosphatase (CheZ) (JONES; ARMITAGE, 2015; SALAH UD-DIN; ROUJEINIKOVA, 2017). However, the contribution of these *che* genes to the overall chemotaxis function is variable in different species of bacteria. For example, many species contain chemotaxis proteins that are non-homologous of any of the *E. coli* proteins, such as the scaffold protein CheV, the deamidase CheD, and phosphatases CheC and CheX (RAO; KIRBY; ARKIN, 2004). Due to the presence of *cheD*, it is not possible to affirm that the mechanism of chemotaxis could be the same as occurs in *E. coli* (PARTRIDGE et al., 2019).

B. trematum was predicted to have mobility ability including flagellum that enables the bacterial movement and chemotaxis (JONES; ARMITAGE, 2015; VANDAMME et al., 1996). Flagellum plays an important role during attachment of the bacteria to the eukaryotic host cell, and also plays a role in innate and adaptative immune response (DINGLE; MULVEY; ARMSTRONG, 2011; LINZ et al., 2016). The CheY-P diffuses to, and interacts with the flagellar motor proteins FliM and FliN, causing motor switching (JONES; ARMITAGE, 2015). The flagellum filament, composed by FliC protein, acts as a helical

screw to produce thrust. The other two genes found, *fliQ* and *fliI* consist in a membrane protein and a soluble protein, respectively, which are part of the export apparatus. The export apparatus switches substrate specificity from proteins needed for the structure and assembly of flagellum (MINAMINO, 2014). In *Bordetella* species, flagella and chemotaxis genes are located in a single large *loci* (LINZ et al., 2016), consistent with our findings (figure 2).

In addition to the proteins involved in the chemotaxis process, the strain CBM01 presented the genes *bplA*, *bplB*, *bplC* and *bplD*., which encode proteins related to lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis. LPS is the major glycolipid molecule present on the cell surface of gram-negative bacteria. LPS has usually been described as having three domains: lipid A, core, and O antigen. These compounds influence both host specificity and immune response, thus contributing to pathogenicity. The lipid A mediates the endotoxicity induced by the inflammatory response and plays an important role in the evasion of the immune response of the host, since it is the only part of the LPS detected by the innate immune system. The O antigen carries the antigenic properties of the molecules and represents the main antigen of gram-negative. It is responsible for important functions in virulence, such as effective colonization of tissues in the host, protection against phagocytosis, serum-mediated killing and resistance to antimicrobial peptides (CAROFF et al., 2001; NOVIKOV et al., 2014; NOVIKOV; MARR; CAROFF, 2019; RAMACHANDRAN, 2014).

To optimize bacterial chances to survival in adverse conditions, microorganisms use dedicated mechanisms to respond adequately to fluctuating environments (RONNEAU; HALLEZ, 2019). For example, siderophores act as extracellular solubilizing agents for iron from minerals or organic compounds when the host or the environment impose iron limitation. Transport of iron into the cell cytosol is mediated by specific membrane receptor and transport systems which recognize the iron-siderophore complexes. Salmochelin receptor IroN (*iroN* gene) found in CBM01 operates as a siderophore receptor. The possession of specialized iron transport systems may be crucial for bacteria to override the iron limitation, continuing microbial growth, and consequently maintaining or expanding the infection (CROSA, 1989; ELLERMANN; ARTHUR, 2017).

Another vital biological divalent cation within living cells, Mg^{2+} is a cofactor in innumerable enzymatic reactions. Magnesium acts as a cofactor and regulator of proteins and stabilizing factor for membranes, ribosomes and other cellular structures. MgtA and MgtB are examples of magnesium transport systems in bacteria. When the concentration of Mg^{2+} decreases in the growth medium, the transcription of these genes is induced. *mgtA* encodes a

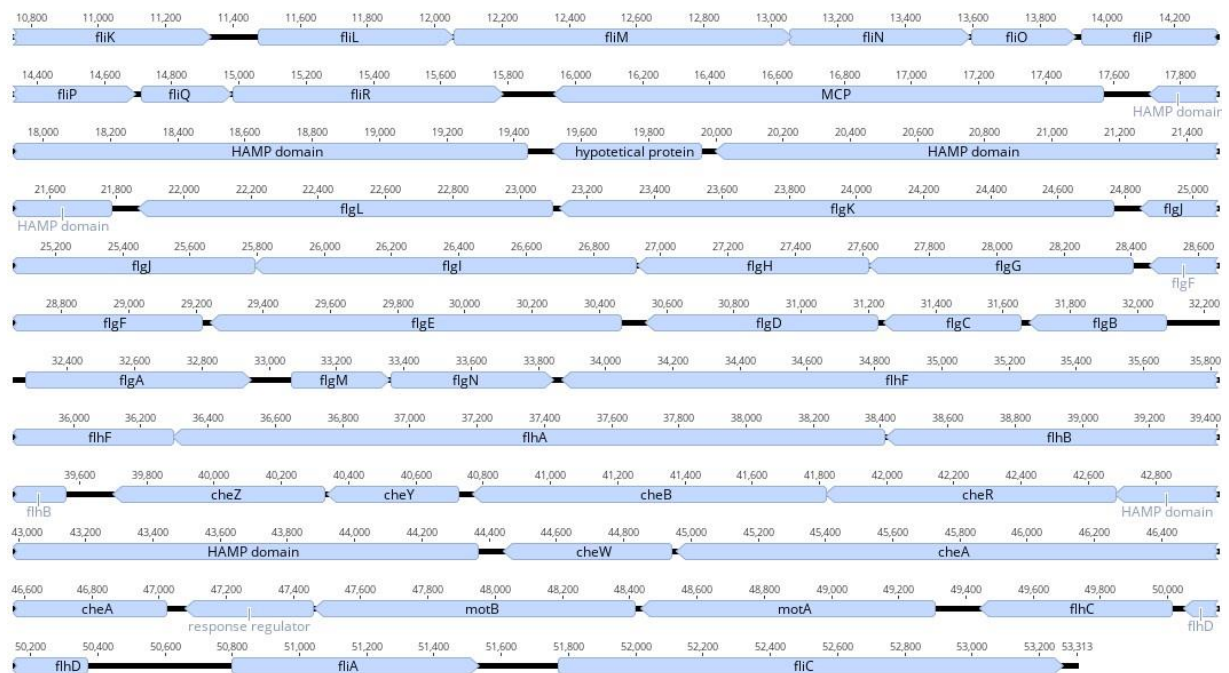
P-type ATPase MgtA and *mgtCB* encodes two proteins, MgtB, a Mg-transporting P-type ATPase and MgtC, a protein of unknown function. Studies have demonstrated that the signal for such induction is Mg^{2+} itself (LEE; GROISMAN, 2012; SMITH; MAGUIRE, 1998; TAO et al., 1995). In our analysis using ABRicate, *mgtB* was found with a low coverage percentage (11.11%). By manual curating the gene, it was verified that it is the gene *mgtA*, agreeing with the genome annotation realized by PGAP. This may have occurred because *mgtA* gene codifies a protein that is 50% identical to MgtB (LEE; GROISMAN, 2012; MAGUIRE, 2006). Subsequent studies are needed to elucidate this issue.

An additional virulence gene that was found, *relA* encoding RelA, a pyrophosphokinase, which is one of the components of a conserved family of proteins called RelA-SpoT homologues (RSH) (ATKINSON; TENSON; HAURYLIUK, 2011). RSH enzymes are able to detect environmental fluctuations by monitoring key metabolites such as amino acids and fatty acids, whose levels quickly vary upon starvation, thereby allowing bacteria to detect subtle variations. The intracellular pool of hyperphosphorylated nucleosides (p)ppGpp, that functions as second messenger, is mainly regulated by RSH. As messenger molecules accumulate under stressful conditions, (p)ppGpp was found to play a pivotal role in a large number of biological processes such as virulence, antibiotic tolerance and resistance, long-term persistence, biofilm formation, sporulation or gut colonization by commensal bacteria. Accumulation of these second messengers profoundly remodels the bacterial metabolism and physiology to slow down the growth and reallocate cellular resources during nutrient stress (BELJANTSEVA et al., 2017; RONNEAU; HALLEZ, 2019).

Some efflux pumps, especially those in the Resistance-Nodulation-Division family (RND), have been shown to play a role in the pathogenicity of bacteria, mainly affecting colonization, infection, and the persistence of microorganisms in the host. The MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system, which confers resistance to macrolides and antimicrobial substances of the host innate defense, have demonstrated implication on fitness cost (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; WARNER; SHAFER; JERSE, 2008). In our virulence analysis, the *mtrD* was initially identified. After manual curation, the *mtrC* and *mtrE* operon components were found. However, this system was not described in our analysis of antimicrobial resistance by ABRicate. This may have occurred due to the composition of the database used by the software or the cutoffs applied. As this efflux system confers resistance to macrolides, which are not the therapy of choice for the treatment of diabetic foot ulcers (KWON; ARMSTRONG, 2018), possible overexpression of this efflux pump would not interfere with the antimicrobial therapy.

The gene *brkB* encodes a serum resistance protein BrkB, that confers resistance to killing by complement. This gene is a part of the *brk* locus together with *brkA* gene and both are necessary for the expression of serum resistance (ELDER; HARVILL, 2004; FERNANDEZ; WEISS, 1998, 1994). As in our study only *brkB* was identified, it is not possible to presume without additional studies if this virulence system is functional.

Figure 2- Genes encoding proteins involved in flagellum composition and chemotaxis in *Bordetella trematum* CBM01



The flagellum is divided into five parts from the base to the tip: the basal body, hook, hook-filament junction zone, filament, and filament cap. The basal body consists of the MS ring (FliF), the C ring (FliG, FliM, FliN), the P ring (FlgI), the L ring (FlgH), and the rod (FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG). FlgA is involved in P-ring formation, and FlgJ to be involved in rod formation. The basal body is a rotary motor along with the Mot complex (MotA and MotB) that acts as a proton channel to couple the inwardly-directed proton flow through the channel to torque generation. FlgM is the anti-sigma factor which acts as a negative regulator of the flagellar regulon. The hook (FlgE) and filament (FliC) extend into the exterior of the cell body. The filament acts as a helical screw to produce thrust. The hook acts as a universal joint to smoothly transmit torque produced by the motor to the filament. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly. The hook-filament junction (FlgK, FlgL) connects the filament with the hook. The filament cap (FliD) is located at the tip of the growing filament to promote filament formation. FliK operates controlling the optimal length of flagellar hook substructure. For construction of the rod-hook-filament structure beyond the cytoplasmic membrane, flagellar proteins are exported via a specific export apparatus from the cytoplasm to the distal end of the growing structure. The export apparatus consists of six membrane proteins, FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, and FliR, and three soluble proteins, FliH, FliI, and FliJ. Export of FlgK, FlgL, FliC, and FliD, which belong to the filament-type class, requires assistance of flagellar chaperones: FlgN for FlgK and FlgL, FliS for FliC, and FliT for FliD. FliL associates with the flagellar basal body has been found to be important for the function of the motor under high-load conditions, such as the highly viscous environments. It interacts with both rotor and stator proteins, increases motor output, and contributes to the normal rotational bias of the motor, and your absence leads to a variety of motility defects. FlhF proteins are GTPases that are often necessary for one or more steps in flagellar organelle such as flagellar biosynthesis, and it is required for sigma-dependent flagellar gene expression, but how FlhF influences these processes is unknown. FlhC and FlhD were initially described as a flagellar regulator, but studies also demonstrated FlhD/FlhC were actually a global regulator, including cell division and biofilm

formation. FliA is the sigma factor for several flagellar operons, which interacts with two subunits of the RNA-polymerase (rpoB and rpoC) (JONNES; ARMITAGE, 2015; KUTSUKAKE et al., 1994; MINAMINO, 2014; OHNISHI et al., 1994; PARTRIDGE; NIETO; HARSHEY, 2015; RAJAGOPALA et al., 2007; SULE et al., 2011; TAKEKAWA et al., 2019; WATERS; O'TOOLE; RYAN, 2007). Methyl-accepting chemotaxis proteins (MCP) are transmembrane receptors that bind to chemorepellents as toxic elements, or chemoattractant such as nutrients. The cytoplasmic domain of MCP harbors a histidine kinase, adenyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein and phosphatase (HAMP) region, which have role in signal propagation. Chemical signal initiates a phosphorylation pathway in the cytoplasm. CheW is the adapter protein that tethers the sensor histidine kinase CheA to the MCP cytosolic domain. The autophosphorylation status of CheA is regulated by the rate of methylation of MCP, which is controlled by CheB (methyl-erasure) and CheR (methyltransferase). The sensor kinase CheA is responsible to phosphorylate CheB and CheY, a protein that binds to the flagellar motor and induces a switch in the sense of rotation of the flagellar motor. CheZ rapidly dephosphorylates CheY to maintain a fast response to signals (PARTRIDGE et al., 2019; SALAH UD-DIN; ROUJEINIKOVA, 2017; WUICHET; ZHULIN, 2012). This loci also has two hypothetical proteins of unknown function and a gene encoding a response regulatory protein.

Antimicrobial susceptibility profile and resistance genes

The MIC results for the strain CBM01 are in table 2. There is no standardized methodology to perform the antimicrobial susceptibility test, specifically for *B. trematum*, by the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) or the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). We used MIC interpretative standards for Non-*Enterobacteriaceae* table from CLSI, according to previous studies (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). For ampicillin-sulbactam, doripenem, tigecycline, colistin and polymyxin B there were no interpretative criteria. However, it is important to point out that this interpretation could not be necessarily correlated with susceptibility, as *in vitro/in vivo* studies are lacking.

Looking at MICs for all drugs tested, we found that only aztreonam had a high value that surely would be considered as resistant. Then, we started searching for resistance genes which could explain that value. However, we did not find any specific resistance gene. Aztreonam has bactericidal activity resulting from the inhibition of bacterial cell wall synthesis due to a high affinity for penicillin binding protein 3 (PBP3). It binds to PBP3 and inhibits cell wall synthesis (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00355>). PBP3 is a transpeptidase encoded by the gene *ftsI*, which is absent in our isolate. Interestingly, another two studies reported resistance to aztreonam, one of them found MIC >32µg/mL (HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013) and the other did not show MIC results, only category interpretation (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018). To confirm if it could be an intrinsic resistance, we searched for the *ftsI* gene and found it present in *B. trematum* isolates (GenBank accession numbers LT546645, UFUJ01000001, UAQO01000000, KBT01000010). Although it is not commonly used, this antimicrobial could be an option for

treating skin and skin-structure infections (BROGDEN; HEEL, 1986). So, it is important to be aware that this drug may be ineffective for *B. trematum*.

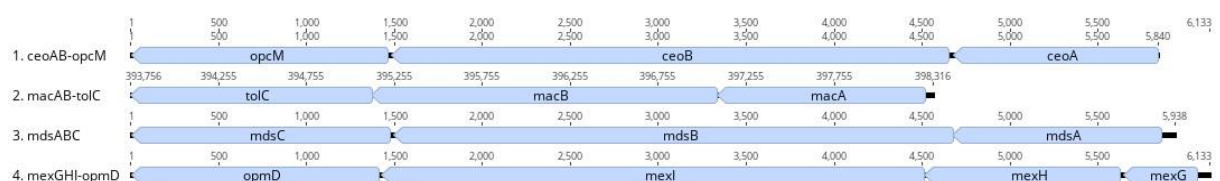
Table 2 – *In vitro* antimicrobial susceptibility profile of *B. trematum* strain CBM01

Antibiotic	MIC (µg/mL)	Interpretation
Amikacin	≤4	S ^a
Gentamicin	2	S
Tobramycin	2	S
Ciprofloxacin	1	S
Levofloxacin	≤1	S
Ceftazidime	4	S
Cefotaxime	8	S
Cefepime	≤2	S
Doripenem	≤0,5	-
Imipenem	≤1	S
Meropenem	≤1	S
Aztreonam	>16	R ^b
Ampicillin-sulbactam	≤4/2	-
Piperacillin-tazobactam	≤8/4	S
Ticarcillin-clavulanic acid	≤16/2	S
Doxycycline	≤2	S
Minocycline	≤2	S
Sulfamethoxazole-trimethoprim	≤9,5/0,5	S
Tigecycline	≤0,25	-
Colistin	≤0,25	-
Polymyxin B	≤0,25	-

^aS susceptible, ^bR resistant

Four putative genes encoding antimicrobial resistance associated with efflux pumps were identified: *macB*, *mdsB*, *mexI* and *ceoB* (figure 3). The first belongs to ATP- binding cassette (ABC) family transporters whereas the others are members of resistance nodulation division (RND) family. All of them presented high pairwise identity (>77%) with the reference genes sequences.

Figure 3. Antimicrobial resistance genes found in *B. trematum* CBM01



The *macB* gene encodes MacB, an ABC transporter that exports macrolides. It forms an antibiotic efflux complex with *macA* and *tolC* (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; LI;

PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015)(FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015). MacA and TolC are proteins encoded by the genes above mentioned, respectively. MacA is a periplasmic adaptor and TolC is an outer membrane channel. This efflux system is involved in macrolide-specific resistance in *Escherichia coli* (KOBAYASHI; NISHINO; YAMAGUCHI, 2001).

The *mdsB* gene encodes the protein MdsB, which operates as an inner membrane transporter of the multidrug and metal efflux complex *mdsABC*. The *mdsA* and *mdsC* genes encode MdsA and MdsC, a membrane fusion protein and outer membrane efflux protein, respectively. MdsABC (multidrug transporter of *Salmonella*) is a pump system well described in *Salmonella enterica*, known to confer resistance to novobiocin and several toxic chemicals, and is involved in pathogenicity (SONG et al., 2015).

The *mexI* gene encodes MexI, the inner membrane transporter of the efflux complex *mexGHI-opmD*. The *mexG* encodes MexG, an additional membrane-associated component with unknown functionality, *mexH* encodes MexH, a membrane fusion protein and *opmD* encodes OpmD, the outer membrane channel protein (SAKHTAH et al., 2016). This efflux pump was previously described conferring resistance to vanadium in *Pseudomonas aeruginosa* (AENDEKERK et al., 2002), and also was described in a plasmid conferring elevated resistance to norfloxacin, ethidium bromide, acriflavine and rhodamine 6G, confirming its role in multidrug resistance (SEKIYA et al., 2003).

The *ceoB* encodes CeoB, the cytoplasmic membrane component of the *ceoAB-opcM* efflux pump. *ceoA* encodes CeoA, the periplasmic linker subunit, and *opcM* encodes OpcM, the outer membrane channel of this system. CeoAB-OpcM was already described in *Burkholderia cenocepacia*. It was shown to be inducible by salicylate and chloramphenicol, and when expressed conferred resistance to chloramphenicol, trimethoprim and ciprofloxacin (PODNECKY; RHODES; SCHWEIZER, 2015).

None of this efflux pumps found is known to be involved in β -lactam resistance and probably they are not associated with the MIC for aztreonam. It is noteworthy that *B. trematum* strain CBM01 has many efflux pumps. Overexpression of efflux pumps is well known to be involved in multidrug resistance, remarkably those from RND family (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). The phenotypic profile of antimicrobial susceptibility from our strain leads us to infer that probably none of these pumps was overexpressed. However, the strain could change this condition if under selective pressure as it occurs during antibiotic treatment.

CONCLUSIONS

The analysis of the isolate CBM01 showed a multiplicity of virulence factors involved in several pathogenic processes, demonstrating its infection potential. Regarding antimicrobial resistance, it was demonstrated that the isolate has different efflux pumps and lacked a gene required for aztreonam activity. Although efflux pumps probably are not being overexpressed given the susceptibility phenotype presented by the isolate, there is no guarantee that these pumps will not be overexpressed if placed under selective pressure. Further *in vitro* studies are needed to better elucidate the mechanisms found here. Virulence mechanisms are necessary to overcome host defense systems, as well the development of antimicrobial resistance is essential to enable pathogenic bacteria to overcome antimicrobial therapies and to adapt to and survive in competitive and demanding new niches.

REFERENCES

- AENDEKERK, S. et al. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2371–2381, 2002.
- ALMAGRO-MOLTO, M.; EDER, W.; SCHUBERT, S. *Bordetella trematum* in chronic ulcers: report on two cases and review of the literature. **Infection**, v. 43, n. 4, p. 489–494, 2015.
- ALMUZARA, M. et al. Isolation of *Bordetella* species from unusual infection sites. **Journal of Medical Microbiology Case Reports**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2015.
- ASSEFA, S. et al. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1968–1969, 2009.
- ATKINSON, G. C.; TENSON, T.; HAURYLIUK, V. The RelA/SpoT Homolog (RSH) superfamily: Distribution and functional evolution of ppgpp synthetases and hydrolases across the tree of life. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- BADAMCHI, A.; PAPIZADEH, M. Comparative phylogeny of the genus *Bordetella* using sequence analysis of 16S rRNA and ompA genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 1–13, 2017.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.
- BELJANTSEVA, J. et al. Molecular mutagenesis of ppGpp: Turning a RelA activator into an inhibitor. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BROGDEN, R. N.; HEEL, R. C. Aztreonam: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 31, n. 2, p. 96–130, 1986.

CAROFF, M. et al. Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 1, p. 63–68, 2001.

CHANG, D. H. et al. Draft genome sequence of *Bordetella trematum* strain HR18. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2015.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Supplement M100**. Wayne, PA, 2019.

CROSA, J. H. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 4, p. 517–30, 1989.

DAXBOECK, F. et al. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1247–1248, 2004.

DESURMONT-DUPAS, M.-C.; CATTOËN, C.; BONNET, I. Bactériémie à *Bordetella trematum* dans un contexte d'immunosuppression. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 8, p. 547–549, 2018.

DINGLE, T. C.; MULVEY, G. L.; ARMSTRONG, G. D. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 4061–4067, 2011.

ELDER, K. D.; HARVILL, E. T. Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5919–5924, 2004.

ELLERMANN, M.; ARTHUR, J. C. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 105, p. 68–78, 2017.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–81, out. 2012.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. Serum resistance in *bvg* -regulated mutants of *Bordetella pertussis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 1, p. 57–63, 1998.

FERNANDEZ, R. C.; WEISS, A. A. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 4727–4738, 1994.

HALIM, I. et al. Isolation of *Bordetella trematum* from bacteremia. **Annales de Biologie Clinique**, v. 72, n. 5, p. 612–614, 2014.

HERNÁNDEZ-PORTO, M. et al. Diabetic leg ulcer colonized by *Bordetella trematum*. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 26, n. 1, p. 72–73, 2013.

- JONES, C. W.; ARMITAGE, J. P. Positioning of bacterial chemoreceptors. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 247–256, 2015.
- KATOH, K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–66, 2002.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.
- KOBAYASHI, N.; NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5639–5644, 2001.
- KUTSUKAKE, K. et al. Sequence analysis of the flgA gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, flgN. **Gene**, v. 143, n. 1, p. 49–54, 1994.
- KWON, K. T.; ARMSTRONG, D. G. Microbiology and antimicrobial therapy for diabetic foot infections. **Infection and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 11–20, 2018.
- LEE, E. J.; GROISMAN, E. A. Tandem attenuators control expression of the *Salmonella* mgtCBR virulence operon. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 212–224, 2012.
- LI, X.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.
- LINZ, B. et al. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016.
- MAGUIRE, M. E. Magnesium transporters: properties, regulation and structure. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 3149–3163, 2006.
- MAJEWSKI, L. L. et al. *Bordetella trematum* sepsis with shock in a diabetic patient with rapidly developing soft tissue infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 1, p. 112–114, 2016.
- MINAMINO, T. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 8, p. 1642–1648, 2014.
- NOVIKOV, A. et al. Complete *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii* and *Bordetella trematum* lipid A structures and genomic sequence analyses of the loci involved in their modifications. **Innate Immunity**, v. 20, n. 6, p. 659–672, 2014.
- NOVIKOV, A.; MARR, N.; CAROFF, M. A comparative study of the complete lipopolysaccharide structures and biosynthesis loci of *Bordetella avium*, *B. hinzii*, and *B. trematum*. **Biochimie**, v. 159, p. 81–92, 2019.
- OHNISHI, K. et al. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2272–2281, 1994.
- PARTRIDGE, J. D. et al. *Escherichia coli* remodels the chemotaxis pathway for swarming. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2019.

- PARTRIDGE, J. D.; NIETO, V.; HARSHEY, R. M. A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2015.
- PODNECKY, N. L.; RHODES, K. A.; SCHWEIZER, H. P. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–25, 2015.
- RAJAGOPALA, S. V. et al. The protein network of bacterial motility. **Molecular Systems Biology**, v. 3, n. 128, p. 1–13, 2007.
- RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 213–218, 2014.
- RAO, C. V.; KIRBY, J. R.; ARKIN, A. P. Design and diversity in bacterial chemotaxis: a comparative study in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **PLoS Biology**, v. 2, n. 2, p. 239–252, 2004.
- RONNEAU, S.; HALLEZ, R. Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 1–12, 2019.
- SAKHTAH, H. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that controls gene expression and biofilm development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 25, p. 3538–3547, 2016.
- SAKSENA, R.; MANCHANDA, V.; MITTAL, M. *Bordetella trematum* bacteremia in an infant: a cause to look for. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 2, p. 305–307, 2015.
- SALAH UD-DIN, A. I. M.; ROUJEINIKOVA, A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 18, p. 3293–3303, 2017.
- SEKIYA, H. et al. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, MexHI-OpmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2990–2992, 2003.
- SMITH, R. L.; MAGUIRE, M. E. Microbial magnesium transport: Unusual transporters searching for identity. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 217–226, 1998.
- SONG, S. et al. MdsABC-mediated pathway for pathogenicity in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 11, p. 4266–4276, 2015.
- SOUMANA, I. H.; LINZ, B.; HARVILL, E. T. Environmental origin of the genus *Bordetella*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 28, p. 1–10, 2017.
- SULE, P. et al. Regulation of cell division, biofilm formation, and virulence by FlhC in *Escherichia coli* O157:H7 grown on meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3653–3662, 2011.
- TAKEKAWA, N. et al. Structure of *Vibrio* FliL, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2019.

- TAO, T. et al. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: mgtA encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg²⁺ in a manner similar to that of the mgtB P-type ATPase. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2654–2662, 1995.
- TATUSOVA, T. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 14, p. 6614–6624, 2016.
- TENA, D.; MEDINA, M. J.; SÁEZ-NIETO, J. A. Isolation of *Xanthobacter* species and *Bordetella trematum* in a patient with polymicrobial peritonitis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 00, n. 00, p. 1–4, 2017.
- VANDAMME, P. et al. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 849–858, 1996.
- WARNER, D. M.; SHAFER, W. M.; JERSE, A.E. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and *in vivo* fitness. **Molecular Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 462–478, 2008.
- WATERS, R. C.; O'TOOLE, P. W.; RYAN, K. A. The FliK protein and flagellar hook-length control. **Protein Science**, v. 16, n. 5, p. 769–780, 2007.
- WUICHET, K.; ZHULIN, I. B. Origins and diversification of a complex signal transduction system in Prokaryotes. **Sci signal**, v. 3, n. 128, p. 1–27, 2012.
- Y CASTRO, T. R. et al. *Bordetella trematum* infection: case report and review of previous cases. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 485, p. 1–6, 2019.

3 DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho foi avaliar um isolado clínico de *B. trematum* com a finalidade de esclarecer sua relevância em um quadro de infecção polimicrobiana de úlcera de pé diabético. São raros os relatos encontrados na literatura, tendo sido este microrganismo associado principalmente a infecções de pele e partes moles (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013), assim como bacteremia (DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HALIM et al., 2014; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015). No caso relatado neste estudo, a paciente da qual o microrganismo foi isolado teve como causa do óbito septicemia de foco cutâneo. Contudo, não houve isolamento do agente etiológico.

A revisão de literatura que consta no manuscrito 1 permitiu a identificação das comorbidades mais frequentemente associadas às infecções por *B. trematum*, que consistiram em diabetes mellitus, doenças vasculares e renais (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; DAXBOECK et al., 2004; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016). Tais achados são condizentes com o presente estudo. Além disso, no que concerne à identificação laboratorial, a literatura traz que a identificação desta espécie é possível por testes laboratoriais automatizados (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015; ALMUZARA et al., 2015; DAXBOECK et al., 2004; DESURMONT-DUPAS; CATTOËN; BONNET, 2018; HALIM et al., 2014; HERNÁNDEZ-PORTO et al., 2013; MAJEWSKI et al., 2016; SAKSENA; MANCHANDA; MITTAL, 2015; TENA; MEDINA; SÁEZ-NIETO, 2017). Porém, há sugestão do sequenciamento do 16S rRNA como metodologia de referência (ALMAGRO-MOLTO; EDER; SCHUBERT, 2015). No caso apresentado, os métodos fenotípicos se mostraram efetivos para a identificação do microrganismo, que foi confirmada genotipicamente.

Com o intuito de entender o papel de *B. trematum* no processo infeccioso, decidiu-se por buscar possíveis fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos por meio do sequenciamento de genoma total do microrganismo. Apesar do *assembly* não resultar em um genoma completo, o genoma *draft* obtido apresentou boa qualidade, conforme resultados apresentados no manuscrito 2. O conteúdo de guanina e citosina (G+C%) (CHANG et al., 2015), a cobertura do genoma obtida e seu tamanho foram compatíveis com os dados disponíveis no GenBank para *B. trematum*. A realização de um novo sequenciamento por tecnologia que gere *reads* longas para integração com os dados provenientes da tecnologia Illumina MiSeq pode auxiliar na obtenção do genoma completo (BESSER et al., 2018).

Entretanto, os dados obtidos foram suficientes para a caracterização de virulência e resistência aos antimicrobianos.

Na análise de genes codificadores de FV foram identificados 16 genes, demonstrando o potencial patogênico do microrganismo. Esse achado associado ao fato de que no paciente diabético, há imunodepressão secundária à hiperglicemia e maior susceptibilidade a infecções, o isolado de *B. trematum* pode ter contribuído para a severidade da infecção. Pacientes com diabetes toleram mal a infecção e esta afeta negativamente o controle glicêmico do diabético. Esse ciclo repetitivo leva à hiperglicemia descontrolada, afetando ainda mais a resposta do hospedeiro à infecção (HOBIZAL; WUKICH, 2012). A expressão dos FV como quimiotaxia e motilidade presentes no isolado podem ter facilitado a colonização da úlcera de pé diabético. Além disso, outros fatores como a ação anti-complemento, a presença de LPS, sideróforos e mecanismos que auxiliam na detecção de modificações nutricionais e adaptação ao ambiente, também podem ter contribuído para a instauração de *B. trematum* no sítio infeccioso. No entanto, por ser uma infecção polimicrobiana, não foi possível atribuir precisamente a influência do isolado no processo.

A ferramenta ABRicate utilizada para a pesquisa na base de dados VFDB detectou os genes codificadores de virulência corretamente, pois os mesmos estavam presentes no genoma conforme a anotação do arquivo pelo GenBank. Apenas um equívoco foi observado. Por haver baixa cobertura para o gene *mgtB*, foi realizada a curadoria manual. Desta forma, constatou-se que o gene presente no isolado em estudo trata-se de *mgtA*. Isso pode ter ocorrido pois o gene *mgtA* codifica uma proteína com 50% de identidade com o produto do gene *mgtB* (LEE; GROISMAN, 2012; MAGUIRE, 2006). Portanto, a curadoria manual é indispensável, sendo realizada para todos os genes identificados.

Acerca da resistência aos antimicrobianos, foram identificados quatro genes codificadores de proteínas que compõem bombas de efluxo dos tipos ABC e RND. As bombas de efluxo encontradas possuem função fisiológica na biossíntese do LPS, como é o caso da proteína MacB, um transportador que faz parte do sistema de efluxo do tipo ABC MacABC-TolC (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; KOBAYASHI; NISHINO; YAMAGUCHI, 2001; LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015). Os genes *mdsB*, *mexI* e *ceoB*, codificadores das proteínas MdsB, MexI e CeoB, fazem parte dos sistemas de efluxo MdsABC, MexGHI-OpmD e CeoAB-OpcM, respectivamente, pertencentes à família RND. As bombas de efluxo do tipo RND tem função relevante na virulência bacteriana, transporte de moléculas do *quorum sensing*, detoxificação de intermediários de processos metabólicos e compostos tóxicos, como metais pesados, solventes ou antimicrobianos produzidos por outros

microrganismos (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTÍNEZ, 2013). Além da função fisiológica das bombas de efluxo, estas podem conferir resistência aos antimicrobianos. Tal fato pode ocorrer decorrente de mutações em genes cromossômicos que levam ao aumento de sua expressão. Efluxos da família RND possuem como característica a capacidade de transportar antibióticos de múltiplas classes, acarretando em multirresistência (BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014; WEBBER; PIDDOCK, 2003). Apesar da presença dessas bombas de efluxo no genoma do isolado de *B. trematum*, o fenótipo detectado não denota multirresistência.

Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, o isolado apresentou resistência apenas para aztreonam, se considerados os pontos de corte da tabela 2B-5 do documento M100_S29 do CLSI (CLSI, 2019). Para alguns antimicrobianos, como ampicilina-sulbactam, doripenem, tigeciclina, colistina e polimixina B não foram encontrados pontos de corte para interpretação do resultado no documento acima mencionado e nas tabelas do EUCAST. As CIM para essas drogas apresentaram valores relativamente baixos. Conforme discutido previamente, a utilização da tabela 2B-5 para interpretação dos resultados pode não ser ideal para *B. trematum*. No caso relatado, a paciente foi tratada empiricamente com piperacilina-tazobactam, droga para a qual o isolado apresentou-se sensível.

Em função da causa do óbito da paciente e da ausência de novos cultivos de material da úlcera de pé diabético, não se descarta a possibilidade da persistência de *B. trematum* no sítio de infecção, visto que esse microrganismo apresentou características compatíveis com um patógeno oportunista. A interpretação e implicação desse microrganismo no processo infeccioso é desafiadora e requer integração de dados clínicos, epidemiológicos e microbiológicos.

4 CONCLUSÃO

A patogenicidade de *Bordetella trematum* não está bem estabelecida. Dessa forma, não foi possível afirmar que o microrganismo tenha contribuído na evolução desfavorável da paciente. Apesar de ser um achado raro, *B. trematum* está tipicamente associado a manifestações clínicas de distúrbios que predisõem ao desenvolvimento de úlceras que podem ser infectadas por microrganismos. A combinação de antibioticoterapia e desbridamento cirúrgico tem papel fundamental na progressão de cura de lesões, prevenindo a ocorrência de infecções sistêmicas. Metodologias utilizadas em rotinas laboratoriais como MALDI-TOF MS e identificação automatizada pelo sistema VITEK 2 mostraram-se capazes de identificar tal microrganismo, sendo ferramentas importantes para diagnósticos futuros.

Por meio da avaliação sequenciamento de genoma total do isolado clínico de *B. trematum*, o presente estudo identificou 16 genes codificadores de fatores de virulência: *cheA*, *cheW*, *cheY*, *fliI*, *fliN*, *fliQ*, *fliC*, *bplA*, *bplB*, *bplC*, *bplD*, *iroN*, *mgtA*, *relA*, *mtrD* e *brkB*. O potencial de infecção do isolado em estudo foi demonstrado, pois os genes de virulência encontrados estão relacionados a processos como quimiotaxia, motilidade, biossíntese do LPS, detecção de flutuações de nutrientes no ambiente, bomba de efluxo e atividade anti-complemento. Dessa forma, pode-se sugerir que *B. trematum* apresenta características de patógeno oportunista.

Os genes de resistência aos antimicrobianos encontrados no isolado clínico de *B. trematum* foram *macB*, *mdsB*, *mexI* e *ceoB*. Esses genes codificam as proteínas MacB, MdsB, MexI e CeoB, respectivamente. Essas proteínas fazem parte de quatro diferentes bombas de efluxo que podem conferir resistência a múltiplos antimicrobianos quando superexpressas. Entretanto, o isolado apresentou CIM baixas para todos os antimicrobianos testados, exceto aztreonam. Nenhum gene específico de resistência aos β -lactâmicos foi encontrado. Desse modo, não foi possível correlacionar a presença dos genes ao fenótipo expresso.

REFERÊNCIAS

- ALMAGRO-MOLTO, M.; EDER, W.; SCHUBERT, S. *Bordetella trematum* in chronic ulcers: report on two cases and review of the literature. **Infection**, v. 43, n. 4, p. 489–494, 2015.
- ALMUZARA, M. et al. Isolation of *Bordetella* species from unusual infection sites. **Journal of Medical Microbiology Case Reports**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2015.
- ALVAREZ-ORTEGA, C.; OLIVARES, J.; MARTÍNEZ, J. L. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1–11, 2013.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 2017.
- BAKER, S. et al. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Science**, v. 360, p. 733–738, 2017.
- BAY, D. C.; ROMMENS, K. L.; TURNER, R. J. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transport family that continues to grow. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 9, p. 1814–1838, 2008.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. D36–D42, 2013.
- BESSER, J. et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 335–341, abr. 2018.
- BEZINE, E.; VIGNARD, J.; MIREY, G. The cytolethal distending toxin effects on mammalian cells: A DNA damage perspective. **Cells**, v. 3, n. 2, p. 592–615, 2014.
- BIANCHI, F. et al. Bioremediation of toluene and naphthalene: development and validation of a GC-FID method for their monitoring. **Annali di Chimica**, v. 95, n. 7–8, p. 515–524, 2005.
- BIEDERMAN, L. et al. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis. **IDCases**, v. 2, n. 4, p. 97–98, 2015.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2014.
- BLAIR, J. M. A.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1165–1177, 2014.
- BLANCO, A. et al. Colonización crónica por *Bordetella petrii*. Primer caso en España. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 29, n. 3, p. 167–169, 2016.
- BOOLCHANDANI, M.; D’SOUZA, A. W.; DANTAS, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 356–370, 2019.
- CARRIÇO, J. A. et al. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians.

- Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 342–349, 2018.
- CHANG, D. H. et al. Draft genome sequence of *Bordetella trematum* strain HR18. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2015.
- CHANG, L.-L. et al. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 518–521, fev. 2004.
- CHEN, L. et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 325–328, 2005.
- CHOWDHURY, S. P. et al. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus sindicus*, a perennial grass of Thar Desert, India. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 1, p. 82–90, 2007.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Supplement M100**. Wayne, PA, 2019.
- COOTE, J. G. Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*. **Advances in Microbial Physiology**, v. 44, p. 141–181, 2001.
- DAXBOECK, F. et al. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1247–1248, 2004.
- DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808–816, 2019.
- DESURMONT-DUPAS, M.-C.; CATTOËN, C.; BONNET, I. Bactériémie à *Bordetella trematum* dans un contexte d'immunosuppression. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 8, p. 547–549, 2018.
- DEURENBERG, R. H. et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. **Journal of Biotechnology**, v. 243, p. 16–24, 2017.
- DIAVATOPOULOS, D. A. et al. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 4, p. 0373–0383, 2005.
- FABRE, A. et al. Opportunistic pulmonary *Bordetella hinzii* infection after avian exposure. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2122–2126, 2015.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.
- FISHBAIN, J. T. et al. Invasive *Bordetella holmesii* infections. **Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. 65–68, 2015.
- FONG, W. et al. Detection and incidence of *Bordetella holmesii* in respiratory specimens from patients with pertussis-like symptoms in New South Wales, Australia. **Pathology**, v. 50, n. 3, p. 322–326, 2018.
- FRY, N. K. et al. *Bordetella petrii* clinical isolate. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1131–1133, 2005.

- FRY, N. K. et al. The first UK isolate of *Bordetella ansorpii* from an immunocompromised patient. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 993–995, 2007.
- GONZÁLEZ, M. M. et al. *Bordetella hinzii* endocarditis, a clinical case not previously described. **European Journal of Case Reports in Internal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 1–3, 2019.
- GROSS, R. et al. The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic Bordetellae. **BMC Genomics**, v. 9, n. 449, p. 1–14, 2008.
- HALIM, I. et al. Isolation of *Bordetella trematum* from bacteremia. **Annales de Biologie Clinique**, v. 72, n. 5, p. 612–614, 2014.
- HARRINGTON, A. T. et al. Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella* strain from patients with respiratory disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 72–74, 2009.
- HERNÁNDEZ-PORTO, M. et al. Diabetic leg ulcer colonized by *Bordetella trematum*. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 26, n. 1, p. 72–73, 2013.
- HINGURAO, K.; NERURKAR, A. A novel methylotrophic bacterial consortium for treatment of industrial effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 691–704, 2018.
- HOBIZAL, K. B.; WUKICH, D. K. Diabetic foot infections: current concept review. **Diabetic Foot & Ankle**, v. 3, n. 18409, p. 1–8, 2012.
- HUMPHREY, J. M. et al. Prosthetic-joint-associated *Bordetella holmesii* infection. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 1–4, 2015.
- IVANOV, Y. V. et al. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5452–5459, 2016.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–4, set. 2007.
- KO, K. S. et al. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2516–2519, 2005.
- KOBAYASHI, N.; NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5639–5644, 2001.
- KULSKI, J. K. Next-Generation Sequencing — An overview of the history, tools, and “Omic” applications. **Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges**, p. 3–60, 2016.
- KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 763–768, 2009.
- KWON, S. S. et al. Persistent *Bordetella petrii* infection related to bone fractures. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 1, p. 70–72, 2016.

- LE COUSTUMIER, A. et al. *Bordetella petrii* infection with long-lasting persistence in human. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 612–618, 2011.
- LEE, E. J.; GROISMAN, E. A. Tandem attenuators control expression of the *Salmonella* mgtCBR virulence operon. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 212–224, 2012.
- LEINONEN, R. et al. The Sequence Read Archive. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D19–D21, 2011.
- LI, X.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.
- LINZ, B. et al. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016.
- LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1–11, 2012.
- LLOYD, N. A.; NAZARET, S.; BARKAY, T. Genome-facilitated discovery of RND efflux pump-mediated resistance to cephalosporins in *Vibrio* spp. isolated from the mummichog fish gut. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019.
- LYNCH, A. S. Efflux systems in bacterial pathogens : An opportunity for therapeutic intervention ? An industry view. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 949–956, 2006.
- MAGUIRE, M. E. Magnesium transporters: properties, regulation and structure. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 3149–3163, 2006.
- MAJEWSKI, L. L. et al. *Bordetella trematum* sepsis with shock in a diabetic patient with rapidly developing soft tissue infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 1, p. 112–114, 2016.
- MCLAUGHLIN, K. et al. Biofilm formation and cellulose expression by *Bordetella avium* 197N, the causative agent of bordetellosis in birds and an opportunistic respiratory pathogen in humans. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 5, p. 419–430, 2017.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.
- MIR-CROS, A. et al. Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 1856–1859, 2017.
- MIRIAGOU, V. et al. CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3172–3174, 2004.
- MITCHELL, C. J.; STONE, T. A.; DEBER, C. M. Peptide-based efflux pump inhibitors of the small multidrug resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2019.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.
- NADJI, S. et al. Spondylodiscitis caused by *Bordetella holmesii*, a misrecognized pathogen

- emerging in invasive infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 75, p. 95–97, 2018.
- NAGATA, J. M. et al. *Bordetella petrii* sinusitis in an immunocompromised adolescent. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 4, p. 458, 2015.
- NOGI, M.; BANKOWSKI, M. J.; PIEN, F. D. Septic arthritis and osteomyelitis due to *Bordetella petrii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1024–1027, 2015.
- PARKHILL, J. et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature Genetics**, v. 35, n. 1, p. 32–40, 2003.
- POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162–176, jan. 2007.
- SAIER JR., M. H. Active transport in communication, protection and nutrition. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 3–4, p. 161–164, 2007.
- SAKSENA, R.; MANCHANDA, V.; MITTAL, M. *Bordetella trematum* bacteremia in an infant: a cause to look for. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 2, p. 305–307, 2015.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SFANOS, K. et al. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 242–264, 2005.
- SMITH, L. M. et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, n. 6071, p. 674–679, 1986.
- SOUMANA, I. H.; LINZ, B.; HARVILL, E. T. Environmental origin of the genus *Bordetella*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 28, p. 1–10, 2017.
- SPIPKER, T. et al. A simplified sequence-based identification scheme for *Bordetella* reveals several putative novel species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 674–677, 2014.
- SPIPKER, T.; LIWIENSKI, A. A.; LIPUMA, J. J. Identification of *Bordetella* spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 5, p. 504–506, 2008.
- STARK, D. et al. *Bordetella petrii* from a clinical sample in Australia: isolation and molecular identification. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 435–437, 2007.
- TAZATO, N. et al. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4830–4838, 2015.
- TENA, D.; MEDINA, M. J.; SÁEZ-NIETO, J. A. Isolation of *Xanthobacter* species and

Bordetella trematum in a patient with polymicrobial peritonitis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 00, n. 00, p. 1–4, 2017.

VANDAMME, P. et al. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 1, p. 37–45, 1995.

VANDAMME, P. et al. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rügner and Tan 1983. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 849–858, 1996.

VANDAMME, P. A. et al. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sedimi*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 3674–3682, 2015.

VON WINTZINGERODE, F. et al. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1257–1265, 2001.

VOURLI, S. et al. Characterization of In111, a class 1 integron that carries the extended-spectrum beta-lactamase gene bla IBC-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, n. 1, p. 149–153, 2003.

WANG, F. et al. Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 896–902, 2007.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WEISS, R. A. Virulence and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 314–317, 2002.

WEYANT, R. S. et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1–7, 1995.

WU, H. J.; WANG, A. H. J.; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 93–101, 2008.

ZHANG, X.; CHERRINGTON, N. J.; WRIGHT, S. H. Molecular identification and functional characterization of rabbit MATE1 and MATE2-K. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 293, n. 1, p. F360–F370, jul. 2007.

ZHENG, L.-L. et al. A comparison of computational methods for identifying virulence factors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42517, 2012.

GLOSSÁRIO

Barcodes: sequências curtas de DNA que são fundidas ao DNA amostra para sua distinção e identificação, funcionando como códigos de barra.

Base calling: conversão do sinal bruto detectado pelo sequenciamento em uma sequência de nucleotídeos.

Base pair (bp): dois nucleotídeos opostos e complementares nas cadeias de DNA e RNA que estão conectadas por ligações de hidrogênio.

Contigs: são sequências montadas a partir da sobreposição (*overlap*) de leituras (*reads*).

Coverage (cobertura): a cobertura corresponde a quantas vezes, em média, cada base do genoma foi sequenciada. O cálculo da cobertura é feita com o total de bases sequenciadas dividido pelo tamanho do genoma.

De novo assembly: montagem de leituras (*reads*) para gerar sequências conhecidas ou desconhecidas na ausência de um genoma de referência como molde.

Gap: espaço (lacuna) em uma montagem onde nenhuma leitura de sequência foi encontrada para uma porção particular do genoma.

Genome assembly: montagem dos fragmentos de uma sequência de DNA a fim de reconstruir uma representação computacional da sequência original.

Mapping: o mapeamento é a montagem de leituras (*reads*) contra uma sequência conhecida (referência), construindo dessa forma uma nova sequência que é semelhante, mas não necessariamente idêntica à sequência utilizada como referência.

N50: pode ser descrito como uma estatística mediana ponderada de modo que 50% de todo o conjunto de dados esteja contido em *contigs* iguais ou maiores que esse valor. É calculado no contexto do tamanho da montagem do genoma.

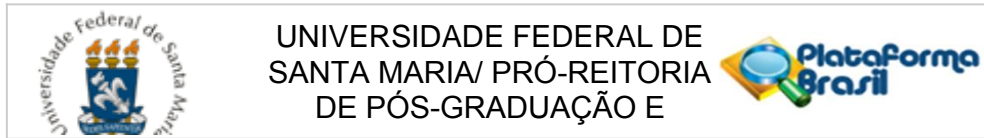
NG50: a estatística de *NG50* é a mesma que *N50*, exceto que é 50% do tamanho do genoma conhecido ou estimado que deve ser do comprimento de *NG50* ou maior, permitindo dessa forma comparações entre diferentes montagens. Também pode ser definido como o comprimento do *scaffold* em que 50% do comprimento do genoma é coberto.

Paired-end reads: são as leituras (*reads*) de ambas as fitas da mesma molécula de DNA (sentido 5'-3' e sentido 3'-5').

Reads: são fragmentos de sequências nucleotídicas geradas a partir do sequenciamento.

Scaffolds: conjuntos de *contigs* ordenados e orientados, montados por sobreposição de sequências, conectados por uma região desconhecida, denominada *gap* de montagem.

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Bordetella trematum em úlcera de pé diabético: relato de caso e revisão de literatura.

Pesquisador: Priscila de Arruda Trindade

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59563316.6.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.729.292

Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa trata de um trabalho de conclusão de curso (TCC) do curso de Farmácia do CCS da UFSM. O estudo foca seu olhar para a diabetes e a bactéria Bordetella trematum. O objetivo é realizar uma revisão de literatura sobre Bordetella trematum, utilizando as bases de dados PubMed, Scielo e Google Scholar para pesquisa de artigos científicos e um relato de caso sobre Bordetella trematum em úlcera de pé diabético. A dificuldade de identificação, associado à baixa frequência de isolamentos problematiza a elucidação de relação colonização/infecção, tornando o seu isolamento significativo, por já haver relatos de resistência intrínseca a antimicrobianos. Tecnologias utilizadas na rotina de laboratórios para identificação de microrganismos, como MALDI-TOF MS e o sistema VITEK®2 se mostraram eficientes e confiáveis para a identificação de Bordetella trematum. Em casos como o que será pesquisado, em que o microrganismo presente é um achado raro, é importante que seja feito o relato para incorporar na literatura mais informações sobre o assunto. O estudo é um relato de caso clínico e revisão de literatura. O relato de caso será feito através de informações contidas no prontuário do paciente, seguindo as diretrizes sugeridas por GAGNIER et al. (2014). Dados como sexo, data de nascimento, peso, altura, patologias descritas, exames solicitados, resultados dos exames microbiológicos, antibióticos utilizados e prognóstico após tratamento serão coletados, além de

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

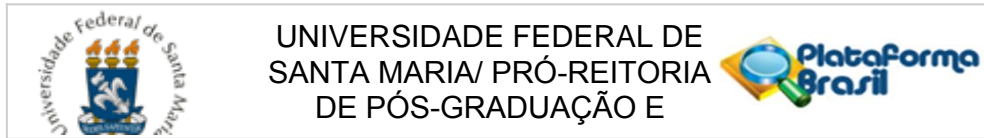
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.729.292

outras informações relevantes que sejam pertinentes ao caso (ANEXO B). Com informações obtidas no laboratório de análises clínicas, serão relatados também aspectos referentes ao isolamento e identificação de *Bordetella trematum*. Para a revisão de literatura, serão consultadas bases de dados como PubMed, Scielo e Google Scholar, utilizando na busca as palavras chave: *Bordetella trematum*, MALDI-TOF MS e VITEK2®, sendo considerados artigos nos idiomas português, inglês e espanhol, com data de publicação indiferente. Não há análise estatística para relato de caso. O custo do estudo é de R\$52,40 de responsabilidade dos próprios pesquisadores. O cronograma de início prevê a aprovação pelo Comitê de Ética.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: divulgar em periódico científico indexado um caso raro de *Bordetella trematum* em úlcera diabética e revisar a literatura de modo a reunir informações sobre o assunto.

Objetivos secundários:

- Avaliar o significado clínico do microrganismo isolado;
- Descrever os métodos laboratoriais usados para identificação do microrganismo;
- Descrever as intervenções ocorridas e correlacioná-las ao desfecho do caso.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: para a pesquisa será utilizado o prontuário do paciente, com informações já coletadas pelo clínico, não sendo necessário o contato do pesquisador com o mesmo, não havendo portanto risco físico e/ou psicológico direto ao paciente.

Benefícios: Como benefício indireto, esta pesquisa trará mais informações sobre o assunto a serem acrescentadas à literatura já existente, podendo ser útil em casos semelhantes futuros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

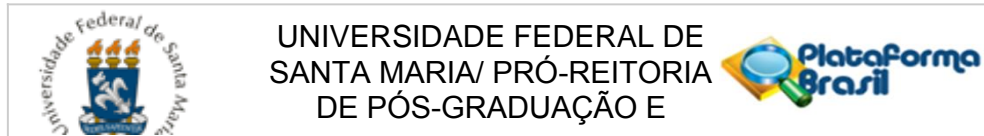
.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta de maneira satisfatória a folha de rosto, aprovação pelo GEP-HUSM, folha de informações básicas do projeto, projeto na íntegra, termo de confidencialidade e termo de consentimento livre e esclarecido.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.729.292

Recomendações:

Sugiro rever o objetivo do estudo, pois "divulgar em evento científico indexado um caso raro" não é o objetivo de pesquisa. Trata sim, do produto posterior a realização do estudo que é tornar público os resultados da mesma.

Uma vez alterado o objetivo, este deve ser corrigido em todos os documentos onde o mesmo conste.

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Justifica a solicitação de dispensa de TCLE, pois para a pesquisa será utilizado o prontuário do paciente, com informações já coletadas pelo clínico, não sendo necessário o contato do pesquisador com o mesmo, não havendo, portanto risco físico e/ou psicológico direto ao paciente e mantendo-se o sigilo da identidade do paciente.

Os demais documentos estão devidamente apresentados. Nestes sentido, o Comitê pode aceitar a dispensa de TCLE.

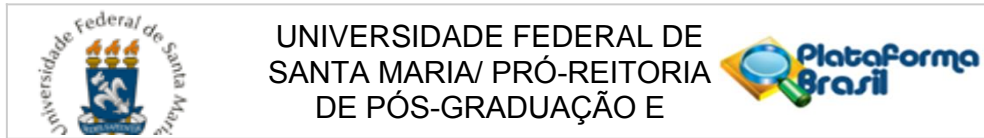
Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_787512.pdf	05/09/2016 13:32:15		Aceito
Outros	projetoIntegra_044030.pdf	05/09/2016 13:31:58	Priscila de Arruda Trindade	Aceito
Outros	termoconfidencialidadeTCCThais.pdf	05/09/2016 13:30:08	Priscila de Arruda Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizaGEPHUSMTCCThais.pdf	05/09/2016 13:10:05	Priscila de Arruda Trindade	Aceito

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.729.292

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	210716TCCThaispararegistroGEPHUS M_CEP.docx	05/09/2016 12:54:50	Priscila de Arruda Trindade	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostotccthais.pdf	05/09/2016 11:20:38	Priscila de Arruda Trindade	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 15 de Setembro de 2016

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar	
Bairro: Camobi	CEP: 97.105-970
UF: RS	Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362	E-mail: cep.ufsm@gmail.com