

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS DE ESCARRO DE
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR CRÔNICA NA FIBROSE CÍSTICA.**

Fabiana Caroline Zempulski Volpato

Porto Alegre
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS DE ESCARRO DE
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR CRÔNICA NA FIBROSE CÍSTICA.**

Fabiana Caroline Zempulski Volpato

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo José Cauduro Maróstica

Tese apresentada como requisito para obtenção de título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre
2022

CIP - Catalogação na Publicação

Volpato, Fabiana Caroline Zempulski
AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA DE AMOSTRAS DE ESCARRO DE
PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR CRÔNICA NA FIBROSE
CÍSTICA. / Fabiana Caroline Zempulski Volpato. --
2022.

195 f.

Orientador: Afonso Luís Barth.

Coorientador: Paulo José Cauduro Maróstica.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Fibrose Cística. I. Barth, Afonso Luís, orient.
II. Maróstica, Paulo José Cauduro, coorient. III.
Titulo.

“On ne voit bien qu’avec le cœur. L’essentiel est invisible pour les yeux.”
Antoine de Saint-Exupéry

Dedico esta tese com muito amor e saudades à Anna Martincoski Zempulski (*in memoriam*), minha querida “vó Anna”, obrigada por sempre ter uma história e a me ensinar a correr atrás dos meus sonhos, essa conquista é reflexo de tudo isso.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Afonso Luís Barth**, agradeço imensamente por toda a disponibilidade, confiança e a oportunidade de trilhar essa jornada sob a sua orientação. Tenho muito orgulho em dizer que fui, sou e sempre serei sua orientada, a gratidão e o carinho por tudo que me ensinastes são imensos. Tenho a honra de ter em minha formação profissional/pessoal uma pessoa fantástica, que sempre tinha a “história certa”, um profissional que é, sem dúvidas, um grande exemplo para todos.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Paulo José Cauduro Maróstica**, agradeço pela oportunidade de olhar para cada paciente desse estudo de uma forma especial, por participar dos *rounds* da equipe pediátrica. Com isso estendo o meu agradecimento a toda equipe multidisciplinar envolvida no tratamento dos pacientes com Fibrose Cística, o trabalho e o empenho de todos é um grande exemplo.

Aos meus pais **Gelson José Volpato** e **Ana Regina Zempulski Volpato**, eu não chegaria tão longe sem todo o apoio de vocês, há muitos anos essa conquista se tornou a conquista de vocês também. Obrigada por tudo.

Ao meu esposo **Anderson Luiz de Carvalho** que sempre me ensinou “a voar como as águias” e sempre vibrou comigo por cada conquista alcançada, agradeço por todo o apoio, incentivo, companheirismo e parceria, é muito bom estarmos no mesmo “barco” (ambos alunos de doutorado).

Às minhas afilhadas **Anna Zempulski Coelho** e **Gabriela Silva Zempulski** e aos meus sobrinhos **Marcelo Zempulski Coelho** e **Davi Carvalho de Lima**, aos mais novos, mesmo sem entender a contribuição de vocês, saibam que me deram força para continuar, seja pelas ligações de vídeo, por recadinhos ou mesmo “me chamando para brincar”. À Gabi, por todo carinho e torcida e por se fazer presente sempre.

À **Ariane Silva Zempulski**, sempre presente em todos os grandes momentos da minha vida, que além de prima é uma grande amiga, agradeço por sempre torcer por mim e me achar sua “referência no assunto”, por todo carinho e amor muito obrigada.

À **Daiana de Lima Morales**, ou a querida “Daia”, não tenho palavras para agradecer por toda paciência e disposição em me ensinar “microbiomas”, por muitas

vezes me salvar quando surgiam perguntas, por todo carinho de sempre, sem dúvidas esse trabalho aconteceu por sua dedicação e atenção.

Ao **Otávio von Ameln Lovison**, por toda a sua ajuda e boa vontade nas análises, sem dúvidas, seria muito mais difícil finalizar essa tese sem a sua dedicação. Agradeço por “tratar” todos os dados como se fossem seus e por todo tempo dedicado a isso.

À **Profa Dra Andreza Francisco Martins** por toda disponibilidade, troca de idéias e ajuda para a realização das análises dessa tese.

À **Fernanda de Paris** agradeço por toda força, troca de conhecimento e palavra amiga durante essa trajetória, o seu “vai dar tudo certo” muitas vezes era fundamental.

À todas as pessoas do **Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana – LABRESIS** que fizeram do laboratório uma casa para mim nestes anos. Agradeço todo o apoio e oportunidades de troca de conhecimento, aprendi e aprendo todos os dias com vocês. Agradeço à Priscila Wink, Amanda Martins, Maiara Carneiro, Camila Wilhelm, Evelyn Almeida, Aymê Duarte, Giovanna de Ross, Patrícia Barth, Natália Kehl e Mayana Kieling.

À toda equipe da **Unidade de Microbiologia** do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por sempre estarem tão dispostos a me auxiliar.

À toda a equipe do **LabCovid** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, mesmo em um momento tão difícil de pandemia vocês foram um presente, todos são profissionais incríveis e me mostraram o verdadeiro significado do trabalho em equipe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela estrutura, material e local para o desenvolvimento desse projeto.

E, por fim, aos pacientes com Fibrose Cística, espero que as informações geradas pelos trabalhos aqui apresentados possam contribuir para uma melhora na qualidade de vida de todos vocês.

RESUMO

Base teórica: A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética que acomete diversos órgãos, entretanto, as infecções crônicas das vias aéreas são uma das principais comorbidades que afetam estes indivíduos. A determinação do perfil microbiológico destas infecções crônicas é realizada através de técnicas tradicionais de cultivo. Dentre as bactérias comumente isoladas nas técnicas de cultivo predominam de forma mais significativa a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Staphylococcus aureus* e espécies do complexo *Burkholderia cepacia*. Essas bactérias provocam infecções persistentes no pulmão do paciente com FC e são de difícil erradicação. Com base em tecnologias moleculares, sugere-se que há uma diferença na diversidade bacteriana nas vias aéreas e a qual pode estar associada a uma melhor evolução clínica da doença. As metodologias moleculares independem do cultivo bacteriano em meios de cultura e tem como base o sequenciamento do gene 16S rRNA que é bastante conservado em bactérias e permite identificar diferentes espécies. O sequenciamento do gene 16S rRNA tem a potencial capacidade de apresentar maior sensibilidade que as técnicas de cultivo tradicional, o que pode antecipar a detecção de um patógeno ou indicar a persistência deste no pulmão de pacientes com FC.

Objetivo: Determinar o microbioma de pacientes com FC em amostras de escarro, afim de correlacionar a microbiota de pacientes jovens com o resultado da cultura bacteriológica tradicional, mutações em *CFTR* e presença de leucócitos no escarro.

Métodos: Amostras de escarros de pacientes com FC foram coletadas para dois estudos distintos. No primeiro estudo uma amostra de escarro de 27 pacientes diferentes foram obtidos e, em um segundo estudo, foi determinado a presença do gênero *Burkholderia* através do microbioma em 22 amostras de escarros de 9 pacientes diferentes. Para ambos os trabalhos a biblioteca do 16S rRNA foi preparada usando a região V3V4 do gene e o produto de amplificação foi submetido a sequenciamento usando Illumina MiSeq. A determinação dos táxons presente na amostra foi realizado por *Amplicon Sequence Variants* (ASV).

Resultado: Em relação ao primeiro estudo, a análise do microbioma detectou os gêneros *Staphylococcus* e *Pseudomonas* em todas as amostras de escarro. Na técnica de cultivo tradicional a espécie mais prevalente foi *Staphylococcus aureus* presente em 70,4% (19/27) das amostras de escarros analisadas, seguida por *Pseudomonas aeruginosa* em 33,3% (9/27) e complexo *Burkholderia cepacia* em 29,63% (8/27). Foi possível observar pelo microbioma uma diminuição significativa da diversidade bacteriana nas amostras de escarro com presença de leucócito e o mesmo ocorreu nas amostras oriundas de pacientes internados. Entretanto não foi observado variações estatisticamente significativas entre os microbiomas de pacientes com diferentes mutações no gene *CFTR*. No segundo estudo, através do microbioma foi possível detectar o gênero *Burkholderia* em pelo menos uma amostra dos 9 (100%) pacientes analisados, o que representou 63,64% (14/22) dos escarros analisados. Em contrapartida, na cultura bacteriológica foi identificada a Bcc em apenas 4 amostras de escarro de 3 diferentes pacientes. Cabe mencionar que os estudos acima foram os primeiros a determinar o microbioma pulmonar de pacientes com FC através da análise por ASV.

Conclusão: Os resultados de ambos estudos indicaram que o microbioma pôde antecipar a detecção de gêneros de importância clínica (*Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Burkholderia*) em comparação com técnicas de cultivo laboratorial, e, com isso contribuir para um tratamento mais precoce. Além disso, a menor diversidade do microbioma pode ser relacionada a aumento do processo inflamatório (presença de leucócitos) bem como a necessidade de internação hospitalar.

Palavras chave: Fibrose Cística, microbioma pulmonar, Comunidade Microbiológica, Técnica de cultura independente; ASV; 16S rRNA.

ABSTRACT

Background: Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease that affects different organs; however, the chronic airway infection is the main comorbidity of these individuals. The evaluation of the microbiological profile of these chronic infections is usually performed by bacteriological culture. Among the bacteria commonly isolated by culture-dependent technique, the main species are *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus* and members of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). These bacteria cause persistent infections in the lung of CF patients which are difficult to eradicate. Based on molecular technologies, it has been suggested that there is a difference in the bacterial diversity from the airways which may be associated with a better prognosis of the disease. These molecular methods are independent of bacteriological culture as they are based on sequencing of the 16S rRNA gene, which is highly conserved in bacteria and allows to differentiate the species. The 16S rRNA sequencing has the potential to be more sensitive than bacteriological culture; and it may anticipate the detection of a pathogen or indicate its persistence in the lung of patients with CF.

Objective: To evaluate the microbiome in the respiratory tract of patients with CF in order to correlate the airways microbiota of young patients with the result of bacteriological culture; *CFTR* mutations and the presence of leukocytes in sputum.

Methods: Sputum specimens from patients with CF were collected for two different studies. For the first study, 27 sputa from different patients were obtained; for the second study, the presence of the *Burkholderia* genus was determined in the microbiome of 22 sputum specimens from 9 different patients. For both studies, library of 16S rRNA was prepared according to a standard protocol using a V3V4 region; the product of amplification was submitted to sequencing into Illumina MiSeq. The determination of the taxa in the specimens was performed using the amplicon sequence variants (ASV).

Results: In relation to the first study, microbiome was capable to detect the genera *Staphylococcus* and *Pseudomonas* in all sputum samples. In the traditional culture technique, the most prevalent species were *Staphylococcus aureus* present in 70.4% (19/27) of the sputum specimens analyzed, followed by *Pseudomonas aeruginosa* in 33.3% (9/27) and *Burkholderia cepacia* complex in 29, 63% (8/27). It was possible to observe, by microbiome analysis, a significant decrease in bacterial diversity in sputum specimens; lower alpha diversity was directly correlated to the presence of leukocytes and hospitalized patients. There was no significant difference in alpha diversity and *CFTR* mutations. In the second study, according to the microbiome analysis, it was possible to detect the genus *Burkholderia* in at least one specimen of all 9 (100%) patients; which represented 63.64% (14/22) of the sputum analyzed. Conversely, the bacteriological culture was capable to detect Bcc in only 4 sputa (18.2%) from 3 different patients. Noteworthy, the studies above were the first to determine the lung microbiome of patients with CF using ASV analysis.

Conclusion: The results of both studies indicates that the microbiome could anticipate the detection of clinically important genera (*Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Burkholderia*) compared to bacteriological culture results, and this may contribute to earlier treatment. In addition, the lower alpha diversity may be related to an increase in the inflammatory process (presence of leukocytes) and with hospitalization status.

Key Words: Cystic Fibrosis; lung microbiome; microbiological community; culture-independent technique; ASV; 16S rRNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de pesquisa em bases de dados.

Figura 2. Marco Conceitual da Infecção Pulmonar em Fibrose Cística.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de microbioma pulmonar de pacientes com Fibrose Cística.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASV	<i>Amplicon Sequence Variants</i>
Bcc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
COVID-19	Doença do coronavírus 19
ECFS	<i>European Cystic Fibrosis Society</i>
ELISA	<i>Ensaio de imunoabsorção enzimática</i>
FC	Fibrose Cística
LB	Lavado broncoalveolar
LabCovid	Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV 2
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight – Mass Spectrometry</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
SARS-CoV 2	Síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2
TIR	Tripsinogênio imunorreativo
VOC	Variante de Preocupação
VOI	Variante de Interesse
VOM	Variante de Monitoramento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	18
2.2 Fibrose Cística	19
2.2.1 Mutações genéticas no gene <i>CFTR</i>	19
2.3 Diagnóstico de Fibrose Cística	20
2.4 Infecção Pulmonar Crônica na Fibrose Cística	21
2.4.1 Patógenos relacionados à infecção pulmonar	22
2.5 Microbioma	25
2.5.1 Microbioma pulmonar	26
3. MARCO CONCEITUAL	29
4. JUSTIFICATIVA	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo primário	31
5.2 Objetivos secundários.....	31
6. ARTIGOS	32
6.1 Artigo I – Artigo submetido à <i>BMJ Open Respiratory Research</i>	32
6.3 Artigo II – <i>Letter</i> submetida à <i>Infection Control & Hospital Epidemiology</i>	51
6.4 Artigo III – Artigo aceito para a publicação na <i>Brazilian Archives of Biology and Technology</i>	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	17
CAPÍTULO ESPECIAL	18
9. A PANDEMIA DE SARS-CoV-2	19
10. ARTIGOS DE SARS-COV 2 COMO PRIMEIRO AUTOR	22
10.1 Artigo: Utilização de pool para otimizar o diagnóstico de SARS-CoV 2.....	22
10.2 Caso clínico da VOC P1(Gamma).....	30
10.3 Artigo papel de filtro para transporte de amostras de SARS-CoV-2, aceito na <i>Journal of Virological Methods</i>	36
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS I – Resumos publicados em anais de congresso referentes à tese.	57
I. Resumo apresentado no 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia.	57
II. Resumo publicado nos anais de congresso do ECCMID 2020.....	59
III. Resumo apresentado no 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. ...	61
IV. Resumo aceito no 13 th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers.....	62

ANEXOS II – Resumos publicados em anais de congresso referentes ao Capítulo Especial.	
.....	64
ANEXOS III – Outros artigos publicados em coautoria no período da minha tese.	66
ANEXOS IV – Capítulo de Livro.	133
APÊNDICE I – Diretriz Metodológica.	134

1. INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva com manifestações sistêmicas, que afeta diversos órgãos. O quadro clínico dos pacientes fibrocísticos normalmente está associado a doença pulmonar progressiva, insuficiência pancreática exócrina, má absorção gastrointestinal, e essas condições resultam em desnutrição e crescimento prejudicado (RATJEN *et al.*, 2015). Cabe ressaltar que as infecções crônicas das vias aéreas são uma das principais comorbidades que afetam estes indivíduos, visto que, podem evoluir à quadros de exacerbações pulmonares intermitentes e perda de função pulmonar (OLIVEIRA, 2004). Estima-se que 80-95% dos pacientes com FC vem a desenvolver insuficiência respiratória causada por infecção bacteriana crônica (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002).

O perfil microbiológico dos patógenos da via aérea, que são isolados por métodos de cultivo tradicional, é bastante conhecido e estão relacionados à faixa etária dos indivíduos com FC. Dentre as espécies comumente isoladas das vias aéreas de FC estão: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), *Haemophilus influenzae*, entre outros. Ao longo da vida dos pacientes, alguns microrganismos ganham notoriedade, como a *P. aeruginosa*, estima-se que cerca de 80% dos indivíduos com FC irão desenvolver infecção crônica por esta bactéria (SAIMAN *et al.*, 2014).

Embora menos prevalentes que a *P. aeruginosa*, outras bactérias também são importantes, como por exemplo membros do complexo *Burkholderia cepacia*, que também são muito associados a doença respiratória em FC tanto em pacientes pediátricos e adultos. Anteriormente, a espécie que dá o nome ao complexo, era denominada como *Pseudomonas cepacia*, porém, foi reclassificada em 1992 como *Burkholderia cepacia*, sendo assim, se estabeleceu um novo gênero de bactérias não fermentadoras (YABUUCHI *et al.*, 1992). Várias outras espécies foram incorporadas ao gênero conforme foram reexaminadas por abordagens taxonômicas (VANDAMME, *et al.*, 1997; YABUUCHI *et al.*, 1992) sendo que, mesmo atualmente, a classificação de bactérias do gênero *Burkholderia* é bastante complexa.

Estima-se que cerca de 30% dos pacientes portadores da FC venham a ser colonizados pelo Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) e isto normalmente está associado a um mau prognóstico clínico (LUTZ *et al.*, 2011). Cabe mencionar que uma porção significativa de pacientes com FC sucumbem rapidamente a uma pneumonia

necrotizante e evoluem ao óbito. Por outro lado, alguns pacientes permanecem colonizados por estas bactérias ao longo de anos sem um impacto adverso (LIPUMA *et al.*, 2001). Essas diferenças entre as manifestações clínicas sugerem potencial patogênico entre as cepas membros do Bcc, como por exemplo, a espécie *Burkholderia cenocepacia* genomovar IIIA (MAHENTHIRALINGAM, 2000).

Diante de um crescente interesse em estudar a microbiota pulmonar de pacientes com FC, ferramentas moleculares de cultivo independente, vem sendo exploradas (MARCHESI *et al.*, 1998). O sequenciamento do gene 16S rRNA é utilizado para pesquisar a comunidade microbiana em diversas patologias. Este gene é bastante conservado em bactérias e permite observar diferenças significativas interespecies (JANDA; ABBOTT, 2007; WOO *et al.*, 2009). A utilização de técnicas moleculares para amostras respiratórias de pacientes portadores de FC pode demonstrar o perfil microbiológico pulmonar destes pacientes e antecipar a detecção de patógenos em comparação com técnicas tradicionais de cultivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura foi realizada através de dados do **PubMed/Medline**, **BVS (Biblioteca Virtual em Saúde)** e **Scielo**, utilizando de forma combinada ou isolada as palavras chaves: “Cystic Fibrosis AND Pulmonary microbiome”, “Cystic Fibrosis AND *Burkholderia*” e “Pulmonary Microbiome AND ASV”, conforme descrito na figura 1.

Os artigos foram selecionados, inicialmente, com base em seus títulos e resumos e, após a leitura na íntegra dos artigos, os que correspondiam com o assunto foram utilizados. Foram selecionados 80 artigos de língua inglesa de 1938 a 2022.

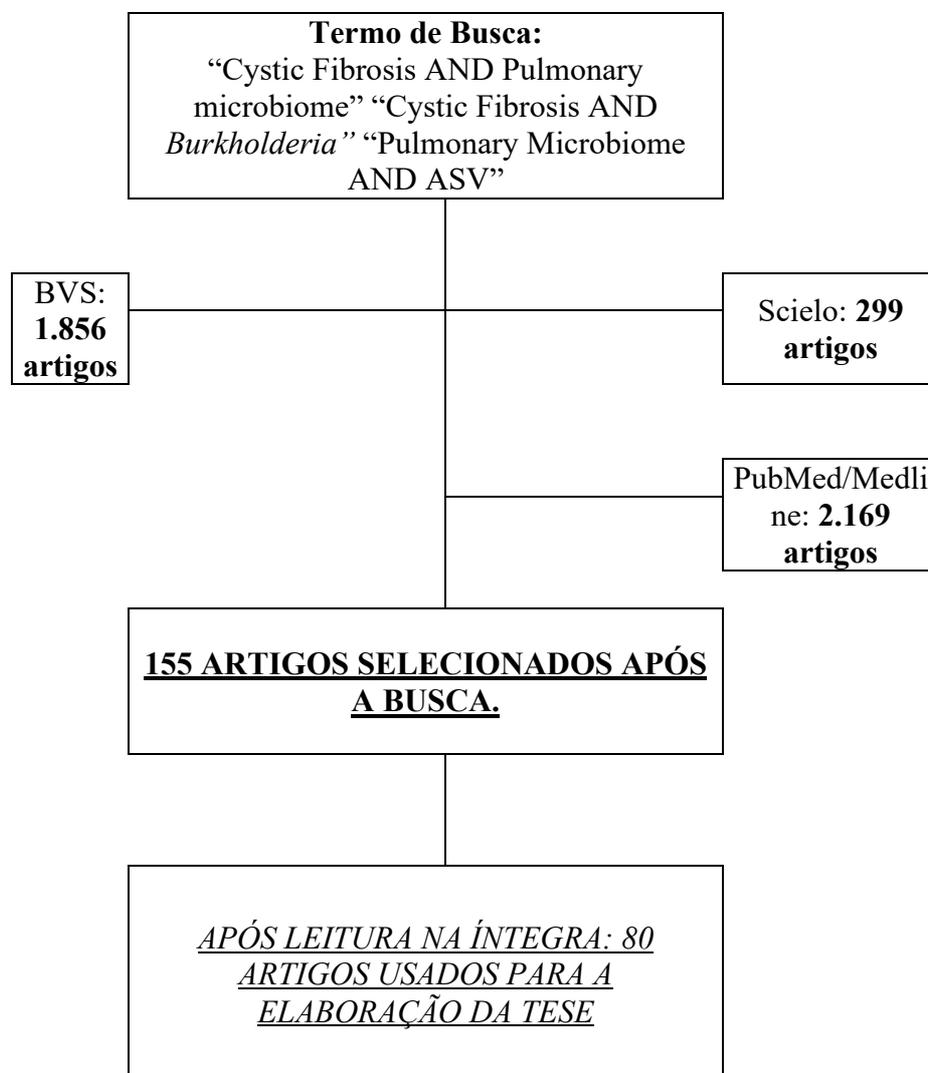


Figura 1. Fluxograma de pesquisa em bases de dados.

2.2 Fibrose Cística

A FC é uma das doenças de caráter genético mais prevalentes em eurodescendentes, com incidência de 1:2.500 indivíduos, sendo que uma a cada 30 pessoas pode ser portadora assintomática do gene (NAVARRO, 2016). A patologia foi descrita pela primeira vez em 1938 por Dorothy Andersen, sendo um quadro clínico com interrupção do crescimento, abdômen distendido e intensa diarreia com fezes em grandes quantidades, pálidas e fétidas (ANDERSEN, 1938). Esse primeiro relato foi feito a partir da avaliação de 49 pacientes e estava relacionado a forma pancreática da doença, onde o termo “fibrose cística do pâncreas” foi utilizado pela primeira vez (ANDERSEN, 1938). Posteriormente, a doença foi associada a infecção pulmonar e a perda de eletrólitos durante uma onda de calor na cidade de Nova York (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005).

A FC é uma desordem monogenética recessiva, também conhecida como mucoviscidose, caracterizada por mutações do gene *CFTR* (do inglês, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005). Esta alteração afeta o funcionamento da proteína CFTR responsável pelo transporte de íons cloreto através da membrana de células apicais, o que resulta em um desequilíbrio hidroeletrólítico e como consequência um espessamento do muco e sua retenção em diversos órgãos (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005; ELBORN, 2016).

Dentre os órgãos afetados, cabe ressaltar a disfunção das células epiteliais no pâncreas (provocando má absorção), no fígado (evoluindo para cirrose biliar), nas glândulas sudoríparas (choque térmico) e nas gônadas por afetar os ductos deferentes (ELBORN, 2016). Entretanto, a forma típica da doença é a tríade: doença pulmonar obstrutiva crônica, quadro de má absorção e alterações eletrolíticas do suor (OLIVEIRA, 2004).

2.2.1 Mutações genéticas no gene *CFTR*

O gene *CFTR* está localizado no braço longo do cromossomo 7 (locus 7q31), e é dividido em 27 éxons, gerando uma proteína composta por 1.480 aminoácidos (DA ROSA *et al.*, 2018). Até o presente momento, no banco de dados do “*Cystic Fibrosis Mutation Database*” estão registradas mais de 2.100 mutações diferentes no gene CFTR (<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>). Entretanto a delta F508, que corresponde a uma deleção da fenilalanina na posição 508 do cromossomo (RIORDAN

et al., 1989), é a mutação mais frequente e estudada na FC. Ela é considerada a principal mutação associada aos casos graves da doença e estima-se que a prevalência de delta F508 é de 50% para indivíduos com homozigose e em heterozigose pode estar presente em até 90% dos pacientes (DA ROSA *et al.*, 2018; CHEN; SHEN; ZHENG, 2021). Indivíduos com esta mutação apresentam sinais precoces de sintomas respiratórios, com redução da função pulmonar, insuficiência pancreática, retardo de crescimento e geralmente apresentam resultados elevados no teste do suor (DA ROSA *et al.*, 2018; CHEN; SHEN; ZHENG, 2021).

A maioria das mutações não delta F508 são relativamente raras (como: G542X, G551D, N1303K e W1282X) e podem apresentar uma frequência de apenas 1-10% sendo que estas variações na prevalência estão relacionadas com a origem étnica da população estudada (DE ARAÚJO *et al.*, 2005; ROGAN; STOLTZ; HORNICK, 2011). Sabe-se que diferentes mutações no gene CFTR têm efeitos variados na função da proteína e podem resultar em diferentes fenótipos da doença (DAVIES; ALTON; BUSH, 2007). Algumas mutações resultam em formas mais leves, entretanto, os impactos clínicos de genótipos raros ainda não estão bem esclarecidos. Assim, em mutações raras é difícil fazer suposições sobre a gravidade da FC, sendo importante considerar aspectos clínicos como: métricas de crescimento, função pulmonar e estado nutricional do paciente (CHEN; SHEN; ZHENG, 2021).

2.3 Diagnóstico de Fibrose Cística

O “Programa Nacional de Triagem Neonatal” incorporou a triagem para fibrose cística no Brasil desde 2001. O teste de triagem tem uma sensibilidade de 87% e se baseia no fato que a doença é detectada a partir da enzima pancreática tripsinogênio imunorreativo (TIR), que em virtude da obstrução dos canalículos e ductos pancreáticos encontra-se elevada na corrente sanguínea de recém-nascidos (MOCELIN *et al.*, 2017). Antes da descoberta do gene CFTR e da incorporação na triagem neonatal, o diagnóstico da FC era essencialmente baseado em critérios clínicos do paciente e pelo resultado do teste de eletrólitos do suor (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005). O teste dos eletrólitos no suor foi descrito por Gibson e Cooke em 1959 que tem por princípio a dosagem do Cloro no suor sendo estimado que o íon esteja elevado em cerca de 98-99% dos pacientes com FC (MATTAR *et al.*, 2010).

Além de testes de detecção laboratorial, alguns sinais clínicos ao nascimento também podem indicar o diagnóstico de FC, como o íleo meconial, que ocorre em cerca de 10 a 20% dos recém-nascido. Esta condição é em decorrência do espessamento de secreções intestinais que resultam na passagem tardia do mecônio provocando a obstrução intestinal (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005).

Com a evolução de métodos moleculares, foi possível a detecção de variantes no gene *CFTR*, o que proporcionou aos laboratórios uma nova metodologia de diagnóstico e permitiu a determinação de quadros leves da doença que antes não eram detectados (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005). Com o surgimento de drogas moduladoras da proteína CFTR, como ivacaftor, lumacaftor/ivacaftor, tezacaftor/ivacaftor e elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, a utilização de técnicas laboratoriais capazes de determinar a mutação específica do gene se tornaram bastante importantes (ELBORN, 2013; BARDIN *et al.*, 2021). Estas drogas disponíveis para o tratamento de pacientes com FC são específicas para a mutação genética que o indivíduo possui, visto que o mecanismo de ação varia de acordo com a deficiência da proteína, podendo atuar especificamente como corretores da CFTR, potencializadores do transporte de íons ou contribuindo para o aumento da expressão das proteínas (BARDIN *et al.*, 2021).

2.4 Infecção Pulmonar Crônica na Fibrose Cística

Desde o início da vida, o pulmão de um paciente com FC torna-se propício à colonização bacteriana e, ao longo dos anos uma grande parte destes indivíduos podem ser acometidos por uma doença pulmonar supurativa e obstrutiva progressiva, o que se torna a maior causa de morte (GILLIGAN, 1991; GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003). No trato respiratório a proteína CFTR altera o equilíbrio eletrolítico na mucosa, o que provoca a excessiva absorção de água do lúmen, diminuindo a quantidade de água na superfície fluídica das vias aéreas, influenciando diretamente nas propriedades viscoelásticas do muco que recobre a via respiratória (LEIGH *et al.*, 2009). Isto leva ao comprometimento das funções mucociliares, propiciando a colonização bacteriana nas vias aéreas destes pacientes (LEIGH *et al.*, 2009; LUTZ *et al.*, 2011). Devido a isso, ocorrem infecções recorrentes o que pode resultar em uma atrofia da glândula da submucosa com produção excessiva de muco causando um dano permanente ao tecido (MISHRA; GREAVES; MASSIE, 2005).

Ao longo de décadas houveram avanços importantes no cuidado de pessoas com FC, acarretando em melhoria substanciais na sobrevivência destes pacientes. Esta evolução pode estar associada a introdução de medicamentos eficazes, acompanhamento ambulatorial dos pacientes, suporte nutricional, etc. (PLANT *et al.*, 2013). Entretanto, o aumento na sobrevida do paciente levou a uma porção crescente de adultos com fibrose cística, o que acarretou em uma população mais velha e com doença pulmonar muito grave.

2.4.1 Patógenos relacionados à infecção pulmonar

A doença respiratória crônica é consequência de diversos fatores, como o aumento da resposta inflamatória devido ao processo infeccioso e aos produtos do metabolismo bacteriano (RAMPHAL *et al.*, 1980). A colonização e/ou infecção do tecido pulmonar, se dá de maneira precoce e na forma de biofilmes (agregado celulares), o que torna os microrganismos mais protegidos da ação de antibióticos e da resposta imune do hospedeiro (LUTZ *et al.*, 2011; CANTIN *et al.*, 2015).

O perfil infeccioso do trato respiratório de pacientes com FC é bem conhecido e está diretamente associado à faixa etária dos indivíduos (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003; LUTZ *et al.*, 2011). Dentre os microrganismos frequentemente associados à doença respiratória, pode-se citar: *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus* em pacientes jovens com FC, e a *Pseudomonas aeruginosa* como o patógeno mais comumente associado ao longo da vida adulta (GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003).

O *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias a causar infecções pulmonares em pacientes com FC, sendo que a instalação deste microrganismo é seguida de redução progressiva da função pulmonar (ESPOSITO *et al.*, 2019). A aquisição do *S. aureus* está relacionada ao transporte nasal da via aérea superior para a inferior, provocando a colonização do pulmão desde os primeiros anos de vida de pacientes com FC (BOUTIN; DALPKE, 2017; ESPOSITO *et al.*, 2019). O transporte desta bactéria para o trato respiratório inferior, somado à mudança composicional do muco nestes pacientes aumenta a probabilidade de infecção das vias aéreas por outros patógenos (BOUTIN; DALPKE, 2017). Relatos na literatura indicam que o *S. aureus* pode auxiliar à *P. aeruginosa* a se instalar no pulmão de pacientes com FC (BOUTIN; DALPKE, 2017). A coinfeção por *S. aureus* e *P. aeruginosa* desencadeia um desfecho ruim no paciente com

FC, e está diretamente ligada a um aumento de episódios de exacerbação pulmonar quando comparados à pacientes mono infectados (LIMOLI *et al.*, 2017).

Infecções por *P. aeruginosa* são mais frequentes a partir dos 18 anos de vida do paciente quando pode se tornar crônica principalmente devido a capacidade desta bactéria crescer em biofilme somado as características singulares do pulmão do paciente com FC (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002; GIBSON; BURNS; RAMSEY, 2003). Uma vez no pulmão, a *P. aeruginosa* pode alterar suas propriedades fenotípicas, tornando-se mucóide devido à produção de alginato, o que desencadeia em uma infecção mais persistente (LUTZ *et al.*, 2011). Sabe-se que o alginato possui uma função protetora em um ambiente relativamente hostil onde as bactérias são submetidas continuamente a um estresse oxidativo (HENTZER *et al.*, 2001). Um mesmo genótipo mucóide pode permanecer colonizando o paciente e ser isolado em múltiplas amostras do mesmo indivíduo ao longo da vida, mesmo após antibioticoterapia (SILBERT; BARTH; SADER, 2001).

2.4.1.1 Complexo *Burkholderia cepacia*

A espécie foi descrita por Palleroni e Holmes em 1981 e foi, em um primeiro momento, taxonomicamente classificada como *Pseudomonas cepacia* e, reclassificada em 1992 como *Burkholderia cepacia* (PALLERONI AND HOLMES, 1981; YABUUCHI *et al.*, 1992). Posteriormente, diversas espécies deste gênero foram organizadas em um complexo, formando assim o complexo *Burkholderia cepacia*, um grupo heterogêneo de bactérias Gram negativas, não fermentadoras, composto até o presente momento por 22 espécies (BALDWIN *et al.*, 2004; VANDAMME; DAWYNDT, 2011).

As bactérias que compõem o complexo são as mais estudadas e conhecidas, entretanto, o gênero é composto por cerca de 100 espécies, altamente prevalentes em plantas e no meio ambiente (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016). Um estudo demonstrou que o gênero *Burkholderia* poderia ser dividido em dois grupos filogenéticos distintos (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2013). Foi proposto, ainda, que as espécies comumente encontradas em plantas fossem reclassificadas em gêneros *Caballeronia* ou *Paraburkholderia*, mas alguns critérios ainda são necessários para essa mudança (SAWANA; ADEOLU; GUPTA, 2014). Cabe ressaltar que o número de espécies do gênero *Burkholderia* está aumentando constantemente, com muitas espécies sendo descritas nos últimos 10 anos, o que torna complexo agrupar as várias espécies em

diferentes grupos filogenéticos ou mesmo descrever novos gêneros (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016).

Algumas espécies, principalmente membros do Bcc, possuem um significado clínico importante e podem ser identificadas ao longo do curso da FC. Mesmo com os avanços no tratamento das últimas duas décadas, infecções por essas bactérias ainda apresentam um impacto considerável na morbidade e na mortalidade desses pacientes (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010). Em alguns indivíduos fibrocísticos a infecção evolui para uma pneumonia necrotizante com uma rápida evolução a óbito, por outro lado, alguns pacientes colonizados podem não ter um impacto adverso importante (LIPUMA *et al.*, 2001). Essas diferentes manifestações clínicas sugerem divergências no potencial patogênico entre as cepas do Bcc, e demonstram a heterogeneidade dessas espécies (MAHENTHIRALINGAM, 2000).

É importante mencionar que, dentre as espécies do Bcc, alguns isolados apresentam diversidades intra-espécies como por exemplo *Burkholderia cenocepacia* III, sendo classificada em 4 diferentes genomovares: A; B; C; D. Apesar de todas as espécies do complexo estarem associadas a um mau prognóstico, pacientes colonizados com *B. cenocepacia* apresentam uma drástica redução das funções pulmonares e uma diminuição da sobrevida (GRAINDORGE *et al.*, 2010). *B. cenocepacia*, quando associada à indivíduos com FC, é responsável pela “síndrome cepacia”, uma infecção pulmonar necrotizante com alto índice de mortalidade, mais comumente associada ao genomovar IIIA (ISLES *et al.*, 1984; BALDWIN *et al.*, 2004; DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010).

Relatos na literatura demonstram que em torno de 66% pacientes com *B. cenocepacia* sobrevivem apenas 5 anos após a aquisição deste microrganismo, o que é muito preocupante, pois, pacientes portadores de *Pseudomonas aeruginosa* possuem uma sobrevida superior à 85% (DREVINEK; MAHENTHIRALINGAM, 2010). Ainda, *Burkholderia* spp apresentam elevada taxa de transmissão entre pacientes com FC, o que torna complexo o controle e o tratamento das infecções por Bcc em pacientes com FC (GRAINDORGE *et al.*, 2010; VANDAMME; DAWYNDT, 2011; SCOFFONE *et al.*, 2017).

2.4.1.1.1 Diagnóstico laboratorial de Bcc

A identificação convencional por métodos fenotípicos não permite a diferenciação de todas as espécies de Bcc, sendo necessário o uso de técnicas de identificação molecular. As principais metodologias moleculares utilizam *primers* para o *locus* do gene *rec-A* (MAHENTHIRALINGAM, 2000) ou para o 16S rDNA. Métodos moleculares, podem apresentar custo elevado e requerem expertise técnica e, muitas vezes, estes fatores inviabilizam a utilização destas metodologias na identificação dos isolados em laboratórios de microbiologia de rotina.

O MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight – Mass Spectrometry*) é uma tecnologia que surgiu nos últimos anos e que permite a identificação de microrganismos de forma rápida e precisa através de técnica de espectrometria de massas com base no perfil proteico da amostra bacteriana o qual é comparado com um banco de dados pré-estabelecido. O sistema MALDI-TOF apresenta ótima capacidade para identificar bactérias, inclusive não-fermentadoras. Visto que, à medida que esta técnica se torna amplamente usada, os bancos de dados ficam mais completos e melhoram ainda mais a confiabilidade na identificação.

2.5 Microbioma

O gene do 16S rRNA é um componente da subunidade 30S dos ribossomos de procariotos e é amplamente utilizado na avaliação filogenética bacteriana em virtude de a taxa evolutiva ser extremamente conservada e apresentar regiões variáveis e constantes entre as espécies (FANER *et al.*, 2017). O grau evolutivo de conservação do gene está relacionado ao fato de ser um componente crítico da função celular bacteriana (CLARRIDGE, 2004). O 16S rRNA possui cerca de 1.500 pares de bases sendo um gene longo o suficiente para fornecer informações sobre polimorfismos intraespecíficos (CLARRIDGE, 2004). Sendo assim, a comparação das sequências do gene 16S rRNA permite a diferenciação no nível de gênero para praticamente todas as principais bactérias, ou até mesmo, classificar os isolados bacterianos em vários níveis, como em espécie e subespécie.

As tecnologias de métodos de sequenciamento de ácidos nucleicos evoluíram significativamente nos últimos tempos principalmente pela melhoria da qualidade dos produtos das sequências amplificadas e pela velocidade de compartilhamento de dados (CLARRIDGE, 2004). O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing – NGS*) começou a ser utilizado entre os anos de 2004-2006 e, é uma tecnologia

empregada em diversas áreas por possuir a capacidade de gerar grande quantidade de informação (HU *et al.*, 2021). A técnica de NGS em equipamento Illumina é baseada em “sequenciamento por síntese” por tecnologia de terminação reversível marcada com fluorescência e o produto final é baseado na leitura óptica da incorporação de nucleotídeos (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; HU *et al.*, 2021).

O uso de técnicas de sequenciamento gera uma grande quantidade de dados gerados por amostra analisada (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017) sendo que um dos fatores limitantes na determinação do microbioma é a análise de bioinformática, principalmente se a identificação das sequências de 16S rRNA são representativas da biota pulmonar. Existem duas formas de quantificar a diversidade e a composição das comunidades microbianas: as OTU (*Operational Taxonomic Unit*) e ASV (*Amplicon Sequence Variant*). OTUs é baseada em uma distinção das sequências onde as leituras suficientemente semelhantes em um banco de dados de referência são agrupadas (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017). Já os métodos de análises baseados em ASV distinguem variantes de sequência que diferem em apenas um nucleotídeo o que permite uma maior sensibilidade e especificidade ao discriminar os padrões ecológicos (CALLAHAN; MCMURDIE; HOLMES, 2017). Este modelo (ASV) tem a capacidade de distinguir entre a variação biológica “verdadeira” das que foram provavelmente um erro de sequenciamento (CHIARELLO *et al.*, 2022). Sendo assim, pode-se indicar que os métodos de ASV disponíveis oferecem uma melhor resolução e maior precisão do que as sequências geradas a partir de OTUs.

2.5.1 Microbioma pulmonar

Os pulmões de indivíduos saudáveis eram considerados órgãos estéreis, visto que técnicas de cultivo microbiológico tradicionais continuamente produziam resultados negativos (DICKSON *et al.*, 2016). O conceito de que o trato respiratório inferior poderia ser composto por uma comunidade microbiana diversa levantou novas hipóteses relacionadas à patogênese de doenças (DICKSON *et al.*, 2016). A avaliação do microbioma pulmonar foi possível a partir de técnicas cultivo-independentes, através de técnicas de metagenômicas, com o sequenciamento do gene do 16S rRNA. Relatos na literatura sugerem que o microbioma das vias respiratórias de indivíduos saudáveis deva ser mais diversificado em comparação àqueles com alguma doença pulmonar crônica (BLAINEY *et al.*, 2012; FRANÇOISE; HÉRY-ARNAUD, 2020).

Um número crescente de estudos vem caracterizando a composição da microbiota das vias aéreas dos pacientes com FC (Tabela 1) os quais, na sua maioria, objetivam estabelecer algum tipo de correlação do microbioma respiratório com a evolução clínica dos portadores da doença (HARRIS *et al.*, 2007; LYNCH, 2009; COBURN *et al.*, 2015). O microbioma das vias aéreas de pacientes com FC é bastante complexo, mas alguns estudos relataram que uma redução da diversidade da comunidade bacteriana e o predomínio de um patógeno específico está associada à faixa etária, uso de antibióticos, diminuição da função pulmonar, aderência do microrganismo e progressão da doença (COX *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2012; CARMODY *et al.*, 2013; COBURN *et al.*, 2015; MUHLEBACH *et al.*, 2018). Ainda, sabe-se que estes pacientes podem apresentar mudanças marcantes na estrutura do microbioma em quadro de exacerbação da doença enquanto que pacientes saudáveis demonstram muito pouca alteração na diversidade bacteriana (HUANG; LIPUMA, 2016). Cabe ressaltar que a comunidade do microbioma é transitória e desafia estratégias atuais de tratamento, uma vez que estes parâmetros se relacionam com a resposta clínica e a evolução do quadro clínico (SMITH *et al.*, 2014).

Tabela 1. Estudos de microbioma pulmonar de pacientes com Fibrose Cística.

Referências	Ano	Número de Pacientes	Total de Amostras	Tipo de Estudo	Tipo de Amostra	Local do Estudo
Leite <i>et al.</i>	2020	5	25	Longitudinal	Escarro	Brasil
Garcia-Nuñez <i>et al.</i>	2020	17	107	Longitudinal	Escarro, Swab de nasofaringe, lavado nasal	Espanha
Muhlebach <i>et al.</i>	2018	46	71	Longitudinal	LB*	Austrália Estados Unidos
Carmody <i>et al.</i>	2018	111	630	Longitudinal	Escarro	da América
Whelan <i>et al.</i>	2017	6	~150	Longitudinal	Escarro	Canadá Estados Unidos
Mahboubi <i>et al.</i>	2016	-	945	-	Escarro	da América
Coburn <i>et al.</i>	2015	269	269	Transversal	Escarro	Canadá Estados Unidos
Blainey <i>et al.</i>	2014	16	-	Transversal	Escarro	da América
Smith <i>et al.</i>	2014	23	54	Longitudinal	Escarro	Austrália Estados Unidos
Zhao <i>et al.</i>	2012	6	126	Longitudinal	Escarro	da América

Fodor <i>et al.</i>	2012	23	23	Transversal	Escarro	Estados Unidos da América
Cox <i>et al.</i>	2010	63	-	Longitudinal	Escarro	Estados Unidos da América

*LB: Lavado Broncoalveolar.

Garcia-Nuñez *et al.* (2020) observaram que a composição microbiana dos brônquios comparada à via aérea superior apresenta diferenças significativas em estágio inicial da doença, como em pacientes mais jovens. Cox *et al.* em (2010), relataram que pacientes adultos com FC exibem uma menor diversidade bacteriana sendo que essa diminuição nas vias aéreas estaria fortemente correlacionada com a perda de função do órgão e com o surgimento de espécies competitivamente dominantes, como, os membros das famílias: *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae* e *Xanthomonadaceae*. Em 2014, Smith e colaboradores, avaliaram a interação do microbioma do paciente com exacerbação da doença pulmonar durante a antibioticoterapia, e relataram uma diminuição na predominância de *Pseudomonas aeruginosa* e um aumento da heterogeneidade da microbiota, durante a primeira semana do tratamento. Esta mudança pode ser um indicativo de sucesso no tratamento se o microbioma permanecer nas mesmas proporções tornando-se um parâmetro preditor de resposta clínica (SMITH *et al.*, 2014).

Outros estudos sugerem que a diversidade do microbioma pode diminuir em pacientes com a doença pulmonar progressiva típica, devido à antibioticoterapia, o que pode causar a seleção de uma espécie, o que apresenta uma relação direta com doenças inflamatórias mais graves (COX *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2012; FLIGHT *et al.*, 2015).

3. MARCO CONCEITUAL

Um dos órgãos mais acometidos na FC é o pulmão, em virtude do distúrbio de transporte de íons cloreto pela proteína CFTR. O mal funcionamento da CFTR provoca um acúmulo do muco nas vias aéreas, esse muco espesso é um ambiente propício para a colonização bacteriana. Com isso, a presença de bactérias patogênicas no trato respiratório estimula o processo inflamatório e isso se torna recorrente e crônico. O diagnóstico laboratorial, através de técnicas de cultura permite a identificação de patógenos quando as células bacterianas estão viáveis para cultivo e presentes em quantidades significativas. As técnicas moleculares, que são cultura independente, permitem determinar a microbiota do trato respiratório bem como indicar a abundância das bactérias que compõem o microbioma.

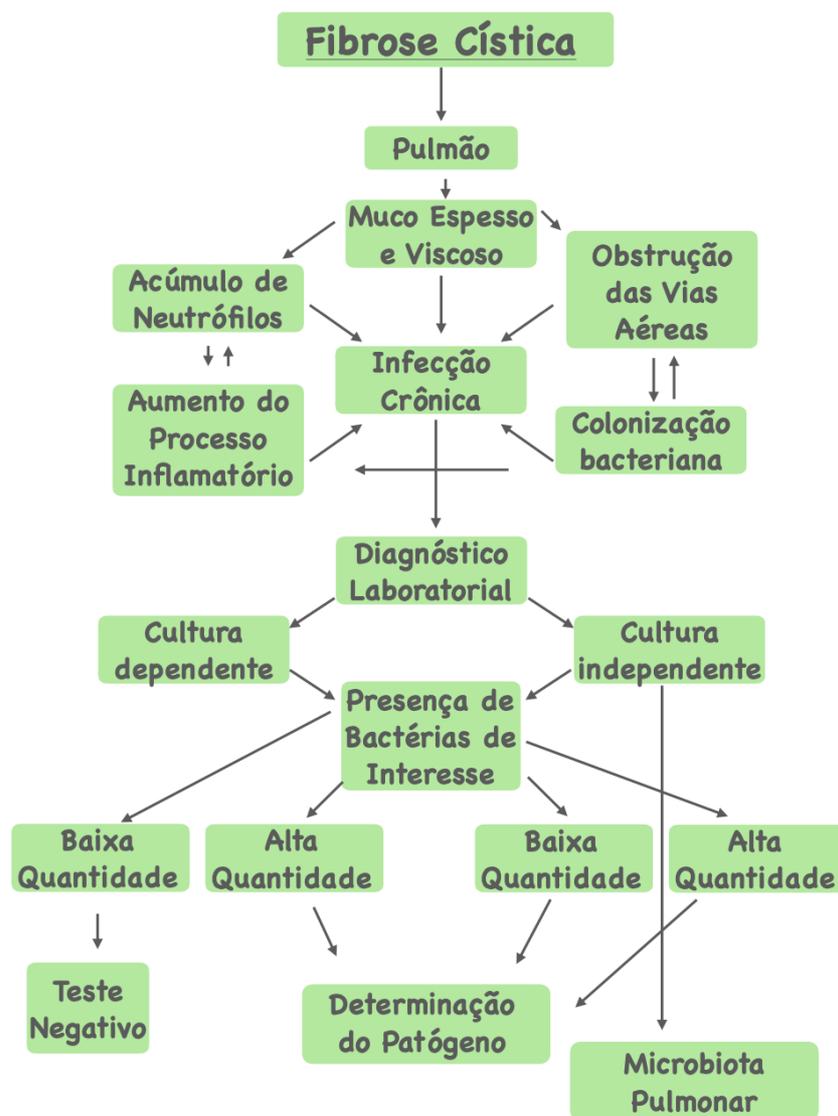


Figura 2. Marco conceitual da infecção pulmonar em pacientes com Fibrose Cística.

4. JUSTIFICATIVA

O espectro da FC vem se modificando ao longo do tempo (SALSGIVER *et al.*, 2016) uma vez que a expectativa de vida dos pacientes está aumentando. Antigamente, o manejo clínico da FC era de domínio pediátrico, visto que, nas décadas de 40 e 50 poucos pacientes alcançavam a idade adulta (CASTELLANI *et al.*, 2018). Atualmente, com a longevidade dos pacientes tem sido observado uma mudança na evolução da doença pulmonar crônica e isso pode ocasionar alteração da diversidade da comunidade bacteriana.

À medida que a gravidade da doença pulmonar evolui, a composição da microbiota se altera, devido às condições de crescimento de patógenos e ao desequilíbrio entre as comunidades microbianas (DICKSON *et al.*, 2016). As amostras do trato respiratório inferior de pacientes com FC tem sido avaliada por metodologias de cultivo tradicionais, os quais são capazes de isolar microrganismos quando estão viáveis e em quantidades relativamente abundantes no trato respiratório do paciente.

Uma análise mais ampla da biota pulmonar de pacientes com fibrose cística pode auxiliar no manejo clínico destes. As infecções respiratórias são as maiores causas de morbidade e mortalidade na FC, sendo que os episódios de exacerbação da doença têm sido relacionados a identificação de patógenos através da cultura bacteriológica convencional como, por exemplo cepas do complexo *Burkholderia cepacia*. É importante considerar que a ausência no isolamento dos patógenos classicamente associados a doença respiratória em FC por técnicas de cultivo-dependentes muitas vezes não significa a erradicação deste patógeno da microbiota das vias respiratórias. Leite e colaboradores em 2020, sugeriram que as informações sobre o microbioma podem contribuir para a melhoria do tratamento de pacientes com FC, em especial, para pacientes com resultados negativos de cultura. Esses autores descreveram o caso de um paciente com piora do estado clínico e sem resultados importantes na cultura bacteriológica, mas a análise do microbioma deste paciente indicou um aumento na abundância de *Pseudomonas* spp. Com base nesta informação o tratamento foi direcionado e houve uma melhora significativa do paciente (LEITE *et al.*, 2020).

Deste modo, a avaliação da microbiota pulmonar de pacientes com FC com o auxílio de ferramentas de bioinformática mais acuradas, é importante para determinar a comunidade bacteriana, antecipando a identificação de patógenos típicos da FC.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Avaliar a característica da comunidade bacteriana das vias aéreas de pacientes com Fibrose Cística através da determinação do microbioma pulmonar.

5.2 Objetivos secundários

- Padronizar a técnica de extração de DNA para o sequenciamento do microbioma no escarro de pacientes.
- Comparar o microbioma com os resultados da cultura convencional e análises genotípicas do escarro de pacientes.
- Relacionar o microbioma do paciente frente a grupos com diferentes mutações genéticas no gene *CFTR*.
- Determinar os gêneros predominantes no microbioma.
- Avaliar de forma transversal o microbioma em indivíduos com FC.

6. ARTIGOS

6.1 Artigo I – Artigo submetido à *BMJ Open Respiratory Research*

Microbiome analysis of Cystic Fibrosis sputum presents higher sensitivity than the conventional bacterial culture

Fabiana Caroline Zempulski Volpato^{a,b*}, Otávio von Ameln Lovison^{b,c,d}, Daiana de Lima-Morales^b, Evelyn Kern Almeida^b, Pabulo Henrique Rampelotto^e, Andreza Francisco Martins^{b,c,d}, Paulo José Cauduro Maróstica^f, Afonso Luís Barth^{a,b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^bLABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^dBioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^ePrograma de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^fPrograma de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

6.3 Artigo II – *Letter* submetida à *Infection Control & Hospital Epidemiology*

Letter to the Editor

Could the data of microbiome be used to predict the presence of *Burkholderia* spp in pulmonary microbiota of CF patients?

Fabiana Caroline Zempulski Volpato*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Otávio von Ameln Lovison

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Bioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Daiana de Lima-Morales

LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Andreza Francisco Martins

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Bioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Paulo José Cauduro Maróstica

Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Afonso Luís Barth

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas
de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

6.4 Artigo III – Artigo aceito para a publicação na *Brazilian Archives of Biology and Technology*

Evaluation of MALDI-TOF MS System for the Identification and Differentiation of *Burkholderia cepacia* Complex Species

Fabiana Caroline Zempulski

Volpato^{1,2*}

<https://orcid.org/0000-0002-5225-2256>

Mayana Kieling Hernandez³

<https://orcid.org/0000-0002-1640-497X>

Daiana de Lima-Morales²

<https://orcid.org/0000-0002-7465-3974>

Priscila Lamb Wink^{2,4}

<https://orcid.org/0000-0002-8126-2365>

Daniela de Souza Martins⁵

<https://orcid.org/0000-0002-3628-1188>

Katia Ruschel Pilger de Oliveira⁵

<https://orcid.org/0000-0001-6312-2169>

Afonso Luís Barth^{1,2,3,4}

<https://orcid.org/0000-0002-7969-390>

¹Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), Faculdade de Medicina, Porto Alegre-RS, Brasil; ²Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Centro de Pesquisa Experimental, Porto Alegre-RS, Brasil; ³Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Porto Alegre-RS, Brasil; ⁴Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Faculdade de Farmácia, Porto Alegre-RS, Brasil; ⁵Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Diagnóstico Laboratorial, Porto Alegre-RS, Brasil.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acompanhamento da doença respiratória infecciosa de pacientes com FC tem sido feito a partir de dados gerados pelo laboratório de microbiologia os quais tradicionalmente utilizam técnicas baseadas em cultura bacteriológica. Resultados positivos de cultura bacteriológica dependem da presença de células bacterianas viáveis e em quantidade significativa do patógeno na amostra clínica. Assim, uma eventual piora do quadro clínico do paciente fibrocístico pode não ser acompanhada de resultados positivos na cultura bacteriana devido as limitações dessa técnica. Portanto, a identificação, pela análise do microbioma, de patógenos clássicos da doença respiratória em FC como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e complexo *Burkholderia cepacia*, seria uma informação importante a ser considerada principalmente quando o exame cultural apresentar resultado negativo. Cabe ressaltar que, embora a técnica de sequenciamento detecte a presença do DNA na amostra clínica e não necessariamente a viabilidade das células, a identificação do material genético de patógenos clássicos da FC na via respiratória dos pacientes deveria ser considerada na terapêutica dos pacientes.

A utilização de técnicas de sequenciamento para avaliar o microbioma não deveria ser a única forma de obter informação sobre a comunidade microbiana, mas deveria ser utilizada de forma complementar às metodologias de cultivo.

Cabe mencionar que a identificação bacteriana, em especial de bacilos Gram negativos não-fermentadores da glicose, nas técnicas cultivo-dependente foi muito otimizada com o uso da tecnologia de espectrometria de massas como o MALDI-TOF MS o qual permite a identificação bacteriana de forma rápida e muito precisa a partir da colônia bacteriana. Esta metodologia pode ser uma ferramenta muito útil na identificação de bactérias do Bcc, visto que a identificação convencional por provas bioquímicas destas bactérias é bastante limitada. Cabe ressaltar que a infecção pulmonar pelo Bcc geralmente é crônica e refratária à terapia e casos mais graves da doença estão associadas à *B. cenocepacia*, espécie pertencente ao complexo. Conforme apresentado no “Artigo III” desta tese, o MALDI-TOF MS mostrou-se muito eficiente na diferenciação de *B. cenocepacia* de outras espécies do Bcc.

A evolução no tratamento de pacientes com FC permitiu um aumento significativo na expectativa de vida desses indivíduos. Dentre os fatores que tem contribuído significativamente para isso pode-se citar o surgimento de medicamentos baseados nas

mutações genéticas do indivíduo (como os moduladores da proteína CFTR), a integração de diversos profissionais à uma equipe de suporte a esses pacientes e o aprimoramento de técnicas de identificação laboratorial de patógenos. Nessa linha, a análise do microbioma do trato respiratório deveria também ser considerada como mais uma informação na avaliação geral da condição clínica dos pacientes fibrocísticos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Ao longo das décadas diferentes abordagens terapêuticas vêm sendo propostas para a melhora da condição clínica dos pacientes com FC. Dentre as diversas formas de abordagens clínicas, Høiby e colaboradores em 1993 propuseram a “Quimioterapia de manutenção”, na qual pacientes são internados no hospital, independentemente de estarem com um quadro de exacerbação pulmonar, para receber tratamento com antibióticos. Entendia-se que essa abordagem seria capaz de aumentar drasticamente a sobrevida dos pacientes, visto que o objetivo era tratar antes da cronicidade da infecção respiratória. A limitação dessa proposta está relacionada ao tratamento sem um conhecimento, mesmo que mínimo, da composição da microbiota pulmonar do paciente. Assim, a implementação da avaliação do microbioma de forma rotineira conforme protocolos estabelecidos em centros de FC poderia ser uma ferramenta útil para fazer uma monitorização do estado da via aérea desses pacientes, principalmente após o tratamento para erradicação de determinados patógenos.

CAPÍTULO ESPECIAL

A pandemia de COVID-19.

9. A PANDEMIA DE SARS-CoV-2

9.1 Voluntariado no Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2 – LabCovid

Desde o início de 2020, a pandemia de COVID-19 provocou um impacto global de proporções nunca antes vistas. Houve uma mobilização em diversos centros de referência para a implementação de laboratórios que realizassem o diagnóstico laboratorial da doença de forma rápida. Em março de 2020, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre iniciou o diagnóstico de SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2) em um laboratório temático: o LabCovid (Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2), coordenado pelo Prof. Dr. Afonso Luís Barth. O laboratório contou com profissionais de diversos setores do hospital e também com três bolsistas de pós-graduação em caráter voluntário. Durante todo o ano de 2020 e 2021 eu fui voluntária no LabCovid atuando ativamente no diagnóstico de SARS-CoV-2 e participando de projetos de pesquisa que auxiliassem no combate à pandemia sendo que até o presente momento nosso grupo publicou nove artigos em revistas científicas. Dos artigos publicados pelo nosso grupo, tive a oportunidade de participar como primeira autora em três e como co-autora nos outros seis trabalhos.

A oportunidade de atuação no LabCovid, durante a pandemia, permitiu ampliar meu conhecimento de biologia molecular, por trabalhar diretamente na melhoria dos testes utilizados para o diagnóstico de SARS-CoV-2. Devido ao cenário pandêmico, existia a necessidade do aprimoramento das técnicas utilizadas, com isso, pude participar da validação da técnica de meia reação de qPCR utilizada pelo laboratório bem como na técnica de multiplexação, onde foi possível aumentar o número de testes por lote de corrida. Ainda, no contexto da pandemia, eu tive a oportunidade de participar de um ensaio clínico para avaliar a utilização de Plasma Convalescente em pacientes com COVID-19. Neste estudo pude contribuir com a realização de testes de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) para determinação dos marcadores inflamatórios: IL-6 e TNF α .

Cabe ressaltar que como voluntária, durante o período de pandemia pude participar ativamente do sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2. O LABRESIS (laboratório temático de pesquisa em resistência antimicrobiana do Centro de Pesquisa Experimental) foi responsável pelo sequenciamento do genoma completo de 260 amostras clínicas de pacientes e, assim, foi possível contribuir com a vigilância genômica

do SARS-CoV-2 na nossa região, especialmente, em Porto Alegre/RS. Embora o sequenciamento que realizamos no período de pandemia seja para vírus, a técnica de NGS é a mesma utilizada para o sequenciamento genômico bacteriano e semelhante ao tema da minha tese de doutorado (microbioma). Somado a isso, eu atualmente participo de dois projetos de SARS-CoV-2 no Hospital de Clínica de Porto Alegre que envolvem outras técnicas de sequenciamento: “Determinação do viroma em amostras de swab naso/orofaríngeo coletadas durante a pandemia de COVID-19” e “Otimização de um teste presuntivo de VOC (*variant of concern*) via sequenciamento de Sanger da porção RBD (*receptor binding domain*) da proteína da espícula viral de SARS-CoV-2”.

A pandemia de COVID-19 é uma realidade que afetou a todos durante os anos de 2020-2022, exatamente no período do meu doutorado e eu me senti no dever, como vários outros profissionais da saúde, de participar de alguma forma no combate à pandemia sendo que o meu envolvimento no LabCovid, afetou o tempo que eu teria para o meu projeto específico de doutorado (avaliação do microbioma de pacientes com FC). Entretanto, este período me permitiu aprimorar e aprender técnicas moleculares de ponta e apesar de todo o impacto da pandemia, posso afirmar que minha atuação no combate contribuiu significativamente para a minha formação profissional.

9.2 Contextualização Histórica da Pandemia de SARS-CoV-2

O início da epidemia do novo coronavírus está relacionada ao mês de dezembro de 2019 quando vários pacientes foram diagnosticados com uma pneumonia viral de origem desconhecida, mas de associação epidemiológica dos casos dessa doença ao mercado de frutos do mar de Huanan na cidade de Wuhan, província de Hubei, China (SOFI; HAMID; BHAT, 2020). Em 30 de janeiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou pandemia de COVID-19, causada por esse novo coronavírus, o SARS-CoV-2.

A disseminação do SARS-CoV-2 em todo o mundo aumentou significativamente a demanda sobre a infraestrutura dos sistemas de saúde. Os laboratórios tiveram dificuldade em adquirir insumos para a realização de testes diagnósticos e iniciou-se a busca por alternativas diagnósticas que poupassem reagentes e agilizassem o tempo de liberação de exames. Sendo assim, diferentes testes diagnósticos foram utilizados com diferentes propósitos: como triagem de indivíduos assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos em risco; testes confirmatórios; diagnóstico diferencial de linhagens;

vigilância epidemiológica; monitoramento de surtos, entre outros (VANDENBERG *et al.*, 2021). Durante os meses de pandemia, todas as tecnologias disponíveis foram exploradas para desenvolver rapidamente testes de detecção altamente sensíveis e específicos para SARS-CoV-2 (VANDENBERG *et al.*, 2021).

Ainda, o vírus se adaptou e evoluiu rapidamente ao redor do mundo, apresentando uma alta diversidade genética (YUAN *et al.*, 2020). Semelhante a muitos vírus de RNA, o SARS-CoV-2 tem evoluído para novas variantes conforme ocorre o aumento na transmissão da doença entre indivíduos (KANNAN *et al.*, 2021). Embora, a maioria das mutações tenha pouco ou nenhum impacto nas propriedades do vírus, algumas alterações podem conferir maior transmissibilidade viral, agravar a doença ou influenciar no desempenho de vacinas e em ferramentas de diagnóstico. Devido à essas características, algumas variantes ganharam maior importância sendo que a Organização Mundial da Saúde propôs uma classificação em três classes: 1) Variante de Preocupação (VOC), 2) Variante de Interesse (VOI) e 3) Variante de Monitoramento (VOM) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Mesmo com todos os esforços de contenção, mais de um ano após a declaração de pandemia, a alta disseminação do vírus tem levado cada vez mais ao aparecimento de variantes de importância epidemiológica. Essa rápida evolução viral desencadeou novas ondas de surto de COVID-19 aumentando drasticamente o número de novos casos, óbitos e o impacto global em diversos setores da economia.

Pode-se afirmar que em um primeiro momento os esforços estavam direcionados à detecção do SARS-CoV-2 em amostras clínicas. Entretanto, além da detecção do vírus foi observado a necessidade de discriminar as suas linhagens para, se necessário, estabelecer medidas de contenção destas. Nos dias de hoje, mais de dois anos após o decreto da pandemia, é ainda enfatizado a importância do diagnóstico precoce de COVID-19.

10. ARTIGOS DE SARS-COV 2 COMO PRIMEIRO AUTOR

10.1 Artigo: Utilização de pool para otimizar o diagnóstico de SARS-CoV 2

Pooling of samples to optimize SARS-CoV-2 diagnosis by RT-qPCR: comparative analysis of two protocols

Fabiana Volpato^{1,2,3}; Daiana Lima-Morales^{1,3}; Priscila Lamb Wink^{1,3,4}, Julia Willig^{3,5}; Fernanda de-Paris³; Patricia Ashton-Prolla^{6,7}; Afonso Luís Barth^{1,2,3,4} *

¹ LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

³ Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2 (Lab Covid) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Programa de Residência Multiprofissional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

⁶ Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁷ Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e Pós-Graduação, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Afonso Luís Barth, LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: albarth@hcpa.edu.br; Phone: +555133598607. ORCID NUMBER: 0000-0002-7969-3908.

10.2 Caso clínico da VOC P1(Gamma)

Article Type: Letter to the Editor

Early detection of the SARS-CoV-2 P.1 variant in Rio Grande do Sul, Brazil: a case report

Fabiana Caroline Zempulski Volpato MSc,^{1,2,3*} Priscila Lamb Wink Ph.D,^{1,2,4} Francielle Liz Monteiro Ph.D,^{1,2,5} Julia Biz Willig MSc,^{1,2} Tarsila Vieceli MD,⁶ Andreza Francisco Martins Ph.D,^{1,4,7,8} Alexandre Prehn Zavascki MD-Ph.D,^{1, 6,9} Afonso Luís Barth Ph.D,^{1,2,3,4}

¹LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

²Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁵Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

⁶Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁷Bioinformatic Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁸Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

⁹Internal Medicine Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

***Correspondence:** Fabiana Caroline Zempulski Volpato, LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: fabiana_volpato@yahoo.com.br; Phone: +555133598607.

10.3 Artigo papel de filtro para transporte de amostras de SARS-CoV-2, aceito na *Journal of Virological Methods*

Evaluation of filter paper to transport oro/nasopharyngeal samples to detect SARS-CoV-2 by RT-qPCR

Maiara dos Santos Carneiro^{1, 2+}, Fabiana Caroline Zempulski Volpato^{1,3,4+}, Priscila Lamb Wink^{1,2,4*}, Dariane Castro Pereira⁴, Luciana Giordani⁴, Afonso Luís Barth^{1,2,3,4}

¹LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

+Joined first authors contributed equally to the work

*Correspondence Author: Priscila Lamb Wink, LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: pris_farma@yahoo.com.br; Phone: +555133598607.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBY, Kevin; GILLIGAN, Peter H.; MILLER, Melissa B. Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3822–3854, 2013.
2. ANDERSEN, Dorothy H. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease a clinical and pathologic study. **American Journal of Diseases of Children**, 1938.
3. BALDWIN, Adam *et al.* The *Burkholderia cepacia* Epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1537–1547, 2004.
4. BARDIN, Emmanuelle *et al.* Modulators of CFTR. Updates on clinical development and future directions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 213, 2021.
5. BLAINEY, Paul C *et al.* Quantitative analysis of the human airway microbial ecology reveals a pervasive signature for Cystic Fibrosis. **Science Translational Medicine**, v. 4, 2012.
6. CALLAHAN, Benjamin J.; MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639–2643, 2017.
7. CANTIN, André M. *et al.* Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 14, p.419-430, 2015.
8. CARMODY, Lisa A. *et al.* Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 10, n. 3, p. 179–187, 2013.
9. CASTELLANI, Carlo *et al.* ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. **Journal of Cystic Fibrosis**, v.17, p.153-158, 2018.
10. CHEN, Qionghua; SHEN, Yuelin; ZHENG, Jingyang. A review of cystic fibrosis: basic and clinical aspects. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 4, n. 3, p. 220–232, 2021.
11. CHIARELLO, Marlène *et al.* Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. **PLoS ONE**, v. 17, n. 2, 2022.
12. OLIVEIRA, Cintia Regina Felix. **Microbiota das vias aéreas de pacientes pediátricos com Fibrose Cística**. Orientador: Nelson A. Rosário Filho. 2004.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2004.

13. CLARRIDGE, Jill E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p.840-862, 2004.
14. COBURN, Bryan *et al.* Lung microbiota across age and disease stage in Cystic Fibrosis. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
15. COX, Michael J. *et al.* Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.
16. DA ROSA, Katiana Murieli *et al.* Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with Cystic Fibrosis in southern Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 6, p. 498–504, 2018.
17. DAVIES, Jane C.; ALTON, Eric W.F.W.; BUSH, Andrew. Cystic fibrosis. **BMJ**, v. 335, p. 1255-1259, 2007.
18. DE ARAÚJO, FG *et al.* Prevalence of $\Delta F508$, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.11-15, 2005.
19. DE BOECK, K. *et al.* Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex colonization in cystic fibrosis patients. **European Respiratory Journal**, v. 23, n. 6, p. 851–856, 2004.
20. DICKSON, Robert P. *et al.* The microbiome and the respiratory tract. **Annual Review of Physiology**, v. 78, p.481-504, 2016.
21. DREVINEK, P.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: Epidemiology and molecular mechanisms of virulence. **European Society of Clinical Microbiology**, 2010.
22. ELBORN, J. Stuart. Cystic fibrosis. **Lancet**, 2016.
23. ELBORN, J. Stuart. Personalised medicine for cystic fibrosis: Treating the basic defect. **European Respiratory Journal**, v. 22, p. 3-5, 2013.
24. ESPOSITO, Susanna *et al.* Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* in patients with Cystic Fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.
25. ESTRADA-DE LOS SANTOS, Paulina *et al.* Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. **Current Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 51–60, 2013.
26. ESTRADA-DE LOS SANTOS, Paulina *et al.* To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 1303-1314, 2016.

27. FANER, Rosa *et al.* The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives. **European Respiratory Journal**, 2017.
28. FEHLBERG, Lorena Cristina Corrêa *et al.* Performance of MALDI-TOF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 2, p. 126–128, 2013.
29. FLIGHT, William G. *et al.* Rapid detection of emerging pathogens and loss of microbial diversity associated with severe lung disease in cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2022–2029, 2015.
30. FODOR, Anthony A. *et al.* The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.
31. FRANÇOISE, Alice; HÉRY-ARNAUD, Geneviève. The microbiome in cystic fibrosis pulmonary disease. **Genes**, v. 11, n. 536, 2020.
32. GARCIA-NUÑEZ, Marian *et al.* The respiratory microbiome in cystic fibrosis: compartment patterns and clinical relationships in early stage disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
33. GIBSON, Ronald L.; BURNS, Jane L.; RAMSEY, Bonnie W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in Cystic Fibrosis. **Genes**, v. 11, n. 5, 2003.
34. GILLIGAN, Peter H. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**. P. 35-51, 1991.
35. GOODWIN, Sara; MCPHERSON, John D.; MCCOMBIE, W. Richard. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 333-351, 2016.
36. GRAINDORGE, Arnault *et al.* Epidemiology and molecular characterization of a clone of *Burkholderia cenocepacia* responsible for nosocomial pulmonary tract infections in a French intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 29–40, 2010.
37. HARRIS, J Kirk *et al.* Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with Cystic Fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20.529-20.533, 2007.
38. HENRY, D. A. *et al.* Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1073–1078, 2001.
39. HØIBY, N. Antibiotic therapy for chronic infection of *Pseudomonas* in the lung. **Annual Review of Medicine**, v. 44, p. 1-10, 1993.

40. HU, Taishan *et al.* Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human Immunology**, v. 82, n. 11, p. 801–811, 2021.
41. HUANG, Yvonne J.; LIPUMA, John J. The microbiome in Cystic Fibrosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 1, p. 59-67, 2016.
42. ISLES, A *et al.* *Pseudomonas cepacia* an emerging problem infection in cystic fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 104, n. 2, p. 206-210, 1984.
43. JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon 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. 2.761-2.764, 2007.
44. KANNAN, Saathvik R. *et al.* Evolutionary analysis of the Delta and Delta Plus variants of the SARS-CoV-2 viruses. **Journal of Autoimmunity**, v. 124, 2021.
45. LEIGH, Margaret W. *et al.* Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/kartagener syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 11, n. 7, 2009.
46. LEITE, Cassiana Costa Ferreira *et al.* Analysis of airway microbiota in adults from a Brazilian cystic fibrosis center. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1.747-1.755, 2020.
47. LIMOLI, Dominique *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* alginate overproduction promotes coexistence with *Staphylococcus aureus* in a model of Cystic Fibrosis respiratory infection. **MBio**, v.8, n.2, 2017.
48. LIPUMA, John J. *et al.* Disproportionate Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex species and transmissibility markers in Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 64, p. 92-96, 2001.
49. LUTZ, Larissa *et al.* Artigo de revisão bacteriologia da Fibrose Cística. **Revista HCPA**, v. 31, n. 2, 168-184, 2011.
50. LYCZAK, Jeffrey B.; CANNON, Carolyn L.; PIER, Gerald B. Lung infections associated with Cystic Fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 194-222, 2002.
51. LYNCH, Joseph P. *Burkholderia cepacia* Complex: Impact on the cystic fibrosis lung lesion. **Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 596-610, 2009.
52. MAHENTHIRALINGAM, Eshwar *et al.* DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3.165-3.173, 2000.

53. MARCHESI, Julian R *et al.* Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, 1998.
54. MATTAR, Ana Claudia Veras *et al.* Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 2, p. 109–114, 2010.
55. MISHRA, Avantika; GREAVES, Ronda; MASSIE, John. The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 4, 2005.
56. MUHLEBACH, Marianne S. *et al.* Initial acquisition and succession of the cystic fibrosis lung microbiome is associated with disease progression in infants and preschool children. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 1, 2018.
57. NAVARRO, Salvador. Recopilación histórica de la fibrosis quística. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 39, n. 1, p. 36–42, 2016.
58. PALLERONI' AND, N J; HOLMES', B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. ver. International **Journal of Systematic Bacteriology**, v. 31, n. 4, 1981.
59. PLANT, Barry J. *et al.* Management of comorbidities in older patients with Cystic Fibrosis. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 164-174, 2013.
60. RAMPHAL, Reuben *et al.* Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 2, p. 614-619, 1980.
61. RATJEN, Felix *et al.* Cystic fibrosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, 2015.
62. RIORDAN, John R *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v. 245, n. 4.922, p. 1.066-1.073, 1989.
63. ROGAN, Mark P.; STOLTZ, David A.; HORNICK, Douglas B. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. **Chest**, 2011.
64. SAIMAN, Lisa *et al.* Infection Prevention and Control Guideline for Cystic Fibrosis: 2013 Update. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. S1, p. s1–s67, 2014.
65. SALSGIVER, Elizabeth L. *et al.* Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis. **Chest**, v. 149, n. 2, p. 390–400, 2016.
66. SAWANA, Aman; ADEOLU, Mobolaji; GUPTA, Radhey S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: Proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic

- organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. NOV, 2014.
67. SCOFFONE, Viola C. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* infections in cystic fibrosis patients: Drug resistance and therapeutic approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
68. SHTEINBERG, Michal *et al.* Cystic fibrosis. **Lancet**, v. 397, n. 10.290, p. 2.195-2.211, 2021.
69. SILBERT, S.; BARTH, A. L.; SADER, H. S. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 3976–3981, 2001.
70. SMITH, Daniel J. *et al.* Pyrosequencing reveals transient cystic fibrosis lung microbiome changes with intravenous antibiotics. **European Respiratory Journal**, v. 44, n. 4, p. 922–930, 2014.
71. SOFI, Mohd Sharjeel; HAMID, Aadil; BHAT, Sami Ullah. SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. **Biosafety and Health**, v. 2, p. 217-225, 2020.
72. VANDAMME, Peter *et al.* Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1.188-1.200, 1997.
73. VANDAMME, Peter; DAWYNDT, Peter. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 87–95, 2011.
74. VANDENBERG, Olivier *et al.* Considerations for diagnostic COVID-19 tests. **Nature Reviews Microbiology**, 2021.
75. VICENZI, Fernando José *et al.* Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from children with cystic fibrosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 37–42, 2016.
76. WOO, Patrick C.Y. *et al.* Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1030–1036, 2009.
77. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tracking SARS-CoV-2 variants, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso: 10 de maio de 2022.
78. YABUUCHI E *et al.* Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group ii to the new genus, with the

type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. cov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, n. 12, p. 1.251-1.275, 1992.

79. YUAN, Fangfeng *et al.* Global SNP analysis of 11,183 SARS-CoV-2 strains reveals high genetic diversity. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2020.
80. ZHAO, Jiangchao *et al.* Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5809–5814, 2012.

ANEXOS I – Resumos publicados em anais de congresso referentes à tese.

I. Resumo apresentado no 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia.

TITLE: Evaluation of sputum DNA extraction protocol to assess the microbiome from CF patients.

AUTHORS: VOLPATO, F. C. Z.², LIMA-MORALES, D.¹, BARTH, A. L.^{1,2,3}.

II. Resumo publicado nos anais de congresso do ECCMID 2020.

Evaluation the presence of leukocytes and bacterial communities of sputum from Cystic Fibrosis patients

Fabiana Caroline Zempulski Volpato; Daiana Lima-Morales; Pabulo Henrique Rampelotto; Paulo José Cauduro Maróstica; Afonso Luís Barth.

III. Resumo apresentado no 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica.

TITLE: PERFORMANCE EVALUATION OF THE MALDI-TOF MS SYSTEM AS A SCREENING TOOL IN THE IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF THE *Burkholderia cepacia* Complex

AUTHORS: VOLPATO, F.1,2; HERNANDEZ, M.K.1; LIMA-MORALES, D.2; WINK, P.L.1,2; BARTH, A.L.1,2

IV. Resumo aceito no 13th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers.

Correlation between microbiome diversity, hospitalization and presence of leukocyte in sputum from Cystic Fibrosis patients based on amplicon sequence variants analysis.

Authors

Volpato; Fabiana; fabiana_volpato@yahoo.com.br; Hospital de Clinicas de Porto Alegre; Porto Alegre; Brazil

Lovison, Otávio; otaviolovison@gmail.com; Hospital de Clinicas de Porto Alegre; Porto Alegre; Brazil

Lima-Morales, Daiana; daia.morales@gmail.com; Hospital de Clinicas de Porto Alegre; Porto Alegre; Brazil

Martins, Andreza; andrezafm20@gmail.com; Hospital de Clinicas de Porto Alegre; Porto Alegre; Brazil

Maróstica, Paulo; pmarostica@hcpa.edu.br; Hospital de Clinicas de Porto Alegre; Porto Alegre; Brazil

Barth, Afonso; albarth@hcpa.edu.br; Hospital de Clinicas de Porto Alegre; Porto Alegre; Brazil

ANEXOS II – Resumos publicados em anais de congresso referentes ao Capítulo Especial.

1. RODRIGUES, G. M.; **VOLPATO, F. C. Z.**; WINK, P. L.; PAIVA, R. M.; BARTH, A. L.; DE-PARIS, F. **PREDICTIVE IDENTIFICATION OF SARS-COV-2 DELTA VARIANT USING SANGER SEQUENCING TECHNIQUE.** In: 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021, São Paulo. Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021.
2. WINK, P. L.; MONTEIRO, F. L.; **VOLPATO, F. C. Z.**; WILLIG, JULIA BIZ; RAMALHO, R.; LOVISON, O. V. A.; BARTH, A. L.; MARTINS, A. F. **SARS-COV-2 CIRCULATING LINEAGES AND P.1 MUTATIONS AMONG PATIENTS ATTENDING AT HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.** In: 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021, São Paulo. Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2021.
3. LIMA-MORALES, D.; WINK, P. L.; **VOLPATO, F.**; MONTEIRO, F. L.; CAMARGO, J.; DE-PARIS, F.; BARTH, A. L. **SARS-COV- 2 NUCLEIC ACID SHEDDING IS VARIABLE FOR EVERY PERSON.** In: 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020, São Paulo. 7º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2020.
4. MONTEIRO, F. L.; **VOLPATO, F.**; WINK, P. L.; WILLIG, J.; DE-PARIS, F.; BARTH, A. L. **LOW REPRODUTIBILITY OF POSITIVE RESULTS WITH CYCLE THRESHOLD ABOVE 36 IN REAL-TIME RT-PCR SARS-COV-2.** In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020, On-line. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
5. MONTEIRO, F. L.; WINK, P. L.; **VOLPATO, F.**; WILLIG, J.; BARTH, A. L. **SIMULTANEOUS DETECTION OF TWO REGIONS OF SARS-COV-2 NUCLEOCAPSID GENE BY MULTIPLEX REAL-TIME RT-PCR.** In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020, On-line. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
6. WINK, P. L.; LIMA-MORALES, D.; **VOLPATO, F.**; PAIVA, R. M.; WILLIG, J.; BOCK, H.; DE-PARIS, F.; BARTH, A. L. **RT-QPCR HALF REACTION OPTIMIZATION FOR DETECTION OF SARS-COV-2.** In: 40ª Semana Científica do HCPA, 2020, Porto Alegre. 40ª Semana Científica do HCPA, 2020.
7. MONTEIRO, F. L.; DE-PARIS, F.; WILLIG, J.; **VOLPATO, F.**; WINK, P. L.; BARTH, A. L. **AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA COVID-19 ATRAVÉS DA RT-QPCR NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.** In: 40ª Semana Científica do HCPA, 2020, Porto Alegre. 40ª Semana Científica do HCPA, 2020.
8. **VOLPATO, F.**; LIMA-MORALES, D.; WINK, P. L.; WILLIG, J.; DE-PARIS, F.; ASHTON-PROLLA, P.; BARTH, A. L. **POOLING OF SAMPLES TO OPTIMIZE SARS-COV-2 DIAGNOSIS BY RT-QPCR: COMPARATIVE**

ANALYSIS OF TWO PROTOCOLS. In: 40ª Semana Científica do HCPA, 2020, Porto Alegre. 40ª Semana Científica do HCPA, 2020.

ANEXOS III – Outros artigos publicados em coautoria no período da minha tese.

Artigos de Bacteriologia.

Artigo I

Increased prevalence of *bla*_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil

Priscila Lamb Wink,^{1,2*} Amanda Silva Martins,¹ Fabiana Volpato,^{1,3} Alexandre P. Zavascki,^{1,3,5} Afonso L. Barth^{1,2,3}

¹ *LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil*

³ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil*

⁴ *Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.*

*Corresponding author: Priscila Lamb Wink, LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: pris_farma@yahoo.com.br; Phone: +555133598607.

Artigo II

Evaluation the susceptibility test of Polymyxin B using the commercial test Policimbac®

Tanise Vendruscolo Dalmolin^{1,2}, Maiara Carneiro^{1,2}, Luíza Peres de Castro¹, Fabiana Caroline Zempulski Volpato^{1,3}, Priscila Lamb Wink^{1,2}, Daiana de Lima Morales¹, Afonso Luís Barth^{1,2,3*}

¹Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana - LABRESIS, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding Author: Telefone: (+55) 51 3359-8607. E-mail: albarth@hcpa.edu.br

Artigo III

Evaluation of filter paper as a means of transporting inactivated Gram-negative non-fermentative bacteria and *Haemophilus* spp. for identification using the MALDI-TOF MS system

Running headline: Filter paper to transport bacteria

Maiara S. Carneiro^{1,2}; Marina N. Crispim¹; Camila M. Wilhelm^{1,2}; Fabiana C. Z. Volpato^{1,3}; Afonso L. Barth^{1,2,3}

¹LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

²PPGCF - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³PPGCM – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Maiara dos Santos Carneiro, LABRESIS - Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: maiaracarneiro7@gmail.com; Phone: +5551983375807.

Artigo IV

Convalescent plasma for COVID-19 in hospitalised patients: an open-label, randomised clinical trial

Leo Sekine ^{1,2}, Beatriz Arns³, Bruna R. Fabro³, Murillo M. Cicolatt³, Rafael R.G. Machado ⁴, Edison L. Durigon^{4,5}, Edino Parolo⁶, José Augusto S. Pellegrini⁶, Marina V. Viana⁶, Patrícia Schwarz⁶, Thiago C. Lisboa⁶, José Miguel S. Dora ^{7,8}, Julia P. Portich⁹, Alessandra A. Paz⁹, Lucia Silla⁹, Almeri M. Balsan¹, Felipe da-Silva Schirmer¹, Juliana P.M. Franz¹, Luciana M. da-Silveira¹, Raquel C. Breunig¹, Viviana Petersen¹, Monalisa Sosnoski¹, Nanci F. Mesquita¹, Fabiana Caroline Z. Volpato^{10,11}, Daniel Sganzerla¹², Maicon Falavigna¹², Regis G. Rosa¹³ and Alexandre P. Zavascki ^{3,8} on behalf of PLACOVID Study Group¹⁴

Artigo V

RAPID COMMUNICATION

Detection of SARS-CoV-2 lineage P.1 in patients from a region with exponentially increasing hospitalisation rate, February 2021, Rio Grande do Sul, Southern Brazil

Andreza Francisco Martins^{1,2,3,4}, Alexandre Prehn Zavascki^{1,4,5,6}, Priscila Lamb Wink^{1,2,7}, Fabiana Caroline Zempulski Volpato^{1,7,8}, Francielle Liz Monteiro^{1,7}, Clévia Rosset^{7,9}, Fernanda De-Paris^{1,7}, Álvaro Krüger Ramos^{1,9}, Afonso Luís Barth^{1,2,7,8}

1. LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
3. Bioinformatic Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
4. These authors contributed equally to the work as first authors.
5. Internal Medicine Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
6. Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
7. Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
8. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
9. Laboratório de Medicina Genômica (LMG), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
10. Programa de Pós-Graduação em Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Correspondence: Priscila Lamb Wink (pris_farma@yahoo.com.br)

Artigo VI

Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 Lineages Indicates Early Circulation of P.1 (Gamma) Variant of Concern in Southern Brazil

Priscila Lamb Wink,^{a,b,c} Rafaela Ramalho,^d Francielle Liz Monteiro,^{a,b,e} Fabiana Caroline Zempulski Volpato,^{a,b,f} Julia Biz Willig,^{a,b} Otávio von Ameln Lovison,^{a,c,d} Alexandre Prehn Zavascki,^{a,f,g} Afonso Luís Barth,^{a,b,c,f} Andreza Francisco Martins^{a,c,d,i}

^aLABRESIS–Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^bLaboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^dBioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^eLaboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^fPrograma de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^gInfectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^hInternal Medicine Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ⁱDepartamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

Artigo VII

Short Communication

SARS-CoV-2 nucleic acid shedding is variable for every person

***Daiana de Lima-Morales^{[1],[2]}, Priscila Lamb Wink^{[1],[2],[3]},
Fabiana Caroline Zempulski Volpato^{[1],[2],[4]}, Joíza Lins Camargo^{[1],[5],[6]},
Fernanda de-Paris^{[1],[2],[6]} and Afonso Luís Barth^{[1],[2],[3],[4]}***

[1]. Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (Labresis), Porto Alegre, RS, Brasil.

[2]. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2 (LabCovid), Porto Alegre, RS, Brasil.

[3]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brasil.

[4]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, Brasil.

[5]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

[6]. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental, Porto Alegre, RS, Brasil.

Artigo VIII

Major Article

RT-qPCR half-reaction optimization for the detection of SARS-CoV-2

Priscila Lamb Wink^{[1],[2],[3]}, ***Fabiana Volpato***^{[1],[2],[4]}, ***Daiana de Lima-Morales***^{[1],[2]}, ***Rodrigo Minuto Paiva***^[2], ***Julia Biz Willig***^{[2],[5]}, ***Hugo Bock***^[2], ***Fernanda de Paris***^[2] and ***Afonso Luís Barth***^{[1],[2],[3],[4]}

- [1]. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Porto Alegre, RS, Brasil.
[2]. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2, Porto Alegre, RS, Brasil.
[3]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brasil.
[4]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, Brasil.
[5]. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Residência Multiprofissional, Porto Alegre, RS, Brasil.

ARTIGO IX

Emergence of SARS-CoV-2 Lambda (C.37) variant in Southern Brazil: a case report

Priscila Lamb Wink PhD,^{1,2,3*} Fabiana Caroline Zempulski Volpato MSc,^{1,2,4} Francielle Liz Monteiro PhD,^{1,2,5} Julia Biz Willig MSc,^{1,2} Alexandre Prehn Zavascki PhD,^{1,6,7} Afonso Luís Barth PhD,^{1,2,3,4} Andreza Francisco Martins PhD^{1,3,8,9}

¹LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Laboratório de Diagnóstico de SARS-CoV-2, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

⁵Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Franciscana, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

⁶Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁷Internal Medicine Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁸Bioinformatic Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Running title: SARS-CoV-2 C.37 lineage in Brazil

Word count of the body text: 674 words

*Correspondence Author: Priscila Lamb Wink, LABRESIS- Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90.035-903. E-mail: pris_farma@yahoo.com.br; Phone: +555133598607.

ANEXOS IV – Capítulo de Livro.

Capítulo de livro escrito para a “Becton Dickinson (BD)” sobre outras aplicabilidades do MALDI-TOF MS.

**MALDI-TOF MS: APLICAÇÃO DA PROTEÔMICA NA DETERMINAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE MECANISMOS
DE RESISTÊNCIA**

Camila M. Wilhelm^{1,2}

Maiara S. Carneiro^{1,2}

Fabiana C. Z. Volpato^{2,3}

Afonso L. Barth^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

APÊNDICE I – Diretriz Metodológica.

Artigo I da Tese – STROBE

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1 Ok	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2 Ok	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3 Ok	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4 Ok	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5 Ok	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls Ok <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7 Ok	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8* Ok	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9 Ok	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11 Ok	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12 Ok	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding Ok (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses

Continued on next page

Results

Participants	13*	Ok	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
		No	(b) Give reasons for non-participation at each stage
		No	(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	Ok	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
		Not Applicable	(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		Not Applicable	(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*		<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time
			<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure
		Not Applicable	<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	Not Applicable	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
			(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
			(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Ok	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

Discussion

Key results	18	Ok	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	Ok	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Ok	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	Ok	Discuss the generalisability (external validity) of the study results

Other information

Funding	22	Ok	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based
---------	----	-----------	---

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

Artigo II da Tese – STROBE

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1 Ok	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2 Ok	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3 Ok	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4 Ok	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5 Ok	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls Ok <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7 No	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Word limite, it was not possible		
Data sources/ measurement	8* Not Applicable	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9 Ok	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at Word limite, it was not possible
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Word limite, it was not possible		
Statistical methods	12 Ok	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding Ok (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses

Continued on next page

Results

Participants	13*	Ok	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
Word limite, it was not possible		No	(b) Give reasons for non-participation at each stage
		No	(c) Consider use of a flow diagram
	Descriptive data	Ok	14* (a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
		Not Applicable	(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		Not Applicable	(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*		<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time
			<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure
		Not Applicable	<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16		(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
Not Applicable			(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
			(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
	Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
		Ok	

Discussion

Key results	Ok	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	Ok	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	Ok	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	Ok	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results

Other information

Funding	Ok	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based
---------	-----------	----	---

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

Artigo III da Tese – STARD

Section & Topic	No	Item
TITLE OR ABSTRACT		
OK	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)
ABSTRACT		
OK	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions (for specific guidance, see STARD for Abstracts)
INTRODUCTION		
OK	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test
OK	4	Study objectives and hypotheses
METHODS		
<i>Study design</i> OK	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria
Not Applicable	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication
OK	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy
OK	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory
	18	Intended sample size and how it was determined
RESULTS		
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram
Not Applicable	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard
<i>Test results</i> OK	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard
DISCUSSION		
OK	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalisability
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test
OTHER INFORMATION		
OK	28	Registration number and name of registry
	29	Where the full study protocol can be accessed
	30	Sources of funding and other support; role of funders

