

## \_ Sequenciação de Nova Geração no apoio à decisão de transplante pulmonar num doente com fibrose quística

Leonor Silveira<sup>1</sup>, Ana Casimiro<sup>2</sup>, Margarida Pinto<sup>3</sup>, Vítor Borges<sup>1</sup>, João Paulo Gomes<sup>1</sup>, Mónica Oleastro<sup>1</sup>

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Departamento de Pediatria Médica. Unidade de Pneumologia, Hospital D. Estefânia.

(3) Laboratório de Microbiologia, Centro Hospitalar de Lisboa Central.

### \_ Introdução

O complexo *Burkholderia cepacia* (*Burkholderia cepacia* complex, Bcc) constitui um grupo heterogéneo de bactérias que inclui cerca de 20 espécies bacterianas relacionadas. Estas são ubíquitas na natureza, sendo encontradas em ambientes naturais como o solo, água, rizosferas, animais e produtos agrícolas (1).

Estas bactérias são, no entanto, patogénicas para o Homem, tendo um impacto clínico relevante nos doentes com fibrose quística (FQ), estando associadas a um pior prognóstico e diminuição da esperança de vida destes doentes (2). Nas amostras respiratórias destes doentes são frequentemente isoladas as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e mais recentemente assistiu-se a um aumento das infeções por espécies pertencentes ao Bcc (3). Estas infeções são particularmente graves nos doentes com FQ, podendo levar ao desenvolvimento de uma septicemia fulminante com paragem respiratória aguda, tratando-se de um quadro clínico conhecido como *cepacia syndrome* (4). De entre as espécies pertencentes ao Bcc, as mais frequentemente encontradas em doentes com FQ são *B. multivorans* e *B. cenocepacia*.

Uma das opções terapêuticas mais importantes para minorar a doença pulmonar avançada em doentes com FQ é o transplante pulmonar, cujo sucesso é, no entanto, dependente do agente causador da infeção respiratória. Mais especificamente, a infeção com *B. cenocepacia* leva a uma sobrevivência a curto e longo prazo significativamente mais baixa do que a infeção com outras espécies do

complexo, pelo que aqueles doentes são normalmente excluídos de serem considerados para transplante pulmonar (5). Assim, é indispensável a avaliação adequada das infeções por Bcc, bem como a discriminação das espécies, antes da decisão clínica de considerar o transplante pulmonar uma opção terapêutica viável para o tratamento de um doente com FQ.

A correta identificação das espécies do Bcc é um desafio para o laboratório de microbiologia, já que os métodos convencionais, baseados em testes bioquímicos ou de espectrometria de massa não têm acuidade suficiente para distinguir para lá do género bacteriano (6). Assim, torna-se necessário recorrer a técnicas moleculares, baseadas em ácidos nucleicos, tal como a tecnologia de Sequenciação de Nova Geração.

### \_ Objetivo

Neste estudo reportamos a aplicação desta tecnologia no contexto de apoio à decisão clínica de transplante pulmonar num doente com FQ.

### \_ Caso clínico

Trata-se de um doente de 16 anos de idade com o diagnóstico de FQ, homocigótico para a mutação CFTR $\Delta$ F508. Os pais são não consanguíneos e são ambos saudáveis. A gravidez foi de termo, parto e período neonatal sem intercorrências. O peso à nascença era de 3860g e apresentava índice de Apgar 9/10. Em criança não apresentava intolerâncias alimentares, mas mostrava má evolução ponderal com início precoce. Teve os primeiros sintomas respiratórios e entéricos aos 4 meses; o diagnóstico de FQ foi feito aos 8 meses na sequência de internamento por bronquiolite aguda, hipoxemia e desnutrição. Apresentava provas do suor com valores elevados (120 e 119mmol/L) e o diagnóstico foi confirmado por estudo genético. Desde criança, o doente teve múltiplos internamentos por exacerbações respiratórias e má nutrição. É um doente diabético com necessidade de insulina desde os 15 anos, apresenta cifoescoliose, polisinusopatia, desnutrição e depressão graves. O doente sofre de insuficiência respiratória crónica (FVC 31,9% em 2014), com retenção de CO<sub>2</sub> (55/107) e hipoxemia (O<sub>2</sub> a 8L/min),

tendo realizado múltiplos ciclos de antibioterapia de largo espectro, com vista à erradicação de agentes respiratórios e para proteção da degradação da função pulmonar, no entanto sem melhoria clínica.

Do ponto de vista microbiológico, aos 3 anos teve o primeiro isolamento de *P. aeruginosa* na expetoração, atualmente apenas com sensibilidade intermédia à ciprofloxacina. Aos 4 anos teve o primeiro isolamento de Bcc na expetoração; atualmente a estirpe é multiresistente.

### **\_Aplicação da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração para apoio à decisão clínica**

Isolados bacterianos deste doente foram enviados para o Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para identificação precisa das espécies bacterianas causadoras da infeção respiratória. Após a extração de DNA, procedeu-se à utilização de métodos de tipagem molecular tradicionais, bem como à Sequenciação Total do Genoma (*Whole Genome Sequencing – WGS*). A identificação inequívoca das espécies bacterianas foi realizada por comparação com sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Foi possível identificar uma estirpe de *P. aeruginosa*, bem como uma estirpe de *B. contaminans*. A frequência de identificação desta espécie de *Burkholderia* spp. tem vindo a aumentar nos últimos anos, nomeadamente em Portugal e em Espanha (7, 8).

Atualmente, o doente encontra-se em fase terminal da sua doença, com insuficiência respiratória crónica, com febre recorrente há 6 meses e broncorreia purulenta abundante; dependente de O<sub>2</sub> e com necessidade de ventilação não invasiva 24h/dia; coexiste a desnutrição grave, diabetes, depressão e retrações musculares que quase impedem a marcha. A sua única oportunidade é o transplante pulmonar. Esta opção foi acordada em reunião multidisciplinar, tendo em conta as espécies bacterianas identificadas.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 2003;5(9):719-29
- (2) Chiappini E, Taccetti G, de Martino M. Bacterial lung infections in cystic fibrosis patients: an update. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(6):653-4.
- (3) Govan JR, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.* 2007;2(2):153-64.
- (4) Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 2002;51(7):533-8.
- (5) De Soyza A, Meachery G, Hester KL, et al. Lung transplantation for patients with cystic fibrosis and *Burkholderia cepacia* complex infection: a single-center experience. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(12):1395-404.
- (6) Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, et al. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(2):126-8.
- (7) Coutinho CP, Barreto C, Pereira L, et al. Incidence of *Burkholderia* contaminants at a cystic fibrosis centre with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. *J Med Microbiol.* 2015;64(8):927-35.
- (8) Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, et al. Increase in isolation of *Burkholderia* contaminants from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(2):150-6. Epub 2014 Oct 12.  
[www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14000329](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14000329)