

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO
FIGUEIRA

**PREVALÊNCIA DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA* NOS PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS EM UM CENTRO DO NORDESTE
DO BRASIL**

Autora: Érica da Fonseca Travassos Cavalcanti

Orientador: Murilo Carlos Amorim de Britto.

[Recife, julho de 2014]

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO
FIGUEIRA

**PREVALÊNCIA DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA* NOS PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA ATENDIDOS EM UM CENTRO DO NORDESTE
DO BRASIL**

PREVALENCE OF COMPLEX *BURKHOLDERIA CEPACIA* IN PATIENTS WITH
CYSTIC FIBROSIS SERVED IN A CENTER OF NORTHEASTERN BRAZIL

Autora: Érica da Fonseca Travassos Cavalcanti
RG: 6586111– SDS-PE **CPF:** 052.451.624-31
Tel: (81) 94251586
E-mail: erica_travassos@hotmail.com

Colaboradora: Cláudia Christina Delgado Leite
Residente de pneumologia pediátrica do IMIP
E-mail: pneumoclaudia@gmail.com

Coorientadora: Patricia Gomes de Matos Bezerra
Doutora em Saúde Materno Infantil pelo IMIP
Pediatria pneumologista do IMIP
E-mail: pmvbezerra@gmail.com

Orientador: Murilo Carlos Amorim de Britto
Doutor em Saúde Pública pela Fundação Oswaldo Cruz
Mestre em Saúde Materno-Infantil pelo IMIP
Pediatria pneumologista do IMIP
RG: 1157999 **CPF:** 280520134-53
Tel: (81) 8837-9852
E-mail: murilodebritto@gmail.com

RESUMO

Cenário: A fibrose cística (FC) é uma doença genética que causa comprometimento sistêmico, mas preponderantemente pulmonar. Tal envolvimento pulmonar, se deve ao aumento da viscosidade das secreções traqueobrônquicas e da sua dificuldade de eliminação, facilitando a presença de vários patógenos. O Complexo *Burkholderia cepacia* faz parte de um grupo de bactérias oportunistas que se relacionam com a piora do quadro e progressão da doença nesses pacientes. **Objetivo:** Identificar a prevalência do Complexo *B. cepacia* nos pacientes com FC acompanhados em um centro de referência do Nordeste do Brasil em 2013. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal, em pacientes acompanhados no IMIP e cadastrados no Registro Brasileiro de Fibrose Cística no período. Participaram do estudo, 53 pacientes, com idade entre 0 e 34 anos, de ambos os sexos. Utilizou-se o escore clínico de Schwachman e o escore Z de IMC/ idade para determinar a gravidade da doença. Outras variáveis como idade, sexo, etnia, condições de diagnóstico, complicações no ano do seguimento, número de consultas, cloro médio no suor foram avaliadas. A presença de *B. cepacia* e outros germes foi determinada pela cultura de secreção traqueobrônquica. **Resultados:** Foram cadastrados no Registro Brasileiro e incluídos no estudo 53 pacientes. A faixa etária variou entre seis meses e 34 anos (média=11,11 \pm 7,86), com ligeiro predomínio de pacientes do sexo masculino (50,9%). Em relação à etnia, houve o predomínio de pacientes mestiços (81,1%) em relação à caucasóides (17%) e negros (1,9%). Sobre as condições de diagnóstico, os sintomas respiratórios persistentes foram de maior importância (75,5%) seguidos de má absorção (45,3%). No que se refere ao estado nutricional, determinou-se o escore-Z de IMC/ idade em 44 (83%) pacientes entre 0,5 e 20 anos (Média= 0,36 \pm 1,27). Na avaliação clínica dos pacientes através do Escore de Schwachman-Kulczycki, a média

foi de 81,32 pontos. Em relação aos germes na cultura de secreção traqueobrônquica, observou-se uma maior prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* (43,4%), seguida do *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina (37,7%) e *Haemophilus influenzae* (24,5%) Já o Complexo *Burkholderia cepacia*, apresentou uma prevalência de 11,3%. **Conclusão:** Existe uma prevalência elevada do Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes fibrocísticos do nosso centro de referência-IMIP.

Palavras-chave: prevalência de *burkholderia cepacia*; fibrose cística; complexo *burkholderia cepacia*.

ABSTRACT

Scenario: Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease that causes systemic involvement, but mainly lung. Such pulmonary commitment is due to the increased viscosity of the secretions tracheobronchial and their difficulty of removal facilitating the presence of various pathogens. The *Burkholderia cepacia* complex is part of a group of opportunistic bacteria that relate to the worsening and progression of disease in these patients.

Objective: To identify the prevalence of *Burkholderia cepacia* complex in CF patients treated at a reference center in the Northeast of Brazil in 2013. **Methods:** A cross-sectional study in patients followed in IMIP and registered in the Brazilian Registry of Cystic Fibrosis was conducted in the period . Participated in the study, 53 patients aged between 0 and 34 years, of both sexes. We used the clinical score Schwachman and the Z score of BMI / age to determine the severity of the disease. Other variables such as age, sex, ethnicity, diagnosis conditions, complications in the year of follow-up, number of visits, average sweat chloride were evaluated. The presence of *Burkholderia cepacia* complexo and other germs was determined by culture of tracheobronchial secretions.

Results: We enrolled in the Brazilian Registry and included in the study 53 patients. Their ages ranged from six months to 34 years (mean = 11.11 ± 7.86), with a slight predominance of male patients (50.9%). Regarding ethnicity, there was a predominance of mixed race patients (81.1%) compared to whites (17%) and blacks (1.9%). On the conditions of diagnosis, persistente respiratory symptoms were most important (75.5%) followed by malabsorption (45.3%). With regard to nutritional status, the Z-score of BMI / age 44 (83%) patients between 0.5 and 20 years (Mean = 0.36 ± 1.27) was determined. In the clinical evaluation of patients through the score Schwachman Kulczycki, the average was 81.32 pontos. Regarding the germs in the culture of tracheobronchial

secretions, there was a higher prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* (43.4%), followed by oxacillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (37.7%) and *Haemophilus influenzae* (24.5%). Already have the *Burkholderia cepacia* complex, showed a prevalence of 11.3%.

Conclusion: There is a high prevalence of *Burkholderia cepacia* complex in CF patients in our reference center-IMIP.

Keywords: prevalence of *Burkholderia cepacia*; cystic fibrosis; *burkholderia cepacia* complex.

INTRODUÇÃO

Fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação no gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) que controla o transporte do cloro, sódio e água através da membrana celular. Caracteriza-se pelo comprometimento sistêmico das glândulas exócrinas e, na maioria dos pacientes, a alteração pulmonar é a manifestação preponderante da doença. Como consequente defeito do gene, a depuração das secreções através do sistema mucociliar é prejudicada pelo aspecto mais viscoso do muco, facilitando a colonização de patógenos^{1,2}.

A colonização microbiana crônica das vias aéreas leva a exacerbações de infecção pulmonar que determina bronquiectasias e culmina com *cor pulmonale*, a principal causa de morbidade e de morte em pacientes com fibrose cística¹⁻³.

Apesar da grande susceptibilidade, a árvore respiratória dos portadores de FC é geralmente colonizada ou infectada por variedade relativamente pequena de espécies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e membros do complexo *Burkholderia cepacia*⁴.

O Complexo *B cepacia* (CBc) foi denominado em 1997 por Vandamme e colaboradores (15) que detectaram cinco genovares (espécies) diversos: *B. cepacia* (genovario I), *B. multivorans* (genovario II), *B. cenocepacia* (genovario III), *B. stabilis* (genovario IV) e *B. vietnamiensis* (genovario V). Hoje conhece-se cerca de 17 espécies⁵.

O CBc tem sido relatado como um grupo de patógenos oportunistas responsáveis pelo agravamento rápido da função pulmonar e morte de muitos portadores da doença, sendo importante sua identificação⁶⁻⁸.

Porém, a identificação dos microrganismos do CBc apresenta certa dificuldade quando realizada em meios de cultura convencionais utilizados nos laboratórios clínicos, já que esses microrganismos apresentam crescimento lento e seu isolamento a partir de secreções do trato respiratório, muitas vezes é dificultado pelo crescimento mais rápido de outros microrganismos que competem por nutrientes, como *Pseudomonas aeruginosa* que cresce ocupando todo o ágar. Além disso, as provas bioquímicas convencionais ou kits bioquímicos comerciais demonstram falhas e dificuldades técnicas⁹.

Segundo a Cystic Fibrosis Foundation, a prevalência do CBc nos pacientes norte-americanos é de 3 a 4%¹⁰. No Brasil parece ser mais elevada. Martins e colaboradores identificaram o germe através de PCR do gene *recA* em 11,4% dos pacientes de um centro da cidade de São Paulo¹¹. Em Campinas, encontraram por método similar, uma prevalência de 22,5%¹². Em Recife, foram identificados germes do complexo através de cultura sem métodos moleculares em 29,2% dos casos¹³. Embora estes estudos não tenham sido padronizados em termos metodológicos, pode-se supor que a prevalência de colonização por este germe varie no Brasil e no mundo.

A identificação da prevalência das cepas do CBc e de outros patógenos em pacientes nos diversos centros de referência do Brasil facilita o planejamento, prevenção e a melhor conduta acerca dos pacientes fibrocísticos.

O objetivo do nosso estudo foi determinar a prevalência do Complexo *B. cepacia* em um centro de referência do Nordeste do Brasil.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, em pacientes com diagnóstico de Fibrose Cística, acompanhados em um centro de referência do Nordeste do Brasil, no período de janeiro a dezembro de 2013 e cadastrados no Registro Brasileiro de Fibrose Cística (RBFC).

O Registro Brasileiro de Fibrose Cística foi criado em 2010 pelo Grupo Brasileiro de Estudos em Fibrose Cística (GBEFC) com o objetivo de colher informações a respeito da doença em todas as regiões do país, através de seus respectivos centros de referência. O GBEFC divulgou seu último relatório (Relatório Anual) em 2011, com dados globais dos centros de referência. A pesquisa foi realizada no IMIP, que é um centro de referência para atendimento da doença no Estado de Pernambuco.

Participaram todos os pacientes cadastrados no RBFC com seguimento em 2013, no qual todas as informações colhidas pertenciam ao seu banco de dados. Como critério de inclusão no cadastro, os pacientes deveriam possuir pelo menos dois testes do Cloro no Suor, presença de duas mutações do gene da FC, ou estudo de diferença de potencial sugestivo da doença.

Todos os pacientes cadastrados e/ou acompanhados no centro de referência realizaram pelo menos um exame de cultura de secreção traqueal de rotina no ano.

Os dados da pesquisa foram coletados pela autora através do Registro Brasileiro de Fibrose Cística. Os pacientes foram classificados pelo escore clínico de Schwachman-Kulczycki que varia de 20 a 100 pontos de acordo com a gravidade da doença. As medidas de escore Z de IMC/ idade foram utilizadas para avaliar o estado nutricional. As variáveis utilizadas como presença de íleo meconial, icterícia prolongada, desnutrição, esteatorréia ou má absorção, sintomas respiratórios persistentes, prolapso retal, antecedentes familiares e a triagem neonatal foram utilizadas para informar as condições de

diagnóstico. Outras variáveis como sexo, cor, número de consultas e o cloro médio (média dos resultados dos dois testes de cloro no suor) também foram coletadas. A presença de *B. cepacia* e outros germes foi determinada pela cultura de secreção segundo critérios da CF Foundation¹⁰. Coletou-se escarro ou aspirado nasotraqueal, que foi cultivado em placas ágar sangue de carneiro (ASC), ágar chocolate (ACH) suplementado com 0,1% de extrato de levedo e com 20µg/ml de nicotinamida adenina dinucleotídeo, uma placa contendo o meio ágar eosina azul de metileno (EMB) e uma última contendo meio seletivo para *B. cepacia* (BCSA). Uma das placas de ASC e a de ACH foram incubadas em anaerobiose¹⁴.

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for Social Sciences na versão 9.0.0. Na descrição dos dados foram utilizadas médias e desvios padrões para as variáveis contínuas e frequências absolutas e relativas (porcentagens) para variáveis discretas.

O projeto faz parte de um estudo ecológico multicêntrico que visa identificar a relação entre a prevalência do germe com a temperatura e umidade nas diferentes regiões do Brasil.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP.

RESULTADOS

Do IMIP, foram cadastrados no Registro Brasileiro e incluídos no estudo 53 pacientes. A faixa etária variou entre seis meses e 34 anos (média=11,11 \pm 7,86), com ligeiro predomínio de pacientes do sexo masculino (50,9%). Em relação à etnia, houve o predomínio de pacientes mestiços (81,1%) em relação à caucasóides (17%) e negros (1,9%).

Sobre as condições de diagnóstico, os sintomas respiratórios persistentes foram de maior importância (75,5%) seguidos de má absorção (45,3%). A desnutrição também foi um fator importante para o diagnóstico em 28,3% dos casos.

O número de consultas foi em média três (3), com mínimo de uma (1) e o máximo de nove (9) consultas. O valor médio de cloretos dos dois testes do suor foi de 93 \pm 25,2 mEq/L, com variação de 18 a 138 mEq/L.

No que se refere ao estado nutricional, determinou-se o escore-Z de IMC/ idade em 44 (83%) pacientes entre 0,5 e 20 anos (Média= 0,36 \pm 1,27).

Na avaliação clínica dos pacientes através do Escore de Schwachman-Kulczycki, a média foi de 81,32 pontos. A pontuação mínima foi de 45 e a máxima de 100 pontos.

Em relação aos germes na cultura de secreção traqueobrônquica, observou-se uma maior prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* (43,4%), seguida do *Staphylococcus aureus* sensível à oxacilina (37,7%) e *Haemophilus influenzae* (24,5%). Outros microrganismos encontrados foram *Aspergillus fumigatus* 3,8% e *Achromobacter sp.* 1,9%. Não foi encontrado *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. A prevalência de *B. cepacia* foi de 11,3%.

DISCUSSÃO

Os resultados do nosso estudo mostram uma prevalência alta de germes do CBc nos pacientes fibrocísticos de um centro de referência do Nordeste do Brasil. Esse resultado é discretamente superior em relação aos dados do Relatório Anual de 2011 do RBFC que indica uma prevalência de todos os centros de referência do Brasil de 10,4%.

Entre os poucos estudos brasileiros, a prevalência de 11,4% do CBc, foi verificada em um estudo realizado na cidade de São Paulo(SP) no qual através de técnicas de PCR e sequenciamento de DNA, conseguiram identificar seus respectivos genovares ¹¹. Em Porto Alegre, um estudo realizado no período de 2007 – 2009, foi detectada a prevalência de 10,6% pacientes ¹⁵, também mostrando resultados semelhantes aos nossos. Um estudo, realizado no Recife, mostrou uma prevalência cumulativa de 29,2% no período de 2000 a 2002 ¹¹ e outro em São Paulo, com prevalência de 22,5% ¹². Estas discrepâncias podem ser explicadas, no primeiro estudo, pela diferença na aferição de prevalência e, no segundo, pela técnica de detecção mais sensível.

Estudos realizados em outros países mostraram uma prevalência mais baixa de 2,9% em pacientes americanos¹⁰, 7% em pacientes italianos¹⁶ e 7,1% em um centro especializado em FC em Portugal¹⁷.

Em relação aos outros germes cultivados, chama atenção a elevada prevalência de *P aeruginosa*. Um estudo de coorte na Austrália e EUA demonstrou que temperatura e umidade elevada são fatores predisponentes para colonização por este germe¹⁸. Dada a similaridade do CBc com o pseudomonas, é possível que o clima e umidade do nosso estado também favoreçam a elevada prevalência do germe. Este estudo faz parte de uma

pesquisa de correlação ecológica que tenta contribuir para o esclarecimento desta associação.

Na avaliação clínica dos pacientes através do Escore de Schwachman-Kulczycki, eles apresentaram uma média de 81,3 pontos que corresponde um estado clinicamente bom, com um valor mínimo de 45 que relaciona a um estado moderado e valor máximo de 100 a um estado excelente. O estado nutricional também mostrou valores próximos da normalidade, refletindo assim as boas condições clínicas da amostra.

Uma limitação metodológica necessita ser enfatizada e pode explicar as condições clínicas e nutricionais relativamente boas dos pacientes da amostra e de um possível subregistro de colonização por CBc. Um número significativo de pacientes não acompanhados no ano de estudo mas em 2012, portava o germe. A falta de seguimento ainda é um problema no nosso meio, especialmente para pacientes que residem no interior.

Ainda, como afirma o Relatório Anual de 2011 do RBFC, os dados devem ser interpretados com cautela devido à falta de padronização referente às técnicas de processamento e cultura das amostras.

Em suma, a prevalência do CBc em pacientes fibrocísticos no Nordeste do Brasil parece ser elevada. Estudos adicionais são necessários para esclarecer melhor o problema.

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer a Deus que tornou possível a realização desse projeto, a minha família que conto com o apoio constante e ao Dr. Prof. Murilo Britto que sempre estava à disposição para me ajudar.

Também gostaria de registrar o meu obrigada à Dra. Profa. Patrícia Bezerra e à Residente de Pneumopediatria Cláudia Christina que me apoiaram muito no decorrer da pesquisa.

Vale ressaltar ainda, o apoio financeiro e o incentivo do Fundo de Apoio à Pesquisa e ao Ensino (FAPE- IMIP) que também foi essencial para realização desse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas diretamente e indiretamente na construção desse trabalho que fez ampliar meu conhecimento técnico-científico.

REFERÊNCIAS

1. Britto MCA, Bezerra PGM, Moura KVN, Brito RCCM, Rego JV, Barbosa SMF. Fibrose Cística. In: Alves JGB, Ferreira OS, Maggi RS, editores. *Pediatria IMIP*. 3 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004, v. 3, p. 642-49.
2. Karczeski BA, Cutting GR. Diagnosis of Cystic Fibrosis, CFTR-Related Disease and Screening. In: Bush et al. *Cystic fibrosis in the 21th century. Progress in respiratory research*. 2006;34:69-76.
3. Govan JRW, Deretic V. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoïd in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*.1996;60:534-576.
4. Whittier S. Update on the microbiology of cystic fibrosis: traditional and emerging pathogens. *Clin Microbiol Newsl*, 2001; 23: 67-71.
5. Vanlaere E, LiPuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthalingam E, Speert D, Dowson C, Vandamme P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evolut Microbiol*.2008;58:1580–1590.
6. Eshwar M, Vandamme P, Maureen EC, Henry D. Infection with *Burkholderia cepacia* Complex Genovomar in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genovomar III Can Replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1469-75.

7. Speert DP, Henry D, Petter V, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:181-7.
8. Drevinek P, Vosalihkova S, Dedeckova K, Mahenthiralingam E. Direct Culture independent Strain Typing of *Burkholderia cepacia* Complex Sputum Simple with Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:1888-91
9. McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US Cystic Fibrosis Treatment Centers. *Chest.* 2000; 117:1661–1665.
10. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report 2009. *Lung.* 2009. Available from: <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/Patient-Registry-Report-2009.pdf>.
11. Martins KM, Fongaro GF, Dutra Rodrigues AB, Tateno AF, Azzuz-Chernishev AC, et al. Genomovar status, virulence markers and genotyping of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from Brazilian cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2008;7:336–9. Doi:10.1016/j.jcf.2007.12.001.
12. Dentini P. Complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística em um Centro de Referência no Brasil: identificação, prevalência e importância clínica. (Dissertação de Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, 2010.

13. Magalhães M, Britto MCA, Bezerra PGM, Veras A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórios de fibrocísticos do Recife. *J Bras Patol Med Lab* 2004;40:223-7.

14. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4009–4015.

15. Leite FC. Variantes genômicas do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística no hospital de clínicas de Porto Alegre. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. (2009).

16. Lambiase A, Raia V, Stefani S. et al. *Burkholderia cepacia* complex infection in a cohort of Italian patients with cystic fibrosis. *J Microbiol* 2007; 45:275-279.

17. Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Correia IS. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev Port de Pneum.* 2008; 14: 5-26.

18. Collaco JM, Mcgready J, Green DM, Naughton KM, Christopher P et al. Effect of Temperature on Cystic Fibrosis Lung Disease and Infections : A Replicated Cohort Study. *PloS one.* 2011; 6:1-7.