DANILA DE SOUZA CARRARO

Colonização por *Burkholderia cepacia complex* em pacientes com doença pulmonar supurativa submetidos ao transplante pulmonar: impacto na sobrevida e análise de genomovar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carraro, Danila de Souza
Colonização por *Burkholderia cepacia complex* em pacientes com doença pulmonar supurativa submetidos ao transplante pulmonar : impacto na sobrevida e análise de genomovar / Danila de Souza Carraro. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

Descritores: 1.*Bukholderia cepacia* 2.*Bukholderia cenocepacia* 3.Fibrose cística 4.Bronquiectasia 5.Transplante de pulmão

USP/FM/DBD-335/16

Dedicatória

Dedico o presente trabalho aos meus pais Magdalena e Paulo, que me transmitiram a coragem de que seria capaz. Minha eterna gratidão.

Ao meu esposo Rafael, que tornou possível a concretização deste sonho.

Aos meus amados filhos Maria Paula e Rafael, que fique como exemplo a importância da educação.

Aos meus irmãos Lilian e Paulo, cunhada, cunhado, sobrinhas e sobrinho pelo apoio e incentivo.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, primeiramente pela oportunidade, pela orientação, confiança e por todo aprendizado. Muito obrigada!

A toda equipe de Transplante de Pulmão do INCOR/FMUSP, em especial a Dra. Silvia, imprescindível na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

Aos Pacientes do Transplante Pulmonar

Às Famílias dos Doadores

Ao aluno Leandro Iuamoto, ao Aristídes e a equipe do LIM 61

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro

FAPESP – Auxilio Pesquisa Regular – Processo no. 2011/51832-0

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E PESQUISADORES

Grupo de Transplante Pulmonar do Instituto do Coração – HCFMUSP

Paulo Manuel Pêgo Fernandes

Marcos Naoyuki Samano

Lucas Matos Fernandes

Luis Gustavo Abdalla

Ricardo Henrique de Oliveira Teixeira

José Eduardo Afonso Júnior

Rafael de Medeiros Carraro

Silvia Vidal Campos

André Nathan Costa

Laboratório de Microbiologia do Instituto Central - HCFMUSP

João Nóbrega de Almeida Júnior

Flávia Rossi

Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Central – HCFMUSP

Ester Sabino

Hélio Caiaffa

Lea Campos de Oliveira

Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica- LIM 61

Karina Andrighetti de Oliveira Braga

Tatiana Machado

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE GRÁFICOS
LISTA DE FIGURAS
1 INTRODUÇÃO..... 01
2 OBJETIVOS..... 06
3 REVISÃO DA LITERATURA..... 08
3.1 Transplante Pulmonar..... 09
3.1.1 Histórico 09
3.1.2 Transplante Pulmonar: indicações e contraindicações..... 11
3.2 Fibrose Cística..... 15
3.3 Bronquiectasias..... 20
3.4 *Burkholderia cepacia complex*..... 23
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 27
4.1 Seleção dos pacientes..... 28
4.2 Amostras..... 28
4.2.1 Coleta de amostras..... 29
4.2.2 Grupo de estudo..... 29
4.3 Microbiologia..... 31
4.4 Biologia Molecular..... 31
4.5 Profilaxia da Infecção por BCC..... 37
4.6 Protocolo de Imunossupressão de Transplante Pulmonar..... 38
4.7 Monitorização e Tratamento de episódios de Rejeição após Transplante Pulmonar..... 38
4.8 Variáveis clínicas correlacionadas com colonização/infecção por cepas de BCC em pacientes do estudo após o transplante pulmonar..... 39
4.9 Avaliação da correlação das variáveis clínicas e laboratoriais (BCC) com óbito..... 39
4.10 Análise estatística descritiva..... 40
4.11 Análise estatística inferencial..... 40
5 RESULTADOS..... 41
6 DISCUSSÃO..... 59
7 CONCLUSÂO..... 66
8 ANEXOS..... 68
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 75
10 APÊNDICE.....

Listas

ABTO	Associação brasileira de transplantes de órgãos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BCC	*Burkholderia cepacia complex*
B.cenocepacia	*Burkholderia cepacia cenocepacia*
CFTR	Proteína reguladora de condutância transmembrânica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Fibrose Cística
∆F508	Mutação por deleção de fenilalanina na posição 508 da proteína
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
LBA	Lavado broncoalveolar
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PCR	Proteína C reativa
PGD	Disfunção primária de enxerto
RR	Risco relativo
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
TxP	Transplante Pulmonar
UTI	Unidade de terapia intensiva
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

Tabela 1 Análise descritiva - Fibrose Cística..... 46

Tabela 2 Análise descritiva - Bronquiectasias..... 47

Tabela 3 Regressão de Cox- Análise Univariada (Fibrose Cística).. 49

Tabela 4 Regressão de Cox- Análise Univariada (Bronquiectasias) 50

Gráfico 1 Número de casos de pacientes colonizados por BCC em pacientes com doença pulmonar supurativa..... 42

Gráfico 2 Caracterização dos genomovares nos pacientes colonizados por *Burkholderia cepacia complex*..... 43

Gráfico 3 Resistência antimicrobiana dos isolados de *Burkholderia cepacia complex* em pacientes com FC submetidos ao transplante pulmonar MR (MULTIRESISTENTE- TODAS AS DROGAS), PR (PANRESISTENTE- 2 DROGAS), NR (SENSÍVEL)… 44

Gráfico 4 Taxa de sobrevida dos pacientes com doença pulmonar supurativa após transplante pulmonar..... 48

Gráfico 5 Kaplan-Meier curva de sobrevida acumulada de pacientes com doença pulmonar supurativa submetidos ao transplante pulmonar..... 51

Gráfico 6 Kaplan-Meier Curva de sobrevida acumulada de pacientes com doença pulmonar supurativa colonizados ou não por *Burkholderia cepacia complex* submetidos ao transplante pulmonar..... 52

Gráfico 7 Kaplan-Meier Curva de sobrevida acumulada de pacientes com Fibrose Cística colonizados ou não por *Burkholderia cepacia complex* submetidos ao transplante pulmonar..... 53

Gráfico 8 Kaplan-Meier Curva de sobrevida acumulada de pacientes com Fibrose Cística submetidos ao transplante pulmonar de acordo com o status de colonização por BCC..... 54

Gráfico 9 Kaplan-Meier curva de sobrevida acumulada de pacientes com doença pulmonar supurativa após o transplante pulmonar com ou sem diagnóstico de disfunção primária do enxerto (PDG)..... 55

Gráfico 10 Kaplan-Meier curva de sobrevida acumulada de pacientes com Bronquiectasias após o transplante

pulmonar com ou sem diagnóstico de disfunção primária do enxerto (PDG)..... 56

Gráfico 11 Disfunção Crônica do Enxerto Pulmonar nos pacientes com Doença Pulmonar Supurativa de acordo com o status colonização por *Burkholderia cepacia complex*..... 57

Gráfico 12 Disfunção Crônica do Enxerto Pulmonar nos pacientes com Fibrose Cística de acordo com o status colonização por *Burkholderia cepacia complex*..... 58

Figura 1 Número de transplantes pulmonares realizados no Brasil entre os anos 2005 até junho de 2015..... 10

Figura 2 Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para as doenças de base que mais frequentemente levam ao transplante. Alfa-1: deficiência de alfa-1-antitripsina; FC: fibrose cística; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; FPI: fibrose pulmonar idiopática; HAPI: hipertensão arterial pulmonar idiopática..... 13

Figura 3 Prevalência das infecções bacterianas respiratórias por agente em pacientes portadores de Fibrose Cística. MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente; MDR-PA: *Pseudomonas aeruginosas* multidroga resistente..... 19

Figura 4 Distribuições de genomovares de BCC em pacientes com FC de acordo com Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry..... 25

Figura 5 Fluxograma da coleta de amostras do trato respiratório da população do estudo e exames de resistência antimicrobiana e tipagem molecular a serem realizados após identificação da *Burkholderia cepacia complex*..... 30

Resumo

CARRARO DS. **Colonização por *Burkholderia cepacia complex* em pacientes com doença pulmonar supurativa submetidos ao transplante pulmonar: impacto na sobrevida e análise de genomovar**. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016**.**

INTRODUÇÃO: Em contraste aos bons resultados do transplante pulmonar no tratamento de pacientes com doença supurativa pulmonar avançada, a colonização por *Burkholderia cepacia complex* (BCC), sobretudo o genomovar III, vem sendo relacionada a pior prognóstico e, por conseguinte, uma contraindicação ao procedimento em alguns centros transplantadores. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto em sobrevida após o transplante pulmonar de pacientes com doença pulmonar supurativa colonizados por BCC, além de determinar a incidência da colonização e suas variantes genômicas no Instituto do Coração/HC-FMUSP.
MÉTODOS: Foram analisados prospectivamente dados clínicos e amostras de culturas do trato respiratório dos pacientes que realizaram transplante pulmonar por doença supurativa entre janeiro de 2008 e dezembro de 2013. A tipagem molecular para estudar os diferentes genótipos da BCC foi realizada a partir de janeiro de 2012 por método de sequenciamento genético e análise do gene *Rec*A.
RESULTADOS: Foram realizados 132 transplantes pulmonares, 62 pacientes com doença pulmonar supurativa, sendo 28 em pacientes com Bronquiectasias e 34 com Fibrose Cística. Observou-se a colonização por BCC em 16 pacientes; em 7 amostras identificados os seguintes subtipos: três cepas *B. metallica* e quatro cepas *B. cenocepacia*. A incidência de BCC nos pacientes com Fibrose Cística foi de 38,2%, enquanto nos pacientes com Bronquiectasias foi 10,7%. Dentre os 16 pacientes colonizados por BCC, ocorreram 2 óbitos, nenhum deles relacionados à infecção pelo agente. Um óbito foi atribuído a sepse por *Acinetobacter baumannii* resistente a múltiplas drogas e o outro, a disfunção orgânica múltipla. O estudo desenvolvido demostrou que a colonização por BCC não gerou impacto em mortalidade nos pacientes após o transplante pulmonar, mesmo quando colonizados pelo subtipo *B. cenocepacia.*

Descritores: *Bukholderia cepacia*, *Bukholderia cenocepacia*, Fibrose Cística, Bronquiectasias, Transplante de pulmão.

Abstract

Carraro DS. ***Burkholderia Cepacia Complex*** **colonization in patients with suppurative lung disease undergoing lung transplantation: impact on survival and genomovar analysis** [Thesis]. São Paulo: ―Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo‖; 2016.

INTRODUCTION: Notwithstanding the good results of lung transplantation for treatment of patients with advanced lung suppurative disease, colonization by *Burkholderia cepacia complex* (BCC), especially genomovar III has been related to a worse prognosis in these patients and therefore contraindication to the procedure certain centers.
The aim of this study was to evaluate the impact on survival after lung transplantation in patients with suppurative lung disease colonized with BCC to determine the incidence of colonization and its genomic variants at the Heart Institute / HC -FMUSP.
METHODS: We prospectively analyzed clinical data and respiratory tract samples of suppurative lung disease patients that performed lung transplantation from January-2008 through November-2013. From January-2012 through December-2013, we also subtyed the different *B. cepacia* genotypes by DNA sequencing primers of the gene *Rec*A.
RESULTS: 132 lung transplantation were performed, 62 patients with suppurative lung disease, 28 patients with Bronchiectasis and 34 with Cystic Fibrosis. BCC was observed in 16 patients; in 7 samples we identified the following subtypes: three strains *B. metallica* and four strains *B. cenocepacia.* The incidence of BCC in patients with Cystic Fibrosis was 38.2% while in patients with Bronchiectasis was only 10.7%. Among the 16 patients colonized with BCC, there were two deaths, none of them related to infection by the agent. One death due to sepsis *Acinetobacter baumannii* resistant to multiple drugs and the other, multiple organ dysfunction. The study demonstrated that colonization by BCC developed no impact on the mortality rate of patients after lung transplantation, even when colonized by the subtype *B. cenocepacia.*

Descriptors: *Bukholderia cepacia*, *Bukholderia cenocepacia*, cystic fibrosis, bronchiectasis, Lung Transplantation

1. Introdução

O transplante pulmonar oferece melhores sobrevida e qualidade de vida aos pacientes com doença pulmonar avançada e baixa expectativa de vida; por isso, atualmente é uma opção terapêutica consolidada para o tratamento destes pacientes em mais de 136 centros no mundo[1].

O registro de 2014 da *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) relatou a realização de 47.647 transplantes de pulmão e 3.772 transplantes combinados coração-pulmão em todo mundo até junho de 2013. São, aproximadamente, 3.700 transplantes realizados por ano, predominando o procedimento bilateral[1].

De acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), atualmente no Brasil, existem apenas 5 centros atuantes para realizar o transplante pulmonar no país (2 centros no Rio Grande de Sul, 2 centros em São Paulo, 1 centro no Ceará)[2].

Entre os anos de 2005 e 2014, foram realizados 578 transplantes pulmonares no Brasil, um número ainda bem inferior em relação ao de outros transplantes de órgãos sólidos[2].

No primeiro trimestre de 2015, apesar do aumento de 19% no número de cirurgias realizadas no Brasil, a taxa de utilização dos pulmões doados foi de 4,1%, com uma taxa de mortalidade em lista de 10% no ano de 2014[3].

A taxa de aproveitamento do órgão ainda continua muito baixa em relação a maior parte do mundo que aproveita pelo menos 20% dos pulmões dos doadores[4].

A elevada complexidade do procedimento cirúrgico e dos recursos necessários para se cuidar de pacientes transplantados de pulmão, aliada ao processo extenso de treinamento de equipe médica altamente especializada,

dificultam a criação de centros transplantadores e impedem que mais pacientes se beneficiem deste procedimento[5]. Por isso, critérios de contraindicação ao transplante, tais como idade avançada, múltiplas comorbidades, ou infecções por micro-organismos de difícil tratamento têm sido levados em consideração para seleção dos candidatos.

Segundo os dados da ISHLT publicados no último registro em 2014[1], a doença pulmonar supurativa constitui a terceira principal indicação de transplante pulmonar e, neste grupo de pacientes, a infecção crônica pulmonar intratável pode representar um dos critérios para inclusão em fila de transplante.

Pacientes portadores de doença pulmonar supurativa avançada são frequentemente colonizados por diferentes bactérias[6,7,8]. As baixas concentrações de oxigênio no epitélio brônquico predispõem à colonização bacteriana e, apesar de apresentar baixa prevalência, a colonização por BCC é a mais grave por estar associada à síndrome *Burkholderia cepacia* que ocasiona: febre elevada, bacteremia, pneumonia necrotizante rapidamente progressiva e morte [9,10,11].

Baseado em análises fenotípicas e genotípicas, o complexo *Burkholderia cepacia* é composto por vinte espécies genômicas: *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar IIIA, IIIB, IIIC, IIID), *B. stabilis* (genomovar IV), *B. vietnamiensis* (genomovar V), *B. dolosa* (genomovar VI), *B. ambifaria* (genomovar VII), *B. anthina* (genomovar VIII) e *B. pyrrocinia* (genomovar IX). Mais recentemente foram descritas as espécies: *B.ubonensis, B.latens, B.diffusa, B.arboris, B.seminalis, B.metallica, B.contaminans*e *B.lata, B. pseudomultivorans, B. stagnalis, B. territorii*[12,13,14].

A vasta maioria destas infecções são causadas pelo genomovar II (*Burkholderia multivorans*), III (*Burkholderia cenocepacia*) e V (*Burkholderia vietnamiensis*). Apesar de haver exceções, as infecções mais graves relatadas foram associadas ao genomovar III[15].

A partir de 2001, estudos foram publicados demonstrando uma menor sobrevida após o transplante pulmonar em pacientes colonizados/infectados por BCC. Aris et al.[16] relataram sobrevida de 50% *versus* 83% no primeiro ano após transplante de pacientes infectados por BCC e não-infectados, respectivamente (p=0,006). Chaparro et al.[17] avaliaram a mortalidade em um período de seguimento médio de 3 anos, e corroborando os dados anteriores, encontraram uma maior mortalidade após o transplante em paciente com FC (Fibrose Cística) e colonizados por BCC em comparação aos pacientes não colonizados (54% *vs* 16%). Dos 15 óbitos no grupo colonizado por BCC, catorze foram precoces e relacionados a sepse pelo agente.

Posteriormente, outros estudos avaliaram mais especificamente a evolução clínica de pacientes colonizados por BCC de acordo com o genótipo, e associaram a presença do genomovar III (*B. cenocepacia*) à pior sobrevida após o transplante pulmonar[18,19,20]. Devido a esta constatação, e tendo em vista a escassez de doadores e elevada mortalidade em lista, alguns centros optaram por não incluir pacientes colonizados por *B.cenocepacia* em lista de espera para transplante pulmonar.

Martins et al.[21] descreveram, numa população de pacientes na cidade de São Paulo, as características genotípicas das cepas de BCC isoladas em pacientes com FC, sendo a *B.cenocepacia* o subtipo mais frequentemente encontrado neste grupo de pacientes (53%). Entretanto, ainda não foi possível

correlacionar estes achados demográficos com a evolução clínica de pacientes antes ou após o transplante pulmonar.

Portanto, faz-se de extrema importância a descrição das cepas de BCC em candidatos ao transplante pulmonar no Brasil e o impacto desta colonização/infecção em sua evolução clínica, para definir estratégias de controle e estabelecer critérios de inclusão em lista de espera para o transplante.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

Principal

- Avaliar o impacto da colonização por BCC na sobrevida dos pacientes com doença pulmonar supurativa após transplante pulmonar

Secundários

- Determinar a incidência da colonização de BCC em pacientes portadores de doença pulmonar supurativa avaliados para transplante pulmonar no Instituto do Coração/HCFMUSP;
- Analisar a distribuição de genomovares das cepas de BCC isoladas (tipagem molecular);
- Correlacionar a resistência aos antimicrobianos das cepas de *Burkholderia cepacia complex* com a evolução clínica dos pacientes após transplante pulmonar*;*
- Correlacionar a colonização/infecção por cepas *Burkholderia cepacia complex* com a evolução clínica dos pacientes após o transplante pulmonar.
- Comparar desfechos clínicos entre os grupos de pacientes portadores de Fibrose Cística e portadores de Bronquiectasias colonizados/infectados por BCC.

3. Revisão da Literatura

3.1 Transplante Pulmonar

3.1.1 Histórico

O primeiro transplante pulmonar descrito na literatura foi em 1963, realizado por James Hardy[22,23]. Tratava-se de um paciente de 58 anos com doença pulmonar obstrutiva crônica e carcinoma espinocelular do pulmão esquerdo, insuficiência respiratória e comprometimento da função renal. Após o transplante unilateral esquerdo, houve melhora da função pulmonar, mas o paciente faleceu após 18 dias por insuficiência renal progressiva[24].

Nos 15 anos seguintes, foram efetuados cerca de 40 transplantes de pulmão. Todos tiveram resultados ruins, com a maioria dos pacientes morrendo nas duas primeiras semanas em consequência de disfunção primária do enxerto, sepse ou rejeição aguda. A causa de óbito mais comum após a segunda semana era a deiscência da anastomose brônquica, considerada um dos principais limitantes ao sucesso da cirurgia nesse período[25].

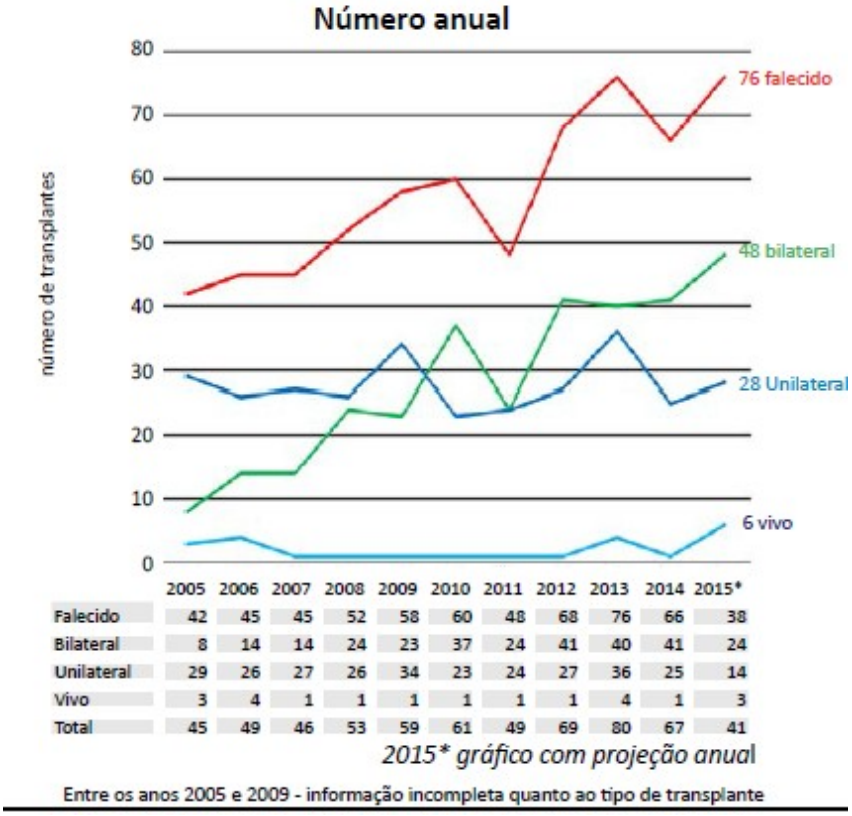
Somente na década de 80 o sucesso nessa modalidade terapêutica foi alcançado pela equipe da Universidade de Toronto, liderada pelo Dr. Joel Cooper, que realizaram o primeiro transplante de pulmão isolado[26].

Ainda em 1986 foi relatado o primeiro transplante pulmonar bilateral e em 1990 foi descrita a técnica que é a mais utilizada até hoje, o transplante pulmonar bilateral sequencial[27].

No Brasil, o primeiro transplante pulmonar foi realizado em Porto Alegre no ano 1989 por Camargo et al.[28].

Desde então, observamos um aumento do número de transplantes realizados, assim como da qualidade dos resultados.

Atualmente, o registro da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) mostrou um total de 619 transplantes de pulmão realizados entre 2005 até junho de 2015 e 5 centros atuantes em 3 estados brasileiros (figura 1)[2].



FONTE: Extraído de Registro Brasileiro de Transplantes - ano XXI nº2

Figura1- Número de transplantes pulmonares realizados no Brasil entre os anos 2005 até junho de 2015

O desenvolvimento das técnicas cirúrgicas e anestésicas, além de melhores estratégias de preservação pulmonar, tornou o transplante de pulmão

uma terapia bem estabelecida para pneumopatias crônicas em estágio terminal.

3.1.2 Transplante Pulmonar: indicações e contraindicações

O transplante pulmonar é indicado aos pacientes que esgotam os recursos terapêuticos clínicos convencionais sem resultados satisfatórios no curso de suas pneumopatias[29,30,31].

As principiais doenças de base com indicação de transplante pulmonar no mundo são: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), com 38,2%; FPI, com 24,3%; Fibrose Cística (FC), com 16,4%; Deficiência de Alfa-1-antitripsina (alfa-1), com 5,6%; Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática (HAPI), com 3,8%; Fibrose Pulmonar (não FPI), com 3,9%; Bronquiectasias, com 2,7%; e Sarcoidose, com 2,5%[1].

Os tipos de transplante disponíveis são: transplante pulmonar unilateral, transplante pulmonar bilateral, transplante lobar intervivos e transplante combinado coração-pulmão. A principal modalidade cirúrgica envolvendo o uso de enxerto pulmonar é o transplante pulmonar bilateral, responsável por mais de 70% dos transplantes realizados anualmente e com tendência de aumento nos últimos anos[1]. Cada modalidade tem suas indicações em situações específicas com vantagens e desvantagens.

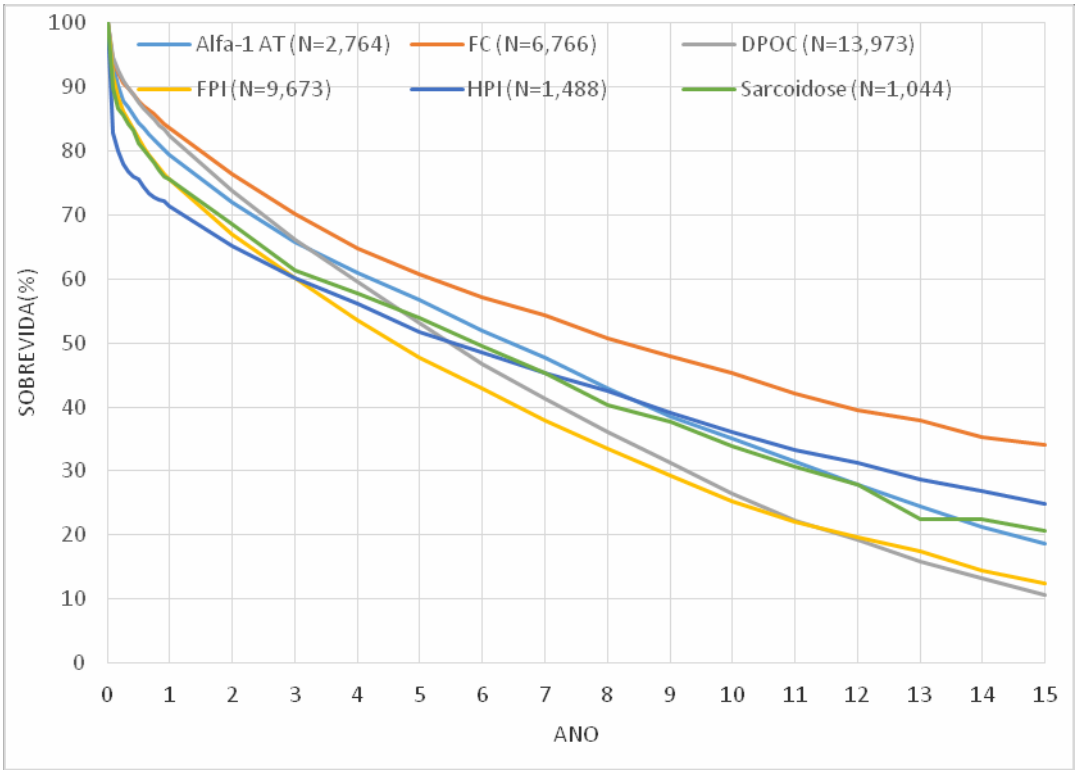
A sobrevida dos pacientes submetidos ao transplante pulmonar depende de diversos fatores, tais como: idade do receptor, idade do doador, doença de base, necessidade de circulação extracorpórea no intraoperatório,

condição funcional do paciente antes do transplante, sendo sua chance de sobrevida imediata e a longo prazo relacionada a estes fatores.

A adequada avaliação das contraindicações contribui para menor ocorrência de desfechos clínicos desfavoráveis não relacionados ao enxerto, beneficiando os pacientes com maior chance de sucesso e, assim, melhorando a sobrevida geral com o tratamento[4,5,32].

Pacientes com FC e Bronquiectasias constituem a terceira maior indicação de transplante pulmonar, sobretudo aqueles com diagnóstico de FC. Devido à escassez de dados na literatura a respeito das outras causas de Bronquiectasias (discinesia ciliar primária, imunodeficiências), os critérios de indicação ao transplante pulmonar são baseados em estudos nos pacientes com FC para todas as causas[33].

Apesar da FC ser uma doença de acometimento multiorgânico, com características que poderiam ser agravantes de morbimortalidade após o transplante pulmonar (colonização de vias aéreas superiores por micro-organismos multirresistentes, doença hepática progressiva, diabetes mellitus, osteoporose)[34,35], estes pacientes apresentam as melhores taxas de sobrevida após o transplante quando comparados a todos os outros tipos de indicação (figura 2) [1,36,33].



FONTE: extraído do registro da *International Society for Heart and LungTransplantation* – ano 2014. JHLT.2014 Oct; 33(10): 1009-1024

Figura 2- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para as doenças de base que mais frequentemente levam ao transplante. Alfa-1: Deficiência de Alfa-1-antitripsina; FC: Fibrose Cística; DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; FPI: Fibrose Pulmonar Idiopática; HAPI: Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática

As principais características consideradas para indicação do transplante nestes pacientes são: VEF1 < 30% ou em rápido declínio sobretudo em mulheres com menos de 20 anos, hospitalização com necessidade de terapia intensiva, hipoxemia, hipercapnia, hemoptise não controlada com embolização, necessidade de ventilação não invasiva e hipertensão pulmonar [5,37]. A indicação do transplante sempre será baseada na avaliação do conjunto de características clínicas e funcionais.

O transplante pulmonar é uma terapia complexa com elevada taxa de mortalidade e um risco elevado de morbidade perioperatório, portanto devemos

lembrar que o candidato ideal ao transplante é o paciente jovem, com doença pulmonar avançada e ausência de doenças em outros órgãos e sistemas, tendo sua chance de sobrevida imediata e a longo prazo otimizada [37].

As contraindicações absolutas ao transplante pulmonar de acordo com ISHLT são:

- Neoplasias malignas ativas (exceto neoplasias cutâneas não-melanoma);
- Disfunção cardíaca não relacionada à doença pulmonar, caracterizada por disfunção ventricular esquerda significativa ou insuficiência coronariana não passível de tratamento percutâneo;
- Disfunção orgânica significativa de qualquer outro órgão nobre aferida por história clínica e exames de avaliação específica de cada órgão.
- Infecções pelos vírus B e C da hepatite sem controle com o tratamento específico;
- Tuberculose pulmonar ativa;
- Adição ao tabaco, álcool, narcóticos, substância psicoativas ou cessação há menos de seis meses
- Doença psiquiátrica grave sem controle ou não passível de tratamento, que possa interferir com a aderência ao tratamento;
- Diátese hemorrágica incorrigível;
- Falta de aderência ao tratamento médico proposto;
- Classe II ou III de obesidade (IMC> 35.0 kg/m2);
- Falta de suporte social e familiar;
- Deformidade grave de caixa torácica.

Especialmente em pacientes com FC, a colonização por determinados agentes infecciosos está relacionada a piores desfechos de mortalidade após o transplante, podendo representar uma contraindicação ao procedimento. Dentre estes se destaca a *B.cenocepacia*, considerada por diversos grupos como um fator de não inclusão em lista de espera para o procedimento[19,20]. Segundo o último consenso da ISHLT para seleção de candidatos, os centros que admitam transplantar estes pacientes devem investir em estratégias para reduzir a recorrência da infecção após a cirurgia. Vale aqui ressaltar que os outros genótipos da BCC não estão relacionados com este aumento de risco, fazendo-se assim fundamental a identificação destes subtipos no processo de seleção e listagem dos candidatos[31].

3.2 Fibrose Cística

A FC é uma doença autossômica recessiva de acometimento multissistêmico[38]. Sua primeira descrição como uma doença foi em 1938, por Dorothy Andersen. É uma das condições genéticas letais mais comuns em descendentes europeus[39].

No Brasil várias incidências já foram relatadas nos diferentes Estados; em Santa Catarina 1:6.000, Paraná 1:8.000 Minas Gerais 1:10.000, no entanto acredita-se que o número de pacientes não diagnosticados seja grande[40].

O gene da FC localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no lócus q31, sendo formado por 250 quilobases de DNA, com 27 exons, e tem a propriedade de codificar um RNAm de 6,5 quilobases, que transcreve uma

proteína transmembrana, reguladora de transporte iônico, composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)[41]. A CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de cloro, sódio e água. Algumas centenas de mutações foram descritas no gene da FC, porém a mais frequente delas ocorre por uma deleção de três pares de bases, acarretando a perda de um aminoácido (fenilalanina) na posição 508 (ΔF508) da proteína CFTR, o que impede seu funcionamento adequado[42].

Pacientes com FC têm subgrupos genéticos distintos. Estas diferenças no fenótipo também estão relacionadas com a classificação funcional de genótipo CFTR[41]. Portanto, a FC se manifesta com diferentes graus de expressão clínica e depende da mutação genética, da carga genética do indivíduo e de fatores ambientais.

A proteína CFTR participa da regulação do transporte de íons, aminoácidos e bactérias. Dentre as funções da CFTR está a regulação, via AMPc, de canal iônico de cloro que regula o balanço hídrico e iônico. Esse canal se localiza na membrana apical das células epiteliais de alguns órgaos, como intestino, pâncreas, vias biliares, aparelho respiratório, aparelho reprodutor, glândulas sudoríparas e túbulos renais[43].

A anormalidade da CFTR produz uma constelação complexa de alterações que incluem defeitos na homeostasia eletrofisiológica através do epitélio das vias aéreas, uma propensão aumentada à aderência de determinadas bactérias patogênicas nas células do epitélio respiratório e um aparente desequilíbrio dos mecanismos inflamatórios nas superfícies epiteliais. As alterações da homeostasia levam à produção de muco espesso e

desidratado nos epitélios respiratórios e as secreções viscosas resultam em obstrução dos dutos intrapancreáticos, canalículos biliares e vasos deferentes[44].

Nas vias respiratórias, associada à obstrução há infecção por bactérias específicas e processo inflamatório crônico, além da produção de um suor excessivamente salgado pelas glândulas sudoríparas. Um elenco de bactérias oportunistas pode passar a colonizar as vias aéreas inferiores, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Burkholderia cepacia complex*. Atualmente com a cultura específica para bactérias e utilização de métodos moleculares para identificação das mesmas, nossa compreensão sobre a microbiota das vias aéreas dos pacientes com FC expandiu e se destacaram várias áreas de oportunidade para reconsiderar a gestão de infecção e melhora da antibioticoterapia nesses pacientes[45,46,47].

A fisiopatologia da FC inclui, portanto: infecções pulmonares, insuficiência pancreática e diabetes, desordens biliares e infertilidade. A doença pulmonar é a maior causa de morbimortalidade em pacientes portadores de FC.

São os achados clínicos que levam a suspeita da doença, e o diagnóstico é confirmado por duas dosagens elevadas de cloro no teste do suor. Alternativamente, podem ser identificadas duas mutações para a fibrose cística em amostra de sangue, lembrando que o último exame só auxilia quando o resultado for positivo[48]. Assim, um teste negativo não exclui a doença principalmente em presença de sintomas sugestivos.

O diagnóstico de FC pelo teste do suor (íontophoresis pilocarpina quantitativa) é positivo quando a concentração do íon Cl é maior que 60 meq/L. Dois testes em tempos distintos são necessários para o diagnóstico[49,50].

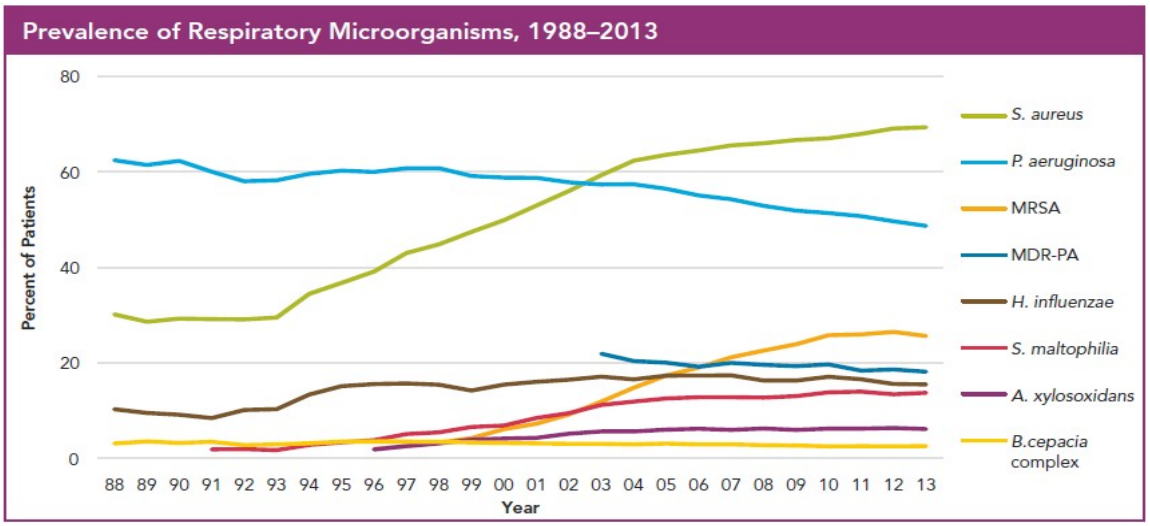
A triagem pelo teste do pezinho é adotada em todo nosso país; sendo um Programa Nacional de Triagem Neonatal, implantado pela Portaria nº 822/2001 do Ministério da Saúde, que garante o direito ao exame a todos os recém-nascidos. No teste do pezinho está incluída a realização da pesquisa da imunotripsina reativa (ITR). O teste é utilizado como screening neonatal para FC. Os recém-nascidos com ITR positivo devem ter o diagnóstico confirmado pelo teste do suor. O valor do teste do pezinho é possibilitar o diagnóstico precocemente, antes do aparecimento de sinais e sintomas clínicos da doença[51].

O diagnóstico precoce, a instituição do tratamento multidisciplinar e individualizado já são bem estabelecidos como fatores que contribuem para diminuição da morbidade da doença[52,53].

Acredita-se que as vias respiratórias dos pacientes com FC não estão infectadas no momento do nascimento, as bactérias patogénicas oportunistas penetram nas vias aéreas inferiores a partir do ambiente. É sabido também que na FC existe uma relação entre idade do paciente e predisposição à colonização por micro-organismo. *Staphylococcus aureus* é a bactéria mais frequente em crianças e a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* tende a prevalecer em adolescentes e se tornar crônica[43,54,55].

Esses pacientes também são suscetíveis às infecções crônicas do trato respiratório por bactérias oportunistas: *Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans, Burkholderia cepacia complex, Staphylococcus*

aureus meticilina resistentes, espécies de *Ralstonia e* bactérias do gênero *Pandoraea*[56]. (Figura 3)



FONTE: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: annual data report – 2013.

Figura 3- Prevalência das infecções bacterianas respiratórias por agente em pacientes portadores de Fibrose Cística. MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente; MDR-PA: *Pseudomonas aeruginosas* multidroga resistente

Apesar da baixa incidência, a BCC faz parte de um grupo de agentes de grande risco na FC, associado a pior prognóstico e aumento significativo de morbidade e mortalidade, resultante de uma bacteremia rápida, progressiva, invasiva e fatal [13]. O tratamento de doença pulmonar para reduzir o impacto da infecção, inflamação e subsequente lesão pulmonar é, portanto, de grande importância[57].

Atualmente o transplante pulmonar tem se tornado uma valiosa ferramenta que proporciona uma maior expectativa e melhor qualidade de vida aos pacientes com FC com grave comprometimento pulmonar. Fatores como adequada seleção dos candidatos ao transplante, preservação do órgão a ser transplantado, drogas imunossupressoras e profilaxia de infecções oportunistas

possibilitaram melhores taxas de sobrevida aos pacientes transplantados[43,58]. O sucesso do transplante pulmonar e o período de sobrevida dos pacientes com FC estão relacionados à indicação do transplante pulmonar no momento adequado, ao tratamento agressivo das infecções e à detecção precoce de rejeição[59].

3.3 Bronquiectasias

O diagnóstico de Bronquiectasias engloba uma série de enfermidades com etiologias e mecanismos fisiopatológicos distintos sob um diagnóstico sindrômico – clínico e radiológico – comum, caracterizado por tosse produtiva diária associada ao achado tomográfico de espessamento de paredes e dilatação luminal brônquica[60,61].

Os dados epidemiológicos atuais são imprecisos para definir a real prevalência na população; tal fato é atribuído ao subdiagnóstico por diversos motivos, principalmente por maior incidência entre populações de baixa renda e menos acesso aos serviços de saúde. Existe uma tendência de aumento de incidência em faixas etárias mais elevadas com predomínio no sexo feminino. Estudos populacionais realizados na América do Norte e Europa evidenciam um aumento importante do custo destes pacientes após o diagnóstico da doença, com aumento do número de consulta médicas, exames complementares e internações hospitalares, mostrando que apesar de pouco frequentes, estes casos têm impacto relevante em custos ao sistema de saúde[62,63].

Na fisiopatologia encontramos características comuns, independente do insulto inicial, que envolvem um estímulo infeccioso crônico, inflamação recorrente das vias aéreas com recrutamento de células inflamatórias, liberação de mediadores inflamatórios diversos, alteração da composição do muco, e consequente edema, ulceração e dilatação crônica das paredes de brônquios e bronquíolos. Além disso, outros fatores como imunodeficiência local, falta de ativação adequada de células inflamatórias e fatores genéticos podem estar envolvidos como contribuintes na gênese da resposta inflamatória anormal[64,65,66,67].

As doenças ou agravos que podem estar relacionados com a gênese das Bronquiectasias são diversos, e variam desde síndromes de imunodeficiência sistêmica, doenças de etiologia autoimunes, obstrução brônquica, doenças genéticas que afetam diretamente o transporte mucociliar (Doença dos cílios imóveis) ou após doenças infecciosas virais, bacterianas, micobacterianas e fúngicas. Apesar de inúmeras etiologias possíveis, as séries de casos publicadas mostram uma parcela majoritária de casos sem causa definida ou idiopática, variando de 35 a 45% do total. Em uma grande parte das situações não existe uma percepção do agravo inicial, e o diagnóstico etiológico é mais tardio, não se conseguindo intervir na evolução clínica dos pacientes[68,69].

O diagnóstico clínico deve ser suspeitado sempre que na avaliação de tosse crônica, sobretudo na ocorrência de purulência diária ou frequente ou recorrente; outros sintomas como dispneia e sibilância também são frequentes, além de outros menos comuns como hemoptise, fadiga ou quadro consumptivo.

Frente à suspeita clínica o exame radiológico de escolha para definição é

a tomografia computadorizada de tórax com cortes finos[70,71]. A radiografia simples é imprecisa sobretudo nos casos menos graves, podendo evidenciar as dilatações brônquicas, por vezes com preenchimento por líquido. Testes laboratoriais podem ser úteis para definição da etiologia (p. ex. deficiência de imunoglobulinas, doença reumatoide). Os testes funcionais pulmonares mostram caracteristicamente um distúrbio ventilatório obstrutivo à espirometria e aprisionamento aéreo à pletismografia. Outros achados como alterações da capacidade pulmonar total, redução da capacidade vital forçada podem variar de acordo com a etiologia e sobretudo a gravidade da doença[65,71].

Atualmente a tomografia de alta resolução do tórax constitui o principal exame para o diagnóstico das bronquiectasias, com alguns achados característicos para o diagnóstico, que seguem: dilatação das vias aéreas (diâmetro maior que 1,5 em relação à artéria adjacente), micronódulos centrilobulares compatíveis com espessamento e/ou impactação de muco em pequenas vias aéreas (padrão de árvore em brotamento), e dilatações císticas das paredes brônquicas por vezes em formatos de cachos de uva[72].

Assim como nos pacientes com FC existe uma tendência de colonização das vias aéreas inferiores crônica, sendo que os principais agentes que se destacam em frequência são *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae;* além dos agentes bacterianos a infecção crônica por fungos filamentosos e micobactérias não tuberculosas também podem ser causa de agravamento clínico[60]. Destes agentes a *Pseudomonas aeruginosa* se correlaciona com maior produção de escarro, maior extensão das lesões à tomografia de alta resolução, aumento do número de hospitalizações e redução

da qualidade de vida[73]. Ao contrário da população de pacientes com FC, neste grupo não se sabe o real impacto e frequência da colonização pela *Burkholderia cepacia complex*; mais estudos populacionais são necessários para avaliação do seu impacto nesta população de pacientes com características fenotípicas de lesão pulmonar semelhantes àqueles com FC, aonde tal agente infeccioso já tem papel bem definido.

O tratamento envolve uma abordagem multiprofissional, cuidados na prevenção e tratamento de exacerbações infecciosas, higiene adequada de secreções pulmonares, além de busca ativa do diagnóstico etiológico para o seu tratamento específico quando disponível. Ressecções pulmonares cirúrgicas localizadas podem ser indicadas em situações específicas, porém atualmente constituem uma terapia de exceção. Beirne et al. [74] publicaram uma análise retrospectiva com 22 pacientes selecionados num período de 13 anos de seguimento, mostrando sobrevida em 5 anos e valores de função pulmonar alcançados semelhantes no seguimento pós transplante aos pacientes com FC.

O transplante pulmonar representa uma terapia já bem consolidada para este grupo de pacientes, habitualmente seguindo os critérios de indicação dos pacientes com FC, visto a sua semelhança de características clínicas da doença.

3.4 Burkholderia cepacia complex

O Burkholderia cepacia complex representa um grupo de espécies relacionadas de bactérias que, embora não sejam patogênicas para pessoas

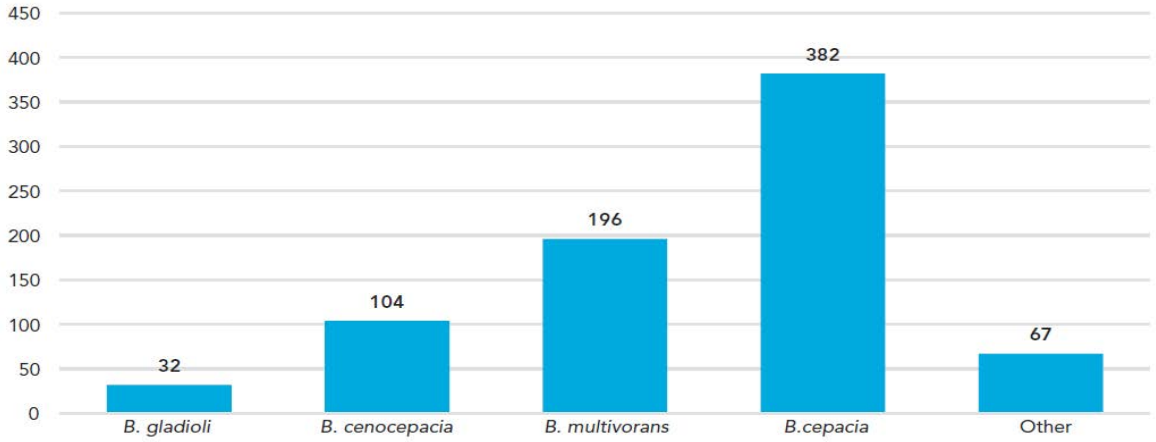
saudáveis, podem causar infecções crônicas e risco de vida aos imunossuprimidos e afecções de trato respiratório em pneumopatas (em especial os portadores de FC). Sabe-se que a mesma trata de uma bactéria ubíqua cujo nicho ambiental exato não é conhecido.

A incidência de BCC em pacientes com FC de acordo com Cystic Fibrosis Foudation Patiente Registry de 1998-2013 variou de 2,5-3,5%[6].

Taxonomicamente esse complexo é composto por diversos tipos de BCC, ou seja, diversos genomovares, baseando-se nas semelhanças fenotípicas e filogenéticas entre elas. Posteriormente houve a identificação de características fenotípicas suficientes para denominação de certos genomovares em espécies-específicas que receberiam a nomeação formal pelo binômio identificador. Atualmente são vinte espécies descritas que representam o chamado *Burkholderia cepacia complex*: *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar IIIA, IIIB, IIIC E IIID), *B. stabilis* (genomovar IV), *B. vietnamiensis* (genomovar V), *B. dolosa* (genomovar VI), *B. ambifaria* (genomovar VII), *B. anthina* (genomovar VIII), *B. pyrrocinia* (genomovar IX), *B. ubonensis*; *B. lattens*; *B. difusa*, *B. arboris*, *B. seminalis, B. metallica*, *B. contaminans, B. lata, B. pseudomultivorans, B. stagnalis, B. territorii*[14,75].

Em 2013, em um estudo realizado pelo laboratório de *Burkholderia cepacia* Research Foundation da Universidade de Michigan, 662 pacientes tiveram cultura positiva para *Burkholderia*: foram confirmados BCC em 94,3% dos pacientes[6]. A distribuição das espécies da BCC mostrou o predomínio de *B.cenocepacia* e *B.multivorans,* semelhantes a outros estudos[13,15]. (Figura 4)

Espécies de BCC identificadas no B. cepacia Research Lab em 2013.



FONTE: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: annual data report – 2013.

Figura 4- Distribuições de genomovares de BCC em pacientes com FC de acordo com Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry.
Os dados não são mutuamente exclusivos. Alguns pacientes têm mais de uma espécie.

Pacientes com FC são vulneráveis ao longo das suas vidas a várias infecções bacterianas que são, em sua maioria, ocasionadas por patógenos oportunistas. Embora a infecção por BCC esteja associada a mau prognóstico, a *B. cenocepacia* (genomovar III) é considerada a mais ameaçadora das diferentes espécies do complexo *Burkholderia cepacia* e frequentemente está associada à menor sobrevida e ao maior risco de desenvolver a síndrome cepacia fatal [13,76,77].

A identificação precisa do BCC nos pacientes fibrocísticos tem grande impacto, seja em nortear o esquema de antibioticoterapia usado nas exacerbações, seja na elegibilidade do paciente para transplante pulmonar, baseado em estudos anteriores de alguns centros transplantadores, que

evidenciaram aumento da morbimortalidade após o transplante nos pacientes colonizados previamente, sobretudo com o genomovar III[19,20,37].

Por isso, apesar da baixa incidência de colonização de BCC, muitos centros não listam esses pacientes para transplante de pulmão.

A infecção por BCC em pacientes com bronquiectasias não FC é limitada e esporádica, mais comumente nosocomial e sua epidemiologia é mal compreendida[78,79].

A evidência anterior de maior mortalidade relacionada a infecções recorrentes pela *B.cenocepacia* motivou os transplantadores, no consenso de 2014 da Sociedade Internacional de Transplante Coração e Pulmão (International Society for Heart and Lung Transplantation – ISHLT), a incluir uma recomendação de vigilância constante e desenvolvimento de novas estratégias para prevenção de recidiva destas infecções, além de atenção ao maior risco de mortalidade e disfunção do enxerto, nos centros que considerarem aceitar estes grupos de pacientes para o transplante[37].

4. Materiais e Métodos

O presente estudo teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número: 0046/11: trata-se de estudo de coorte prospectivo, realizado no Hospital das Clínicas/InCor-HCFMUSP.

4.1 Seleção dos pacientes

Foram incluídos no estudo os pacientes com doença pulmonar supurativa (Fibrose Cística e Bronquiectasias) submetidos ao transplante pulmonar consecutivamente entre janeiro de 2008 e dezembro de 2013 e analisadas todas as amostras de culturas do trato respiratório (escarro e lavado broncoalveolar) coletadas.

Todos os pacientes foram submetidos ao procedimento de transplante pulmonar via toracotomia bilateral (incisão de clamshell).

4.2 Amostras

As amostras de trato respiratório foram as mesmas solicitadas pela rotina assistencial do serviço de transplante pulmonar InCor – HCFMUSP, Serviço de Pneumologia do HCFMUSP.

A coleta de cultura de escarro ocorria a cada 4 meses em pacientes em lista de transplante pulmonar. A cultura de secreção brônquica foi coletada no

pré e intraoperatório, e nas broncoscopias com coleta de lavado broncoalveolar (LBA) com 2 semanas, 6 semanas, 3 meses, 6 meses, 9 meses e 12 meses após o transplante pulmonar ou piora clínica em todos os pacientes.

4.2.1 Coleta de amostras

Desta forma, as amostras do trato respiratório foram coletadas, como descrito abaixo:

- pacientes em lista de transplante pulmonar (avaliação pré-operatória).
- pacientes já submetidos ao transplante pulmonar (avaliação pós-operatória).
- pacientes em lista de transplante que foram transplantados durante o estudo (avaliação intraoperatória).

4.2.2 Grupos de estudo

No presente estudo acompanhamos a evolução clínica dos seguintes grupos de pacientes após o transplante pulmonar:

Grupo FC: pacientes com FC sem BCC e pacientes com FC com BCC; dentre este será subdividido em pacientes com *B.cenocepacia,* BCC genomovares (exceto *B.cenocepacia*) e BCC não genotipados.

Grupo Bronquiectasias: pacientes com Bronquiectasias sem BCC e com BCC.

O estudo procedeu conforme o seguinte fluxograma em relação às amostras e exames laboratoriais (figura 5):

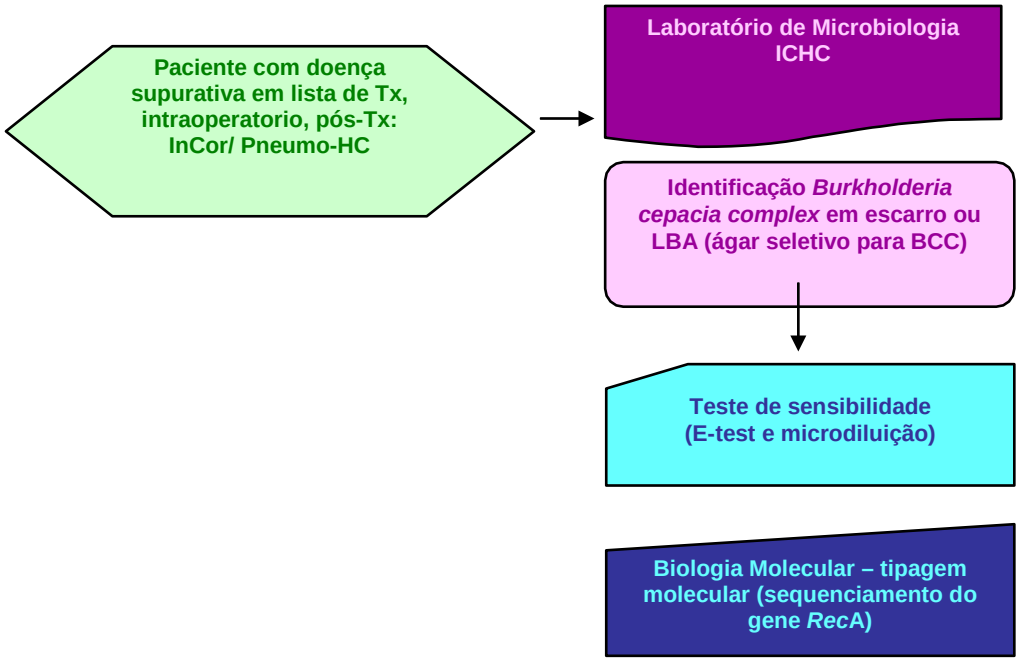


Figura 5- Fluxograma da coleta de amostras do trato respiratório da população do estudo e exames de resistência antimicrobiana e tipagem molecular a serem realizados após identificação da *Burkholderia cepacia complex*

A genotipagem da BCC somente iniciou na nossa instituição em janeiro 2012 após a aprovação do protocolo desse projeto de pesquisa e apoio financeiro da FAPESP. As amostras passaram a ser identificas através do carimbo PR-931.

O estudo de resistência e genotipagem bacteriana foi realizado no laboratório de microbiologia e biologia molecular do Instituto Central do HCFMUSP, respectivamente.

4.3 Microbiologia

Identificação de BCC: amostras de trato respiratório foram semeadas em ágar seletivo para BCC (Oxoid, Columbia, Estados Unidos da América) e incubadas a 37ºC por 72 horas. Identificação fenotípica foi realizada por metodologia automatizada VITEK2® com cartões GNI (BioMerieux, Marcy-L'Etoile, França).

Sensibilidade: teste de sensibilidade para Meropenem, ceftazidime, sulfametoxazol-trimetoprima foi realizado por metodologia automatizada VITEK2® com cartões GN AST 104 (BioMerieux, Marcy-L'Etoile, França) e por técnica de gradiente difusão Etest®. A interpretação seguiu os padrões internacionais do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)[80]. Denominamos como BCC MR as cepas resistentes às 3 drogas testadas, PR resistentes 1 ou 2 drogas e NR nenhuma resistência às drogas.

4.4 Biologia Molecular

Genotipagem por sequenciamento eletroforese de capilar: o estudo molecular para identificação genotípica da BCC foi realizado por sequenciamento de DNA a partir de *primers* do gene *RecA*11, previamente descritos [81].

Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído a partir de uma suspensão de bactérias retiradas da placa de cultivo e colocadas em tubos estéreis contendo solução fisiológica estéril. Após centrifugação a 5000g durante 5 minutos, os sedimentos foram submetidos à de extração de DNA, utilizando o kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Todo procedimento foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante e o material mantido a -20ºC até o momento do uso.

Determinação dos genomovares das cepas do complexo *Burkholderia cepacia.*

A determinação dos genomovares do complexo *Burkholderia cepacia* foi realizada por meio do sequenciamento capilar automatizado de Sanger, utilizando segmentos específicos do gene *Rec*A, a partir dos oligonucleotídeos iniciadores*,* previamente descritos (Payne et al., 2005): BUR3 F-5' GAAGAAGCAGTTCGGCAA e BUR4 R-5' GAGTCGATGACGATCAT, gerando um fragmento de 469pb e BUR1 F-5' GATCGAAGAAGCAGTTCGGCAA e BUR2 R-5' TTGTCCTTGCCCTGAGCCGAT, gerando um fragmento de 869pb.

Amplificação dos fragmentos de DNA

A técnica de PCR foi realizada utilizando 20 ng de DNA em um volume total de 50uL, contendo 1U Taq DNA polimerase, 25 mM dNTP, 1,5 mM de MgCl2, 5,0uL tampão 10x, 10 pmol de cada primer.

A reação foi realizada utilizando um termociclador eppendorf (Bio-Rad, Mississauga, Ontário, Canadá) durante 30 ciclos de, 30 segundos a 94 °C, 45s à temperatura de hibridização e 60s a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, purificados e quantificados para serem usados no sequenciamento.

Purificação produtos de PCR

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Quantificação DNA

Os DNAs amplificados purificados foram quantificados por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento Nanodrop.

Foram pipetados 2,0µl de tampão de eluição para fazer a calibração do equipamento e, em seguida, 2,0µl de DNA. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão entre as absorbâncias A260/A280 entre 1,7 – 1,9 (193).

Variações fora deste intervalo indicam presença de impurezas na amostra. As amostras com boa qualidade de pureza foram utilizadas numa concentração de final de 20-40ng em até 6,5uL. Aquelas com concentração inferior a 10ng em 6,5µl foram repetidas para serem utilizadas na reação de sequenciamento.

Reação de Sequenciamento

Foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos da PCR e o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, California). Esse método utiliza dideoxinucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes diferentes, permitindo a leitura concomitante no sequenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). Cada reação foi preparada com volume total de 10µl: foram adicionados 2uL do tampão, 1µl de cada primer a 5pmol, 0,5 µl do Big Dye, 20/40ng de DNA em volume de 6,5uL, sendo o volume completado com de H_2O MilliQ. As reações foram realizadas individualmente para cada primer. As condições de amplificação foram, inicialmente um ciclo de desnaturação à 94ºC, por 2 minutos e 95ºC por 20 segundos. Em seguida foram realizados 35 ciclos a 60ºC por 15 segundos e extensão à 72C, por 2 minutos. Após os 35 ciclos a reação permaneceu a 4ºC.

Precipitação da placa para o sequenciamento

Após essa amplificação a placa de reação foi precipitada pelo método do Isopropanol. Foram adicionados 40uL de isopropanol a 70% (preparado na hora). A placa envolvida em papel alumínio e incubada por 15min a temperatura ambiente. Após essa incubação a placa foi centrifugada por 45 min a 4000rpm em centrifuga refrigerada. Todo o volume foi então retirado, invertendo a placa sobre um papel absorvente com muito cuidado.

Posteriormente, acrescentou-se 200uL de etanol a 70% (recém preparado) e a placa centrifugada por 5min a 4000rpm.

Novamente todo o volume foi retirado e a placa foi invertida com um papel toalha e centrifugada por 1min a 800rpm e colocada em termociclador a 95ºC por 2min. Após esfriar em lugar escuro, a placa foi tampada e envolvida com papel alumínio e mantida a -20ºC até ser colocada no sequenciador ABI 3700.

Análise resultado do sequenciamento

Os cromatogramas foram analisados individualmente para cada iniciador utilizado. Verificou-se em cada cromatograma o perfil e altura dos picos, a presença de ruídos e contaminação por meio de picos duplos. As sequências com bons resultados foram utilizadas para montagem dos contingentes, utilizados para a análise do genomovares.

A análise dos genomovares

Os resulatdos obtidos a partir do sequenciamento foram montados usando o software Sequencher version 4.1.4. Estas sequencias foram então alinhadas através do programa ClustalX utilizando-se outras referências obtidas no banco de dados público do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), e estão listadas abaixo: [82]

Burkholderia arboris HE981731.1; *Burkholderia multivorans* HE981730.1, HM598379.2, |AF456013.1, AF143776.1; *Burkholderia pseudomultivorans* HE963747.1; *Burkholderia cepacia* BCU70431, AY099311.1, GQ306216.1 FJ897558.2, FJ897561.1, FJ897553.1; *Burkholderia cenocepacia* CP000958.1, AM747720.1, AF456024.1, AF456056.1, AY951899.1, JF916680.1, JF261105.1; *Burkholderia seminalis* AM748098.1, AM748096 , AM748096.1, AM748102.1; *Burkholderia stabilis* HM598395.1, GU938625.1, GU938640.1; *Burkholderia pseudomallei* NC_021884.1, NC_018527, HM598368.1, HM598372.1; Burkholderia pyrrocinia JQ658434.1, DQ360828.1, AY951904.1, AY951905.1; *Burkholderia ambifaria* EU079012.1, EU079013.1; *Burkholderia anthina* JF824701.1, JF806422.1; *Burkholderia arboris* JF824702.1, HM446326.1, HM598391.1; *Burkholderia caledonica* AJ550304.1 ; GQ306219.1; *Burkholderia diffusa* JF806423.1, JF806424.1; *Burkholderia gladioli* HM598365.1; *Burkholderia glumae* AJ551324.1; *Burkholderia latens* AM748099.1; *Burkholderia metallica* AM748094.1; *Burkholderia plantarii* AJ551323.1; *Burkholderia ubonensis* AY780511.1; *Burkholderia vietnamiensis* AF456027.1, AY950449.1.

Inicialmente, fora feita uma abordagem utilizando fragmentos pequenos (469pb) para a reconstrução filogenética. Para a escolha do melhor modelo filogenético de substituição de DNA, foi utilizado o programa Modeltest v.3.7, resultando no modelo HKY. Utilizando o método de verossimilhança, foi feita uma reconstrução filogenética no programa PhyML3.0 com Bootstrap de 300 replicações. A busca da árvore ótima foi reconstruída usando o algoritmo Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) [83].

Entretanto, após a análise preliminar da árvore, constatou-se que os valores de suporte não eram bons o suficiente, possivelmente devido ao pequeno número de sítios informativos contidos no fragmento de 469 nucleotídeos. Dessa forma, decidiu-se expandir o sequenciamento para fragmentos de 869 nucleotídeos. Para essa reconstrução, a abordagem fora modificada e o método bayesiano aplicado. Utilizando o programa BEAST v.1.8.0[84]. O arquivo de entrada (xml) foi preparado utilizado o programa Beauti (ferramenta do pacote Beast), utilizando o modelo de coalescência com relógio molecular relaxado. Vinte milhões de corridas foram feitas, salvando as árvores com informações de substituições de nucleotídeos a cada 1000 corridas, totalizando em 20 mil árvores finais. As árvores foram então sumarizadas no programa TreeAnotator (pacote Beast) e a árvore consenso final de Máxima credibilidade – MCC (com valores de probabilidade posterior para cada ramo) foi visualizada no programa FigTree (http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree) [84].

4.5 Profilaxia da Infecção por BCC

Antimicrobianos foram escolhidos com base nos resultados das culturas de escarros e do lavado broncoalveolar. Todos os pacientes infectados com BCC foram tratados com pelo menos duas drogas (sulfametoxazol- trimetoprim e meropenem) até que os testes de sensibilidade estivessem disponíveis. Antibiótico inalatório também foi utilizado para todos os pacientes com fibrose cística (tobramicina ou colistina).

4.6 Protocolo de Imunossupressão para o Transplante Pulmonar

Para o tratamento de indução de imunossupressão, todos os pacientes receberam metilprednisolona (500 mg durante a cirurgia) e basilixmab (20 mg durante a cirurgia e no quarto dia pós transplante). Para a manutenção da terapia imunossupressora: tacrolimus (0,15mg/kg/d), azatioprina (2mg/kg/d) e prednisona (0,5 mg /kg /d) foi utilizada durante 1 mês, com reduções de dose ao longo do seguimento. Depois de novembro / 2010, nosso protocolo imunossupressor foi alterado para a ciclosporina (5 mg /Kg/d), micofenolato de sódio (10mg /kg até 1440mg /d) e prednisona (0,5 mg/Kg/d) para todos os pacientes com Fibrose Cística devido ao menor efeito diabetogênico da ciclosporina em relação ao tacrolimus. O esquema para outras causas de Bronquiectasias permaneceu o mesmo.

4.7 Monitorização e Tratamento de episódios de Rejeição após Transplante Pulmonar

A broncoscopia de vigilância foi realizada na segunda e sexta semana após o transplante, em seguida, nos meses 3, 6, 9 e 12, ou quando clinicamente indicado. Os episódios de rejeição foram tratados quando as biópsias foram classificadas com graduação A2 ou superior de acordo com os critérios definidos por publicação da ISHLT em 2002, após revisão dos criterios iniciais de 1996, para a padronização de nomenclatura no diagnóstico de rejeição do enxerto pulmonar. A pulsoterapia de 3 dias com metilprednisolona (10 mg/kg/d de até 1 g/d) foi utilizada para o tratamento dos episódios de rejeição.

4.8 Variáveis clínicas correlacionadas com colonização/infecção por cepas de BCC em pacientes do estudo após o transplante pulmonar

Os dados clínicos foram coletados para correlação com o diagnóstico laboratorial de BCC:

- Idade, Sexo, índice de massa corporal (IMC)
- Tempo de internação pós transplante imediato e tempo de internação em Unidade de terapia intensiva
- Complicações: disfunção primária do enxerto, rejeição aguda, disfunção crônica do enxerto, resistência bacteriana
- Desfechos: tempo de sobrevida, óbito.

4.9 Avaliação da correlação das variáveis clínicas e laboratoriais (BCC) com óbito

Variáveis contínuas e categóricas independentes foram analisadas: idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), a colonização por BCC, disfunção primária do enxerto (PGD), episódios de rejeição aguda, disfunção crônica do enxerto, tempo de internação na unidade de terapia intensiva (UTI), dias de internação hospitalar após o transplante pulmonar por um período de seguimento 6 meses e necessidade de pulsoterapia.

4.10 Análise estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos foram realizadas, apresentando as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (±dp) e intervalo de confiança (IC) de 95%. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências e porcentagens.

4.11 Análise estatística inferencial

As variáveis categóricas foram analizadas com o teste Qui Quadrado e o risco relativo (RR) foi utilizado para a ponderação do risco inerente a cada variável.

Para avaliação de sobrevida foi utilizada a curva de Kaplan Meier e para as comparações das curvas foi utilizado o teste de Log-rank.

A análise univariada por regressão de Cox foi utilizada para a exploração de correlação entre as variáveis preditoras e a variável desfecho (óbito).

Foi utilizado o valor de significância estatística menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$ para todas as análises com exceção da análise univariada.

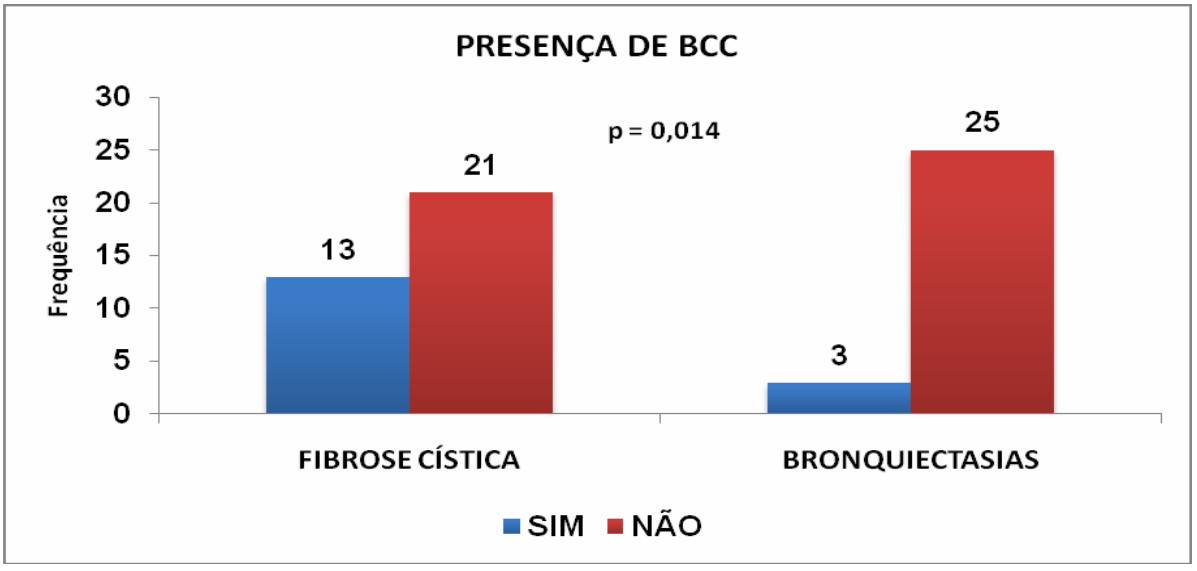
A modelagem estatística e os testes foram realizados com o software SPSS versão 21.0.

5. Resultados

Entre 2008 e 2013, foram realizados 132 transplantes de pulmão em nossa instituição; 62 transplantes pulmonares foram realizados em pacientes com doença pulmonar supurativa, 34 pacientes portadores de fibrose cística e 28 pacientes com Bronquiectasias, sendo destes: três pacientes com Discinesia Ciliar Primária, um paciente com Deficiência de Imunoglobulina A, um paciente com Doença do Enxerto Versus Hospedeiro após transplante de medula óssea, um paciente com Sequela Pulmonar após pneumonite por Sarampo e 22 pacientes com Bronquiectasias de etiologia indefinida.

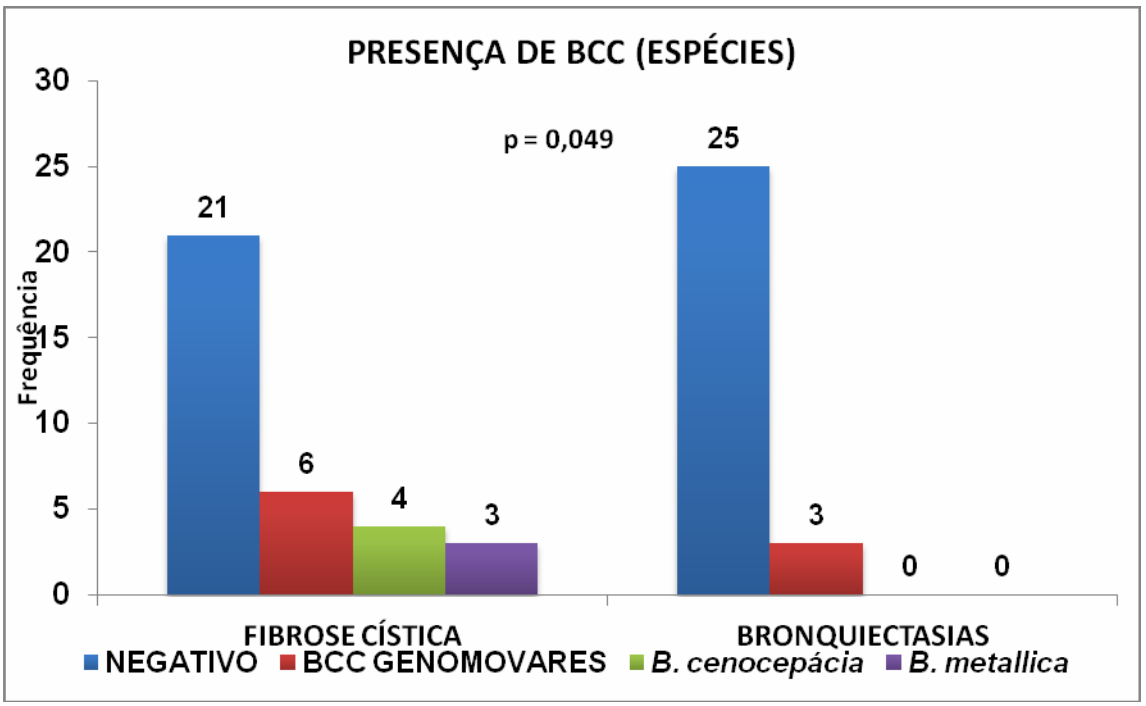
Observamos um número maior de pacientes com BCC em portadores de FC. A incidência de BCC no grupo de estudo foi de: 38% (13/34) em pacientes com FC e 10,7% (3/28) nos pacientes com Bronquiectasias. (Gráfico1)

Gráfico 1- Número de casos de pacientes colonizados por BCC em pacientes com doença pulmonar supurativa



A análise do sequenciamento genético da BCC para avaliação dos diferentes genomovares foi realizada em sete pacientes com FC, identificamos: três pacientes com *B.metallica* e quatro pacientes com *B.cenocepacia.*(Gráfico 2)

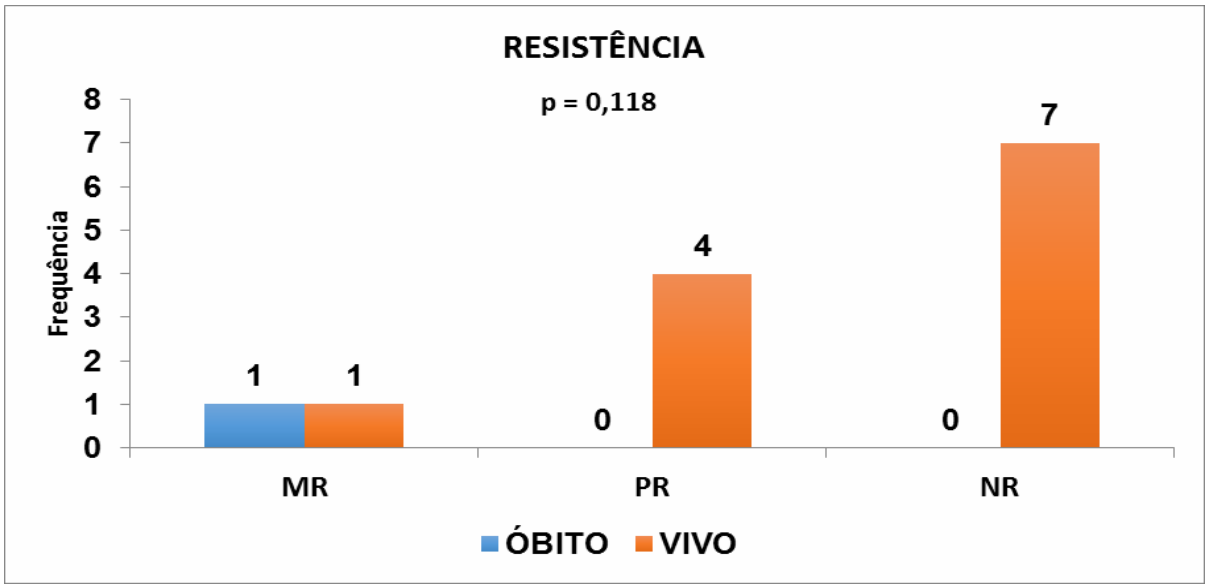
Gráfico 2- Caracterização dos genomovares nos pacientes colonizados por *Burkholderia cepacia complex*



Com relação aos testes de sensibilidade, nos pacientes com Bronquiectasias encontramos: 2 pacientes com BCC sensíveis à todas as drogas testadas (NR) e 1 paciente com BCC resistentes à 2 drogas (PR).

Com relação a resistência antimicrobiana em pacientes com FC, observamos dois casos de pacientes com BCC multiresistentes (MR), apenas um paciente com BCC MR evoluiu para óbito. Nos demais pacientes, quatro foram classificadas como BCC PR e sete como BCC NR, ambos não relacionados à óbito. O tratamento instituído nos pacientes com BCC MR foram respectivamente: meropenem, sulfametoxazol-trimetoprima, amicacina e meropenem, sulfametoxazol-trimetoprima, colestimetato.(Gráfico 3)

Gráfico 3- Resistência antimicrobiana dos isolados de *Burkholderia cepacia complex* em pacientes com FC submetidos ao transplante pulmonar
MR (MULTIRESISTENTE - TODAS AS DROGAS), PR (PANRESISTENTE -1 ou 2 DROGAS), NR (SENSÍVEL)



Correlação das Variáveis Clínicas com colonização/infecção por cepas de BCC em pacientes do estudo após transplante pulmonar

As características e medidas clínicas dos pacientes com FC e Bronquiectasias correlacionado com o diagnóstico laboratorial de BCC estão resumidos nas tabelas 1 e 2.

Foram incluídos, no grupo de pacientes com FC, vinte e um pacientes não colonizados/infectados por BCC (8F/13M; idade média 22,52± 7,06) e treze pacientes colonizados/infectados por BCC (8F/ 5M; 27,9 ± 10,7). No grupo de pacientes com Bronquiectasias foram incluídos vinte e cinco pacientes não colonizado/não infectados por BCC (7 F / 18 M; idade média 37,88 ±13,36) e três pacientes colonizados por BCC (1F/2M; idade média 44,33 ± 10,78). O IMC variou conforme descrito nas tabelas 1 e 2.

Disfunção primária do enxerto foi observada em maior número em pacientes com Bronquiectasias e a mortalidade também foi maior nesse grupo.

Tempo de internação, tempo de internação em unidade de terapia intensiva, rejeição aguda, disfunção crônica do enxerto, necessidade de pulsoterapia estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela-1- Análise descritiva - Fibrose Cística

	Não colonizados (n = 21)	***B.cenocepacia* (n = 4)**	***B.metallica* (n = 3)**	**BCC não genotipados (n = 6)**
IDADE	22,52 ± 7,06	27 ± 11,34	26,33 ± 14,57	29,33 ± 10,38
SEXO	8 F / 13 M	3 F / 1 M	2 F / 1 M	3 F / 3 M
IMC	18,66 ± 3,76	19,52 ± 5,10	19,5 ± 2,16	19,77 ± 3,95
TEMPO DE UTI (dias)	11,05 ± 11,37	22,75 ± 21,76	13 ± 13,86	10,5 ± 4,50
TEMPO DE INTERNAÇÃO (dias)	55,29 ± 23,87	52,5 ± 24,12	59,67 ± 34,79	43,16 ± 16,51
TEMPO DE TRANSPLANTE (meses)	36,43 ± 23,87	17,75 ± 10,90	48 ± 31,43	41,5 ± 9,09
ÓBITO	5 (23%)	1 (25%)	0	0
PGD	4 (19%)	2 (50%)	1 (33,3%)	0
DISFUNÇÃO CRÔNICA DO ENXERTO	2 (9,5%)	1 (25%)	2 (66,6%)	2 (33,3%)
REJEIÇÃO AGUDA	11 (52,3%)	3 (75%)	1 (33,3%)	5 (83,3%)
PULSOTERAPIA	12 (57,1%)	3 (75%)	1 (33,3%)	5 (83,3%)
RESISTÊNCIA	-	1 (25%)	2 (66,6%)	3 (50%)

Abreviações: IMC= índice de massa corporal; tempo de UTI= tempo de internação na unidade de terapia intensiva; PGD= disfunção primária do enxerto.

Tabela 2- Análise descritiva – Bronquiectasias

	Não colonizados (n = 25)	BCC (n = 3)
IDADE	37,88 ±13,36	44,33 ± 10,78
SEXO	7 F / 18 M	1 F / 2 M
IMC	21,49 ± 5,91	24,57 ± 1,71
TEMPO DE UTI (dias)	13,35 ± 20,89	38,66 ± 50,57
TEMPO DE INTERNAÇÃO (dias)	33,96 ± 33,84	61,66 ± 32,19
TEMPO DE TRANSPLANTE (meses)	26,16 ± 28,19	44 ± 36,75
ÓBITO	13 (52%)	1 (33,3%)
PGD *	14 (56%)	0
DISFUNÇAO CRONICA DO ENXERTO	2 (8%)	0
REJEIÇÃO AGUDA	6 (24%)	0
PULSOTERAPIA	6 (24%)	0
RESISTÊNCIA	-	1 (33,3%)

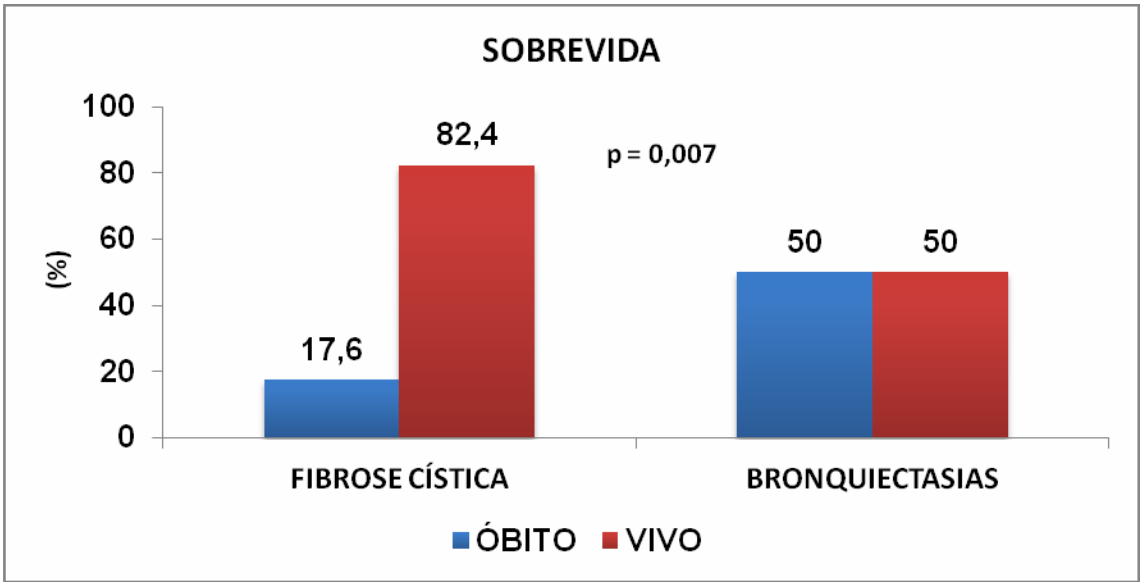
Abreviações: IMC= índice de massa corporal; tempo de UTI= tempo de internação na unidade de terapia intensiva; PGD= disfunção primária do enxerto.

Durante o seguimento, a mortalidade em pacientes com FC foi de 17,6% (6/34). Ocorreram seis óbitos e apenas um paciente colonizado por BCC, mas o óbito foi atribuído a sepse devido à *Acinetobacter baumannii* multidroga resistente. (Gráfico 4)

Os pacientes com Bronquiectasias apresentaram maior mortalidade no seguimento em comparação aos pacientes com FC. A mortalidade no grupo de pacientes com Bronquiectasias foi de 50% (14/28), sendo que nos colonizados/infectados por BCC ocorreu apenas 1 óbito. O paciente faleceu 97 dias após o transplante pulmonar por pneumonia aspirativa e sangramento,

levando a disfunção orgânica múltipla. Permaneceu todo o tempo internado em Unidade de terapia intensiva após a cirurgia. (Gráfico 4)

Gráfico 4- Taxa de Sobrevida dos Pacientes com Doença Pulmonar Supurativa após Transplante Pulmonar



Avaliação da Correlação das Variáveis Clínicas e laboratoriais (BCC) com Óbito

Nenhuma variável analisada pode ser associada ao maior risco de mortalidade nos pacientes com FC na análise univariada de regressão de COX. (Tabela3)

Tabela 3- Regressão de COX - análise univariada (Fibrose Cística)

VARIÁVEL	HR	IC (95%)	p
TEMPO DE INTERNAÇÃO	1,017	0,970 - 1,066	0,487
TEMPO DE UTI	1,045	0,993 - 1,099	0,090
BCC (SIM/NÃO)	0,312	0,036 - 2,674	0,288
PGD (SIM/NÃO)	0,732	0,086 - 6,271	0,776
SEXO (FEMININO/MASCULINO)	0,459	0,083 - 2,554	0,374
IMC (< = 18,5/> 18,5)	2,145	0,392 - 11,726	0,379
IDADE	0,990	0,904 - 1,085	0,832
DISFUNÇÃO CRÔNICA DO ENXERTO (SIM/NÃO)	0,631	0,073 - 5,449	0,675
REJEIÇÃO AGUDA (SIM/NÃO)	0,581	0,116 - 2,898	0,507

Abreviações: IMC= índice de massa corporal; tempo de UTI= tempo de internação na unidade de terapia intensiva; PGD= disfunção primária do enxerto.

Disfunção primária do enxerto (PGD) foi a única variável associada ao desfecho óbito com significância estatística. A variável disfunção crônica do enxerto não apresentou evento (óbito) (Tabela 4)

Tabela 4- Regressão de COX - análise univariada (Bronquiectasias)

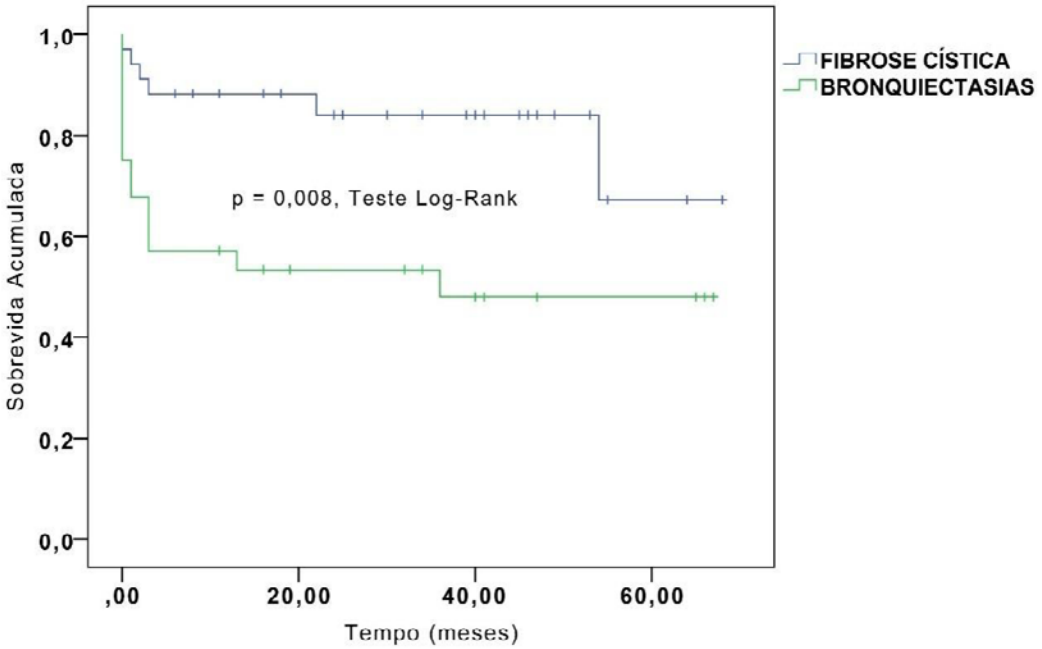
VARIÁVEL	HR	IC (95%)	p
TEMPO DE INTERNAÇÃO	1,009	0,977 - 1,042	0,575
TEMPO DE UTI	1,01	0,990 - 1,030	0,337
BCC (SIM/NÃO)	0,538	0,070 - 4,127	0,551
PGD (SIM/NÃO) *	11,08	2,290 - 53,602	0,003
SEXO (FEMININO/MASCULINO)	1,535	0,513 - 4,591	0,444
IMC (< = 18,5/> 18,5)	2,541	0,562 - 11,478	0,226
IDADE	1,021	0,978 - 1,066	0,334
DISFUNÇÃO CRÔNICA DO ENXERTO (SIM/NÃO)	-	-	-
REJEIÇÃO AGUDA (SIM/NÃO)	0,224	0,029 - 1,722	0,150

Abreviações: IMC= índice de massa corporal; tempo de UTI= tempo de internação na unidade de terapia intensiva; PGD= disfunção primária do enxerto.

Desfecho Clínico avaliado através da Curva de Sobrevida dos pacientes com Doença Pulmonar Supurativa

Observamos um aumento da mortalidade no grupo Bronquiectasias principalmente no primeiro mês após o transplante. Este aumento pode estar correlacionado com a alta incidência da disfunção primária do enxerto nestes pacientes. (Gráfico 5)

Gráfico 5- Kaplan-Meier curva sobrevida acumulada de pacientes com doença pulmonar supurativa submetidos ao transplante pulmonar

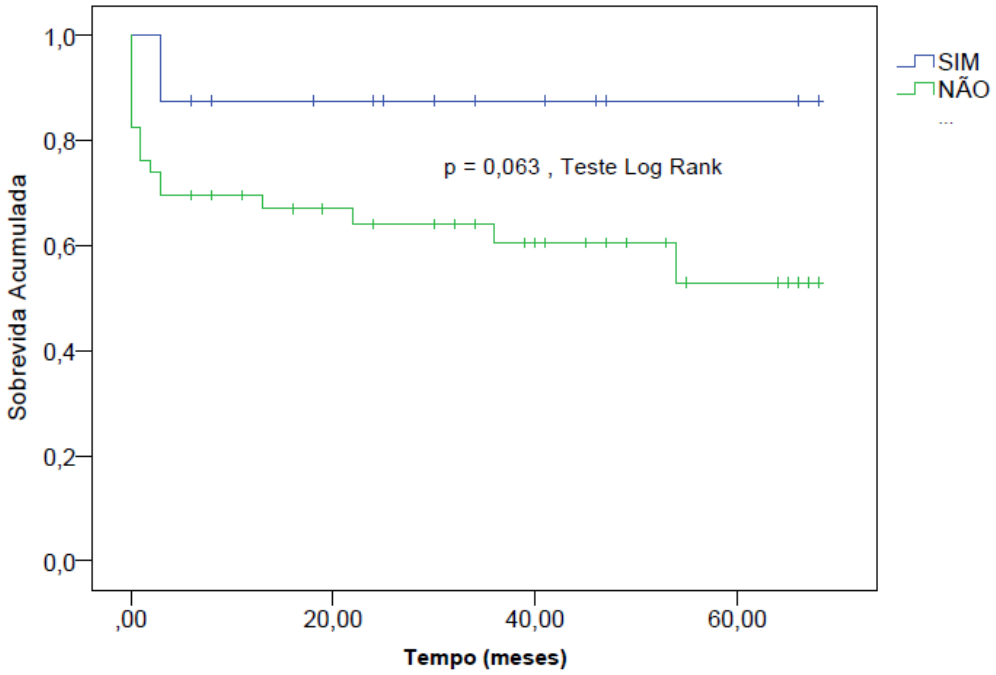


NÚMERO DE PACIENTES EM RISCO

TEMPO (MESES)	**0**	**20**	**40**	**60**
Número de pacientes com Fibrose Cística	34	30	29	28
Número de pacientes com Bronquiectasias	28	15	14	14

Durante o seguimento ocorreram 2 óbitos em pacientes com Doença Pulmonar Supurativa colonizados por BCC. BCC não foi um fator relacionado à óbito no grupo de estudo.(Gráfico 6)

Gráfico 6- Kaplan-Meier curva sobrevida acumulada de pacientes com doença pulmonar supurativa colonizados ou não por *Burkholderia cepacia complex* submetidos ao transplante pulmonar

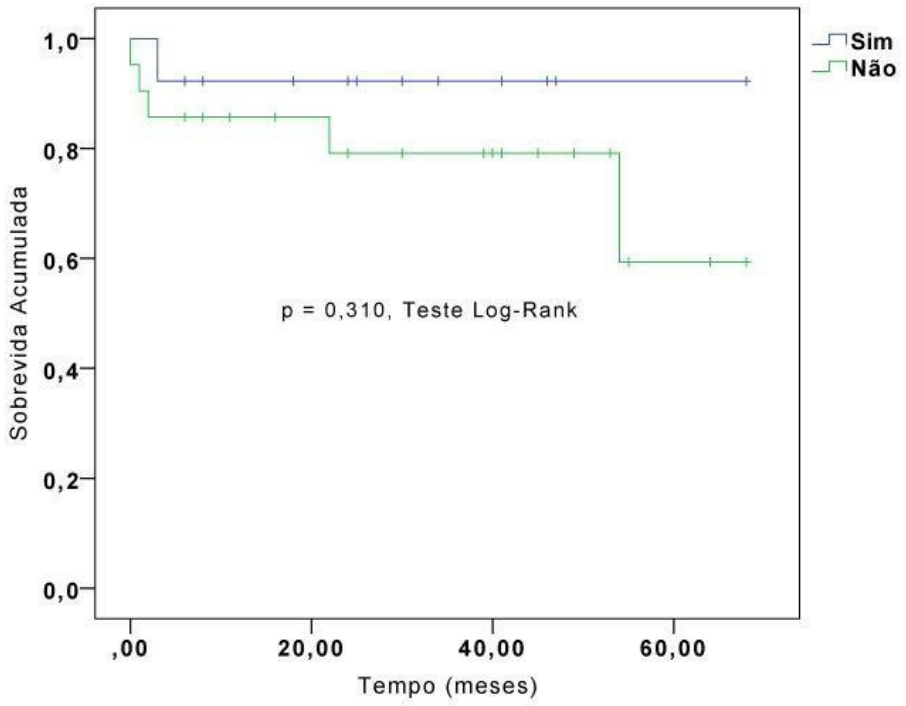


NÚMERO DE PACIENTES EM RISCO

TEMPO (MESES)	**0**	**20**	**40**	**60**
Número de pacientes com Doença Pulmonar Supurativa (Não)	46	30	29	28
Nùmero de pacientes com *Burkholderia cepacia complex* (Sim))	16	14	14	14

Quando comparamos a colonização por BCC em pacientes com FC e os pacientes com FC não colonizados, observamos que a colonização por BCC não gerou impacto na mortalidade (p=0,310). (Gráfico 7)

Gráfico 7- Kaplan- Meier Curva de sobrevida acumulada de pacientes com Fibrose Cística colonizados ou não por *Burkholderia cepacia complex* submetidos ao transplante pulmonar

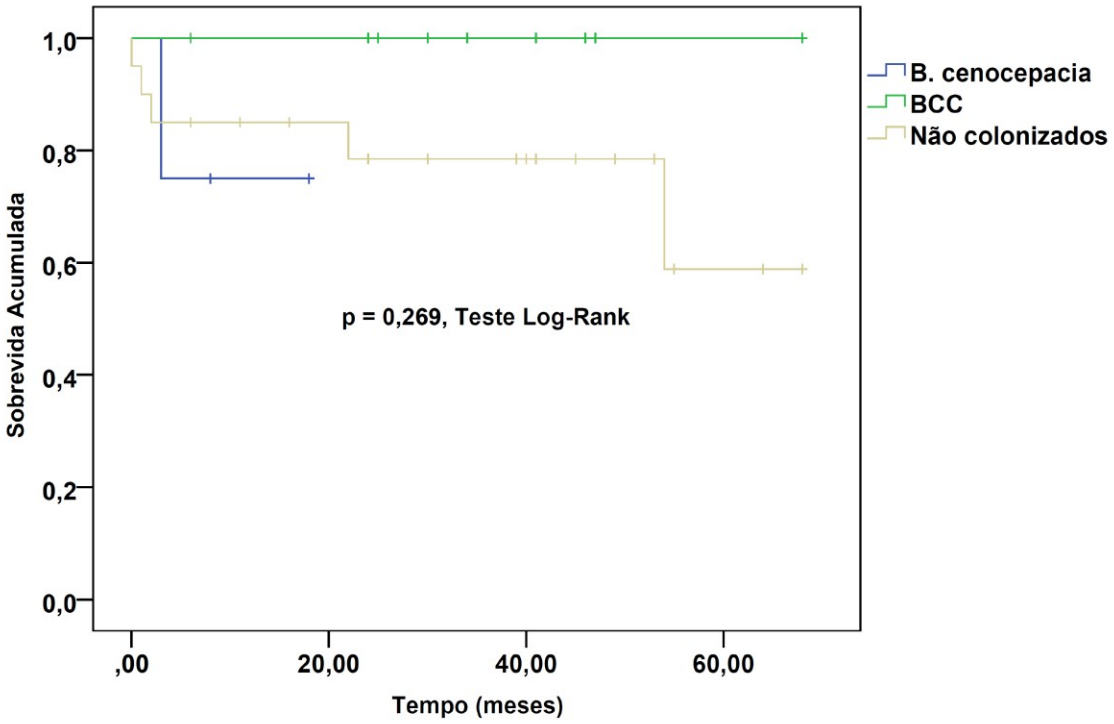


NÚMERO DE PACIENTES EM RISCO

TEMPO (MESES)	**0**	**20**	**40**	**60**
Pacientes com FC colonizados por BCC (Sim)	13	12	12	12
Pacientes com FC colonizados por BCC (Não)	21	18	17	16

Na curva de sobrevida comparativa entre pacientes colonizados por BCC e *B.cenocepacia* não encontramos diferença estatisticamente significante. (Gráfico 8)

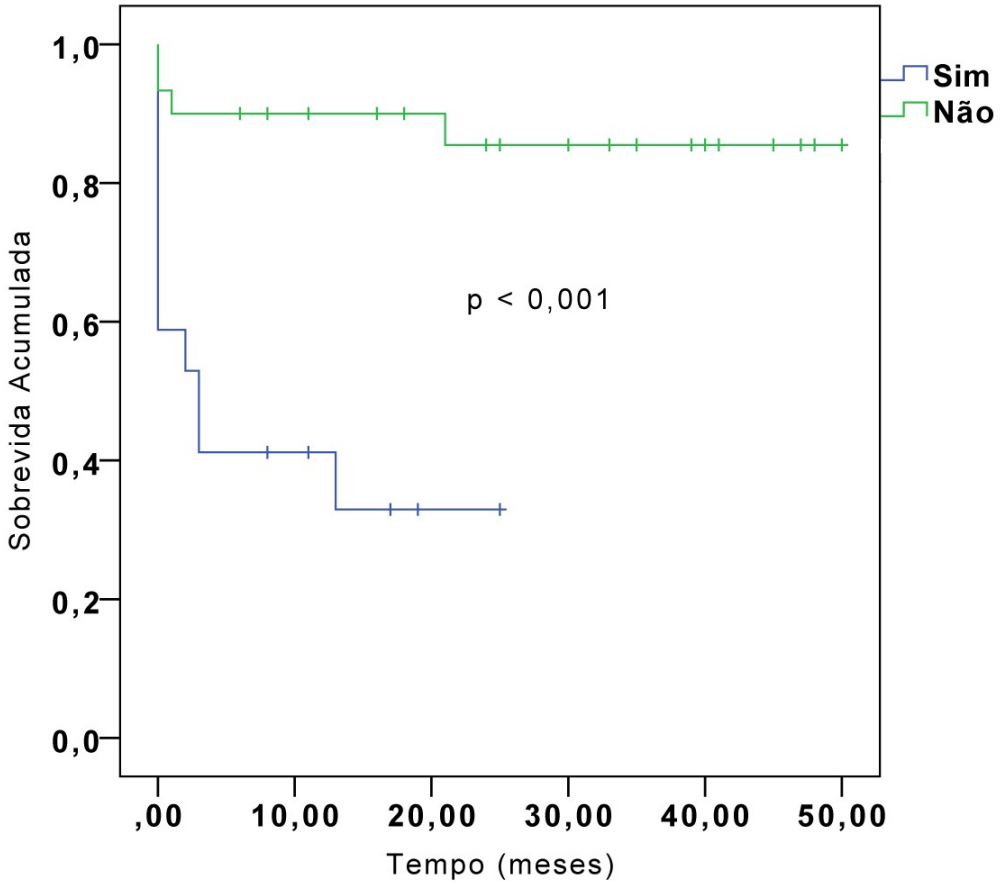
Gráfico 8- Kaplan- Meier - Curva de sobrevida acumulada de pacientes com Fibrose Cística submetidos ao transplante pulmonar de acordo com o status de colonização por BCC



NÚMERO DE PACIENTES EM RISCO				
TEMPO (MESES)	**0**	**20**	**40**	**60**
Pacientes colonizados por *B. cenocepacia*	4	3	-	-
Pacientes colonizados por BCC	9	9	9	9
Pacientes não colonizados	21	18	17	16

Os pacientes que desenvolveram disfunção primária do enxerto (PGD) apresentaram elevada mortalidade. A PGD é um fator fortemente relacionado a mortalidade no primeiro ano após transplante pulmonar. (Gráfico 9)

Gráfico 9- Kaplan-Meier curva de sobrevida acumulada de pacientes com doença pulmonar supurativa após o transplante pulmonar com ou sem diagnóstico de Disfunção primária do Enxerto (PGD).

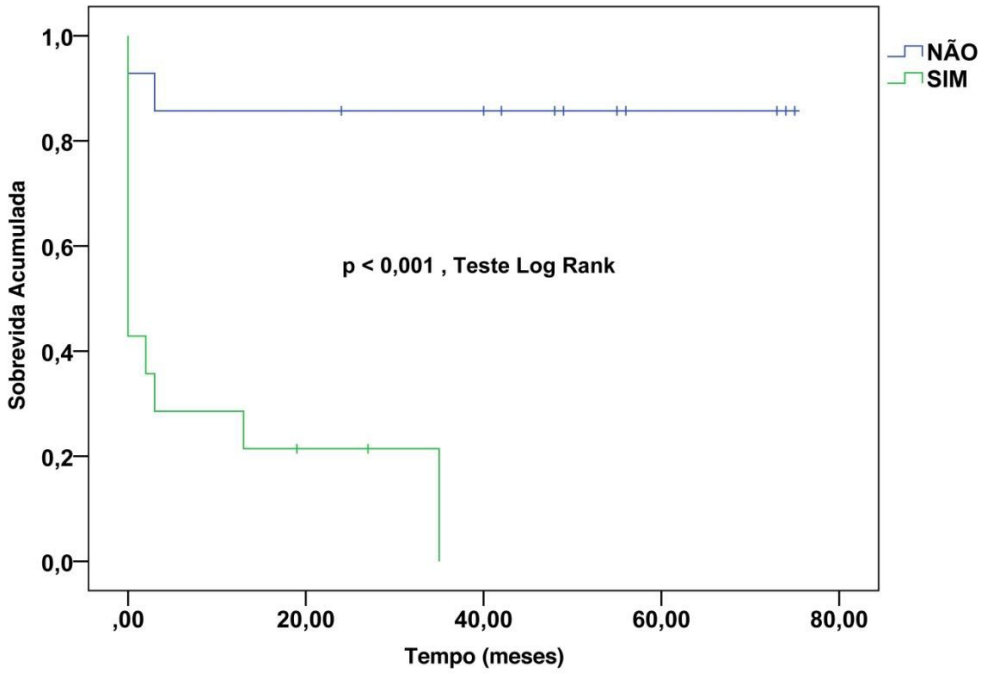


NÚMERO DE PACIENTES EM RISCO

TEMPO (MESES)	**0**	**20**	**40**	**50**
Número de pacientes sem PGD (Não)	41	40	39	39
Número de Pacientes com PGD (Sim)	21	3	3	3

Disfunção primária do enxerto no presente estudo está relacionada a mortalidade nos primeiros meses pós transplante pulmonar em pacientes com Bronquiectasias. (Gráfico 10)

Gráfico 10- Kaplan-Meier curva de sobrevida acumulada de pacientes com Bronquiectasias após o transplante pulmonar com ou sem diagnóstico de Disfunção primária do Enxerto (PGD).



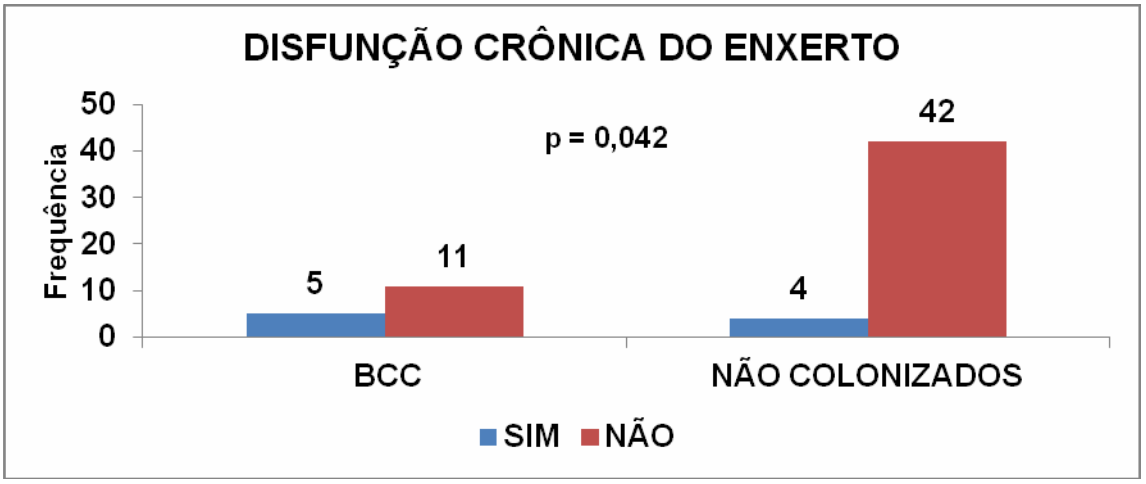
NÚMERO DE PACIENTES EM RISCO

TEMPO (MESES)	**0**	**20**	**40**	**60**
Pacientes com Bronquiectasias sem PGD (Não)	14	13	13	13
Pacientes com Bronquiectasias com PGD (Sim)	14	2	1	1

Quando analisamos a proporção de disfunção crônica de enxerto nos pacientes com Doença Pulmonar Supurativa colonizados por BCC e comparamos com os pacientes não colonizados por essa bactéria, encontramos um risco 3,6 vezes maior nos pacientes com Doença Pulmonar

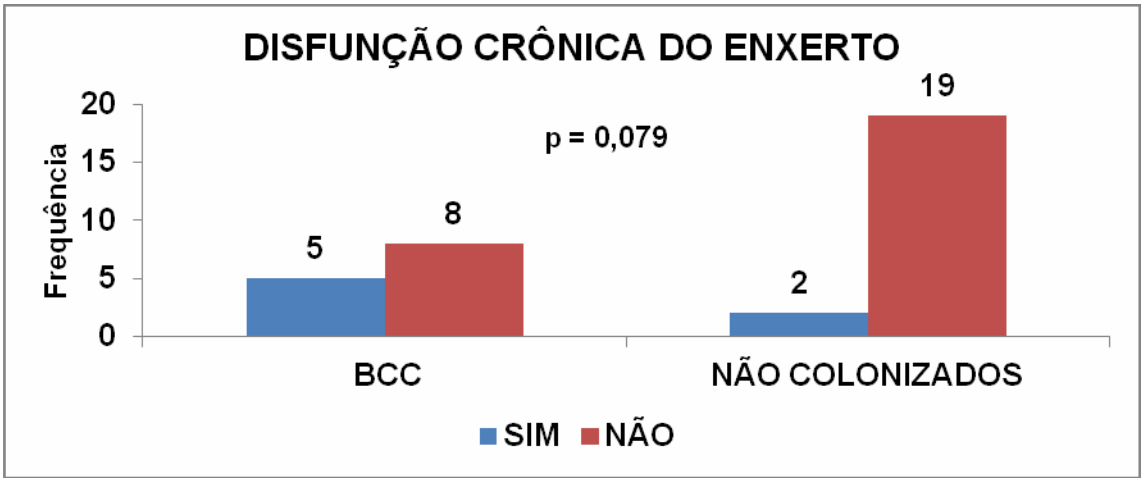
Supurativa colonizados por BCC de apresentarem disfunção crônica do enxerto. RR 3,6 IC 95% (1,09-11,75). (Gráfico 11)

Gráfico 11- Disfunção Crônica do Enxerto Pulmonar nos pacientes com Doença Pulmonar Supurativa de acordo com o status colonização por *Burkholderia cepacia complex*



Quando analisamos disfunção crônica de enxerto no grupo de pacientes com FC, colonizados e não colonizados por BCC, não observamos significância estatística. RR 4,03 IC95% (0,91-17,86). (Gráfico 12)

Gráfico 12- Disfunção Crônica do Enxerto Pulmonar nos pacientes com Fibrose Cística de acordo com o status de colonização por *Burkholderia cepacia complex*



6. Discussão

Estudos prévios confirmam que a colonização por BCC genomovar III (*B.cenocepacia*) está associada a menor sobrevida após transplante de pulmão e maior mortalidade nos primeiros meses pós transplante pulmonar[16,20,19]. Assim, considerando escassez de doadores e aumento da mortalidade em lista, alguns centros têm optado por não incluir pacientes colonizados por *B. cenocepacia* da lista de espera para transplante de pulmão.

No presente estudo foram realizados 132 transplantes pulmonares, 62 pacientes com doença pulmonar supurativa.O transplante pulmonar bilateral foi realizado em todos os pacientes do estudo e a colonização por BCC foi observada em 25,8% dos pacientes (16/64). Durante o seguimento, apenas 2 óbitos foram observados no grupo de pacientes com doença pulmonar supurativa e colonizados por BCC (2/16): 1 óbito em paciente com FC, 62 dias após o trasnplante pulmonar, o óbito foi atribuído a choque séptico devido a *Acinetobacter baumannii* multi droga resistente e 1 óbito em paciente com Bronquiectasias, 97 dias após o transplante pulmonar, por disfunção orgânica múltipla (pneumonia aspirativa e sangramento).

A identificação de BCC em meio de cultura seletivo no Laboratório de Microbiologia da nossa Instituição, tornou-se rotineiramente realizada em todas as culturas de escarro e lavado broncoalveolar a partir do ano 2008, e a identificação das espécies de BCC no Laboratório de Biologia Molecular realizada através do método de sequenciamento do gene *RecA*, iniciou-se no ano de 2012.

A primeira descrição do sequenciamento do gene *RecA* foi descrita em 2000 por Mahenthiralingam et al.[15] ; esse gene modifica uma proteína

multifuncional de mesmo nome que atua, dentre outras funções, na recombinação e no reparo do DNA da bacteriano lesado, e tem sido explorado como marcador filogenético em vários gêneros de bactérias, apresentando diferenças pontuais capazes de permitir a caracterização das espécies[85].

Não observamos durante o acompanhamento dos pacientes a colonização/infecção por BCC após o transplante pulmonar (TxP) no grupo de pacientes com FC. Todos as culturas positivas para BCC ocorreram durante o período pré e no intraoperatório do TxP. Dos três pacientes com Bronquiectasias colonizados por BCC, dois tiveram crescimento da bactéria também após o primeiro ano de TxP.

O presente estudo mostrou que a distribuição dos genomovares da BCC em nosso grupo de pesquisa teve o predomínio de *B. cenocepacia* e *B. metalica,* a incidência da colonização/infecção por BCC foi de 38% em pacientes com FC (13/34) e 10,7% (3/28) nos pacientes com Bronquiectasias, valor este significantemente maior que a incidência descrita atualmente para a população de pacientes americanos com FC que foi de 2,6%[6]. Dados sobre pacientes com Bronquiectasias colonizados por BCC submetidos ao transplante pulmonar são escassos.

Em um estudo descritivo realizado em nossa Instituição entre o ano de 2000 a 2011, 20% dos transplantes pulmonares foram realizados em pacientes com FC, constituindo a segunda maior indicação de TxP e de 30 pacientes com FC apenas 4 pacientes estavam colonizados por BCC e, apesar de ser uma doença de envolvimento de múltiplos órgãos com características que podem agravar a morbidade e mortalidade após TxP, esses pacientes tiveram as melhores taxas de sobrevida após o transplante, quando comparado com todos os outros tipos de indicação[86].

Alguns estudos retrospectivos de centros individuais mostraram taxas de mortalidade proibitivas para o transplante em pacientes com FC colonizados por *B.cenocepacia*, e por conseguinte, contraindicação para o procedimento[18,19,20].

A melhor evidência sobre o tema foi uma metanálise que reuniu estudos publicados abordando a seleção de pacientes com FC colonizados por BCC. A conclusão desta foi que a colonização por BCC não teve impacto na sobrevida após TxP e, portanto, não deve ser uma contraindicação à realização do procedimento. Mesmo a colonização por *B.cenocepacia* não deve ser considerada uma contraindicação absoluta ao TxP, mas sim ponderada como um risco realista, dentre outros no processo de seleção de candidatos, para a sobrevida a longo prazo após TxP[87].

Nosso estudo não encontrou nenhuma diferença na sobrevida após TxP entre pacientes colonizados ou não por BCC, mesmo quando B.cenocepacia foi analisada separadamente. Apesar da limitação do tamanho da amostra, sobretudo dos pacientes com análise de genotipagem (7/62), fato que nos impossibilita uma conclusão definitiva sobre mortalidade, trata-se do primeiro estudo realizado no Brasil que correlaciona a colonização pela BCC com evolução clínica dos pacientes.

A diferença na mortalidade devido à infecção *B.cenocepacia* observado em nosso estudo pode estar relacionada com fatores do hospedeiro. Determinantes genéticos da população, a resposta imune do hospedeiro, e a interação entre *B.cenocepacia* e a microbiota respiratória

prevalente em pacientes com FC no Brasil ainda não foram amplamente explorados; a interação hospedeiro - parasita pode ser diferente na população brasileira. Em relação ao estudo genético, Faucz e colaboradores[88] demonstraram uma maior heterogeneidade das mutações do gene CFTR na população de pacientes com FC em vários estados brasileiros em comparação a outras populações da Europa, estudos da microbiota pulmonar e das diferentes mutações genéticas em pacientes com FC submetidos ao transplante pulmonar estão atualmente em curso na nossa instituição.

Somente no ano de 2012, análise genética de BCC foi iniciada em nossa instituição, e apesar da pequena amostra, nossa coorte teve grande importância no conhecimento dos pacientes submetidos a transplante de pulmão em relação à infecção do BCC, bem como pelos diferentes subtipos BCC, e também a evolução dos pacientes infectados.

Por um curto período de seguimento (5 anos e 1 ano para os desfechos clínicos) encontramos 16 BCC e tivemos a oportunidade de analisar geneticamente sete cepas e identificamos quatro *B.cenocepacia*. De Soyza et al, [20] em um centro de transplante pulmonar maior que o nosso, encontraram 22 BCC e 12 *B. cenocepacia* em um seguimento de 10 anos. Eles mostraram uma mortalidade 9/12 (75%) e no presente estudo foram 01/04 (25%).

No atual trabalho, observamos uma maior incidência de disfunção primária do enxerto (PGD) no grupo de pacientes com Bronquiectasias (14/28) em comparação ao grupo de pacientes com FC (7/34); entretanto os pacientes com Bronquiectasias colonizados por BCC não apresentaram disfunção primária do enxerto.

PGD esteve relacionada a uma maior mortalidade nos pacientes com Bronquiectasias, o que não aconteceu com os pacientes com FC. Embora a PGD seja causa conhecida de morbi-mortalidade precoce e de incidência de disfunção crônica do enxerto pulmonar[89], neste estudo, tal aumento de mortalidade não pode ser atribuido somente a PGD, já que a causa imediata mais frequente do óbito foi disfunção orgânica múltipla, e não disfunção aguda do enxerto pulmonar isolada.

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da disfunção crônica do enxerto pulmonar, infecções recorrentes por *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus sp* e vírus respiratórios são estabelecidas na literatura[90]. Quando analisamos em conjunto os pacientes com Doença Pulmonar Supurativa, encontramos uma maior frequência da disfunção crônica do enxerto nos pacientes com infecção por BCC (5/16 vs. 4/46), porém esta associação causal entre infecção por BCC e disfunção crônica do enxerto necessita de estudos com maior número de pacientes.

Uma análise mais adequada do impacto clínico da colonização pela BCC nos pacientes com outras causas de Bronquiectasias não foi possível devido a muito baixa ocorrência de eventos no presente estudo (3/28 pacientes). Esta incidência muito baixa quando comparada ao grupo de pacientes com FC, pode significar uma característica clínica de interação entre hospedeiro e microbioma distintos, não favorecendo a colonização pela BCC.

Concluindo, os pacientes colonizados por BCC não tiveram um pior prognóstico em comparação aos não colonizados, a taxa de mortalidade durante o seguimento desses pacientes foi baixa (2 óbitos em 16 infectados por BCC).

Colonização/infecção por *Burkholderia cepacia complex* não teve qualquer impacto sobre a taxa de mortalidade dos pacientes com FC após o transplante pulmonar, mesmo depois de realizada a genotipagem e observada *B.cenocepacia.*

Portanto, apesar da limitação de tamanho de amostra, até o momento, não consideramos adequado em nosso centro a contraindicação ao transplante de pacientes colonizados por BCC, mesmo naqueles colonizados por genomovar III.

7. Conclusões

- Nosso estudo não observou pior prognóstico ou maior mortalidade nos pacientes com doença pulmonar supurativa colonizados por BCC submetidos ao transplante pulmonar

- A incidência de colonização do trato respiratório por BCC nesta população de pacientes com doença pulmonar supurativa foi 25,8% (16/62).

- A análise do genomovar foi realizada em 7 pacientes, sendo *B.cenocepacia* (4/7) e *B.metallica* (3/7) os subtipos encontrados.

- A resistência antimicrobiana das cepas de BCC não se correlacionou com pior evolução clínica dos pacientes.

- Disfunção primária do enxerto foi a única variável clínica relacionada com mortalidade no grupo de pacientes com Bronquiectasias.

- Pacientes com Bronquiectasias apresentaram maior mortalidade durante o estudo comparado com o grupo de pacientes com Fibrose Cística.

8. Anexos

Anexo 1- Tabela de valores absolutos- Fibrose Cística

ID	IDADE	SEXO	IMC	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*	BCC
1	20	F	14,8	NÃO	SIM	N
2	20	F	17	SIM	SIM	*B.metallica*
3	25	F	19,1	NÃO	SIM	N
4	19	F	17	NÃO	SIM	N
5	22	M	17,4	NÃO	SIM	N
6	11	M	20,7	SIM	SIM	N
7	35	M	24	NÃO	NÃO	N
8	20	M	18	SIM	SIM	N
9	31	F	21,2	SIM	SIM	BCC não genotipado
10	27	F	18	SIM	SIM	N
11	43	F	20,8	SIM	SIM	*B.metallica*
12	20	M	13,8	SIM	SIM	N
13	19	M	19,2	SIM	SIM	N
14	36	M	23,9	SIM	SIM	BCC não genotipado
15	32	M	22,9	SIM	SIM	N
16	38	M	27,2	NÃO	SIM	N
17	19	F	21,7	SIM	NÃO	N
18	27	M	22,5	NÃO	SIM	N
19	40	M	17,3	NÃO	SIM	BCC não genotipado
20	18	F	24	SIM	SIM	BCC não genotipado
21	15	F	20	SIM	SIM	N
22	36	F	18,1	NÃO	SIM	BCC não genotipado
23	24	M	14,1	NÃO	SIM	N
24	15	M	14,1	SIM	SIM	BCC não genotipado
25	20	F	16,8	SIM	SIM	*B.cenocepacia*
26	18	F	13,7	NÃO	SIM	*B.cenocepacia*
27	14	F	11,1	SIM	NÃO	N
28	26	M	17,7	NÃO	SIM	N
29	21	M	17,6	SIM	SIM	N
30	27	F	19,5	SIM	SIM	N
31	43	F	23,6	NÃO	SIM	*B.cenocepacia*
32	27	M	24	NÃO	NÃO	*B.cenocepacia*
33	12	M	15,6	NÃO	NÃO	N
34	16	M	20,7	SIM	NÃO	*B.metallica*

Abreviações: Id= identificação do paciente; IMC= índice de massa corporal;

Anexo 1- Tabela de valores absolutos- Fibrose Cística

ID	RESISTÊNCIA	PGD	PULSOTERAPIA	DISFUNÇÃO CRÔNICA DO ENXERTO	REJEIÇÃO AGUDA
1		NÃO	SIM	NÃO	SIM
2	NR	SIM	SIM	SIM	SIM
3		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
4		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
5		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
6		NÃO	SIM	NÃO	SIM
7		NÃO	SIM	NÃO	SIM
8		NÃO	SIM	NÃO	SIM
9	PR	NÃO	SIM	SIM	SIM
10		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
11	PR	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
12		NÃO	SIM	SIM	SIM
13		NÃO	SIM	NÃO	SIM
14	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
15		NÃO	SIM	NÃO	SIM
16		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
17		NÃO	SIM	NÃO	SIM
18		NÃO	SIM	NÃO	SIM
19	NR	NÃO	SIM	SIM	SIM
20	PR	NÃO	SIM	NÃO	SIM
21		NÃO	SIM	NÃO	SIM
22	NR	NÃO	SIM	NÃO	SIM
23		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
24	PR	NÃO	SIM	NÃO	SIM
25	PR	SIM	SIM	NÃO	SIM
26	PR	NÃO	SIM	SIM	SIM
27		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
28		NÃO	SIM	NÃO	SIM
29		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
30		SIM	SIM	SIM	NÃO
31	PR	NÃO	SIM	NÃO	SIM
32	MR	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
33		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
34	MR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO

Abreviações: Id= identificação do paciente; MR (MULTIRESISTENTE- TODAS AS DROGAS), PR (PANRESISTENTE -1 ou 2 DROGAS), NR (SENSÍVEL) ;PGD= disfunção primária do enxerto.

Anexo 2- Tabela valores absolutos - Bronquiectasias

ID	IDADE	SEXO	IMC	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*	BCC
1	26	M	20	SIM	SIM	N
2	27	F	24,3	SIM	NÃO	N
3	52	M	24,3	NÃO	SIM	BCC não genotipado
4	53	M	21,6	NÃO	NÃO	N
5	28	F	19,6	NÃO	SIM	N
6	30	M	18,6	NÃO	SIM	N
7	38	M	20,2	SIM	SIM	N
8	49	M	23	SIM	SIM	BCC não genotipado
9	55	F	24	NÃO	NÃO	N
10	46	M	25	SIM	SIM	N
11	32	F	26,4	SIM	SIM	BCC não genotipado
12	19	M	21,7	SIM	SIM	N
13	27	M	28,4	NÃO	NÃO	N
14	17	M	18,6	NÃO	NÃO	N
15	39	M	21,6	NÃO	SIM	N
16	61	M	26,4	NÃO	SIM	N
17	47	M	22,3	NÃO	NÃO	N
18	29	F	19,2	SIM	NÃO	N
19	54	M	36	SIM	SIM	N
20	43	M	25	SIM	SIM	N
21	46	F	20	NÃO	NÃO	N
22	18	F	17,2	NÃO	NÃO	N
23	36	M	20,4	NÃO	NÃO	N
24	56	M	20,7	NÃO	NÃO	N
25	46	M	22	NÃO	NÃO	N
26	17	F	29,,6	SIM	NÃO	N
27	45	M	21,3	NÃO	NÃO	N
28	44	M	23,2	NÃO	NÃO	N

Abreviações: Id= identificação do paciente; IMC= índice de massa corporal;

Anexo 2- Tabela valores absolutos – Bronquiectasias

ID	RESISTÊNCIA	PGD	PULSOTERAPIA	DISFUNÇÃO CRÔNICA DO ENXERTO	REJEIÇÃO AGUDA
1		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
2		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
3	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
4		NÃO	SIM	NÃO	SIM
5		NÃO	NÃO	SIM	NÃO
6		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
7		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
8	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
9		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
10		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
11	PR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
12		NÃO	SIM	NÃO	SIM
13		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
14		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
15		NÃO	SIM	NÃO	SIM
16		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
17		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
18		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
19		SIM	SIM	SIM	SIM
20		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
21		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
22		SIM	SIM	NÃO	SIM
23		NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
24		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
25		SIM	SIM	NÃO	SIM
26		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
27		SIM	NÃO	NÃO	NÃO
28		SIM	NÃO	NÃO	NÃO

Abreviações: Id= identificação do paciente; MR (MULTIRESISTENTE- TODAS AS DROGAS), PR (PANRESISTENTE -1 ou 2 DROGAS), NR (SENSÍVEL) ;PGD= disfunção primária do enxerto.

Anexo 3- Tabela de valores absolutos- Fibrose Cística (causa óbito x tempo internação)

ID	ÓBITO	CAUSA DO ÓBITO	TEMPO UTI (DIAS)	TEMPO INTERNAÇÃO (DIAS)	TEMPO TRANSPLANTE (MESES)
1	SIM	SEPSE POR ASPERGILLUS APÓS TRANSPLANTE RENAL	7	109	54
2	NÃO		29	74	76
3	NÃO		16	74	76
4	NÃO		11	40	72
5	SIM	TROMBOEMBOLISMO PULMONAR	7		0
6	NÃO		24	73	63
7	NÃO		9	41	61
8	NÃO		12	73	57
9	NÃO		11	50	55
10	SIM	HEPATITE FULMINANTE	6		0
11	NÃO		5	85	54
12	SIM		9	76	21
13	NÃO		9	89	53
14	NÃO		16	25	49
15	NÃO		5	17	49
16	NÃO		12	89	48
17	NÃO		7	30	47
18	SIM	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO E PNEUMONIA	55		1
19	NÃO		5	40	42
20	NÃO		15	52	38
21	SIM	TRANSFERIDA PARA OUTRO SERVIÇO			38
22	NÃO		10	25	33
23	NÃO		6	23	33
24	NÃO		6	67	32
25	NÃO		44	82	26
26	NÃO		5	51	26
27	NÃO		7	28	24
28	NÃO		5	41	19
29	NÃO		3	43	19
30	NÃO		4	70	16
31	NÃO		3	54	16
32	SIM	CHOQUE SEPTICO POR *ACINETOBACTER*	39	23	3
33	NÃO		7	24	14
34	NÃO		5	20	14

Abreviações: tempo de UTI= tempo de internação na unidade de terapia intensiva.

Anexo 4- Tabela de valores absolutos- Bronquiectasias (causa óbito x tempo internação)

ÓBITO	CAUSA DO ÓBITO	TEMPO UTI (DIAS)	TEMPO INTERNAÇÃO (DIAS)	TEMPO TRANSPLANTE (MESES)
SIM	DISFUNÇÃO ORGANICA MULTIPLA	2	0	0
NÃO		13	38	75
NÃO		7	34	74
NÃO		6	27	74
NÃO		8	30	74
NÃO		6	19	73
SIM	PERICARDITE	4	43	35
SIM	DISFUNÇÃO ORGANICA MULTIPLA	97	97	3
SIM	COMPLICAÇÃO CIRURGICA	15	0	0
NÃO		5	27	56
NÃO		12	54	55
NÃO		8	46	49
NÃO		10	103	48
NÃO		7	71	42
NÃO		11	56	40
SIM	DISFUNÇÃO ORGANICA MULTIPLA	2	0	0
SIM	SEPSE KLEBSIELA -KPC	72	0	2
SIM	DISFUNÇÃO ORGANICA MULTIPLA	7	0	0
NÃO		12	71	27
SIM	COMPLICAÇÃO CIRURGICA	2	0	0
SIM	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL HEMORRÁGICO	23	0	0
SIM	BRONCOASPIRAÇÃO	7	43	13
NÃO		10	78	24
SIM	CHOQUE SEPTICO PESUDOMONAS E ACINETOBACTER	11	98	3
NÃO		8	16	19
SIM	CHOQUE HEMORRAGICO	4	0	0
SIM	CHOQUE HEMORRAGICO	3	0	0
SIM	DISFUNÇÃO ORGANICA MULTIPLA	2	0	0

Abreviações: tempo de UTI= tempo de internação na unidade de terapia intensiva

9. Referências Bibliográficas

1. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Stehlik J. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-first Adult Lung and Heart–Lung Transplant Report—2014; Focus Theme: Retransplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplant.* Elsevier; 2014;33(10):1009–24.

2. David-Neto E. Ano XXI N^{o} 1. 2015;Registro Brasileiro de Transplantes [www.abto.org.br]. Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada Estado Ano XX Nº1[acces June 23, 2015] available in:http://www.abto.org.br/abtov03/upload/file/RBT/2015/rbt20158052015- lib.pdf

3. N. p. http://portal.saude.gov.br/portal/saude[acces June 23, 2015].

4. Costa da Silva F, Afonso JE, Pêgo-Fernandes PM, Caramori ML, Jatene FB. São Paulo lung transplantation waiting list: patient characteristics and predictors of death. *Transplant Proc*. 2009;41(3):927–31.

5. Afonso Júnior JE, De Campos Werebe E, Carraro RM, Henrique De Oliveira R, Teixeira B, Fernandes LM, Abdalla LG, Samano MN, Pêgo-Fernandes PM. Transplante pulmonar Lung transplantation. *Einstein*. 2015;13(2):297–304.

6. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2013 Annual Data Report to the Center Directors. 2014;1–92.

7. Hauser N, Orsini J. Cepacia Syndrome in a Non-Cystic Fibrosis Patient*. Case Rep Infect Dis.* Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015:1–4.

8. Mahenthiralingam E. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatr Respir Rev*. 2014;15(S1):13–5.

9. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(8):918–51.

10. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. Burkholderia cepacia complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 2002;51(7):533–8.

11. Lynch JP. Burkholderia cepacia Complex: Impact on the cystic fibrosis lung lesion. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009. p. 596–610.

12. Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the Burkholderia cepacia complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34(2):87–95.

13. Ramsay K a., Butler C a., Paynter S, Ware RS, Kidd TJ, Wainwright CE, Bell SC. Factors Influencing Acquisition of Burkholderia cepacia Complex Organisms in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):3975–80.

14. De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, Lipuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M, Ginther JL, Wagner DM, Keim P, Bell SC, Jacobs JA, Currie BJ, Vandamme P. Burkholderia stagnalis sp.nov. and Burkholderia territorii sp.nov., two novel Burkhoderia cepacia complex species from environmental and human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.2015;65(7):2265-2271.

15. Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, et al. Infection with Burkholderia cepacia Complex Genomovars in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genomovar III Can Replace Burkholderia multivorans*. Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1469–75.

16. Aris RM, Routh JC, LiPuma JJ, Heath DG, Gilligan PH. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with Burkholderia cepacia complex. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(11):2102–6.

17. Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, Krajden M, Chan C, Winton T, Keshavjee S, Scavuzzo M, Tullis E, Hutcheon M, Kesten S. Infection with Burkholderia cepacia in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:43–8.

18. Boussaud V, Guillemain R, Grenet D, Coley N, Souilamas R, Bonnette P, Stern M. Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonised with Burkholderia cepacia complex: results from two French centres. *Thorax.* 2008;63(8):732–7.

19. Alexander BD, Petzold EW, Reller LB, Palmer SM, Davis RD, Woods CW, Lipuma JJ. Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with Burkholderia cepacia complex. *Am J Transplant*. 2008;8(5):1025–30.

20. De Soyza A, Meachery G, Hester KLM, Nicholson A, Parry G, Tocewicz K, 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.

21. Martins KM, Fongaro GF, Dutra Rodrigues AB, Tateno AF, Azzuz-Chernishev AC, de Oliveira-Garcia D, et al. Genomovar status, virulence markers and genotyping of Burkholderia cepacia complex strains isolated from Brazilian cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2008;7(4):336–9.

22. Canadjiennb FM. Lung Homotransplantation. 1966;(June 1963).

23. Hardy JD, Webb WR, Dalton Ml Jr, WalkerGR Jr. Lung homotransplantation in man: Report of the initial case. *JAMA*. 1963;186(12):1065–74.

24. Dalton ML. The first lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(5):1437–8.

25. Nelems JM, Rebuck AS, Cooper JD, Goldberg M, Halloran PF, Vellend H. Human lung transplantation. *Chest*. 1980;78(4):569–73.

26. Group TTLT. Unilateral lung transplantation for pul - PubMed Mobile. *N Engl J Med*. 1986. p. 314:1140–5. Available from:

27. Cooper JD. The evolution of techniques and indications for lung transplantation*. Ann Surg*. 1990;212:249–55; discussion 255–6.

28. Jatene FB, Fernandes PMP, Medeiros IL De. Transplante pulmonar - Lung transplantation. *Rev Med*. 2009;88(3):111–22.

29. Studer SM, Levy RD, McNeil K, Orens JB. Lung transplant outcomes: A review of survival, graft function, physiology, health-related quality of life and cost-effectiveness. *Eur Respir J*. 2004;24(4):674–85.

30. Nakajima T, Palchevsky V, Perkins DL, Belperio JA, Finn PW. Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome. *Semin Immunopathol*. 2011;33(2):135–56.

31. Whitson BA, Hayes D. Indications and outcomes in adult lung transplantation. *J Thorac Dis*. 2014;6(8):1018–23.

32. Pêgo-Fernandes PM, Samano MN, Fiorelli AI, Fernandes LM, Camargo SM, Xavier AM, et al. Recommendations for the use of extended criteria donors in lung transplantation. *Transplant Proc*. 2011;43(1):216–9.

33. Hayes D, Meyer KC. Lung transplantation for advanced bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(2):123–38.

34. Chapron J, Zuber B, Kanaan R, Hubert D, Desmazes-Dufeu N, Mira JP, et al. Prise en charge des complications aiguës sévères chez l'adulte mucoviscidosique. *Rev Mal Respir*. 2011;28(4):503–16.

35. Durupt S, Nove Josserand R, Durieu I. [Therapeutic update in cystic fibrosis]. *Rev Med Interne*. 2014;35(6):388–92.

36. Corris PA. Lung transplantation for cystic fibrosis and bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(3):297–304.

37. Weill D, Benden C, Corris PA, Dark JH, Duane Davis R, Keshavjee S, et al. Temporary Removal: A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014-An update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. Elsevier; 2014;34(1):1–15.

38. Goetzinger KR, Cahill AG. An update on cystic fibrosis screening. *Clin Lab Med*. 2010;30(3):533–43.

39. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(13):475–82.

40. Cística F, Introdução UM a. Editorial fibrose cística – uma introdução. 2011;31(2):121–2.

41. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130(5):1441–7.

42. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: A retrospective cohort study. *Lancet*. 2003;361(9370):1671–6.

43. Damas C, Amorim A, Gomes I. Fibrose cística: *Revisão. Rev Port Pneumol*. 2008;XIV(1):89–112.

44. Rogan MP, Stoltz DA., Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*. 2011;139(6):1480–90.

45. Rabin HR, Surette MG. The cystic fibrosis airway microbiome. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(6):622-7.

46. Carvely LJ, Zhao J, Lipuma JJ. Cystic fibrosis lung microbiome: opportunities to reconsider management of airway infection. *Pediatric Pulmonology*. 2015;50:S31–S38.

47. Surette MG. The cystic fibrosis lung microbiome. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(SUPPL. 1):61–5.

48. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373(9678):1891–904.

49. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153(2):S4–14.

50. Mayell SJ, Munck A, Craig J V., Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, et al. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009;8(1):71–8.

51. Lopes MEM. Ciência & Saúde Coletiva —Teste do Pezinho completa 10 anos no Brasil. Online. 2011;16(1):716

52. Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, Drevinek P, Foweraker J, Havermans T, et al. European cystic fibrosis society standards of care: Framework for the cystic fibrosis centre. *J Cyst Fibros*. 2014;13(S1):S3–22.

53. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, Bryon M, Duff A, Flume P, et al. European cystic fibrosis society standards of care: Best practice guidelines. *J Cyst Fibros.* 2014;13(S1):S23–42.

54. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax.* 2007;62(4):360–7.

55. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Crit Care Med*. 2003;168(8):918– 51.

56. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: Diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med*. 2014;34(2):197–217.

57. Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. *J Cyst Fibros*. 2012;11(6):461–79.

58. Braun AT, Merlo C a. Cystic fibrosis lung transplantation. *Curr Opin Pulm Med*. 2011;17(6):467–72.

59. Joseph P. Lynch III, David M. Sayah, John A. Belperio, S. Sam Weigt.Lung Transplantation for Cystic Fibrosis: Results, Indications, Complications, and Controversies. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015; 36(02): 299-320

60. Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med*. 2002;346(18):1383–93.

61. O'Donnell AE. Bronchiectasis. *Chest.* 2008;134(4):815–23.

62. Weycker D, Edelsberg J, Oster G, Tino G. Prevalence and Economic Burden of Bronchiectasis. *Clin Pulm Med*. 2005;12(4):205–9.

63. Joish VN, Spilsbury-Cantalupo M, Operschall E, Luong B, Boklage S. Economic Burden of Non-cystic Fibrosis Bronchiectasis in the First Year after Diagnosis from a US Health Plan Perspective. *Appl Health Econ Health Policy.* 2013;11(3):299–304.

64. XU Xue-feng DH. Chinese Medical Journal: a peer reviewed, open access journal, published semimonthly by the Chinese Medical Association. *Chineses Medical Journal*. 2012; 3312–7.

65. Pasteur MC, Bilton D, Hill AT, Group BTSB non-CG. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. *Thorax.* 2010;65 Suppl 1:i1–58.

66. Tsang KW, Bilton D. Clinical challenges in managing bronchiectasis. *Respirology*. 2009;14(5):637–50.

67. Moulton BC, Barker AF. Pathogenesis of Bronchiectasis*. Clin Chest Med.* 2012;33(2):211–7.

68. Anwar GA, McDonnell MJ, Worthy SA, Bourke SC, Afolabi G, Lordan J, et al. Phenotyping adults with non-cystic fibrosis bronchiectasis: A prospective observational cohort study. *Respir Med*. 2013;107(7):1001–7.

69. Shoemark A, Ozerovitch L, Wilson R. Aetiology in adult patients with bronchiectasis. *Respir Med*. 2007;101:1163–70.

70. Stafler P, Carr SB. Non-cystic fibrosis bronchiectasis: its diagnosis and management. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2010;95(3):73–82.

71. Rademacher J, Welte T. Bronchiectasis--diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(48):809–15.

72. Dodd JD, Souza C a, Müller NL. Conventional high-resolution CT versus helical high-resolution MDCT in the detection of bronchiectasis. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;187(2):414–20.

73. Ho PL, Chan KN, Ip MS, Lam WK, Ho CS, Yuen KY, et al. The effect of Pseudomonas aeruginosa infection on clinical parameters in steady-state bronchiectasis. *Chest*. 1998;114:1594–8.

74. Beirne PA, Banner NR, Khaghani A, Hodson ME, Yacoub MH. Lung transplantation for non-cystic fibrosis bronchiectasis: analysis of a 13-year experience. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1530–5.

75. Vanlaera E, LiPuma JJ, Baldwin A, Henry D, Brandt E De, Mahenthiralingam E, et al. 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 Evol Microbiol*. 2008;58(7):1580–90.

76. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon Burkholderiacepacia complex. *Nat Rev Micro*. 2005;3(2):144–56.

77. Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Evidence of transmission of Burkholderia cepacia, Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;228(1):57–62.

78. Bressler AM, Kaye KS, LiPuma JJ, Alexander BD, Moore CM, Reller LB, et al. Risk factors for Burkholderia cepacia complex bacteremia among intensive care unit patients without cystic fibrosis: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(8):951–8.

79. Reik R, Spilker T, Lipuma JJ. Distribution of Burkholderia cepacia complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2926–8.

80. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI Doc M100-S20. 2010;30(1):1–153.

81. Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, et al. Development of a recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(7):3917– 27.

82. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673–80.

83. Posada D, Crandall K. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.*1998; 14: 817–818.

84. Drummond A, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 2007; 7: 214

85. Lloyd AT, Sharp PM. Evolution of the recA gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J Mol Evol*.1993;37:399-407.

86. Samano MN, Pêgo-Fernandes PM, Fonseca Ribeiro a. K, Turaça K, Abdalla LG, Fernandes LM, Correia AT, Jatene FB. Lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *Transplant Proc. Elsevier Inc*. 2013;45(3):1137–41.

87. Olland A, Falcoz PE, Kessler R, Massard G. Should cystic fibrosis patients infected with Burkholderia cepacia complex be listed for lung transplantation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011;13(6):631–4.

88. Faucz FR, Souza DAS, Olandosski M, Raskin S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screenings and counseling for cystic fibrosis in this country. *Journal of Human Genetics*.2010;55(2):71-76.

89. Porteous MK, Diamond JD,Christie JM. Primary graft dysfunction: lessons learned about the first 72h after lung transplantation.*Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(5):506-14.

90. Vos R, Verleden SE, Verleden GM. Chronic lung allograft dysfuntion: evolving practice. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(5):483- 491.

10. Apêndice

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0046/11

Título: ESTUDO DAS CEPAS DE BURKHOLDERIA CEPACIA COMPLEX EM PACIENTES CANDIDATOS AO TRANSPLANTE PULMONAR: AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE VIRULÊNCIA E ANÁLISE DE GENOMOVAR

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

Pesquisador Executante: Danila de Souza Carraro

Finalidade Acadêmica: Tese de Doutorado

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 06/03/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- **Carta datada de 06.11.12 - Alteração do pesquisador executante de Silvia Vidal Campos para Danila de Souza Carraro, o projeto será utilizado como Tese de Doutorado.**
- **Relatório Parcial**

CAPPesq, 07 de Março de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
15/03/13

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HC INSTITUTO CENTRAL

São Paulo, 24 de Setembro de 2012.

ILMO(A). Sr(a).
Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes e Dra. Silvia Vidal Campos
Departamento de Cardiopneumologia do INCOR HCFMUSP
Referência: Projeto de Pesquisa:

PR-931 **"Estudo das cepas de *Burkhlderia cepacia complex* em pacientes candidatos ao transplante pulmonar: avaliação dos marcadores de virulência e análise de Genomovar"**

A Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central considerou exeqüível a realização da coleta de laboratório relacionados ao seu projeto de pesquisa. Informamos que V.s.a. poderá iniciá-lo conforme seu Cronograma, sendo que os pedidos de exames deverão ser preenchidos conforme modelo abaixo, a fim de evitarmos desvios nos resultados. **É FUNDAMENTAL QUE V.S.a PROVIDENCIE UM CARIMBO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SEU PROTOCOLO, conforme:**

PR-931 **CARIMBADO EM TODOS OS PEDIDOS DE EXAMES, DE PREFERÊNCIA, COM TINTA VERMELHA.**

No campo **PESQUISA** com carimbo vermelho: PR-931

Qualquer dúvida ou necessidade de esclarecimentos, contactar Dra. Flávia Rossi, relatora do projeto, pelo telefone 2661-6348.
Nº total de pacientes no projeto → 200 pacientes, sendo 02 amostras por paciente.
Duração do Estudo: 24 meses.

- **Isolamento (meio de cultura específico) de B.Cepacia em espécimes de trato respiratório (lavado broncoalveolar, escarro e ou secreção brônquica)**
- **Teste de sensibilidade (e-test) para meropenem, ceftazidima e sulfametoxazol/trimetropim**
- **Sequenciamento do Gene reca da B. Cepacia para genotipagem (Genomovar)**

Os materiais solicitados pela área técnica para atendimento da solicitação deverão ser fornecidos pelo pesquisador (Placas de Agar sangue e alças de repique).

C/C
MICROBIOLOGIA

Atenciosamente,

Profa. Dra. Leila Antonangelo
Comissão de Ensino e Pesquisa
DLC - HCFMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0046/11

Título: ESTUDO DAS CEPAS DE Burkholderia cepacia complex EM PACIENTES CANDIDATOS AO TRANSPLANTE PULMONAR: AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE VIRULÊNCIA E ANÁLISE DE GENOMOVAR

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

Pesquisador Executante: Danila de Souza Carraro

Disciplina: Cirurgia Torácica

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/09/2016, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 24.05.16 - Emenda ao protocolo, novo cronograma e solicitação de prorrogação até setembro/2016; Relatório parcial do estudo

CAPPesq, 14 de Setembro de 2016

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
15/09/16

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
55 11 2661-7585 | e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br