

***Burkholderia pseudomallei*: primeiro caso de melioidose em Portugal**

Ana Pelerito¹, Alexandra Nunes¹, Susana Coelho², Cátia Piedade², Paulo Paixão², Rita Cordeiro¹, Daniel Sampaio³, Luís Vieira³, João Paulo Gomes¹, Sofia Núncio¹

ana.pelerito@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Hospital da Luz, Lisboa.

(3) Departamento de Genética Humana, INSA.

_ Introdução

Burkholderia pseudomallei é uma bactéria de Gram negativo que pode ser naturalmente encontrada no solo e em águas estagnadas (1). Tem sido classificada como agente de bioterrorismo devido ao elevado risco de aerolização, à sua baixa dose infecciosa e à elevada taxa de mortalidade (2, 3).

B. pseudomallei é o agente responsável pela melioidose, uma grave infeção adquirida por ingestão, inalação ou inoculação (4), sendo caracterizada por diversas manifestações clínicas, incluindo pneumonia e sépsis (3). É uma doença endémica no sudoeste asiático, norte da Austrália e outras regiões tropicais (3).

_ Objetivo

Este estudo apresenta o primeiro caso de melioidose em Portugal, revelando o importante papel da metodologia de Sequenciação Total do Genoma para a correta identificação e caracterização da estirpe isolada.

_ Caso clínico

Em janeiro de 2011, uma paciente de 62 anos deu entrada no Hospital da Luz com um quadro de artrite bilateral dos joelhos e edema simétrico dos membros inferiores, com 4 dias de evolução, sem febre quantificada mas com episódios de sudorese noturna. Soube-se que tinha realizado uma viagem à Tailândia em outubro de 2010, durante um período de chuva intensa naquela região. Um mês depois, a paciente desenvolveu uma lombociatalgia esquer-

da, resistente à terapêutica analgésica. Três semanas antes da admissão no hospital, a paciente apresentava uma massa lombar esquerda e uma lesão pustulosa no mento. Uma semana depois, após uma consulta de dermatologia, eram visíveis lesões ulceradas na fase posterior e lateral externa da perna direita, tendo-lhe sido administrado amoxicilina/clavulanato e mupirocina durante 5 dias. Quatro dias antes da admissão no hospital, apresentava dor articular dos joelhos e articulação tibio-társica esquerda, com edema e sinais inflamatórios, condicionando impotência funcional, bem como um edema simétrico até aos joelhos dos membros inferiores. Após internamento, foi-lhe diagnosticado: i) um tumor com ~15cm no maior eixo, de contorno irregular, móvel nos planos, com consistência pouco elástica e sem flutuação; ii) artrite dos joelhos, com derrame articular ligeiro; iii) artrite da tibio-társica esquerda; e iv) duas lesões cutâneas na perna direita sugestivas de eritema nodoso.

Os resultados laboratoriais mostraram uma anemia média e parâmetros inflamatórios elevados. Ressonâncias magnéticas abdominais e pélvicas revelaram duas lesões semelhantes: uma de carácter expansivo (14x11cm) na região glútea esquerda com osteomielite envolvendo o íliaco homolateral, e uma contralateral com menor dimensão (5cm).

_ Aplicação da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração para apoio à decisão clínica

O isolamento da bactéria *B. pseudomallei* foi feito a partir de uma hemocultura e do pus da lesão glútea esquerda. A identificação foi feita pelo sistema Vitek 2 (bioMérieux), tendo a confirmação da espécie sido feita por PCR em tempo real com sondas de hidrólise (5). A paciente foi tratada com meropenem intravenoso durante 14 dias, o que levou à regressão das lesões cutâneas bem como das artrites.

Tendo em conta a resistência da estirpe isolada (aqui designada como PtBps01) ao antibiótico de primeira linha, trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), foi administrada alternativamente uma terapia oral com amoxicilina/clavulanato (terapêutica de segunda linha). A lesão glútea direita foi drenada após dois meses

de tratamento, tendo sido mantida esta terapia de erradicação durante sete meses até total resolução do processo infeccioso.

De modo a caracterizar a estirpe PtBps01, foi realizada Sequenciação Total do Genoma usando o equipamento MiSeq (Illumina), seguida de uma análise genómica comparativa com sequências de estirpes de *B. pseudomallei* (disponíveis no GenBank) representativas de vários grupos de genomas. O genoma "draft" de PtBps01 contém 7,117,230bp com um conteúdo em GC de 68,2%. Análises filogenéticas envolvendo tanto o core-genoma como o pan-genoma, agruparam a estirpe portuguesa com isolados do sudoeste asiático, sugerindo tratar-se de um caso importado da Tailândia. De facto, a estirpe PtBps01 apresentou uma proximidade genética com o conhecido isolado Tailandês 1106a, revelando uma similaridade >99% no core-genoma. PtBps01 contém dois prófagos intactos de 40.7Kb e 25.1Kb, ambos compreendendo 30 genes com homologia com outros fagos de *Burkholderia*. Nenhum plasmídeo foi encontrado em PtBps01.

Dado que a resistência ao SXT é raramente observada (6-8), procedeu-se à investigação da base genética potencialmente associada a esta resistência na estirpe PtBps01, focando em particular os mecanismos envolvendo a bomba de efluxo BpeEF-OprC, a qual foi demonstrada conferir resistência ao SXT (9). No entanto, nenhuma mutação foi encontrada, o que sugere que a resistência bacteriana tenha origem num mecanismo ainda desconhecido.

A análise de *multilocus sequence typing* (MLST) revelou o perfil alélico 1-4-2-3-8-4-3, correspondendo ao tipo ST376. De acordo com bases de dados públicas de *B. pseudomallei*, nenhum isolado europeu descrito até à data apresentou este perfil. De facto, ST376 parece ser restrito ao sudoeste asiático, tal como foi previamente observado em amostras de água recolhidas na Tailândia na década de 60 (10), bem como em isolados clínicos obtidos, em 2012, de um paciente de Laos com parotidite supurativa e de dois pacientes da Malásia com melioidose.

_Conclusão

Em conclusão, o historial de viagem em conjunto com os dados obtidos por Sequenciação Total do Genoma da estirpe isolada, sugerem claramente que este primeiro caso português de melioidose resulta de uma importação da Tailândia. Considerando que os sintomas desta doença não são patognomónicos (podendo o quadro clínico ser confundido com outras situações, como a tuberculose), este caso vem reforçar a necessidade de se incluir a melioidose no diagnóstico diferencial de quadros infecciosos em viajantes regressados de zonas endémicas.

Referências bibliográficas:

- (1) Currie BJ. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. *Eur Respir J.* 2003;22(3):542-50. <http://erj.ersjournals.com/content/22/3/542.long>
- (2) Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):225-30. <http://wwwnc.cdc.gov/eid/>
- (3) Limmathurotsakul D, Peacock SJ. Melioidosis: a clinical overview. *Br Med Bull.* 2011;99:125-39.
- (4) Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):383-416. Review. Erratum in: *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):533. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15831829/
- (5) Cuadros J, Gil H, Miguel JD, et al. Case report: melioidosis imported from West Africa to Europe. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(2):282-4. www.ajtmh.org/content/85/2/282.long
- (6) Saiprom N, Amornchai P, Wuthiekanun V, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Thailand. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(5):557-9. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857915000564
- (7) Dance DA, Davong V, Soeng S, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(4):368-9. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857914001976
- (8) Wuthiekanun V, Cheng AC, Chierakul W, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(6):1029-31. <http://jac.oxfordjournals.org/content/55/6/1029.long>
- (9) Podnecky NL, Rhodes KA, Schweizer HP. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front Microbiol.* 2015;6:305. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00305/full>
- (10) McCombie RL, Finkelstein RA, Woods DE. Multilocus sequence typing of historical *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Southeast Asia from 1964 to 1967 provides insight into the epidemiology of melioidosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2951-62. <http://jcm.asm.org/content/44/8/2951.long>