

Susana Correia¹
Catarina Nascimento¹
Luísa Pereira²
Mónica V Cunha³
Isabel Sá-Correia⁴
Celeste Barreto⁵

Infecção respiratória por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*: Evolução clínica em doentes com fibrose quística

The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients

Recebido para publicação/received for publication: 07.07.18
Aceite para publicação/accepted for publication: 07.10.15

Resumo

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) é um grupo constituído por nove espécies de bactérias patogénicas oportunistas na fibrose quística (FQ), associadas a prognóstico mais reservado e a infecção cruzada entre os doentes. Existe grande heterogeneidade na deterioração pulmonar dos doentes colonizados/infectados com Bcc, evoluindo, por vezes, de forma fulminante – síndrome da *cepacia*.

Abstract

Bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), a group of nine related species, are opportunistic pathogens in cystic fibrosis (CF) patients, associated with a poor prognosis and patient-to-patient transmissibility. The pulmonary deterioration in Bcc-colonised/infected patients has a heterogeneous pattern leading, sometimes, to a fulminant development – the *cepacia* syndrome.

¹ Interna do Internato Complementar de Pediatria / Resident, Specialist Training, Paediatrics

² Assistente Hospitalar / Consultant

⁵ Chefe de Serviço / Unit Head

Centro Especializado em fibrose quística (Coordenadora: Dr.^a Celeste Barreto) / Cystic Fibrosis Centre (Coordinator: Dr Celeste Barreto)
Unidade de Pneumologia (Coordenadora: Dr.^a Celeste Barreto) / Pulmonology Unit (Coordinator: Dr Celeste Barreto)
Departamento da Criança e da Família (Director: Prof. J. Gomes Pedro) / Child and Family Department (Director: Prof. J. Gomes Pedro)
Hospital de Santa Maria, Av. Prof. Egas Moniz, 1699 Lisboa

³ Investigadora Doutorada / PhD Researcher

⁴ Professora Catedrática / Cathedra Professor

IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico.
Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal

Correspondência / Correspondence to: Susana Correia
Departamento da Criança e da Família, Hospital de Santa Maria
Av. Prof. Egas Moniz, 1699 Lisboa, Portugal
E-mail: susanaamcorreia@hotmail.com

Com o objectivo de avaliar a relação entre a colonização/infecção com as diferentes espécies do Bcc e a evolução clínica, os autores analisaram, retrospectivamente, 31 doentes com FQ acompanhados no Hospital de Santa Maria com isolamentos entre Janeiro de 1995 e Março de 2006. Os doentes foram divididos nos grupos: Grupo I – isolamento intermitente (15 doentes) e Grupo II – isolamento crónico (16 doentes). A prevalência das espécies do Bcc foi: *B. cepacia* 57%, *B. cenocepacia* 43%, *B. multivorans* 7%, *B. stabilis* 13%. Três doentes faleceram com síndrome da *cepacia*. As espécies *B. cepacia* e *B. stabilis*, pouco frequentes nas populações de FQ caracterizadas na Europa e na América do Norte, foram isoladas de uma percentagem importante dos doentes estudados, não tendo sido possível estabelecer uma correlação entre a espécie e a evolução clínica.

Nos doentes deteriorados, mas não nos estáveis, do grupo II, em quem foi possível analisar retrospectivamente a função respiratória (FEV1) e os períodos de internamento por exacerbação pulmonar, encontraram-se algumas diferenças relevantes antes e após o isolamento de Bcc.

Perante a incapacidade actual de orientar as medidas de profilaxia através da caracterização molecular dos isolados de Bcc, há que manter as medidas de controlo recomendadas.

Rev Port Pneumol 2008; XIV (1): 5-26

Palavras-chave: Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), fibrose quística (FQ), *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*

To evaluate the relationship between colonisation/infection by the different Bcc species and the clinical course, the authors carried out a retrospective study of 31 CF patients with Bcc bacteria isolations followed at Hospital de Santa Maria from January 1995 to March 2006. Patients were categorised into two groups: Group I, with intermittent isolations and Group II with chronic isolations. The prevalence of Bcc species was as follows: *B. cepacia* 57%, *B. cenocepacia* 43%, *B. multivorans* 7%, *B. stabilis* 13%. Three of the patients died of *cepacia* syndrome. The species *B. cepacia* and *B. stabilis*, usually less frequent in CF populations of Europe and America, were isolated in a considerable percentage of the patients examined. No correlation could be established between the species and the clinical outcome.

Deteriorated but not stable patients from group II, whose lung function and pulmonary exacerbation-caused hospitalisation could be retrospectively analysed, exhibited significant differences in the number of hospitalisations and pulmonary function (FEV1) in the year prior to and the years following Bcc isolation.

Based on the available data, it is not currently possible to outline preventive measures through the molecular characterisation of Bcc isolates, reinforcing the notion that the recommended control measures must be followed.

Rev Port Pneumol 2008; XIV (1): 5-26

Key-words: *Burkholderia cepacia* (Bcc) complex, cystic fibrosis (CF), *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*

Introdução

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), abundante no solo e na rizosfera das plantas^{1,2}, faz parte de um grupo de agentes patogénicos de grande risco na fibrose quística (FQ), associado a pior prognóstico e infecção cruzada entre os doentes^{2,3,4}. Estas bactérias são intrinsecamente resistentes a múltiplos antibióticos, desinfetantes e anti-sépticos^{5,6,7} e transmitem-se entre os doentes com FQ através do contacto social^{2,8,9,10}, sendo a hospitalização um factor de maior risco para a aquisição de Bcc^{3,10,11}. A sua aquisição e transmissão é facilitada pelo contacto próximo e prolongado entre doentes com FQ e pela partilha de equipamentos de terapêutica inalatória^{8,12}. Estando demonstrado que a aquisição de bactérias do Bcc se encontra associada ao internamento hospitalar e à infecção cruzada através de contactos sociais entre doentes com FQ, a grande maioria de centros de FQ em todo o mundo implementou regras especiais de higiene hospitalar e medidas severas de isolamento de indivíduos colonizados e indivíduos não colonizados com Bcc¹³. No entanto, alguns estudos têm também sugerido o ambiente como potencial fonte de colonização^{2,14}.

Existe uma grande heterogeneidade na deterioração pulmonar dos doentes com FQ colonizados/infectados com Bcc, por vezes evoluindo de forma fulminante – síndrome da *cepacia*, que ocorre em cerca de 30% dos casos^{2,3}. Actualmente, identificam-se nove espécies (ex-ge-nomovares) no complexo Bcc: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* e *B. pyrrocinia*^{2,3}. Na espécie *B. cenocepacia*, distinguem-se ainda quatro subgrupos filogenéticos, designados por III-A, III-B, III-C e III-D. Apesar de todas as espécies poderem ser isoladas das secreções de doentes com FQ¹⁵, a espécie *B. cenocepacia* foi a predominante nas populações de

Introduction

The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), abundant in soil and plant rhizosphere^{1,2}, is part of a group of opportunistic pathogens in cystic fibrosis (CF) patients, associated with a poor prognosis and patient-to-patient transmissibility^{2,3,4}. These bacteria have an inherent resistance to multiple antibiotics, disinfectants and antiseptics^{5,6,7} and are transmitted CF patient-to-CF patient via social contact^{2,8,9,10}, with hospitalisation a major risk factor for Bcc acquisition^{3,10,11}. Close and prolonged contact among CF patients and sharing nebulisers facilitates Bcc acquisition and transmission^{8,12}. It is proven that Bcc bacteria acquisition is associated to hospitalisation and cross-infection via social contact CF patients. Accordingly, the majority of CF centres worldwide have implemented special hospital hygiene rules and the strict isolation of Bcc colonised and non-colonised patients¹³. That notwithstanding, several studies have suggested the environment as a potential colonisation source^{2,14}.

The pulmonary deterioration in Bcc-colonised/infected patients has a heterogeneous pattern, leading, in approx. 30% of cases^{2,3} to a fulminant development – the *cepacia* syndrome. Nine species are currently identified (ex-genomovars) in the Bcc complex: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* and *B. pyrrocinia*^{2,3}. Four phylogenetic subgroups can be found in *B. cenocepacia*: III-A, III-B, III-C and III-D. While all these species can be isolated in CF patients' secretions¹⁵, the *B. cenocepacia* species predominated in the CF

O complexo *Burkholderia cepacia* faz parte de um grupo de agentes patogénicos de grande risco na fibrose quística

Alguns estudos têm sugerido o ambiente como potencial fonte de colonização

**A espécie
B. cenocepacia
tem sido associada
a elevadas taxas
de morbilidade
e mortalidade**

FQ dos Estados Unidos da América¹⁶, Canadá¹⁷, Itália¹⁸ e França¹⁹ já caracterizadas, seguida de *B. multivorans*. A espécie *B. cenocepacia* tem sido associada a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, existindo algumas evidências de que estirpes pertencentes a esta espécie poderão ser mais virulentas e/ou transmissíveis^{2,3,20}.

No Centro Especializado em FQ da Clínica Universitária de Pediatria do Hospital de Santa Maria, as taxas de incidência e prevalência da colonização/infecção pelo complexo Bcc entre Janeiro de 1995 e Março de 2006 variaram entre 1,2% e 7,8% e entre 7,1 % e 13,3%, respectivamente. O presente estudo teve como objectivo investigar a relação entre a colonização/infecção com as diferentes espécies do complexo Bcc nos doentes com FQ acompanhados, entre 1995 e 2006, nesse centro, o maior do país, e a sua evolução clínica. Os resultados divulgados neste estudo, focado numa subpopulação portuguesa bem definida, colonizada com bactérias do complexo Bcc, pretendem, não só ser uma contribuição para a caracterização da situação nacional, mas também para aferir da capacidade de espécies isoladas com pouca frequência das secreções respiratórias de doentes com FQ, para se transmitirem e causarem infecção crónica e/ou doença grave neste tipo de populações.

Material e métodos

Realizou-se uma análise retrospectiva dos processos de consulta e internamento dos 31 doentes seguidos regularmente na consulta de Pediatria do Centro Especializado de Fibrose Quística (CEFQ), da Clínica Universitária de Pediatria do Hospital de Santa Maria (HSM), em Lisboa, com o diagnóstico confirmado de fibrose quística (FQ) (por duas provas de suor e/ou estudo genético) e com culturas das secre-

populations in the USA¹⁶, Canada¹⁷, Italy¹⁸ and France¹⁹ which have been mapped, followed by *B. multivorans*. The *B. cenocepacia* species has been associated to high morbidity and mortality rates. There is evidence that the strains of these species are more virulent and/or transmissible^{2,3,20}.

The incidence and prevalence of colonisation/infection by Bcc complex between January 1995 – March 2006 at the Hospital de Santa Maria Clínica Universitária de Pediatria CF Centre ranged from 1.2% – 7.8% and 7.1 % – 13.3% respectively. Our study aims to investigate the link between colonisation/infection by different Bcc complex species and the clinical course in CF patients followed at our centre, the country's largest, from 1995 and 2006. Our results focus on a well-defined Portuguese sub-population colonised with Bcc complex bacteria and are intended to add to the mapping of the Portuguese picture and to assess the capacity of species rarely isolated in the respiratory secretions of CF patients and which transmit and cause chronic infection and/or disease in these populations.

Material and methods

We carried out a retrospective study into the clinical files and hospital records of 31 CF patients routinely followed at Lisbon's Hospital de Santa Maria (HSM) Clínica Universitária de Pediatria CF Centre (CEFQ). These patients had a CF diagnosis confirmed by two sweat tests and/or genetic study and their respiratory secretion cultures were positive for *Burkholderia cepacia* (Bcc) complex bacteria.

ções respiratórias positivas para bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc). Os doentes foram divididos em dois grupos: Grupo I – isolamento intermitente (1 ou 2 isolamentos por ano); Grupo II – isolamento crónico (≥ 3 isolamentos por ano). Para cada doente foram caracterizados e analisados: sexo, idade do diagnóstico, genotipo, idade do primeiro isolamento de Bcc, co-infecção com outras bactérias e sobrevivência após o isolamento. No Grupo II, avaliou-se, ainda, a evolução clínica do doente ao longo do período de infecção crónica pela comparação dos parâmetros: (1) número de internamentos por exacerbação pulmonar; (2) valor do *forced expiratory value in the first second* (FEV1) e (3) índice nutricional (IN) (peso/altura / P50 do peso/P50 da altura) ou, se a idade for superior a 18 anos, o índice de massa corporal (IMC) (altura/peso²). Essa comparação abrangeu o ano imediatamente anterior ao primeiro isolamento de Bcc, estendendo-se a um período máximo de quatro anos após o primeiro isolamento destas bactérias. Nalguns doentes, devido à sua idade, não foi possível realizar estudo funcional respiratório. Noutros, por residirem a distâncias consideráveis do CEFQ, não estão disponíveis avaliações seriadas da função respiratória e/ou do IN/IMC, que são realizadas nos hospitais da área de residência. Acresce, ainda, que para alguns dos doentes do Grupo II que faleceram durante o período deste estudo não estão disponíveis os dados do IN/IMC devido aos numerosos e extensos períodos de internamento em que não foram recolhidos os dados da estatura.

Os isolados do complexo *B. cepacia* examinados foram obtidos a partir de amostras de secreções respiratórias (expectoração ou aspirado nasofaríngeo), colhidas bimensalmente ou trimestralmente, entre Janeiro de 1995 e Março de 2006, em todos os doentes seguidos no

Patients were categorised into two groups: Group I, with intermittent isolations (1 or 2 per year) and Group II with chronic isolations (≥ 3 per year).

Both groups were profiled in terms of gender, age at diagnosis, genotype, age at first Bcc isolation, co-infection by other bacteria and survival after isolation. We also assessed the Group II patients' clinical course throughout the period of chronic infection by comparing the following parameters: (1) number of pulmonary exacerbation-caused hospitalisations; (2) value of Forced Expiratory Value in the first second (FEV1) and (3) Nutritional Index (NI) (weight/height / P50 weight/P50 height) or, in patients aged over 18, Body Mass Index (BMI) (Height/Weight²). The comparison took in the year immediately prior to the first Bcc isolation and covered a maximum four years post-first-isolation of these bacteria. Some patients' age meant it was not possible to perform a lung function study. Serial lung function and or NI/BMI evaluations, which are performed in the catchment area hospitals, were not available for patients who lived a considerable distance from the CEFQ. Further, NI/BMI data on the Group III patients who died during the course of this study was not available as these patients experienced several and prolonged hospital stay periods during which this data was not collected.

The *B. cepacia* complex isolates examined were obtained from bimonthly or tri-monthly respiratory secretion samples (expectoration or nasopharyngeal aspirate) collected between January 1995 and March 2006 from all patients followed at the Centre. The isolating and identification of the

centro. O isolamento e identificação dos isolados como pertencendo ao Bcc baseou-se, numa primeira fase, em testes bioquímicos, realizados no Laboratório de Bacteriologia do HSM, usando-se, respectivamente, o meio selectivo *Burkholderia cepacia* medium, suplementado com *Burkholderia cepacia* selective supplement, e o sistema comercial AP1 20NE. Como recomendado na literatura internacional, esta identificação preliminar foi posteriormente confirmada por recurso a técnicas moleculares no Grupo de Ciências Biológicas do Centro de Engenharia Biológica e Química do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia do Instituto Superior Técnico. A identificação da espécie dos diversos isolados do Bcc baseou-se na análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do gene *recA* com a endonuclease *HaeIII*, a qual gera perfis característicos em cada espécie²¹. A amplificação do gene *recA* foi efectuada por PCR, utilizando-se sequências iniciadoras específicas para identificação de bactérias do Bcc descritas na literatura²¹. Após a identificação preliminar da espécie por este método, procedeu-se à sua confirmação por nova amplificação do gene *recA*, mas utilizando sequências iniciadoras específicas para cada espécie²¹. A genotipagem dos isolados foi efectuada por ribotipagem e, quando necessário, por um método mais discriminatório, a análise do polimorfismo dos macrofragmentos de restrição separados por electroforese em campo pulsado. Os resultados da genotipagem dos isolados encontram-se publicados^{22,23,24}.

Resultados

No presente estudo, foi realizada uma análise retrospectiva dos processos de consulta e internamento de 31 doentes. Cerca de 48% destes doentes foram considerados com co-

isolates as Bcc was firstly based on biochemical tests performed at the HSM Bacteriology Laboratory, using *Burkholderia cepacia* medium selective means, supplemented by *Burkholderia cepacia* selective supplement, and the commercial system AP1 20NE, respectively. As the international literature recommends, this preliminary identification was later confirmed via molecular techniques by the Biological Sciences Group at Lisbon's Centro de Engenharia Biológica e Química at the Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Instituto Superior Técnico. Species identification of the various Bcc isolations was based on the analysis of the restriction fragments polymorphism of the *recA* gene polymorphism of the restriction fragments of the *recA* gene with the *HaeIII* endonucleas, which gives characteristic profiles in each species²¹. PCR was used to amplify the *recA* gene, using specific primers for identifying Bcc bacteria, as described in the literature²¹. After using this method for the preliminary identification of the species, identification is confirmed by a second amplification of the *recA* gene, but using specific primers for each species²¹. Genotyping of the isolates was performed by ribotyping and a more discriminatory method was used when necessary to analyse the restriction polymorphism macrofragments separated by pulse field electrophoresis. The results of the genotyping of the isolates has been published^{22,23,24}.

Results

This study conducted a retrospective analysis of the out-patients' and hospital records of 31 patients. Around 48% of these patients were considered to have intermittent

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

lonização intermitente (Grupo I) e 52% com colonização/infecção crónica (Grupo II).

De entre os 15 doentes do Grupo I, cerca de 73% eram do sexo feminino e 27% do sexo masculino. A idade de diagnóstico situou-se entre o nascimento e os 4 anos, com uma mediana de 10 meses. A idade do primeiro isolamento de bactérias do complexo *B. cepacia* (Bcc) situou-se entre 2 meses e 28 anos, com uma mediana de 3 anos. Todos os doentes deste grupo apresentavam mutações da classe II da FQ (Quadro I). Cerca de 80% (12) destes doentes encontravam-se co-colonizados/infetados com outros géneros bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e/ou *Pseudomonas aeruginosa*) (Quadro I). Quatro (27%) faleceram durante o período do estudo devido a causas não directamente relacionadas com a colonização com Bcc.

Entre os 16 doentes do Grupo II, a percentagem dos sexos feminino e masculino era idên-

isolations (Group I) and 52% chronic colonisation/infection (Group II).

Approx. 73% of the Group I patients were female and 27% were male. Age at diagnosis was between birth and 4 years, median 10 months. Age at first isolation of *B. cepacia* (Bcc) complex bacteria was between 2 months and 28 years, median 3 years. All patients from this group had CF Class II mutations (Table I). Around 80% (12) of these patients had co-colonisation/infection by other bacteria types (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* and/or *Pseudomonas aeruginosa*) (Table I). Four (27%) of these patients died, of causes not directly related to the Bcc colonisation, during the study period.

There were an identical number of male and female patients among the 16-strong Group II. Age at diagnosis was between 4 months and 16 years, median 2 years, 10

Quadro I – Características dos doentes do Grupo I

N.º do doente	Sexo	Idade de diagnóstico	Idade do 1.º isolamento	Genotipo	Classe	Co-infecção
1	F	4m	4a	F508del/F508del	II/II	SA
2	M	4a	20a	R334W+R1177E/F508 del	?/II	SA PA
3	M	3m	3m	F508del/R1066C	II/II	PA
4	F	3a	6a	F508del/P205S	II/?	SA PA
5	F	10m	2a	F508del/*	II/-	SA PA HI
6	F	3m	4m	A561E/A561E	II?/II?	HI
7	F	3m	4m	F508del/F508del	II/II	-
8	F	2m	2m	F508del/G542X	II/I	-
9	F	3a	11a	F508del/*	II/-	SA PA
10	F	2a	3a	F508del/A561E	II/II?	PA
11	M	1a	5a	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
12	F	ao nascer	6a	F508del/F508del	II/II	SA HI
13	M	1a	2a	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
14	F	6m	1a	F508del/F508del	II/II	-
15	F	?	28a	F508del/985E	II/?	SA PA HI

* não identificado; m – meses; a – anos

SA – *Staphylococcus aureus*; HI – *Haemophilus influenzae*; PA – *Pseudomonas aeruginosa*

■ Faleceu

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

Table I – Group I patient profiles

Patient n.º	Gender	Age at diagnosis	Age at 1 st isolation	Genotype	Class	Co-infection
1	F	4m	4y	F508del/F508del	II/II	SA
2	M	4y	20y	R334W+R1177E/F508 del	?/II	SA PA
3	M	3m	3m	F508del/R1066C	II/II	PA
4	F	3y	6y	F508del/P205S	II/?	SA PA
5	F	10m	2y	F508del/*	II/–	SA PA HI
6	F	3m	4m	A561E/A561E	II?/II?	HI
7	F	3m	4m	F508del/F508del	II/II	–
8	F	2m	2m	F508del/G542X	II/I	–
9	F	3y	11y	F508del/*	II/–	SA PA
10	F	2y	3y	F508del/A561E	II/II?	PA
11	M	1y	5y	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
12	F	birth	6y	F508del/F508del	II/II	SA HI
13	M	1y	2y	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
14	F	6m	1y	F508del/F508del	II/II	–
15	F	?	28y	F508del/985E	II/?	SA PA HI

* not known; m – months; y – years

SA – *Staphylococcus aureus*; HI – *Haemophilus influenzae*; PA – *Pseudomonas aeruginosa*

■ Deceased

tica. A idade de diagnóstico situou-se entre 4 meses e 16 anos, com uma mediana de 2 anos e 10 meses. A idade do primeiro isolamento de bactérias do Bcc situou-se entre 5 meses e 21 anos, com uma mediana de 11 anos. Neste grupo, apenas 75% dos doentes (12) apresentava mutações da classe II da FQ (Quadro II). Cerca de 94% (15) encontrava-se co-colonizados/infectados com bactérias de outros géneros. Faleceram 6 doentes deste grupo (38%) durante o período do estudo (Quadro II).

A prevalência das várias espécies de Bcc isoladas destes 2 grupos de doentes de FQ durante o período em estudo foi: *B. cepacia* 57%, *B. multivorans* 7%, *B. cenocepacia* 43% e *B. stabilis* 13%. No grupo de colonização intermitente apenas foram isoladas as espécies *B. cepacia* (71%, 10 doentes) e *B. cenocepacia* (43%, 6 doentes), enquanto no grupo de colonização crónica foram isoladas as espécies *B. cepacia* e

months. Age of first isolation of Bcc bacteria was between 5 months and 21 years, median 11 years. Only 75% of the patients in this group (12) had CF Class II mutations (Table II). Approx. 94% (15) of these patients had co-colonisation/infection by other bacteria types. Six patients of this group (38%) died during the study period (Table II).

The prevalence of the several Bcc species isolated in these two CF patient groups during the study period was *B. cepacia* 57%, *B. multivorans* 7%, *B. cenocepacia* 43% and *B. stabilis* 13%. Only the *B. cepacia* (71%, 10 patients) and *B. cenocepacia* (43%, 6 patients) species were isolated in the intermittent colonisation group while in the chronic colonisation group the *B. cepacia* and *B. cenocepacia* species were isolated in equal patient percentage (44%) and the *B. stabilis* and *B. multivorans* species in 25%

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

Quadro II – Características dos doentes do Grupo II

N.º de doente	Sexo	Idade de diagnóstico	Idade do 1.º isolamento	Genotipo	Classe	Co-infecção
16	M	15a	17a	3272-26A ->G/1527delC	I(V)?	SA
17	F	9a	17a	F508del/875+1G->A	II/I	SA PA HI
18	F	5m	1a	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
19	F	16a	19a	F508del/F508del	II/II	PA
20	F	2a	9a	1609delCA/1989+1G->T	I/I	SA PA HI
21	F	3a	12a	1609delCA/1989+1G->T	I/I	SA PA
22	F	4m	10a	F508del/F508del	II/II	PA
23	M	1a1m	15a	F508del/F508del	II/II	SA PA
24	F	3a	6a	F508del/Y1092X	II/I	SA PA HI
25	M	1a4m	10a	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
26	M	5m	5m	F508del/F508del	II/II	–
27	M	1a4m	8a	F508del/R1066C	II/III	SA PA HI
28	M	5a4m	7a	3272-26A ->G/3007delG	I(V)?	SA HI
29	M	2a8m	14a	F508del/F508del	II/II	SA HI
30	M	5a	19a	F508del/*	II/–	SA HI
31	F	5a	21a	F508del/F508del	II/II	HI

* não identificado; m – meses; a – anos

SA – *Staphylococcus aureus*; HI – *Haemophilus influenzae*; PA – *Pseudomonas aeruginosa*

□ Faleceu; ■ Faleceu com síndrome da *cepacia*

Table II – Group II patient profiles

Patient n.º	Gender	Age at diagnosis	Age at 1 st isolation	Genotype	Class	Co-infection
16	M	15y	17y	3272-26A ->G/1527delC	I(V)?	SA
17	F	9y	17y	F508del/875+1G->A	II/I	SA PA HI
18	F	5m	1y	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
19	F	16y	19y	F508del/F508del	II/II	PA
20	F	2y	9y	1609delCA/1989+1G->T	I/I	SA PA HI
21	F	3y	12y	1609delCA/1989+1G->T	I/I	SA PA
22	F	4m	10y	F508del/F508del	II/II	PA
23	M	1y1m	15y	F508del/F508del	II/II	SA PA
24	F	3y	6y	F508del/Y1092X	II/I	SA PA HI
25	M	1y4m	10y	F508del/F508del	II/II	SA PA HI
26	M	5m	5m	F508del/F508del	II/II	–
27	M	1y4m	8y	F508del/R1066C	II/III	SA PA HI
28	M	5y4m	7y	3272-26A ->G/3007delG	I(V)?	SA HI
29	M	2y8m	14y	F508del/F508del	II/II	SA HI
30	M	5y	19y	F508del/*	II/–	SA HI
31	F	5y	21y	F508del/F508del	II/II	HI

* not known; m – months; y – years

SA – *Staphylococcus aureus*; HI – *Haemophilus influenzae*; PA – *Pseudomonas aeruginosa*

□ Deceased; ■ Died as a result of *cepacia* syndrome

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

B. cenocepacia em igual percentagem de doentes (44%), e as espécies *B. stabilis* e *B. multivorans* em 25% e 12,5%, respectivamente (Quadros III e IV). É de notar que a soma das prevalências das várias espécies excede os 100%, porque 5 doentes apresentaram colonização com mais de uma espécie (2 doentes no grupo de colonização intermitente e 3 no grupo de colonização crónica) (Quadros III e IV). Em 25 doentes (83%) foi isolada uma única espécie de Bcc (Quadros III e IV). Involgar é o caso de duas irmãs conviventes (doentes 20 e 21), cronicamente colonizadas/infectadas com *B. cenocepacia* ou *B. cepacia*, respectivamente, durante mais de quatro anos (Quadro IV). Só após este período é que a estirpe de *B. cepacia*, que infectava cronicamente a doente 21, foi isolada na irmã, o que contrasta com a ideia estabelecida de que o risco de infecção cruzada entre doentes é grande.

and 12.5% of patients respectively (Tables III and IV).

It is notable that the sum of the prevalence of the several species exceeds 100%. This is due to 5 patients presenting colonisation with more than 1 species (2 patients in the intermittent colonisation group and 3 in the chronic colonisation group) (Tables III and IV). A unique species of Bcc was isolated in 25 patients (83%) (Tables III and IV). An unusual case was that of two sisters (patients 20 and 21) who shared living space and who were chronically colonised/infected by *B. cenocepacia* and *B. cepacia*, respectively, for over four years (Table IV). Only after this period was the *B. cepacia* strain which chronically infected patient 21 isolated in her sister, in contrast to the established idea that there is a high risk of cross-infection between these patients.

Quadro III – Isolamentos das várias espécies do complexo *Burkholderia cepacia* no Grupo I

N.º do doente	1.º isolamento	2.º isolamento
1	<i>B. cenocepacia</i>	–
2	<i>B. cepacia</i>	–
3	<i>B. cepacia</i>	–
4	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
5	<i>B. cepacia</i>	–
6	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
7	<i>B. cenocepacia</i>	–
8	N.D.	–
9	<i>B. cenocepacia</i>	–
10	<i>B. cenocepacia</i> ?	<i>B. cepacia</i>
11	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
12	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
13	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
14	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
15	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>

N.D. – Não determinado

■ Faleceu

Table III – Isolations of the various *Burkholderia cepacia* complex species in Group I

Patient n.º	1 st isolation	2 nd isolation
1	<i>B. cenocepacia</i>	–
2	<i>B. cepacia</i>	–
3	<i>B. cepacia</i>	–
4	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
5	<i>B. cepacia</i>	–
6	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
7	<i>B. cenocepacia</i>	–
8	N.K.	–
9	<i>B. cenocepacia</i>	–
10	<i>B. cenocepacia</i> ?	<i>B. cepacia</i>
11	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
12	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
13	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
14	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
15	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>

N.K. – Not known

■ Deceased

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

Quadro IV – Isolamentos das várias espécies do complexo *Burkholderia cepacia* no Grupo II

N.º do doente	1.º ano	2.º ano	3.º ano	4.º ano	5.º ano
16	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
17	<i>B. multivorans</i> <i>B. stabilis</i>	<i>B. multivorans</i> <i>B. cenocepacia</i>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> <i>B. cenocepacia</i>	–
18	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
19	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	–	–
20	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i> <i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
21	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
22	<i>B. cenocepacia</i> <i>B. cepacia</i>	–	–	–	–
23	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	–	–	–
24	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	–	–	–
25	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	–	–	–
26	<i>B. cepacia</i>	–	–	–	–
27	<i>B. cepacia</i>	–	–	–	–
28	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	–
29	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	–	–	–
30	<i>B. stabilis</i>	–	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	–
31	<i>B. cenocepacia</i>	–	–	–	–

□ Faleceu; ■ Faleceu com síndrome da *cepacia*

Table IV – Isolations of the various *Burkholderia cepacia* complex species in Group II

N.º do doente	1.º ano	2.º ano	3.º ano	4.º ano	5.º ano
16	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
17	<i>B. multivorans</i> <i>B. stabilis</i>	<i>B. multivorans</i> <i>B. cenocepacia</i>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> <i>B. cenocepacia</i>	–
18	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>
19	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	–	–
20	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i> <i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
21	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>
22	<i>B. cenocepacia</i> <i>B. cepacia</i>	–	–	–	–
23	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	–	–	–
24	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	–	–	–
25	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	–	–	–
26	<i>B. cepacia</i>	–	–	–	–
27	<i>B. cepacia</i>	–	–	–	–
28	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	–
29	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	–	–	–
30	<i>B. stabilis</i>	–	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stabilis</i>	–
31	<i>B. cenocepacia</i>	–	–	–	–

□ Deceased; ■ Died as a result of *cepacia* syndrome

Três doentes do Grupo II (19%) faleceram com um quadro clínico característico da síndrome da *cepacia*: o doente 17, que se encontrava cronicamente colonizado/infectado com duas estirpes das espécies *B. multivorans* e *B. cenocepacia*; o doente 19, que apresentava infecção crónica com *B. stabilis*; e o 22, do qual se isolaram 2 estirpes de *B. cenocepacia* e 1 de *B. cepacia* (Quadro IV). O doente 21 faleceu com infecção crónica com *B. cepacia*, embora sem um quadro clínico característico da síndrome da *cepacia*. A situação clínica dos restantes doentes falecidos deste grupo (o doente 23, colonizado com *B. cenocepacia*, e o 30, cronicamente colonizado com *B. stabilis*), encontrava-se já previamente deteriorada em resultado da infecção crónica com *P. aeruginosa* durante vários anos (Quadros II e IV).

Na grande maioria dos doentes falecidos, verificou-se um número elevado de internamentos, quer no ano anterior, quer nos anos posteriores ao isolamento de Bcc, o que reflecte uma situação clínica previamente deteriorada e anterior ao isolamento de Bcc. No entanto, para o doente 21, cronicamente colonizada/infectada com uma estirpe de *B. cepacia*, registou-se um aumento do número de internamentos nos anos seguintes ao primeiro isolamento de Bcc. O doente 30 foi internado uma única vez durante a infecção crónica com *B. stabilis* e faleceu devido a causa não relacionada com a infecção com Bcc (Quadro V). Nos doentes 26, 27 e 29, colonizados/infectados com a espécie *B. cepacia*, ocorreu um aumento no número de internamentos entre o ano anterior e os três anos posteriores ao primeiro isolamento de Bcc (Quadro V). No doente 28, colonizado/infectado com *B. cepacia*, no 25, colonizado/infectado com *B. multivorans*, nos doentes 16, 18 e 20, colonizados/infectados com *B. cenocepacia* e no 24, infectado/colonizado com *B. stabilis*,

Three Group II patients (19%) died of a clinical course characteristic of *cepacia* syndrome: patient 17, chronically colonised/infectured with two strains of *B. multivorans* and *B. cenocepacia* species; patient 19, chronically infected with *B. stabilis* and patient 22, in whom two strains of *B. cenocepacia* and one of *B. cepacia* were isolated (Table IV). Patient 21 died of a chronic *B. Cepacia* infection, although the clinical course was not characteristic of *cepacia* syndrome. The clinical condition of the other deceased patients of this group (patient 23, colonised by *B. cenocepacia* and patient 30, chronically colonised by *B. stabilis*) had prior deterioration due to chronic *P. aeruginosa* infection over several years (Tables II and IV).

A large number of the deceased patients had a high amount of hospitalisation whether in the year prior to or the years following the Bcc isolation. This reflects prior clinical deterioration anterior to the Bcc isolation. Patient 21, chronically colonised/infectured with a *B. Cepacia* strain, had a high number of hospitalisations in the years following the first Bcc isolation. Patient 30 was only hospitalised once during the chronic *B. stabilis* infection and died of causes not related to the Bcc infection (Table V). Patients 26, 27 and 29, colonised/infectured by a *B. Cepacia* species, had a greater number of hospitalisations between the year previous to and the three years following the first Bcc isolation (Table V). In patient 28, colonised/infectured by *B. cepacia*, patient 25, colonised/infectured by *B. multivorans*, patients 16, 18 and 20, colonised/infectured by *B. cenocepacia* and patient 24, colonised/infectured by *B. stabilis*, there were no signifi-

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

Quadro V – Número de internamentos por exacerbação pulmonar no Grupo II

N.º do doente	1.º ano antes 1.º isolamento	1.º ano após 1.º isolamento	2.º ano após 1.º isolamento	3.º ano após 1.º isolamento	4.º ano após 1.º isolamento	Falecimento
16	0	0	0	0	0	
17	2	4	1	4	2	após 1.º ano
18	2	0	2	1	0	
19	2	2	6	3	–	após 1.º ano
20	0	0	0	1	0	
21	0	2	0	3	–	após 1.º ano
22	3	4	–	–	–	1.º ano
23	6	5	7	–	–	após 1.º ano
24	0	0	0	1	0	
25	0	1	0	0	0	
26	0	1	2	2	0	
27	0	1	3	–	–	
28	1	0	2	0	0	
29	0	2	2	–	–	
30	0	0	1	0	0	após 1.º ano
31	0	1	–	–	–	

□ Faleceu; ■ Faleceu com síndrome da *cepacia*

Table V – Number of pulmonary exacerbation-caused hospitalisations in Group II

Patient n.º	1 st year before 1 st isolation	1 st year after 1 st isolation	2 nd year after 1 st isolation	3 rd year after 1 st isolation	4 th year after 1 st isolation	Deceased
16	0	0	0	0	0	
17	2	4	1	4	2	after 1 st year
18	2	0	2	1	0	
19	2	2	6	3	–	after 1 st year
20	0	0	0	1	0	
21	0	2	0	3	–	after 1 st year
22	3	4	–	–	–	1 st year
23	6	5	7	–	–	after 1 st year
24	0	0	0	1	0	
25	0	1	0	0	0	
26	0	1	2	2	0	
27	0	1	3	–	–	
28	1	0	2	0	0	
29	0	2	2	–	–	
30	0	0	1	0	0	after 1 st year
31	0	1	–	–	–	

□ Deceased; ■ Died as a result of *cepacia* syndrome

não ocorreram diferenças relevantes no número de internamentos verificados entre o ano anterior e os anos posteriores ao isolamento de bactérias do Bcc (Quadro V).

Nos doentes em que foi possível realizar, seriamente, estudo funcional respiratório verificou-se, para o doente 17, colonizado/infectado com *B. multivorans* e *B. cenocepacia*, para o 19, infectado/colonizado com *B. stabilis*, para o 27, colonizado/infectado com uma estirpe de *B. cepacia*, e para o 30 colonizado/infectado com *B. stabilis*, uma diminuição importante nos valores de FEV1 após o isolamento de Bcc, coincidente com a deterioração clínica destes doentes. Note-se, no entanto, que os valores de FEV1 obtidos para o ano imediatamente anterior ao isolamento de Bcc, em particular para os doentes 17, 19 e 30, eram já baixos, o que denota uma situação clínica previamente deteriorada. O mesmo se verificou nos doentes 16, 23, 24 e 31. No entanto, nestes doentes, não se registaram alterações relevantes antes e após o isolamento de Bcc, o que é concordante com a sua estabilidade clínica (Quadro VI). Para os doentes 18, 20 e 21 não existem registos dos valores de FEV1 antes do isolamento de Bcc. Nos restantes, para os quais existiam os valores de FEV1, também não se registaram alterações relevantes.

Nos doentes em que se determinou, regularmente, o IN/IMC, não se verificaram diferenças relevantes nos valores obtidos no ano anterior e nos anos posteriores ao isolamento das diferentes espécies de Bcc (Quadro VII). Para os doentes 21 e 22, falecidos durante o período deste estudo, não estão disponíveis os dados do IN/IMC devido aos numerosos e extensos períodos de internamento nos quais não foram recolhidos os valores da estatura. O doente 30 não residia em Portugal continental, motivo pelo qual também não estão disponíveis dados

relevantes na quantidade de hospitalizações ocorridas no ano anterior e nos anos seguintes ao isolamento da Bcc bactéria (Table V).

In patients in whom it was possible to perform serial lung function studies, a significant decrease in FEV1 values was seen after Bcc isolation in patient 17, colonised/infected by *B. multivorans* and *B. cenocepacia*, in patient 19, colonised/infected by *B. stabilis*, in patient 27, colonised/infected by a *B. cepacia* strain and patient 30 colonised/infected by *B. stabilis*, in line with these patients' clinical deterioration.

It is notable, however, that FEV1 values for the year immediately prior to the Bcc isolation, particularly for patients 17, 19 and 30, were already low, revealing prior clinical deterioration. The same was seen in patients 16, 23, 24 and 31. These patients, however, experienced no significant alterations before and after Bcc isolation, which is in line with their clinical picture (Table VI). There are no available records of FEV1 values prior to Bcc isolation for patients 18, 20 and 21. There were no relevant alterations registered either for the remaining patients for whom FEV1 values were available.

In patients whose NI/BMI was regularly assessed, there were no relevant differences seen in the values from the year prior to and the years following isolation of the different Bcc species (Table VII). IN/BMI data was not available for patients 21 and 22, who died during the study period, as they experienced several and prolonged hospitalisations, during which these data were not recorded. Patient 30 did not live in mainland Portugal, meaning the NI/

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

Quadro VI – Evolução da função respiratória no Grupo II

N.º do doente	1.ª antes 1.º isolamento FEV1	1.º a após 1.º isolamento FEV1	2.º a após 1.º isolamento FEV1	3.º a após 1.º isolamento FEV1	4.º a após 1.º isolamento FEV1
16	63,0%	53,8%	80,9%	ND	51,3%
17	27,0%	34,0%	22,0%	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND	53,2%
19	32,4%	28,0%	15,0%	ND	–
20	ND	56,8%	56,8%	52,3%	53,8%
21	ND	31,5%	28,9%	ND	–
22	ND	ND	–	–	–
23	34,0%	24,0%	30,9%	–	–
24	56,8%	52,9%	55,0%	52,3%	ND
25	104,8%	124,5%	111,4%	103,3%	124,5%
26	ND	ND	ND	ND	ND
27	60,2%	43,8%	ND	–	–
28	ND	87,1%	91,2%	ND	105,5%
29	99,0%	107,2%	ND	–	–
30	26,3%	20,3%	23,0%	18,0%	19,8%
31	33%	32%	–	–	–

ND – Não determinado/Não disponível

■ Faleceu; ■ Faleceu com síndrome da *cepacia*

Table VI – Evolution of lung function in Group II

Patient n.º	1 st before 1 st isolation FEV1	1 st after 1 st isolation FEV1	2 nd after 1 st isolation FEV1	3 rd after 1 st isolation FEV1	4 th after 1 st isolation FEV1
16	63.0%	53.8%	80.9%	NK	51.3%
17	27.0%	34.0%	22.0%	NK	NK
18	NK	NK	NK	NK	53.2%
19	32.4%	28.0%	15.0%	NK	–
20	NK	56.8%	56.8%	52.3%	53.8%
21	NK	31.5%	28.9%	NK	–
22	NK	NK	–	–	–
23	34.0%	24.0%	30.9%	–	–
24	56.8%	52.9%	55.0%	52.3%	NK
25	104.8%	124.5%	111.4%	103.3%	124.5%
26	NK	NK	NK	NK	NK
27	60.2%	43.8%	NK	–	–
28	NK	87.1%	91.2%	NK	105.5%
29	99.0%	107.2%	NK	–	–
30	26.3%	20.3%	23.0%	18.0%	19.8%
31	33%	32%	–	–	–

NK – Not known/Unavailable

■ Deceased; ■ Died as a result of *cepacia* syndrome

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

Quadro VII – Evolução do índice nutricional/índice de massa corporal no Grupo II

N.º do doente	1.º a antes 1.º isolamento	1.º a após 1.º isolamento	2.º a após 1.º isolamento	3.º a após 1.º isolamento	4.º a após 1.º isolamento
16	18,9**	19,1**	19,1**	ND	22,1**
17	35%*	ND	33%*	–	–
18	90%*	108%*	97,7%*	97,9%*	104%*
19	17**	16,1**	17,5**	ND	–
20	60%*	58%*	ND	54,5%*	53%*
21	ND	ND	ND	ND	–
22	ND	ND	–	–	–
23	21%*	20,9%*	17%*	–	–
24	87%*	89,6%*	85%*	87,1%*	87,5%*
25	96,8%*	87%*	91,5%*	86%*	100%*
26	ND	ND	ND	ND	98%*
27	97%*	ND	ND	–	–
28	ND	ND	ND	ND	ND
29	109%*	94,2%*	ND	–	–
30	ND	ND	ND	N.	ND
31	17,8**	19**	–	–	–

ND – Não determinado/Não disponível; * índice nutricional; ** índice de massa corporal

□ Faleceu; ■ Faleceu com síndrome da *cepacia*

Table VII – Nutritional index / body mass index evolution in Group II

PaTient n.º	1 st before 1 st isolation	1 st after 1 st isolation	2 nd after 1 st isolation	3 rd after 1 st isolation	4 th after 1 st isolation
16	18.9**	19.1**	19.1**	NK	22.1**
17	35%*	NK	33%*	–	–
18	90%*	108%*	97.7%*	97.9%*	104%*
19	17**	16.1**	17.5**	NK	–
20	60%*	58%*	NK	54.5%*	53%*
21	NK	NK	NK	NK	–
22	NK	NK	–	–	–
23	21%*	20.9%*	17%*	–	–
24	87%*	89.6%*	85%*	87.1%*	87.5%*
25	96.8%*	87%*	91.5%*	86%*	100%*
26	NK	NK	NK	NK	98%*
27	97%*	NK	NK	–	–
28	NK	NK	NK	NK	NK
29	109%*	94.2%*	NK	–	–
30	NK	NK	NK	N.	NK
31	17.8**	19**	–	–	–

NK – Not known/Unavailable; * nutritional index; ** body mass index

□ Deceased; ■ Died as a result of *cepacia* syndrome

de IN/IMC. Para os doentes 16, 17, 19, 23 e 31, registaram-se valores do IMC muito reduzidos, antes e após o isolamento de Bcc, o que, possivelmente, estará relacionado com a sua mais avançada idade e a progressão da doença.

Discussão

Embora o número de estudos que relaciona a evolução clínica dos doentes com a espécie do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) isolada seja reduzido, existe a ideia generalizada de que a espécie *B. cenocepacia* está associada a maior morbilidade e mortalidade em doentes com fibrose quística (FQ)^{2,3}. Nesse contexto, a determinação das espécies do complexo Bcc que colonizam/infectam doentes num dado centro de FQ tem assumido particular importância nos últimos anos, na medida em que se estabeleceu a ideia de que pode ser usada com carácter preditivo da evolução clínica do doente. No presente estudo, as espécies *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans* e *B. stabilis* foram isoladas nas secreções respiratórias da subpopulação de 31 doentes com FQ examinada. Na subpopulação estudada, as espécies *B. cepacia* e *B. stabilis*, muito pouco frequentes nas populações de FQ caracterizadas até ao momento, na Europa e na América do Norte (em que a prevalência se situa entre 0,2 a 4,8%, para *B. cepacia*, e 0,2 a 3,2%, para *B. stabilis*^{16,17,18,19}), foram isoladas numa percentagem elevada dos doentes examinados (57% e 13%, respectivamente). A prevalência, pouco habitual, destas espécies poder-se-ia explicar pela transmissão interdoentes. O facto de, na maioria dos doentes, se terem identificado estirpes únicas de Bcc^{22,23,24}, tal como seria de esperar num centro especializado em FQ, em que se pratica uma rigorosa política de isolamento, contraria, contudo, a hipótese de contágio entre doentes. A contami-

MBI data was not available. Patients 16, 17, 19, 23 and 31 had very low BMI values both before and after Bcc isolation, possibly reflective of their older age and the disease's progression.

Discussion

Despite the relatively few number of studies relating the clinical picture of patients with an isolated species of *Burkholderia cepacia* (Bcc) complex, there is a general idea that the *B. cenocepacia* species is associated to greater morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients^{2,3}. Hence, determining the Bcc complex species colonising/infecting patients at a given CF centre has become more and more important over the past years. The idea has gained ground that this can be used to predict the patient's clinical course. In our study, the *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans* and *B. stabilis* species were isolated from the respiratory secretions of the sub-population of 31 CF patients examined. In the sub-population studied, the species *B. cepacia* and *B. stabilis*, usually less frequent in the CF populations of Europe and America profiled so far (which have a rate from 0.2 – 4.8% for *B. cepacia* and 0.2 – 3.2%, for *B. stabilis*^{16,17,18,19}) were isolated in a considerable percentage of the patients examined (57% and 13%, respectively).

The unusual prevalence of these species can be explained by patient-to-patient transmission. The fact that unique strains of Bcc^{22,23,24} have been identified in the majority of these patients, just as expected in a specialised FC centre in which a strict isolation policy is practiced, contradicts, however, patient-to-patient transmission. Contamination of nebulisation/ salbutamol

Existe a ideia generalizada de que a espécie *B. cenocepacia* está associada a maior morbilidade e mortalidade em doentes com fibrose quística

Na sub-população estudada, as espécies *B. cepacia* e *B. stabilis* (...) foram isoladas numa percentagem elevada dos doentes

nação de soluções de nebulização com salbutamol, nebulizadores, *sprays* nasais e géis de ultrassonografia têm resultado, em diferentes países, em surtos de infecção nosocomial por Bcc^{6, 7, 25}. Num estudo recente, testou-se a hipótese de a elevada prevalência de espécies de Bcc pouco frequentes em populações de FQ, registada durante os anos de 2003-2005 no centro de FQ do HSM, se dever à utilização de soluções salinas não estéreis intrinsecamente contaminadas com *B. cepacia*²⁴. A contaminação destas soluções fora detectada pelo *Infarmed* durante o controlo microbiológico de rotina. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação epidemiológica entre a utilização das soluções contaminadas e a contaminação dos doentes²⁴. É necessário um estudo conjunto com outros centros portugueses, especializados nesta patologia, para avaliar se esta prevalência de espécies pouco usuais de Bcc é específica da subpopulação estudada ou se é generalizada na população de doentes portugueses com FQ.

Embora a *B. cepacia*, seguida de *B. cenocepacia*, fossem predominantes nesta subpopulação, os resultados obtidos não permitiram relacionar uma determinada espécie de Bcc isolada de um grupo de doentes com FQ com uma mais rápida deterioração pulmonar, uma vez que as quatro espécies isoladas nesta subpopulação se associaram a má evolução clínica, incluindo a síndrome da *cepacia* (3 espécies). Ainda que o reduzido número de doentes examinados limite conclusões mais definitivas, as espécies *B. cepacia* e *B. cenocepacia* originaram tanto colonizações intermitentes como colonizações/infecções crónicas, enquanto a *B. stabilis* e a *B. multivorans* originaram apenas colonizações/infecções crónicas. Em resultado da invulgar predominância de isolados das espécies *B. cepacia* e *B. stabilis* na população portuguesa com FQ recebendo cuidados médicos no Hospital

solutions, nebulisers, nasals sprays and ultrasound gels have led in different countries to outbreaks of hospital-acquired Bcc infection^{6, 7, 25}. A recent study tested the hypothesis that a high rate of Bcc species which are rarely found in CF populations and which was registered at our CF centre at the HSM during 2003-2005 was due to using non-sterile saline solutions intrinsically contaminated by *B. cepacia*²⁴. These contaminated solutions were detected by Infarmed during a routine microbiological inspection. It was not possible, however, to establish an epidemiological link between using contaminated solutions and patient contamination²⁴. A study performed in tandem with other Portuguese centres specialising in this pathology is needed to assess if this prevalence of unusual Bcc species is specific to the sub-population studied or if it is prevalent throughout the Portuguese CF patient population.

While *B. cepacia*, followed by *B. cenocepacia* predominated in this sub-population, the results obtained did not allow a determined species of Bcc isolated in a CF patient group to be linked to swifter lung deterioration, as the 4 species isolated in this sub-population are associated to a poor clinical picture, including *cepacia* syndrome (3 species). Further, the small number of patients limits firmer conclusions. The *B. cepacia* and *B. cenocepacia* species give rise to as many intermittent colonisations as chronic colonisations/infections, while *B. stabilis* and *B. multivorans* only give rise to chronic colonisations/infections. As a result of the unusual predominance of isolations of the *B. cepacia* and *B. stabilis* species in the Portuguese CF population receiving medical care at Lisbon's Hospital

As espécies

B. cepacia

e *B. cenocepacia*

originaram tanto

colonizações

intermitentes

como colonizações/

/infecções crónicas,

enquanto a *B. stabilis*

e a *B. multivorans*

originaram apenas

colonizações/

/infecções crónicas

de Santa Maria, em Lisboa, este estudo adverte para o facto de estas espécies serem ambas capazes de causar infecções crónicas com elevada morbilidade. Estas evidências contrastam com o que tem sido a conclusão de outros estudos, que parecem indiciar que situações de maior morbilidade e mortalidade estão associadas à espécies *B. cenocepacia* e *B. multivorans*, maioritariamente isoladas destes doentes^{2,3}. Note-se, no entanto, que a elevada percentagem destas quatro espécies na subpopulação portuguesa estudada, constituída por um reduzido número de doentes, quando comparada com as populações de outros estudos, poderá, no entanto, ter propiciado as referidas conclusões, que são obviamente impossíveis em populações afectadas apenas por *B. cenocepacia* e *B. multivorans*. Como seria de esperar, o grupo do isolamento crónico apresentou maior mortalidade, independentemente da espécie de Bcc isolada. Neste grupo, foi possível observar para alguns doentes um elevado número de internamentos e valores baixos de FEV1, concordante com uma maior deterioração. No entanto, a grande maioria dos doentes já se encontrava deteriorada antes do isolamento de Bcc, em resultado da colonização com outros agentes patogénicos e da progressão da doença. Em alguns casos, foi possível relacionar uma alteração destes parâmetros com a deterioração do doente em resultado da colonização com as bactérias do Bcc. Nos que permaneceram clinicamente estáveis, não se registaram alterações significativas nos valores de FEV1, no número de internamentos e no estado nutricional. Relativamente aos isolamentos intermitentes, há que salientar a dificuldade da identificação de isolados de Bcc a partir de culturas de secreções respiratórias, com implicações na identificação e na determinação do tipo de colonização brônquica^{26,27}. Existe alguma evidência de que a colonização pulmonar pode-

de Santa Maria, this study stresses the fact that both these species are capable of causing chronic infections, with high morbidity. This evidence contradicts the conclusion of other studies, which seem to indicate that situations of greater morbidity and mortality are associated to the *B. cenocepacia* and *B. multivorans* species, which were those isolated more than any other in these patients^{2,3}. It is notable that the high rate of these four species in the Portuguese sub-population under study, composed of a small number of patients could, in comparison to populations in other studies, have led to the conclusions in questions. This would obviously be impossible in populations only affected by *B. cenocepacia* and *B. multivorans*.

As expected, the chronic isolation group had higher mortality, independent of the Bcc species isolated. In this group it was possible in some patients to see a high number of hospitalisations and low FEV1 values, in line with the patients' major deterioration. A great number of patients, however, had already deteriorated prior to Bcc isolation as a result of colonisation by other pathogenic agents and disease progression. It was possible in some cases to link an alteration in these parameters with deterioration in the patient due to colonisation by Bcc bacteria. In clinically stable patients no significant alterations were seen in FEV1 values, number of hospitalisations and nutritional state. In terms of intermittent isolations, the difficulty in identifying Bcc isolations by respiratory secretion cultures should be underlined, with implications for the identification and determination of type of bronchial colonisation^{26,27}. There is evidence that lung colonisation might not be

O grupo do isolamento crónico apresentou maior mortalidade, independentemente da espécie de Bcc isolada

rá não ser detectada por culturas *standard* durante algum tempo (até 2 anos), após a aquisição de Bcc²⁸. Além disso, não é claro se, nos casos de isolamento intermitente, há uma reinfeção por uma nova estirpe ou se há recrudescência da estirpe inicial²⁷. No nosso grupo de doentes com isolamento intermitente, não se verificou, na maioria dos casos, substituição da estirpe inicial de Bcc.

Foram registados casos em que uma mesma estirpe (com o mesmo ribotipo) que infectou persistentemente um doente durante vários anos foi erradicada por antibioticoterapia ou não teve impacto, aparente, na situação clínica de outros doentes. As razões porque estirpes de diferentes espécies do complexo *B. cepacia* diferem na sua persistência, epidemiologia e potencial patogénico na FQ, e porque a mesma estirpe pode ser associada a evoluções clínicas muito diferentes, permanecem pouco claras, dependendo certamente de factores inerentes a cada doente específico, da co-colonização com outros patogénios e, certamente, de outros factores ainda por identificar, reforçando a importância da realização deste tipo de estudos.

Perante a incapacidade, à luz dos actuais conhecimentos, de orientar as medidas de profilaxia, pela caracterização molecular dos isolados do complexo Bcc, há que manter as medidas de controlo recomendadas, através da evicção dos contactos com doentes colonizados/infectados, do uso exclusivo, pelos doentes com FQ, de soluções salinas esterilizadas e da desinfecção sistemática de todos os componentes dos sistemas de nebulização, em cujos reservatórios as bactérias de Bcc crescem facilmente^{6,29}. As monitorizações frequentes dos medicamentos, relativamente à contaminação microbiana, e a vigilância de surtos inexplicados por agentes pouco frequentes, constituem também medidas muito importantes no controlo da infecção por Bcc²⁴.

detected by standard cultures for some time (up to 2 years) after Bcc acquisition²⁸. In addition, it is not clear if, in cases of intermittent isolation, there is a re-infection by a new strain or if there is a recrudescence of the initial strain²⁷. In the majority of cases in our intermittent isolation patient group, no replacement of the initial Bcc strain was seen.

Cases were registered in which the same strain (with the same ribotype) which persistently infected a patient over several years was eradicated by antibiotherapy or had no apparent impact on the clinical picture of other patients. It is not clear why strains of the different *B. cepacia* complex species differ in their persistence, epidemiology and pathogen potential in CF and why the same strain can be associated to very different clinical evolutions. It depends on factors inherent in each individual patient, on co-colonisation by other pathogens and other factors still to be identified, stressing the importance of undertaking studies of this type.

Based on the available data, it is not currently possible to outline preventive measures through the molecular characterisation of Bcc complex isolations and the recommended control measures must be followed. These measures are implemented via avoiding contact with colonised/infected patients, CF patients practising individual use of sterilised saline solutions and the systematic disinfection of all nebulisation system components, where sources of Bcc bacteria grow easily^{6,29}. The frequent monitoring of medication for microbe contamination and control of unexplained outbreaks by rare agents are very important control measures in con-

**Há que manter as
medidas de controlo
recomendadas**

A utilidade de conseguir orientar medidas de profilaxia através da caracterização molecular do complexo Bcc é de extrema importância, pois poderia evitar a segregação de alguns dos doentes infectados com estes agentes patogénicos. É bem conhecido que a “hospitalização” tem efeitos psicológicos nocivos e que a segregação dos doentes produz efeitos ainda mais negativos no seu bem-estar emocional^{30,31} e, em última análise, no seu bem-estar físico.

Agradecimentos

Ao Dr. Luís Lito, à Dra. Maria José Salgado e ao Prof. José Melo-Cristino, do Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Santa Maria, pelo apoio no isolamento e cultura das estirpes estudadas. À Dra. Pilar Azevedo e ao Dr. Carlos Lopes, da consulta de fibrose quística de adultos do Serviço de Pneumologia do Hospital de Santa Maria, onde alguns destes doentes são actualmente seguidos, pela disponibilização dos dados clínicos.

Bibliografia / Bibliography

1. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Ann Rev Phytopathol* 2001; 39:225-58.
2. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:144-56.
3. Speert, DP. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatr Respir Rev* 2002; 3:230-5.
4. Saiman L, Siegel J, Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control* 2003; 31:S1-S62.
5. Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia cepacia* occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol* 2003; 5:719-29.

trolling Bcc infection²⁴. It is very important to outline preventative measures through molecular profiling of the Bcc complex as this can avoid some patients infected with these pathogens being segregated. It is well established that hospitalisation can have undesirable psychological effects and that segregating patients can impact on their emotional well-being^{30,31} and, ultimately, their physical well-being even more negatively.

Acknowledgments

Thanks are due to Dr Luís Lito, Dr Maria José Salgado and Prof. José Melo-Cristino, of the Hospital de Santa Maria Bacteriology Laboratory, for help in the isolating and culture of the strains under study.

Thanks are due to Dr Pilar Azevedo and Dr Carlos Lopes of the Adult Cystic Fibrosis Clinic where some of these patients are currently followed, for making available their clinical data.

6. Holmes, B. The identification of *Pseudomonas cepacia* and its occurrence in clinical material. *J Appl Bacteriol* 1986; 61:299-314.
7. Oie, S, Kamiya A. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. *Am J Infect Control* 1996; 24:389-95.
8. LiPuma, JJ, Dase SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1990; 336:1094-6.
9. Govan JRW, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, Greening AP, Webb AK. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993; 342:15-9.
10. Smith DL, Gumery LB, Smith EG, Stableforth DE, Kaufmann ME, Pitt, TL. Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission. *J Clin Microbiol* 1993; 31:3017-22.
11. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, Paton JY. Outcome of *Bur-*

INFECÇÃO RESPIRATÓRIA POR BACTÉRIAS DO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA*: EVOLUÇÃO CLÍNICA EM DOENTES COM FIBROSE QUÍSTICA

Susana Correia, Catarina Nascimento, Luísa Pereira, Mónica V Cunha, Isabel Sá-Correia, Celeste Barreto

khorderia (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. Thorax 1995; 50:1194-8.

12. Hutchinson GR, Parker S, Pryor JA, Duncan-Skingle F, Hoffman PN, Hodson ME, Kaufmann ME, Pitt TL. Home-use nebulizers: a potential source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1996; 34:584-7.

13. Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60:539-74.

14. LiPuma JJ, T Spillker, T Coenye, Gonzalez CF. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. Lancet 2002; 359:2002-3.

15. Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol 2001; 39:3427-6.

16. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, Mahenthalingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. Am J Resp Crit Care Med 2001; 164:92-6.

17. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthalingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis in Canada: geographical distribution and clustering of strains. Emerg Infect Dis 2002; 8:181-7.

18. Agodi A, Mahenthalingam E, Barchitta M, Gianino V, Sciacca A, Stefani S. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology and genomovar status. J Clin Microbiol 2001; 39:2891-6.

19. Brisse S, Cordevant C, Vandamme P, Bidet P, Loukil C, Chabanon G, Lange M, Bingen E. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2004; 42:4824-7.

20. Mahenthalingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Geaville 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; 33:1469-75.

21. Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia*

multivorans, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. J Clin Microbiol 38: 3165-73.

22. Richau JA, Leitão JH, Correia M, Lito L, Salgado MJ, Barreto C, Cescutti P, Sá-Correia I. Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a Portuguese Cystic Fibrosis Center. J Clin Microbiol 2000; 38:1651-5.

23. Cunha MV, Leitão JH, Mahenthalingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, Salgado MJ, Sá-Correia I. Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese Cystic Fibrosis Center: a 7-year study. J Clin Microbiol 2003; 41:4113-20.

24. Cunha MV, Pinto-de-Oliveira A, Meirinhos Soares L, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Barreto C, Sá-Correia I. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among the *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Cystic Fibrosis Center. J Clin Microbiol 2007; 45:1628-33.

25. Balkhy HH, Cunningham G, Francis C, Almuneeff MA, Stevens G, Akkad N, Elgammal A, Alassiri A, Furukawa E, Chew FK, Sobh M, Daniel D, Poff G, Memish ZA. A National Guard outbreak of *Burkholderia cepacia* infection and colonization secondary to intrinsic contamination of albuterol nebulization solution. Am J Infect Control 2005; 33:182-8.

26. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A *et al.* Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 37:1004-7.

27. LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. Clin Chest Med. 1998; 19: 473-86

28. LiPuma, JJ, Marks-Austin KA, Holsclaw DS *et al.* Inapparent transmission of *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* among patients with cystic fibrosis. Pediatr Inf Dis J 1994; 13:716.

29. Concepcion F, Estivariz MD, Lubna I, Bhatti MD *et al.* An outbreak of *Burkholderia cepacia* associated with contamination of albuterol and nasal spray. Chest 2006; 130:1346-50.

30. Festini F, Buzzetti R, Bassi C, Braggion C *et al.* Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review. J Hosp Infect 2006; 64:1-6.

Duff AJ. Psychological consequences of segregation resulting from chronic *Burkholderia cepacia* infection in adults with CF. Thorax 2002; 57:756-8.