



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Tania Wrobel Folescu

**Complexo *Burkholderia cepacia*: impacto clínico em pacientes com Fibrose
Cística acompanhados no Rio de Janeiro**

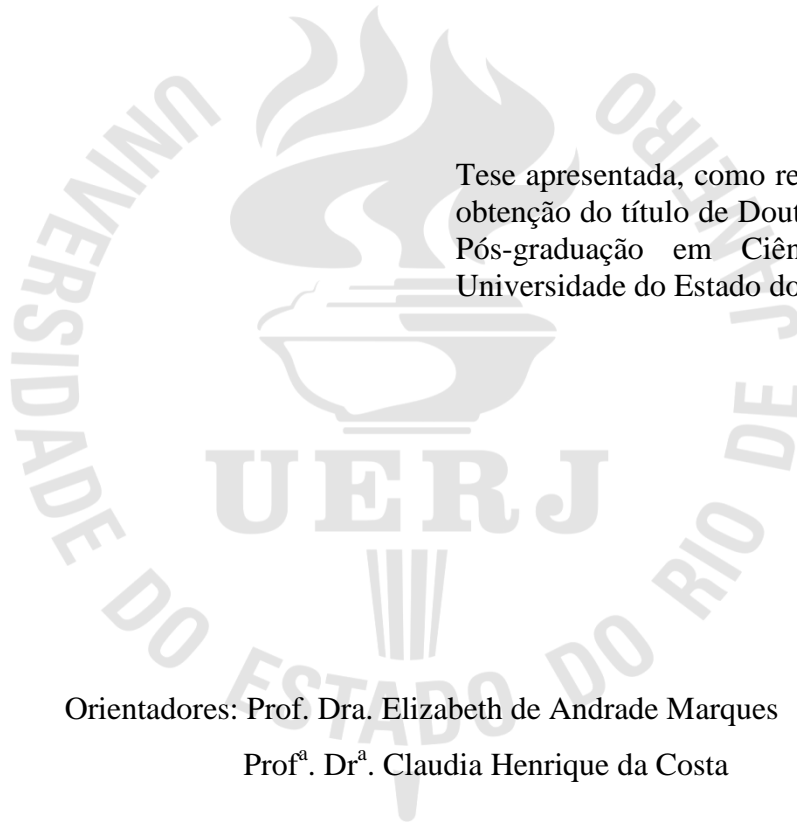
Rio de Janeiro

2016

Tania Wrobel Folescu

**Complexo *Burkholderia cepacia*: impacto clínico em pacientes com Fibrose Cística
acompanhados no Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Médicas da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



Orientadores: Prof. Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Prof^ª. Dr^ª. Claudia Henrique da Costa

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F663 Folescu, Tania Wrobel.

Complexo *Burkholderia cepacia*: impacto clínico em pacientes com fibrose cística acompanhados no Rio de Janeiro. - 2016
71 f.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques.

Coorientadora: Cláudia Henrique da Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Fibrose cística – Teses. 2. Índice de massa corporal - Teses.
3. *Burkholderia cepacia*. 4. Teste de função respiratória. I. Marques,
Elizabeth de Andrade Marques. II. Costa, Cláudia Henrique.
III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 616.24

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Tania Wrobel Folescu

**Complexo *Burkholderia cepacia*: impacto clínico em pacientes com Fibrose Cística
acompanhados no Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Médicas da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de novembro de 2016.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof^ª. Dra Cláudia Henrique da Costa (Coorientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr Agnaldo José Lopes
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr Rogério Lopes Rufino
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra Laurinda Yoko Shinzato Higa
Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira

Prof^ª. Dra Ana Paula D´Alincourt Carvalho Assef
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2016

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio incondicional,
mesmo nos momentos em que nada parecia possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar onipresente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, Pedro (*em memória*) pelas lições de ética, humildade e perseverança, e que certamente estaria comemorando esse momento de realização.

À minha mãe Eva, grande conselheira e ouvinte, por estar sempre presente em minha vida, com lições de força de vontade, respeito, dignidade e fé.

Ao meu marido Jaime, pelo apoio matemático e preciso, e pela paciência, mesmo nos momentos de grandes questionamentos.

Às minhas filhas, grandes amigas e confidentes, que iluminam a minha vida todos os dias:

Renata, minha colega de profissão e de corrida, por acreditar em todos os meus projetos, por me fazer acreditar que tarefa dada é tarefa cumprida. Seu incentivo e exemplo de resistência e determinação muito contribuíram para cada etapa desta realização.

Julia, exemplo de maturidade e decisão, e que mesmo à distância, me ofereceu apoio crítico e estatístico, e me fez acreditar que amor e carinho, muitas vezes, dispensam palavras.

À minha neta Nina, por me fazer entender que ser avó transcende todos os sentimentos de amor e carinho.

À Prof Dr^a Elizabeth Marques pelos anos de parceria e amizade e pelo incentivo à pesquisa, me fazendo entender definitivamente que pesquisa e assistência caminham juntas.

À Prof Dr^a Claudia Henrique Costa, por sua receptividade e paciência, e por me encorajar a seguir os caminhos da pesquisa, sempre com entusiasmo.

À Dr^a Laurinda Higa, pela amizade, por seus grandes conhecimentos em Medicina, que transmitidos ao longo dos anos, me fizeram construir uma visão diferenciada da prática médica.

Ao Prof Dr Ronir Raggio Luiz pelo apoio estatístico, de fundamental importância na concretização dos resultados.

A toda equipe do PGCM, pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do IFF, pelo dia-a-dia e trabalho em equipe.

Aos pacientes, que não só me incentivam a estudar a complexidade da Fibrose Cística, mas também me fazer entender que a vida vale a pena.

A dor é passageira, o orgulho é para sempre.

(das Maratonas da vida)

RESUMO

FOLESCU, Tania Wrobel. **Complexo *Burkholderia cepacia*: impacto clínico em pacientes com fibrose cística acompanhados no Rio de Janeiro**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

As infecções respiratórias recorrentes são a maior causa de morbimortalidade na Fibrose Cística (FC). O aumento da sobrevivência dos pacientes com FC e o uso de vários esquemas de antibióticos favorecem a emergência de organismos resistentes, tais como bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*, que hoje conta com 20 espécies identificadas. A colonização por bactérias do complexo *B. cepacia* (CBc) tem sido associada a pior prognóstico e infecção cruzada entre pacientes com FC. O objetivo desta tese foi avaliar a repercussão clínica da colonização pelas bactérias do CBc em pacientes com FC, acompanhados no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira e no Hospital Universitário Pedro Ernesto, colonizados por *Pseudomonas aeruginosa* e por CBc e avaliar seu impacto na progressão da doença pulmonar. Com base em culturas de secreções respiratórias realizadas de rotina, foram identificados pacientes cronicamente colonizados por *P. aeruginosa* e por bactérias do CBc de 2004 a 2013. Estes pacientes foram separados em 3 grupos: I- portadores de colonização intermitente (1 ou 2 culturas positivas em 12 meses); II- portadores de colonização crônica (3 ou mais culturas positivas em pelo menos 12 meses) e III - nunca colonizados por bactérias do complexo *B. cepacia*. Os pacientes dos três grupos foram avaliados e comparados quanto ao estado nutricional (índice de massa corporal - IMC) e à função pulmonar (VEF₁ e CVF). Dos 56 pacientes cronicamente colonizados por *P. aeruginosa* incluídos, 27 apresentavam também colonização por bactérias do CBc (13 intermitente/14 crônica). Os percentis de IMC foram significativamente menores em pacientes cronicamente colonizados por *P. aeruginosa* e bactérias do complexo *B. cepacia*. Os valores médios de VEF₁% e CVF% também foram significativamente menores nestes pacientes tanto no momento da colonização crônica quanto após 24 meses de acompanhamento. A taxa média de queda anual de VEF₁% e CVF% também foi maior neste grupo. A colonização crônica por bactérias do CBc está associada à perda significativa da função pulmonar e IMC menor pode preceder e ser fator de risco para colonização crônica por este grupo de bactérias.

Palavras-chave: Fibrose Cística, *Burkholderia cepacia*. Testes de função respiratória. Índice de massa corporal.

ABSTRACT

FOLESCU, Tania Wrobel. ***Burkholderia cepacia* complex: clinical course in cystic fibrosis patients.** 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Respiratory infections in cystic fibrosis (CF) are the main cause for morbidity and mortality. Prolonged survival and frequent use of antibiotics has led to knowledge of emergent pathogens in CF, *Burkholderia cepacia* complex (BCC), a group of 20 identified species. BCC colonization has been associated to poor prognosis and cross-infection in CF patients. The aim of this thesis was to investigate the clinical outcome of BCC colonization in CF patients chronically colonized with *Pseudomonas aeruginosa*, who were followed at two CF reference centers in Rio de Janeiro (Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira and Hospital Universitário Pedro Ernesto). CF patients chronically colonized with *P. aeruginosa* were divided into three groups: intermittent (I), chronic (II) and no colonization (III) with BCC. Body mass index (BMI) percentile and spirometric parameters were analyzed at three different times in each group. Fifty-six patients chronically colonized with *P. aeruginosa* were included. Of these, 27 also had evidence of BCC colonization (13 intermittent and 14 chronic). BMI percentile was significantly lower among patients chronically colonized by both *P. aeruginosa* and BCC. Mean values of FEV₁% and FVC % were also significantly lower in these patients, both at the time of chronic BCC colonization and 24 months forward. Mean annual rate of decline of both FEV₁% and FVC % was also higher for these patients. Chronic BCC colonization is associated with significant loss of lung function. Lower BMI might be a risk factor for chronic BCC colonization, preceding these events.

Keywords: Cystic fibrosis. *Burkholderia cepacia*. Respiratory Function Tests. Body mass index.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema representativo do estudo: momentos de avaliação dos grupos	26
Figura 2 -	Fluxograma do estudo	30
Tabela 1 –	Características da população do estudo	32
Tabela 2 -	Dados espirométricos e percentil de IMC no momento 1	33
Tabela 3 -	Dados espirométricos e percentil de IMC no momento 2	35
Tabela 4 -	Dados espirométricos e percentil de IMC no momento 3	36
Tabela 5 -	Dados espirométricos (Taxa de declínio anual: VEF1% e CVF% preditos)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BGNMF	Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> - proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística
CVF	Capacidade vital forçada
F508del	Delta F 508 (deleção de três pares de base do códon da fenilalanina)
DRFC	Diabetes relacionado à Fibrose Cística
FC	Fibrose Cística
EUA	Estados Unidos da América
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
IMC	Índice de massa corporal
LABACT	Laboratório de Bacteriologia
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TIR	Tripsina imunorreativa
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	22
1.1	Objetivo geral	22
1.2	Objetivos específicos	22
2	MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1	Aspectos éticos	23
2.2	Instituições participantes	23
2.3	Desenho experimental	24
2.3.1	<u>Critérios de inclusão da população</u>	24
2.3.2	<u>Critérios de exclusão</u>	24
2.3.3	<u>Desenho do estudo</u>	25
2.3.4	<u>Coleta de dados</u>	27
2.3.5	<u>População em estudo</u>	27
2.3.5.1	Avaliação da função respiratória	28
2.3.5.2	Avaliação do estado nutricional	28
2.3.5.3	Avaliação bacteriológica	29
2.4	Análise estatística	29
3	RESULTADOS	30
3.1	Características da população	31
3.2	Colonização crônica por <i>P. aeruginosa</i> (momento 1)	32
3.3	Colonização crônica por bactérias do complexo <i>B. cepacia</i> (momento 2)	34
3.4	Evolução dados espirométricos e nutricionais (momento 3)	35
3.5	Evolução anual dos dados espirométricos	36
3.6	Identificação das espécies do Complexo <i>B. Cepacia</i>	37
4	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

APÊNDICE A – <i>Burkholderia cepacia</i> complex: clinical course in cystic fibrosis patients	51
APÊNDICE B - Monitoring clinical and microbiological evolution of a cystic fibrosis patient over 26 years: experience of a Brazilian CF centre	57
ANEXO A - Declaração de aprovação no comitê de ética do Instituto Fernandes Figueira	67
ANEXO B - Declaração de aprovação no comitê de ética do Hospital Pedro Ernesto	70

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) tem sido considerada a doença congênita letal mais comum em populações de origem caucasiana (Europa Central, América do Norte, Austrália). A incidência varia entre os países e grupos étnicos, atingindo 1:2500 a 1:3500 caucasianos nascidos vivos na Europa e América do Norte (GIBSON *et al.*, 2003). Segundo as informações do registro norte-americano de pacientes da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF PATIENT REPORT, 2014), mais de 28.000 pacientes recebem tratamento em Centros de Referência, sendo mais de 50% adulto. No Brasil, não existem estudos epidemiológicos abrangentes que permitam estimar a incidência nas diversas regiões, porém um estudo nas regiões Sul e Sudeste evidenciou a incidência de 1:7576 nascidos vivos (RASKIN, 2001) e dados do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (Registro Brasileiro de Fibrose Cística- REBRAFC, 2014) referem que, 3.511 pacientes haviam sido registrados, dos quais, 3.327 (94,7%) tinham algum seguimento nos centros de referência para FC em todo o Brasil e 25% tinham idade acima de 18 anos.

A base genética para FC é a existência de mutações em um único gene do braço longo do cromossomo 7 (GIBSON *et al.*, 2003). Em se tratando de doença autossômica recessiva, os pais dos indivíduos afetados por FC são ambos heterozigotos portadores de mutação. O que se espera de um heredograma de FC a partir de pais heterozigotos é que 25% da prole seja de homozigotos normais, 50% de heterozigotos fenotipicamente normais e 25% de homozigotos afetados pela doença. Segundo os dados da *Cystic Fibrosis Mutation Database* (CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE, 2016), já foram descritas 2009 mutações responsáveis pela transmissão da doença. A mutação F508del é a mais frequente na população mundial. Os dados da *World Health Organization* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004) evidenciam que nas populações originárias do norte da Europa, a DF508 é responsável por 70-75% das mutações, e sua incidência diminui no centro e Sul da Europa). No Brasil, em um estudo realizado com pacientes das regiões Sul e Sudeste, a mutação DF508 foi encontrada em aproximadamente 47% dos alelos (RASKIN *et al.*, 1993). No estado do Rio de Janeiro observou-se frequência reduzida de DF508 (30,68%) em relação às taxas mundiais e também a outros estados brasileiros como São Paulo (50%) e Rio Grande do Sul (47%) (CABELLO *et al.*, 1999).

O gene da FC codifica uma proteína que regula o transporte transmembrana de células epiteliais, a CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística), que se localiza na membrana apical de diversas células epiteliais e cuja disfunção leva ao desencadeamento da sequência fisiopatológica da FC (LUCZAK *et al.*, 2002). A partir de sua síntese, a CFTR é “dobrada” e preparada para o transporte até a membrana celular no retículo endoplasmático. Uma vez na membrana da célula, ela é responsável pela condução de cloro através da mesma e atua na regulação do conteúdo de íons e água nas secreções luminiais. O conhecimento dos mecanismos moleculares pelos quais as mutações levam à expressão da FC permitiu que elas fossem agrupadas em sete classes de acordo com os efeitos funcionais na síntese e maturação da proteína CFTR (NISSIM-RAFINIA *et al.*, 2007;). As mutações de classe I interferem na produção da CFTR, ou seja, esta proteína não é sintetizada. Nas mutações de classe II, como a DF508, a CFTR é mal processada, sendo degradada no retículo endoplasmático. As mutações de classe III codificam CFTR que chega à membrana apical, mas que é incapaz de ser ativada. Nas mutações de classe IV, a CFTR chega à membrana celular, é ativada, mas o canal de cloro não funciona adequadamente. As mutações de classe V interferem na maturação da CFTR gerando uma quantidade menor de proteína, que, no entanto, é funcional. As mutações de classe VI desestabilizam a proteína CFTR na superfície das células, seja por aumento da endocitose ou por diminuição da reciclagem das mesmas de volta para superfície das células. Já as mutações de classe VII geram proteínas CFTR irrecuperáveis, pois não há RNA mensageiro disponível, interferindo na formação da proteína (DE BOECK & AMARAL, 2016; ORENSTEIN *et al.*, 2000). Assim, as mutações de classe I, II e III estão geralmente associadas à deficiência absoluta de atividade da CFTR, enquanto as mutações de classe IV, V e VI conferem atividade residual desta proteína. Essa classificação tem sido útil no entendimento da correlação genótipo-fenótipo, principalmente no que se refere ao comprometimento pancreático: as mutações de classe I, II e III configuram um quadro clínico mais completo com insuficiência pancreática e doença pulmonar; as mutações de classe IV e V tendem a expressar formas mais brandas de deficiência da CFTR, que incluem desde quadros de suficiência pancreática até FC atípica, que se apresenta com comprometimento pulmonar leve e/ou agenesia congênita de vasos deferentes em homens e até ausência completa de sinais e sintomas em mulheres (MOSKOWITZ *et al.*, 2005). O entendimento dos efeitos moleculares e celulares das mutações de CFTR são informativos para estudos de estrutura e função e também

permitem estudos para terapias corretivas para mutações específicas (DE BOECK & AMARAL, 2016).

Desta forma, o defeito genético básico e a subsequente disfunção da CFTR resultam em produção de secreções hiperviscosas a partir de glândulas exócrinas, que, por sua vez, leva às diferentes expressões clínicas da doença, tais como: concentração de cloro elevada no suor, comprometimento respiratório caracterizado por infecções bacterianas e bronquiectasias, insuficiência pancreática, obstrução intestinal, cirrose biliar e agenesia congênita bilateral de vasos deferentes, características muitas vezes encontradas em combinação (ORENSTEIN *et al.*, 2000).

Na maioria dos pacientes com FC a insuficiência pancreática está presente desde o período neonatal. Normalmente, a proteína CFTR presente na membrana apical das células dos ductos pancreáticos é responsável pela secreção de bicarbonato, cloro e fluidos para sua luz, mantendo a solubilidade das enzimas derivadas dos ácinos e transportando-as para o duodeno. Nos pacientes com FC, a disfunção da CFTR leva à redução de bicarbonato e fluidos e ao conseqüente aumento da viscosidade da secreção pancreática. Aparentemente o comprometimento pancreático é subsequente à obstrução ductal por secreções espessas e posterior substituição acinar por fibrose (NISSIM-RAFINIA *et al.*, 2007). O resultado da disfunção pancreática descrita é a má absorção de nutrientes, desnutrição e vários sintomas relacionados ao trato gastrointestinal, tais como dor e distensão abdominal, diarreia, constipação, anemia e edema (LUDWIG, 2008).

Para que o diagnóstico de FC seja estabelecido é preciso que o paciente apresente pelo menos uma característica fenotípica compatível, tenha história familiar de irmão com FC, ou, ainda, tripsina imunorreativa sérica elevada detectada durante rastreamento neonatal pelo “teste do pezinho” (ROSENSTEIN & CUTTING, 1998) bem como apresente características laboratoriais de disfunção da CFTR (FARRELL *et al.*, 2008). Essas evidências podem incluir teste do suor alterado ou medida da diferença de potencial nasal/retal alterados ou presença de duas mutações conhecidas para FC no gene da CFTR. A análise da concentração de eletrólitos no suor tem sido a medida mais simples da função da CFTR e é considerada padrão ouro no diagnóstico da FC, desde que um procedimento padrão conhecido como método de Gibson & Cooke foi estabelecido em 1959. O cloreto é o íon primário a ser avaliado no teste do suor, embora a concentração de sódio acompanhe o resultado do teste. Uma concentração de cloro

≥ 60 mmol/L confirma o diagnóstico de FC, valores entre 40 e 59 mmol/L são considerados intermediários e valores < 40 mmol/L são considerados normais. Para crianças menores de seis meses, o Consenso da *Cystic Fibrosis Foundation* recomenda que os valores de cloreto no suor: ≤ 29 mmol/L sejam indicadores de FC improvável; 30 a 59 mmol/L são valores intermediários e ≥ 60 mmol/L indicativo de FC (FARREL *et al*, 2008). A pesquisa de mutações para FC permite o diagnóstico de casos atípicos (com resultados de testes do suor normais), a identificação de portadores, o diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético, sendo que em alguns países faz parte do programa de triagem neonatal. A medida da diferença de potencial nasal é um exame complementar ao teste do suor para o diagnóstico de FC. Seu principal benefício reside na possibilidade de se realizar o diagnóstico em pacientes nos quais o teste do suor tenha sido negativo ou inconclusivo.

Sabe-se que o diagnóstico precoce pode ter papel importante na sobrevida de pacientes com FC e pesquisas apontam que os pacientes diagnosticados a partir da triagem neonatal têm quadro nutricional e respiratório melhores do que os diagnosticados a partir do quadro clínico, até idade mais avançada. Segundo a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFR PATIENT REGISTRY, 2014), a mediana de idade de sobrevida dos pacientes com FC tem aumentado nos últimos 25 anos e, em 2014, chegou aos 39 anos nos Estados Unidos da América (EUA).

A principal causa de morte por FC é a doença pulmonar, responsável por mais de 80% dos óbitos, seguida de complicações pelo comprometimento hepático. Alguns fatores parecem ter efeito negativo na sobrevida: gênero feminino, comprometimento funcional respiratório, desnutrição, diabetes, exacerbações respiratórias frequentes, além da presença de mutação DF508 e condições sociais adversas que limitem o acesso a tratamento especializado (BUZZETTI *et al.*, 2009).

Existem evidências favoráveis à ideia de que a lesão pulmonar em FC se deve a mediadores inflamatórios liberados por neutrófilos que migraram para os pulmões em resposta à infecção crônica. A concentração de neutrófilos em vias aéreas de pacientes com FC é dez vezes maior que em indivíduos saudáveis e a neutrofilia verificada nas vias aéreas tem sido associada a mediadores que recrutam mais células inflamatórias para o pulmão (interleucina 8 – IL8) e também que aumentam a lesão tissular (elastase derivada de neutrófilos). Assim, a terapia antimicrobiana, reduzindo o estímulo para a migração de neutrófilos deve atenuar a lesão tecidual pulmonar (RAO & GRIGG, 2006). No entanto, estudo a partir de lavado broncoalveolar em

crianças com FC demonstrou que tanto os infectados quanto os não infectados apresentavam maior número de neutrófilos em vias aéreas do que os indivíduos controle. Essa evidência sugere que nas vias aéreas de pacientes com FC possa haver um estado “pró-inflamatório”, isto é, predisposição para resposta inflamatória excessiva e prolongada. Existem evidências a partir de estudos em animais e humanos de que a inflamação na FC é desproporcional aos níveis de infecção bacteriana, mas ainda permanece pouco claro se a inflamação precede a infecção nesses pacientes (MOSKOWITZ *et al.*, 2005).

De forma direta ou indireta, a infecção pulmonar crônica na FC está envolvida na sequência fisiopatológica que é responsável pela morbimortalidade dos pacientes (MARQUES, 2011). As infecções bacterianas são polimicrobianas e se estabelecem muito precocemente nesses pacientes. Em geral, estão associadas a um número limitado de microrganismos. *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* estão relacionados a infecções em pacientes mais jovens. A infecção por *S. aureus* pode ser crônica ou intermitente e seu impacto na sobrevida dos pacientes com FC é controverso, porém as consequências das infecções crônicas por *S. aureus* parecem ser menos graves do que as infecções por *Pseudomonas aeruginosa*.

Com o curso da doença, *P. aeruginosa* coloniza cronicamente o trato respiratório, e esse microrganismo passa a produzir um polímero de polissacarídeo denominado alginato, caracterizando o fenótipo mucoide (DAVIS, 2006). A infecção por este microrganismo suscita uma resposta inflamatória exuberante e os produtos bacterianos e neutrofílicos destroem as paredes das vias aéreas. Além disso, existe hipertrofia das glândulas e células do epitélio, cujas secreções contribuem para a impactação mucoide. As bronquiectasias se instalam juntamente com o crescimento de vasos sanguíneos predispondo a hemoptises. O enfisema também é consequência de todo esse processo e a infecção bacteriana persistente exacerba-se periodicamente, exigindo intervenção clínica adequada (ORENSTEIN *et al.*, 2000). A colonização crônica por *P. aeruginosa* está associada à deterioração pulmonar e ao pior prognóstico clínico em pacientes com FC (KEREM *et al.*, 1990). A colonização precoce (antes de 5 anos de idade) está associada a um risco de morte 2,6 vezes maior e a um volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) 14% mais baixo quando comparado com pacientes não colonizados (ROSENFELD *et al.*, 2003), corroborando com a ideia da associação deste perfil microbiológico com maior morbidade e mortalidade (NIXON *et al.*, 2001).

Muitas bactérias podem ser encontradas nas secreções respiratórias de pacientes com FC e técnicas moleculares têm demonstrado que a diversidade de microrganismos presentes no escarro e no lavado broncoalveolar é bastante alta. A maioria desses patógenos é composta por Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores (BGNNF), um grupo caracteristicamente ambiental e raro em outros pacientes, sugerindo que o pulmão do paciente com FC seja um nicho particular para o estabelecimento de microrganismos oportunistas. Destacam-se neste grupo: bactérias do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*. Para os pacientes com FC, a correta identificação destas bactérias tem implicações epidemiológicas e terapêuticas (LUDWIG, 2008). As bactérias do CBc constituem um grupo de patógenos que parecem interferir no curso da doença pulmonar, e além disso algumas cepas podem causar infecção cruzada em pacientes com FC. Com o objetivo de minimizar a possibilidade de infecção cruzada, os pacientes cronicamente infectados por *P. aeruginosa* e bactérias do CBc precisam ser segregados (SAIMAN *et al.*, 2003). O convívio social é evitado e cuidados no atendimento ambulatorial, bem como de isolamento durante as internações devem ser respeitados. Com base na importância das bactérias que colonizam o trato respiratório e o aumento de evidências de que o tratamento precoce é benéfico para o paciente com FC, recomenda-se a realização de culturas regulares das secreções respiratórias (GIBSON *et al.*, 2003).

Como o curso da FC varia entre os pacientes, com o acompanhamento regular, pode-se estabelecer terapia individualizada atendendo às necessidades de cada um. Nesse sentido são necessárias informações que retratem claramente as condições do sistema respiratório e da progressão das lesões estruturais pulmonares. Nos centros de referência, avaliações clínicas multidisciplinares são feitas a cada dois ou três meses e incluem exames complementares como cultura de secreção de vias aéreas. Avaliações sanguíneas (incluindo hemograma, bioquímica, função hepática pancreática e renal), e de imagem, como ultrassonografia abdominal, radiografia de tórax e ecocardiograma são realizados uma ou duas vezes no ano. Este acompanhamento constitui a “chave do sucesso” para a avaliação da condição multissistêmica do paciente e é usado para acompanhar a progressão da doença e a resposta às intervenções terapêuticas (GIBSON *et al.*, 2003).

A doença pulmonar é a maior causa de morbidade e mortalidade em FC e cursa com obstrução progressiva de vias aéreas decorrente de menor *clearance* mucociliar, obstrução

bronquiolar e brônquica, infecções endobronquicas recorrentes e inflamação persistente, bem como destruição de vias aéreas. Os testes de função pulmonar têm sido considerados instrumento fundamental no monitoramento da função pulmonar e constitui uma medida indireta e não invasiva da estrutura pulmonar (JONG *et al.*,2004). Devido as frequentes exacerbações, há um declínio progressivo do VEF₁ por ano, e este parâmetro tem sido apontado como fundamental no monitoramento da progressão da doença. Quanto menor for o VEF₁, mais grave é a doença pulmonar (CFF PATIENT REGISTRY, 2014). Em geral, a presença de um VEF₁ maior ou igual a 90% do predito sugere função pulmonar normal embora possa haver evidências de lesão pulmonar mesmo com espirometrias com valores normais; VEF₁ de 70 a 89% indica doença pulmonar leve; de 40 a 69%, doença moderada e abaixo de 40% traduz doença pulmonar grave¹. Devido aos avanços terapêuticos, a queda do VEF₁ tem sido mais lenta nas últimas décadas, mas ainda é uma característica marcante da FC e um importante marcador da evolução da doença (CFF PATIENT REGISTRY, 2014).

O quadro nutricional de pacientes com FC é melhor atualmente do que era há 10 anos, porém, o investimento contínuo nesta questão é fundamental no acompanhamento desses pacientes. Do ponto de vista nutricional, existem alvos específicos a serem atingidos e o índice de massa corporal (IMC) tem sido apontado como o parâmetro mais importante a ser monitorado. Para crianças e adolescentes com FC, o IMC é definido em percentis comparáveis com indivíduos sem FC, e o objetivo é manter os pacientes o mais próximo possível do percentil 50. A associação de um melhor quadro nutricional com melhora da função pulmonar está bem documentada, assim como a piora nutricional é um dos fatores de risco para perda de função pulmonar (ZEMANICK *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de estratégias antimicrobianas para patógenos respiratórios em FC tem sido um componente fundamental na melhora de sobrevida para esses pacientes e isso depende da detecção e identificação apropriada desses agentes. Pode ser difícil saber quando um microrganismo é verdadeiramente emergente ou quando o aumento de sua frequência é resultado de melhorias nas técnicas de biologia molecular que permitiram sua identificação (LUTZ *et al.*, 2011). A evolução do conhecimento em relação aos microorganismos emergentes pode trazer impacto na luta contra a evolução natural da doença pulmonar na FC.

A espécie *Burkholderia cepacia* foi primeiramente isolada na década de 1940, por Walter Burkholder, que descreveu uma patologia em bulbos de cebola, propondo na ocasião o nome

Pseudomonas cepacia para o agente etiológico (BURKHOLDER, 1950). Em 1992, após estudos de homologia do ácido nucleico em espécies do gênero *Pseudomonas*, algumas espécies foram transferidas para o novo gênero Burkholderia, em homenagem ao pesquisador que descreveu o microorganismo (VANDAMME & DAWYNDT, 2011). Mais tarde, estudos taxonômicos utilizando técnicas mais refinadas como análise da sequência 16S rRNA, ácidos graxos e hibridização DNA-DNA, demonstraram que os microrganismos identificados inicialmente como “*B. cepacia*” apresentavam similaridades fenotípicas e eram distintos genotipicamente. Por convenção taxonômica esses microrganismos foram designados em “variantes genômicas”. Atualmente essas variantes genômicas foram formalmente reconhecidas como espécies do CBc e 20 receberam identificação binomial: *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. arboris*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. contaminans*, *B. difusa*, *B. dolosa*, *B. latens*, *B. lata*, *B. metallica*, *B. multivorans*, *B. pyrrocyntia*, *B. seminalis*, *B. stabilis*, *B. ubonensis*, *B. vietnamiensis*, *B. pseudomultivorans*, *B. stagnalis* e *B. territorii* (VANDAMME & DAWYNDT, 2011; PEETERS *et al.*, 2013; DE SMET *et al.*, 2015). Embora quase todas as espécies (exceto a *B. ubonensis*) já tenham sido isoladas em pacientes com FC, as espécies mais prevalentes são a *B. cenocepacia* (Estados Unidos, Canadá e França), seguida de *B. multivorans* (CORREIA *et al.*, 2008; DREVINEK & MAHENTHIRALINGAM, 2010).

Através de análise da sequência do gene *recA*, é possível subdividir o genomovar III – *B. cenocepacia* – em quatro grupos ou *clusters* filogenéticos: IIIA, IIIB, IIIC, IIID, porém a maioria das amostras clínicas é dos grupos IIIA e IIIB (VANDAMME & DAWYNDT, 2011).

Existe uma grande heterogeneidade na deterioração da função pulmonar de pacientes infectados por bactérias do CBc. A maioria dos estudos relata que a infecção por esse grupo de bactérias pode estar associada tanto a quadros pouco sintomáticos quanto a formas progressivas de deterioração da função pulmonar, e também a quadros graves, com rápido declínio da função pulmonar e bacteremia fulminante (“síndrome cepacia”) (CORREIA *et al.*, 2008). Estudos descrevem a associação de colonização por bactérias do CBc com declínio acelerado da função pulmonar e do índice de massa corporal (IMC), sendo mais evidente quando da colonização por *B. cenocepacia* (COURTNEY *et al.*, 2004). Todo esse contexto sugere que a patogenicidade da infecção pelas bactérias do CBc pode variar, porém a *B. cenocepacia* tem tido maior relevância porque tem sido associada a um aumento da mortalidade e alto risco de desenvolvimento de síndrome cepacia (JONES *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2011).

As bactérias do CBc se caracterizam pela resistência intrínseca a vários antibióticos. Essa resistência é causada por vários mecanismos como: permeabilidade limitada, mudança na estrutura dos lipopolissacarídeos, presença de bombas de efluxo, beta-lactamases cromossômicas induzíveis e alteração de proteínas ligadoras de penicilina. Além disso, essas bactérias podem adquirir resistência durante o uso frequente de antibióticos, o que contribui para as dificuldades terapêuticas para esses pacientes (NZULA *et al.*, 2002; RHODES & SCHWEIZER, 2016).

Outro fator de preocupação sobre as bactérias do CBc tem sido a possibilidade de sua transmissão entre os pacientes com FC através de contato social, contato próximo e partilha de equipamentos de terapêutica inalatória. Desta forma, a grande maioria dos centros de referência em todo o mundo tem adotado medidas rígidas de higiene e segregação tanto hospitalar como ambulatoriais entre os pacientes colonizados e não colonizados por bactérias do CBc (CORREIA *et al.*, 2008).

O reconhecimento do CBc e, em especial, a identificação das espécies do complexo é uma tarefa bastante complexa no laboratório clínico devido a proximidade filogenética e a similaridade fenotípica não só entre as espécies do CBc como também entre outras BGNNF, por exemplo *Ralstonia* spp e *Pandoraea* spp. Em geral, os laboratórios utilizam, na rotina, procedimentos manuais e/ou automatizados que costumam ter bons resultados para bacilos Gram negativos. No entanto, são comuns os erros de identificação do CBc, mesmo com a utilização de técnicas mais robustas como espectrometria de massa, recentemente introduzida para uso em laboratório clínico. A acurácia da técnica é variável de acordo com a espécie do CBc (SHELLY *et al.*, 2000; FEHLBERG *et al.*, 2013). Até o momento, as técnicas moleculares são consideradas de referência para a identificação das espécies do BCc (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2000). Não identificar ou identificar incorretamente o CBc representa um problema para as análises epidemiológicas e para o tratamento dos pacientes com FC.

A colonização por bactérias do CBc, em geral, envolve apenas uma espécie de forma transitória ou crônica. No Brasil, poucos estudos fazem referência à frequência (SILVA FILHO *et al.*, 2002) e ao impacto clínico da colonização por espécies do CBc (CARVALHO *et al.*, 2007). Segundo o Registro Brasileiro de Fibrose Cística, 10,3% dos pacientes cadastrados apresentavam isolamento de bactérias do CBc em amostras de secreção respiratória pelo menos uma vez ao ano (Registro Brasileiro de Fibrose Cística- REBRAFC, 2014). Como a frequência, virulência e transmissibilidade variam de uma espécie para outra, é fundamental que os estudos

possam monitorar a repercussão clínica em diferentes centros a fim de que se entenda a história natural das infecções por bactérias do CBc e que este conhecimento possa repercutir na abordagem assistencial e terapêutica dos pacientes com fibrose cística.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar a repercussão clínica da colonização pelas bactérias do complexo *B. cepacia* em pacientes com FC, cronicamente colonizados por *P. aeruginosa*.

1.2 Objetivos específicos

- a) Descrever a população envolvida no estudo de acordo idade, gênero, critérios diagnósticos de FC e existência de insuficiência pancreática, diabetes e hepatopatia.
- b) Analisar evolutivamente a função pulmonar: VEF₁ e capacidade vital forçada (CVF), além do quadro nutricional e intercorrências de todos os pacientes incluídos no estudo, de acordo com os grupos identificados

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O projeto obteve aprovação dos Comitês de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – FIOCRUZ (IFF/FIOCRUZ), e do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ, conforme as recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/CONEP do Ministério da Saúde sob o registro CAAE: 02867612.1.0000.5269.

2.2 Instituições participantes

O estudo foi realizado em pacientes com Fibrose Cística assistidos no Serviço de Pneumologia do Departamento de Pediatria do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – FIOCRUZ (IFF/FIOCRUZ) e no ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro (PPC)/Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) (Anexos A e B).

As instituições são centros de referência para FC do Estado do Rio de Janeiro. Crianças e adolescentes são acompanhados no IFF/FIOCRUZ, enquanto adultos (pacientes com 18 anos ou mais) fazem o seguimento na PPC/UERJ.

A rotina assistencial é semelhante em ambos os centros, com consultas realizadas idealmente em intervalos de até três meses. Nas consultas, os pacientes passam por avaliação clínica, em equipe multiprofissional e são realizadas culturas de secreção respiratória (escarro ou, no caso de crianças não expectorantes, *swab* de orofaringe).

2.3 Desenho experimental

Trata-se de um estudo realizado a partir de uma coorte retrospectiva de pacientes portadores de FC cronicamente colonizados por *P. aeruginosa* e vinculados às instituições envolvidas entre janeiro de 2004 e dezembro de 2013.

2.3.1 Crítérios de inclusão da população

Os critérios de inclusão dos pacientes foram:

- Ter preenchido critérios diagnósticos de FC, segundo consenso internacionalmente aceito pela *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) (ROSENSTEIN & CUTTING, 1998; FARREL *et al*, 2008), que correspondem a existência de uma ou mais características clínicas obrigatoriamente associadas a uma evidência de disfunção de CFTR.
- Ter recebido acompanhamento clínico e laboratorial regulares (pelo menos quatro vezes ao ano) entre 2004 e 2013, nas duas instituições envolvidas, incluindo a coleta e cultura secreções respiratórias nas consultas agendadas e realização de exames funcionais de acordo com o planejamento assistencial da equipe, em momento de estabilidade clínica.
- Ter preenchido critérios de colonização crônica por *P. aeruginosa* até 2008: mais de 50% das culturas obtidas nos últimos 12 meses positivas para *P. aeruginosa* (LEE *et al.*, 2003)

2.3.2 Crítérios de exclusão

- Evidenciar colonização bacteriana exclusivamente por *S. aureus* ou apresentar microbiota normal nas culturas de secreções respiratórias
- Estar sendo submetido a qualquer esquema antimicrobiano visando à erradicação de *P. aeruginosa*.

- Falta de acesso a documentos fonte para a coleta de dados (resultados das culturas ou prontuários médicos).

2.3.3 Desenho do estudo

Através de análise retrospectiva a partir de dados de prontuário de pacientes portadores de FC, vinculados aos centros de assistência citados, foram selecionados aqueles que, no período entre janeiro de 2004 e dezembro de 2008 apresentaram critérios de colonização crônica por *P. aeruginosa* e que tenham sido colonizados por bactérias do CBc em algum momento, exceto os alocados no grupo III.

Esses pacientes foram alocados nos seguintes grupos:

Grupo I – pacientes com colonização intermitente por bactérias do CBc (um ou dois isolamentos por ano) (CORREIA *et al*, 2008)

Grupo II – pacientes com colonização crônica por bactérias do CBc (três ou mais isolamentos por ano) (CORREIA *et al*, 2008)

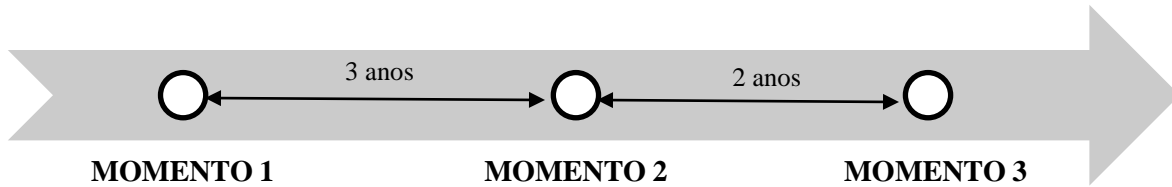
Grupo III – pacientes nunca colonizados por bactérias do CBc

Tais grupos foram analisados conforme descrito na figura 1 e os seguintes momentos foram definidos para estudo:

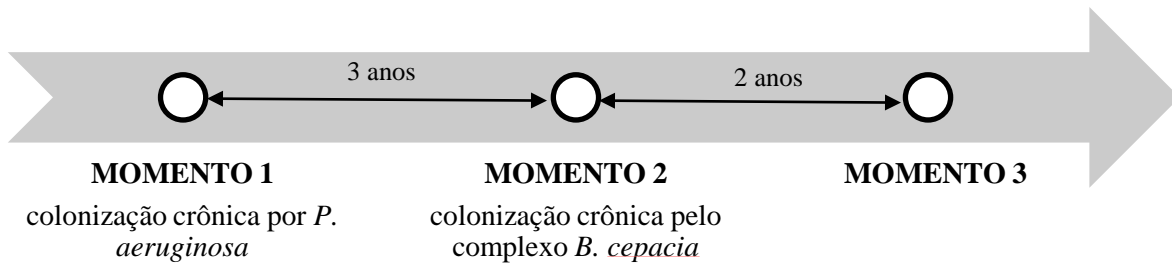
- Momento 1: Colonização crônica por *P. aeruginosa* foi definido a partir do início do uso de tobramicina inalatória em meses alternados.
- Momento 2: Colonização crônica por CBc para o grupos II. Como a mediana de tempo para a colonização crônica por CBc no grupo II foi de três anos, este intervalo de tempo foi usado para avaliação dos grupos I e III.
- Momento 3: Cinco anos após colonização crônica por *P. aeruginosa*

Os dados dos pacientes incluídos foram registrados e avaliados por até 5 anos após a inclusão

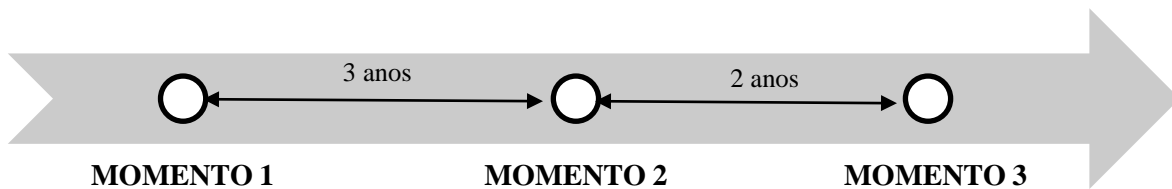
Figura 1- Esquema representativo do estudo: momentos de avaliação dos grupos
Grupo I



Grupo II



Grupo III



Fonte: A autora, 2016.

2.3.4 Coleta de dados

Foi criada uma planilha específica para este estudo no intuito de registrar os dados clínicos e microbiológicos. Os documentos fonte são os prontuários médicos e os resultados de culturas respiratórias armazenados no Laboratório de Bacteriologia (LABACT/HUPE/UERJ)

2.3.5 População em estudo

Para cada paciente, foram avaliados dados demográficos e clínicos registrados em prontuário, como gênero, idade, genótipo e critérios diagnósticos, estado de suficiência pancreática (gordura fecal ou elastase fecal ou necessidade de reposição exógena de enzimas), diabetes relacionado à FC (DRFC), caracterizado por presença de glicemia jejum $>126\text{mg/dL}$ e teste de tolerância oral a glicose com glicemia $>200\text{mg/dL}$ (BLACKMAN & TANGPRICHA, 2016). A hepatopatia foi caracterizada pelos seguintes parâmetros: elevações persistentes das transaminases acima de 1,5 vezes dos valores de referência ou de uma única elevação das transaminases superior a três vezes do valor da normalidade associado a alterações nas imagens ultrassonográficas (STAUFER *et al*, 2014). A insuficiência pancreática exócrina foi definida pela reposição exógena de enzimas pancreáticas. A existência de DRFC e de hepatopatia foram baseadas no registro médico destes diagnósticos nos prontuários.

Com objetivo de analisar o impacto clínico, foram feitas as seguintes avaliações para todos os pacientes envolvidos no estudo: parâmetros espirométricos ($\text{VEF}_1\%$, $\text{CVF}\%$) e IMC. Quanto à evolução clínica, foram verificados os seguintes parâmetros: número de internações por exacerbação respiratória e desfecho em relação a óbito.

2.3.5.1 Avaliação da função respiratória

A espirometria foi realizada a cada consulta para os pacientes adultos; as crianças foram submetidas à espirometria habitualmente a partir de seis anos de idade, na dependência da capacidade cognitiva de realizar o teste, sendo realizado aproximadamente a cada seis meses. Os exames foram realizados em sistema computadorizado, modelo *Collins Survey II* (Warren E. Collins, Inc). As manobras realizadas produziram curvas volume-tempo e fluxo-volume que devem passar por critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade padronizados pela *American Thoracic Society* (ATS) (MILLER *et al*, 2005). Os laudos de espirometria que não atendiam a estes critérios não foram incluídos no estudo. Os valores absolutos foram convertidos em percentuais do predito usando as equações de Knudson como referência (KNUDSON *et al*, 1983). Os maiores valores anuais de VEF₁% e CVF% para cada paciente foram analisados (KNUDSON *et al*, 1983).

2.3.5.2 Avaliação do estado nutricional

A avaliação nutricional foi realizada por meio do monitoramento do índice de massa corporal (IMC) obtido por medidas antropométricas em cada consulta. O cálculo do IMC foi realizado pela relação entre peso (em quilos) dividido pelo quadrado da altura (em metros). Tais resultados foram utilizados para cálculo dos percentis correspondentes para cada paciente utilizando a ferramenta disponível em www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi. A avaliação dos percentis de IMC é possível em pacientes de 2 a 19 anos.

2.3.5.3 Avaliação bacteriológica

As culturas de secreção respiratória de ambos os centros (coletadas pelo menos a cada três meses) foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia (LABACT) do HUPE/UERJ, seguindo protocolos padronizados estabelecidos para culturas em pacientes com FC (GILLIGAN *et al*, 2006). As amostras de secreções respiratória foram semeadas em Agar sangue, Agar MacConkey e Agar Mannitol (Difco Labs, Detroit, MI, USA) além do meio seletivo para *Burkholderia cepacia Selective Agar* (BCSM-Oxoid, Basingstoke, England). Os microorganismos foram caracterizados através de métodos fisiológicos manuais (GILLIGAN *et al*, 2014).

Para a caracterização das diferentes espécies do CBc (no grupo II) foram empregadas técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do gene *rec A* realizados no laboratório de Bastonetes Gram negativos Não Fermentadores da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas - UERJ de acordo com metodologia previamente descrita (MAHENTHIRALINGAM *et al*, 2000; CARVALHO *et al*, 2005).

2.4 Análise estatística

Análises estatísticas descritivas foram feitas por meio da construção de tabelas e gráficos e também de medidas-resumo apropriadas às escalas de mensuração das variáveis. O teste qui-quadrado foi utilizado para a verificação das significâncias estatísticas das associações de duas variáveis categóricas.

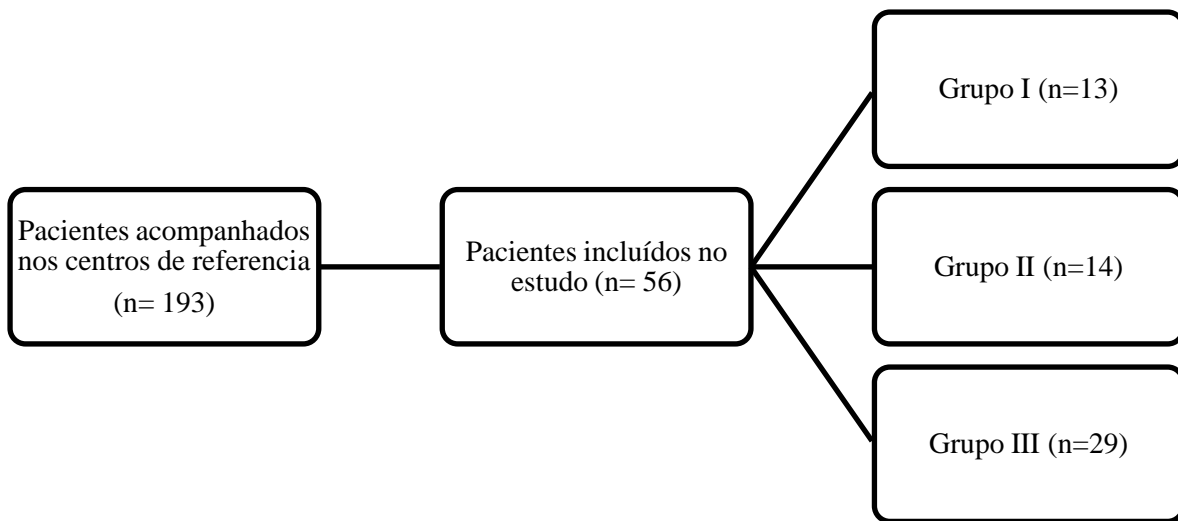
Para a comparação entre variáveis numéricas e variáveis categóricas com duas ou três categorias foram utilizados, respectivamente, os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

Para a análise das significâncias estatísticas das variações temporais dentro de cada grupo, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. O *software* estatístico utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 17.0 for Windows).

3. RESULTADOS

A partir dos dados de registro dos 193 pacientes vinculados e regularmente acompanhados nos dois centros de referência para FC no Rio de Janeiro, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2013, foram identificados 56 pacientes que preenchiam critérios de colonização crônica por *P. aeruginosa*. Destes, 27 apresentavam também evidências de colonização por bactérias do CBc: 13 pacientes apresentavam colonização intermitente e 14 evidenciavam critérios de colonização crônica por bactérias do CBc (Figura 2).

Figura 2– Fluxograma do estudo



Fonte: A autora, 2016.

3.1 Características da população

Quanto às características no momento do diagnóstico de FC, a maioria (n=54; 96,4%) apresentava manifestações clínicas sugestivas de FC, dois (3,6%), evidenciavam história familiar sugestiva e sete (12,5%) apresentaram rastreamento neonatal suspeito (dosagem de tripsina imunorreativa elevada no Programa de triagem neonatal para FC). Dos 56 pacientes incluídos, 53 haviam sido submetidos a análise genética para um painel de 16 mutações e a mutação DF508 estava presente de forma homozigótica (13/53) ou heterozigótica (20/53) em 62,2% dos casos estudados.

Dos 56 pacientes envolvidos no estudo, com relação à distribuição por gênero, houve predomínio do gênero feminino (n=38, 67,9%). A idade dos pacientes no momento da inclusão no estudo variou de 0 a 36 anos e a distribuição por faixa etária demonstrou predomínio de crianças e adolescentes até 19 anos (n=52; 92,9%) (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se analisou a idade no momento da inclusão no estudo ($p>0,05$).

Em relação a outras colonizações bacterianas concomitantes, os pacientes do estudo apresentavam apenas isolamentos esporádicos de *H. influenzae*, *Achromobacter* spp e *Stenotrophomonas* spp. A colonização crônica concomitante foi observada apenas para *S. aureus*, nas seguintes proporções: *S. aureus* sensível a oxacilina em 84,6% dos pacientes no grupo I, 28,5% no grupo II e 92,6% no grupo III; *S. aureus* resistente a metilicina em 7,7% no grupo I, 0% no grupo II e 7,4% no grupo III.

Em relação aos indicadores de prognóstico da doença, comorbidades como hepatopatia e diabetes mellitus relacionada a FC foram pouco frequentes (1,8% e 3,6%, respectivamente), enquanto a insuficiência pancreática esteve presente na maioria da população (94,6%).

Para a população envolvida, verificou-se que a média anual de internações foi de 0,7. Analisando os grupos em separado notou-se que são, em média, 1,2 internações/ano no grupo com colonização intermitente por bactérias do CBc, 0,7 internações/ano no grupo cronicamente colonizado por bactérias do CBc e 0,5 internações/ano no grupo não colonizado por bactérias do CBc (Tabela 1). Em relação ao número médio de internações, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos (p -valor $>0,05$).

Tabela 1- Características da população do estudo

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p-valor
Gênero (n)				
Masculino	4	8	6	0,056*
Feminino	9	6	23	
Idade (idade media no momento 1, em anos)	9,2	11,1	9,4	0,744**
Média de internações por ano	1,2	0,7	0,5	0,601**

Legenda: *Obtido por teste X^2 ; **Obtido por teste de Kruskal-Wallis; Nível de significancia estatística: p-valor<0,05

Fonte: A autora, 2016.

A cada exacerbação infecciosa os pacientes receberam curso de três antibióticos endovenosos por 2 semanas. No primeiro isolamento de CBc todos os pacientes receberam curso de três antibióticos endovenosos (meropenem, ceftazidime e amicacina), por duas semanas, seguido de três meses consecutivos de tobramicina inalatória (*step 1*). No caso de reisolamento de bactérias do CBc, outro curso de antibióticos semelhante ao *step 1* foi administrado, porém para o isolamento de CBc em culturas subsequentes, o tratamento foi discutido com equipe multidisciplinar.

Durante o período do estudo, ocorreram 7 óbitos, sendo 2 no grupo com colonização intermitente e 5 no grupo com colonização crônica pelo CBc. Nenhum paciente do grupo não colonizado veio a óbito.

3.2 Colonização crônica por *P. aeruginosa* (momento 1)

Foram obtidos dados de espirometria (VEF₁% e CVF%) nos três momentos previamente descritos de 49 dos 56 pacientes envolvidos no estudo: 10 dos 13 pacientes no grupo com colonização intermitente pelo CBc (grupo I), 13 dos 14 no grupo com colonização crônica pelo CBc (grupo II) e 26 dos 29 pacientes não colonizados por bactérias do CBc (grupo III). O fator limitante à realização da espirometria na maioria destas situações (6 dos 56) foi idade inferior a

seis anos, e um paciente não foi submetido a espirometria devido a problemas neurológicos com incapacidade cognitiva para realização do exame.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados para os valores de VEF₁ (p-valor: 0,267) e para CVF (p-valor: 0,911) no momento da colonização crônica por *P. aeruginosa* (Tabela 2).

Em relação ao IMC, foram obtidos dados dos 56 pacientes no momento da colonização crônica por *P. aeruginosa*. Esses valores foram colocados em curvas de percentil de IMC e avaliados. Dos grupos envolvidos no estudo, no momento do diagnóstico de colonização crônica por *P. aeruginosa*, foram avaliados as médias dos percentis nos três grupos e houve diferença estatisticamente significativa (p-valor: 0,002) entre eles. Observou-se que no grupo que mais tarde evoluiu com colonização crônica por bactérias do CBc (grupo II), o percentil do IMC era significativamente menor (média: 17,8) do que os demais grupos (médias: 41,1 e 53,9 para os grupos I e III, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2- Dados espirométricos e percentil de IMC no momento 1

Parâmetros	Grupos	Média	Desvio-padrão	p-valor
VEF1%	I	78,9	27,0	0,267
	II	70,6	17,2	
	III	81,5	22,2	
	Total	78,2	21,8	
CVF%	I	85,5	24,2	0,911
	II	86,5	18,3	
	III	89,3	19,2	
	Total	87,9	19,4	
Percentil de IMC	I	41,4	25,4	0,002
	II	17,8	19,5	
	III	53,9	30,3	
	Total	42,2	30,6	

Legenda:

Grupo I pacientes com infecção intermitente por bactérias do CBc (1 ou 2 isolamentos por ano)

Grupo II pacientes com infecção crônica por bactérias do CBc (3 ou mais isolamentos por ano)

Grupo III pacientes nunca infectados por bactérias do CBc

VEF1% volume expiratório forçado no primeiro segundo % predito

CVF% capacidade vital forçada % predito

*p-valor obtido por teste de Wilcoxon (significância estatística: p-valor<0,05)

Fonte: A autora, 2016.

3.3 Colonização crônica por bactérias do complexo *B. cepacia* (momento 2)

Para fins de comparação dos três grupos estudados, foi avaliada a mediana de tempo entre o início do estudo e colonização crônica por CBc. Como a mediana de tempo para a colonização crônica por CBc no grupo II foi de três anos, este intervalo de tempo foi usado para avaliação dos grupos I e III. Os valores médios de VEF1% foram mais baixos no grupo II (66,4%) do que nos grupos I (82,9%) e III (72,6%). Os valores médios de CVF1% também foram mais baixos no grupo II (80,8%) do que nos grupos I (88,9%) e III (82,0%). No entanto, em relação aos dados espirométricos descritos para os três grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas (p -valor $>0,05$). Quando foram comparados os percentis de IMC, os valores médios também foram menores no grupo II (22,3) do que os do grupo I (43,5) e III (45,7), sem diferença estatisticamente significativa (p -valor 0,082) (Tabela 3).

Tabela 3- Dados espirométricos e percentil de IMC no momento 2

Parâmetros	Grupos	Média	Desvio-padrão	p-valor
VEF1%	I	82,9	27,9	0,176
	II	66,4	22,4	
	III	72,6	22,3	
	Total	73,1	23,7	
CVF%	I	88,9	23,4	0,426
	II	80,8	18,7	
	III	82,0	19,4	
	Total	83,1	19,9	
Percentil de IMC	I	43,5	26,9	0,082
	II	22,3	20,5	
	III	45,7	29,2	
	Total	39,8	28,1	

Legenda:

Grupo I pacientes com infecção intermitente por bactérias do CBc (1 ou 2 isolamentos por ano)

Grupo II pacientes com infecção crônica por bactérias do CBc (3 ou mais isolamentos por ano)

Grupo III pacientes nunca infectados por bactérias do CBc

VEF1% volume expiratório forçado no primeiro segundo % predito

CVF% capacidade vital forçada % predito

*p-valor obtido por teste de Wilcoxon (significância estatística: p-valor<0,05)

Fonte: A autora, 2016.

3.4 Evolução dados espirométricos e nutricionais (momento 3)

No final do estudo, cinco anos após a colonização crônica por *P. aeruginosa*, dados evolutivos do ponto de vista dos três grupos foram avaliados e comparados: pacientes do grupo II (cronicamente colonizados por bactérias do CBc) evidenciaram valores médios de VEF₁% menores (52,3%) do que os grupos I (86,6%) e III (67,0%), com diferença estatisticamente significativa (p-valor 0,004). Valores médios de CVF% também foram significativamente menores no grupo II (67,8%) do que nos grupos I (93,6%) e III (78,0%), com p-valor 0,032. Surpreendentemente, valores médios de VEF₁% e CVF % do predito do grupo com colonização intermitente por CBc (grupo I) foram significativamente maiores do que o grupo nunca colonizado por bactérias do CBc.

Neste momento, também foram analisados dados nutricionais, como o valor médio de percentil de IMC para os três grupos e, para o grupo II (21,1), foi significativamente menor do que os grupos I e III (45,4 e 45,6 respectivamente), com p-valor: 0,035 (Tabela 4).

Tabela 4- Dados espirométricos e percentil de IMC no momento 3

Parâmetros	Grupos	Média	Desvio-padrão	p-valor
VEF1%	I	86,6	22,3	0,004
	II	52,3	20,1	
	III	67,0	18,8	
	Total	66,7	22,5	
CVF%	I	93,6	18,7	0,032
	II	67,8	21,2	
	III	78,0	16,7	
	Total	78,1	19,9	
Percentil de IMC	I	45,4	20,8	0,035
	II	21,1	15,0	
	III	45,6	28,4	
	Total	39,8	26,1	

Legenda:

Grupo I pacientes com infecção intermitente por bactérias do CBc (1 ou 2 isolamentos por ano)

Grupo II pacientes com infecção crônica por bactérias do CBc (3 ou mais isolamentos por ano)

Grupo III pacientes nunca infectados por bactérias do CBc

VEF1% volume expiratório forçado no primeiro segundo % predito

CVF% capacidade vital forçada % predito

*p-valor obtido por teste de Wilcoxon (significância estatística: p-valor<0,05)

Fonte: A autora, 2016.

3.5 Evolução anual dos dados espirométricos

As taxas de queda anual dos parâmetros espirométricos foram avaliadas e comparadas entre os grupos do estudo e houve diferenças com significado estatístico. Enquanto pacientes dos grupos I (com infecção intermitente por CBc) e III (nunca infectados por CBc) apresentaram taxa média de queda anual de VEF₁% de $0 \pm 2,9\%$ e $-2,6 \pm 2,9\%$ respectivamente, pacientes do grupo II

(cronicamente colonizados por CBc) apresentaram taxa de queda anual de VEF₁% de $-6 \pm 6,0\%$. Em relação ao CVF%, notou-se que valores médios de queda anual dos grupos I e III foram $0,6 \pm 2,5\%$ e $-2,2 \pm 2,9\%$ respectivamente, enquanto a taxa de queda anual de CVF% para pacientes com colonização crônica por CBc foi de $-6 \pm 7,9\%$. (Tabela 5).

Tabela 5- Dados espirométricos (Taxa de declínio anual: VEF₁% e CVF% preditos)

	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	P-valor Kruskal-Wallis*
VEF ₁ %	I	10	0,0	2,9	0,002
	II	13	-6,0	6,6	
	III	26	-2,6	2,9	
	Total	49	-3,0	4,6	
CVF %	I	10	0,6	2,5	0,010
	II	13	-6,0	7,9	
	III	26	-2,2	2,9	
	Total	49	-2,6	5,2	

Legend:

- n número de pacientes que fizeram a espirometria
 Grupo I pacientes com infecção intermitente por bactérias do CBc (1 ou 2 isolamentos por ano)
 Grupo II pacientes com infecção crônica por bactérias do CBc (3 ou mais isolamentos por ano)
 Grupo III pacientes nunca infectados por bactérias do CBc
 VEF₁% volume expiratório forçado no primeiro segundo % predito
 CVF% capacidade vital forçada % predito
 *Significância estatística: p-valor<0,05

Fonte: A autora, 2016.

3.6 Identificação das espécies do Complexo *B. cepacia*

Os dados dos pacientes cronicamente colonizados por CBc foram separados e analisados de forma a verificar quais espécies do complexo *B. Cepacia* eram mais prevalentes. Esta avaliação evidenciou que a maior parte dos pacientes era colonizada por *B. cenocepacia* ($n=8$) e *B. vietnamiensis* ($n=5$). Analisando dados espirométricos (VEF₁ e CVF %) para esses pacientes não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes colonizados por espécies

diferentes, porém houve maior número de óbitos em pacientes cronicamente colonizados por *B. cenocepacia* (80% dos óbitos de pacientes do grupo II).

4. DISCUSSÃO

O cenário do diagnóstico da FC mudou dramaticamente na última década, desde a implantação do teste de triagem neonatal para FC, através da dosagem da tripsina imunorreativa. Atualmente, ao invés do diagnóstico baseado em sintomas e sinais e após um processo diagnóstico longo e difícil, muitos têm o diagnóstico a partir da triagem neonatal positiva (ROSENFELD *et al*, 2016). Dados da *Cystic Fibrosis Foundation* de 2013 descrevem que 62% dos diagnósticos de FC nos Estados Unidos são feitos a partir da triagem neonatal. O diagnóstico precoce permite melhorar o prognóstico a longo prazo, através do monitoramento regular e intervenção adequada, iniciando-se ainda antes mesmo da instalação de deficiências nutricionais ou lesão estrutural pulmonar irreversível (ROSENFELD *et al*, 2016). No Brasil, o Sistema Único de Saúde passou a incluir a dosagem de tripsina imunorreativa (TIR) no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2001. No Rio de Janeiro esta inclusão aconteceu a partir da portaria 983/ 2011, de 27 de dezembro de 2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No Brasil, o número de diagnósticos novos a partir da triagem neonatal vem aumentando significativamente e em 2014, dos 166 casos novos, 70% foram feitos a partir da dosagem de TIR elevada (Registro Brasileiro de Fibrose Cística- REBRAFC, 2014). Como o presente estudo teve início em 2004 no Rio de Janeiro, num momento em que o PNTN ainda não permitia cobertura ampla para o diagnóstico precoce de FC, somente 12,5% dos pacientes foram diagnosticados a partir da dosagem de TIR no período neonatal e estes foram provenientes da clínica privada.

Mais de 2000 mutações têm sido associadas à FC (CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE, 2016). A mutação mais frequente em praticamente todas as populações do mundo é a F508del e está presente em mais de 70% dos alelos na população caucasiana (CABELLO, 2011). Sabe-se que a presença da mutação F508del em homozigose, geralmente, mas não exclusivamente, produz um fenótipo mais severo em todos os órgãos afetados, quando comparados com a presença dessa mutação em heterozigose ou na sua ausência (KEREM, 1990).

O Brasil permanece com menos de 50% dos pacientes apresentando resultados de investigação genética e ainda não há uniformidade na realização dos testes genéticos para FC. Alguns centros realizam apenas a pesquisa da mutação F508del, enquanto outros pesquisam painéis de mutações ou sequenciamento do gene CFTR. Em 2014, dos 1.604 pacientes com

mutação identificada, 1.118 (69,7%) apresentavam a mutação F508del, sendo 25% em homozigose (Registro Brasileiro de Fibrose Cística- REBRAFC, 2014). Em concordância com os dados da população brasileira, no presente estudo, dos 53 pacientes submetidos à análise genética para FC, 33 (62,2%) apresentavam a mutação F508del.

O número de adultos (maiores de 18 anos) em acompanhamento nos centros de referência para FC nos EUA vem aumentando e, em 2014, chegou a 50,7% (CFF PATIENT REGISTRY, 2014). No Brasil, o número de adultos acompanhados em centros de referência corresponde a 24,6% e o de crianças e adolescentes corresponde a 75,4% (Registro Brasileiro Fibrose Cística em 2014). No presente estudo, houve predomínio de pacientes com idade inferior a 20 anos (92,9%) em relação ao número de adultos (7,1%) evidenciando que fatores prognósticos e de sobrevida podem ter influência na distribuição por faixa etária na população estudada.

Dentre os fatores que negativamente afetam o prognóstico em FC, inclui-se desnutrição, diabetes mellitus, infecção por *P. aeruginosa* (NIXON *et al.*, 2001; EMERSON *et al.*, 2002) e por bactérias do CBc e frequência de exacerbações. A mediana de sobrevida para pacientes do gênero feminino com FC é aproximadamente três anos menor que para indivíduos do gênero masculino (DEMKO *et al.*, 1995). Fatores socioeconômicos e ambientais também influenciam no prognóstico da doença respiratória em FC. Por outro lado, sabe-se que pacientes com insuficiência pancreática apresentam declínio de função pulmonar mais lento (KONSTAN *et al.*, 2003). No presente estudo, houve predomínio de indivíduos do gênero feminino (67,9%) e a insuficiência pancreática estava presente em 94% dos pacientes e esses dados podem ter contribuído como fatores prognósticos negativos para a população estudada.

A repercussão clínica da colonização por bactérias do CBc é preocupante e estudos descrevem impacto negativo em morbidade e mortalidade, associados com aumento do risco de morte, aceleração no declínio da função pulmonar e aumento no número de hospitalizações (COURTNEY *et al.*, 2004; CORREA-RUIZ *et al.*, 2013). Mc Closkey *et al.* compararam três grupos de pacientes (n=190): colonizados por *P. aeruginosa* e CBc, colonizados somente por *P. aeruginosa* e não colonizados pelas duas bactérias. Evidenciou-se que a colonização por CBc estava associada a um declínio mais rápido porém variável da função pulmonar, e que esta variabilidade poderia estar relacionada a espécie de CBc envolvida. No entanto, em todos os grupos estudados, não houve menção à cronicidade da colonização.

Outro estudo conduzido com pacientes portugueses (CORREIA *et al.*, 2008), avaliou retrospectivamente 31 pacientes com FC colonizados por CBc e estes foram divididos em dois grupos (I: isolamento intermitente e II: isolamento crônico). Como esperado, no grupo com isolamento crônico houve maior mortalidade, maior número de hospitalizações e valores de VEF₁% menores. Alguns pacientes com colonização crônica por CBc já apresentavam piora da função pulmonar antes da colonização por CBc, como resultado da colonização por outros agentes patogênicos em FC e também da progressão da própria doença. Não houve comparação entre os grupos em relação a possíveis interações entre co-infecções e piora dos parâmetros clínicos.

Em relação à importância da identificação de co-infecções sabe-se que a colonização crônica por *P. aeruginosa* leva a resposta inflamatória prolongada, a qual acredita-se ser causadora de lesão tecidual respiratória e contribuir para subsequente perda de função pulmonar (DORING, 2012). É descrito também que a colonização crônica por *P. aeruginosa* está diretamente associada à função pulmonar alterada e menor sobrevida (EMERSON *et al.*, 2002). Na presente análise, todos os pacientes eram cronicamente colonizados por *P. aeruginosa*, e este fato é um fator de risco para maior morbidade. No entanto, como todos os pacientes incluídos eram previamente colonizados cronicamente por *P. aeruginosa*, o acréscimo em morbidade foi homogêneo para os três grupos, sem haver aumento específico na morbidade em relação aos grupos. Este aspecto se torna relevante uma vez que a deterioração de qualquer dos critérios clínicos ou laboratoriais não estaria associado a *P. aeruginosa*, uma bactéria reconhecida pelo impacto na doença respiratória em FC (ZEMANICK *et al.*, 2010).

Em relação à mortalidade, neste estudo, houve maior número de óbitos no grupo cronicamente colonizado por CBc, e este dado possivelmente esteve associado a repercussão da colonização crônica por CBc. Quanto à repercussão no quadro funcional pulmonar, verificou-se que os pacientes que desenvolveram colonização crônica por CBc apresentaram valores médios de VEF₁ e CVF significativamente menores, evidenciando que a colonização crônica por CBc pode ser um fator de risco para deterioração da função pulmonar. Valores médios de VEF₁% e CVF% maiores foram encontrados em pacientes com colonização intermitente por CBc e este dado poderia estar relacionado a uma maior adesão às propostas terapêuticas.

As análises de taxas de queda de VEF₁% têm sido estudadas em FC com objetivo de avaliar a progressão da doença pulmonar e identificar grupos de risco para os quais intervenções

terapêuticas podem ser indicadas e também para avaliar tais intervenções. Os fatores de risco associados a quedas de VEF₁ incluem baixa idade, função pulmonar preservada, sexo feminino, genes modificadores, insuficiência pancreática, diabetes *mellitus*, estado nutricional ruim e colonização por *P. aeruginosa* e CBc.

O Estudo Epidemiológico de Fibrose Cística (MORGAN *et al*, 1999) foi um estudo prospectivo em uma grande população (n= 24863) nos EUA e Canadá, que permitiu o entendimento da história natural da doença pulmonar e se tornou base para estudo da queda de VEF₁ em pacientes com diferentes faixas etárias. Outro estudo com crianças e adolescentes com FC evidenciou que as taxas de queda anuais de VEF₁% eram: -1,12, -2,39 e -2,34% em pacientes 6 a 8 anos, 9 a 12 anos e 13 a 17 anos, respectivamente (KONSTAN *et al*, 2007). Frangolias *et al* comparando dois grupos de pacientes adultos com FC (infectados ou não por CBc), não encontraram diferenças significativas entre casos e controles (FRANGOLIAS *et al*, 1999). Em nosso estudo, as taxas de queda anuais de VEF₁% foram estatisticamente diferentes entre os grupos envolvidos, e os pacientes do grupo cronicamente colonizado por CBc apresentaram taxa média de queda de VEF₁% de -6% ao ano, o que é muito maior do que o esperado em todas as faixas etárias descritas, evidenciando o impacto da colonização crônica por CBc na doença respiratória.

A associação de um bom estado nutricional com melhora da função pulmonar tem sido bem documentada (ZEMANICK *et al*, 2010), e a desnutrição se configura como fator de risco para aceleração da queda de função pulmonar. Konstan *et al* avaliaram a correlação entre crescimento e estado nutricional e função pulmonar em 931 crianças de três a seis anos de idade. Identificaram que a função pulmonar (VEF₁) era melhor aos seis anos em crianças com índices nutricionais (peso para idade) acima do percentil 75 antes dos três anos de idade, enquanto que aqueles com índices nutricionais (peso para idade) abaixo do percentil 5 aos três anos apresentavam VEF₁ significativamente menor (KONSTAN *et al*, 2003)

No entanto não se sabe se a perda de IMC precede o declínio de VEF₁%. Um estudo retrospectivo (McPHAIL *et al*, 2008) comparou a função pulmonar e o estado nutricional em duas coortes de FC. Foram encontrados melhora da função pulmonar e quadro nutricional em pacientes de 6 a 12 anos. Havia taxa de declínio de função pulmonar menor em pacientes com IMC basal maior e com menor taxa de queda de IMC. No estudo atual, os pacientes cronicamente

colonizados por CBc apresentavam IMC basal menor, o que pode ter sido um fator de risco para colonização crônica por CBc e progressão da doença.

Muitos estudos em FC tem evidenciado que após colonização por CBc, o desfecho pode variar consideravelmente desde um declínio rápido e fatal da função pulmonar e bacteremia, até um estado de colonização assintomática, sugerindo que a patogenicidade das bactérias do CBc varia (COURTNEY *et al.*, 2004). No presente estudo, *B. cenocepacia* foi a espécie mais frequente no grupo com colonização crônica (8/14). Neste grupo, o número de óbitos foi maior e associado a colonização por *B. cenocepacia* em 80% dos casos. *B. vietnamiensis* foi isolado em um paciente do grupo com colonização crônica por CBc que veio a óbito. O tempo médio entre colonização crônica por CBc e óbito foi de 5,2 anos. Considerando somente os pacientes colonizados por *B. cenocepacia*, esse tempo médio ficou reduzido para 4,7 anos.

O aspecto retrospectivo deste estudo, bem como o uso de critérios restritos de inclusão, limitaram o tamanho da amostra. No entanto poucos estudos contemplam a colonização intermitente e crônica por CBc em crianças e adultos com FC. A compreensão do impacto da colonização crônica por CBc nos pacientes com FC reforça a importância do desenvolvimento de possíveis medidas de erradicação e de segregação destes pacientes.

CONCLUSÃO

Os pacientes cronicamente colonizados por *P. aeruginosa* e que desenvolveram também colonização crônica por CBc evidenciaram evolutivamente maior comprometimento funcional pulmonar e nutricional quando comparados a grupos com colonização intermitente ou sem colonização por CBc. No entanto, valores mais baixos de IMC podem preceder os efeitos da colonização por CBc, podendo ser um fator de risco para colonização crônica.

A progressão da doença se mostrou também mais rápida em pacientes colonizados cronicamente por CBc, tanto do ponto de vista funcional quanto nutricional.

REFERÊNCIAS

Blackman SM, Tangpricha V. Endocrine Disorders in Cystic Fibrosis. *Pediatr Clin North Am*. 2016 Aug;63(4):699-708. doi: 10.1016/j.pcl.2016.04.009.

Brody AS, Klein JS, Molina PL, Quann J, Bean JA, Wilmott RW. High-resolution computed tomography in young patients with cystic fibrosis: distribution of abnormalities and correlation with pulmonary function tests. *J Pediatr*. 2004 Jul; 145 (1): 32-8.

Buzzetti R, Salvatore D, Baldo E, Forneris MP, Lucidi V, Manunza D, Marinelli I, Messori B, Neri AS, Raia V, Furnari ML, Mastella G. An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009 Jul;8(4):229-37.

Cabello GMK. Avanços da genética na fibrose cística. *Revista HUPE*. 2011; 10(4): 36-45.

Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena J Jr *et al*. Cystic Fibrosis: low frequency of $\Delta F508$ mutation in 2 population samples of Rio de Janeiro, Brazil. *Human Biol*. 1999 Apr; 71(2): 189-96.

Carvalho AP, Ventura GM, Pereira CB, Leão RS, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, Merquior VL, Albano RM, Marques EA. *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. *APMIS*. 2007; 115:311-18.

Carvalho GM, Carvalho AP, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, *et al*. Transient isolation of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with *Burkholderia vietnamiensis*. *J Cyst Fibros*. 2005;4(4):267-70.

Correa-Ruiz A(1), Girón R, Buendía B, Medina-Pascual MJ, Valenzuela C, López-Brea M, Sáez-Nieto JA. *Burkholderia cepacia* complex infection in an Adult Cystic Fibrosis unit in Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Dec;31(10):649-54. doi:10.1016/j.eimc.2012.12.001. Epub 2013 Mar 23.

Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Sá-Correia I, Barreto C. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev Port Pneumol*. 2008;14(1):5-26.

Courtney JM, Dunbar KEA, Mc Dowel A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, Elborn JS. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis adults. *J Cys Fibros*. 2004;3:93-8.

Coutinho CP, Dos Santos SC, Madeira A, Mira NP, Moreira AS, Sá-Correia I. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. *Front Cell Infect Microbiol*. 2011 Dec; 1:12. doi:10.3389/fcimb.2011.00012.eCollection 2011.

Cystic Fibrosis Foundation. 2014 Annual Data Report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry.

Cystic Fibrosis Mutation Database. Disponível em www.genet.sickkids.on.ca/statisticspage.html. Acesso em: 18/08/2016.

Davis PB. Cystic Fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Mar; 173(5): 475-82.

De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016 Aug;4(8):662-74. doi: 10.1016/S2213-2600(16)00023-0. Epub 2016 Apr 1.

Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol*. 1995 Aug;48(8):1041-9.

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 *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015 Jul;65(7):2265-71. doi: 10.1099/ijs.0.000251.Epub 2015 Apr 14.

Ministério da Saúde (Brasil). Portaria nº 983, de 27 de dezembro de 2011.

Döring G(1), Flume P, Heijerman H, Elborn JS; Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros*. 2012 Dec;11(6):461-79. doi:10.1016/j.jcf.2012.10.004. Epub 2012 Nov 6.

Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Eur Soc of Clin Microb and Infect Dis*; 2010;16:821-830.

Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Aug;34(2):91-100.

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*. 2008;153:S4-S14.

Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, Pereira RH, Gales AC, Marques EA. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Oct;77(2):126-8. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.011. Epub 2013 Jul 23.

Frangolias DD, Mahenthiralingham E, Rae S, Raboud JM, Davidson AGF, Wittman R, et al. *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: variable disease course. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1972-7.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in Cystic Fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 2003 Oct; 168(8):918-51.

Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. *Cystic Fibrosis Microbiology*. Cumitech 43. Wassington, DC: ASM Press; 2006.

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

Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC), 2014. Disponível em: <http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro2011_Portugues_site.pdf>. Acesso em: 18/8/16.

Jones AM, Dodd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J et al. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004; 59:948-951.

Jong PA, Ottink MD, Robben SG, Lequin MH, Hop WC, Hendriks JJ, et al. Pulmonary disease assessment in cystic fibrosis: comparison of CT scoring systems and value of bronchial and arterial dimension measurements. *Radiology*. 2004 May; 231(2):434-9

Kerem E, Corey M, Gold R, Levison H. Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pediatr*. 1990 May;116(5):714-9.

Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 1983 Jun; 127(6):725-34.

Konstan MW, Butler SM, Wohl ME, Stoddard M, Matousek R, Wagener JS, Johnson CA, Morgan WJ; Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2003 Jun;142(6):624-30.

Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2007;151(2):134-9.

Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cystic Fibros*. 2003 Mar; 2 (1): 29-34.

Luczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr; 15(2):194-222.

Ludwig Neto N. Fibrose Cística Enfoque Multidisciplinar, Brasil: primeira edição, 2008. p.212-213.

Lutz L, de-Paris F, Vieira MI, et al. Bacteriologia da fibrose cística. Rev HCPA. 2011;31(2):168-184

Manno G, Dalmastrri C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, Romano L, Giannattasio A, Chiarini L, Bevivino A. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different *Burkholderia cenocepacia* strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. J Clin Microbiol. 2004 Apr;42(4):1491-7.

Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, AvGay Y, et al. 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. 2000;38:3165–73.

Marques, E. A. Perfil Microbiológico na Fibrose Cística. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (Impresso). 2011; 10:23-35.

McCloskey M, McCaughan J, Redmond AO, Elborn JS. Clinical outcome after acquisition of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. Ir J Med Sci. 2001 Jan-Mar;170(1):28-31

McManus TE, Beattie D, Graham C, Moore JE, Elborn JS. Cystic fibrosis genotype and bacterial infection: a possible connection. Br J Biomed Sci. 2005;62(2):85–8.

McPhail GL, Acton JD, Fenchel MC, Amin RS, Seid M. Improvements in lung function outcomes in children with cystic fibrosis are associated with better nutrition, fewer chronic pseudomonas aeruginosa infections, and dornase alfa use. J Pediatr. 2008;153(6):752–7.

Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J; ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. Eur Respir J. 2005 Aug;26(2):319-38.

Morgan WJ, Butler SM, Johnson CA, Colin AA, FitzSimmons SC, Geller DE, Konstan MW, Light MJ, Rabin HR, Regelman WE, Schidlow DV, Stokes DC, Wohl ME, Kaplowitz H, Wyatt MM, Stryker S. Epidemiologic study of cystic fibrosis: design and implementation of a prospective, multicenter, observational study of patients with cystic fibrosis in the U.S. and Canada. Pediatr Pulmonol. 1999 Oct;28(4):231-41.

Moskovitz SM, Gibson RL, Effman EL. Cystic fibrosis lung disease. Pediatr Radiol. 2005 May; 35:739 –57.

Nissim–Rafinia M, Kerem B, Kerem E. Molecular biology of cystic fibrosis: CFTR processing and functions, and classes of mutation. In: Hodson M, Geddes D, Bush A. Cystic Fibrosis. London, UK: Edward Arnold (Publishers): 2007. p. 49 – 58.

Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2001 May;138(5):699-704.

Nzula S, Vandamme P, Govan JRW. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50:265-269.

Orenstein DM, Rosenstein BJ, Stern RC. The cystic fibrosis gene and the molecular bases of cystic fibrosis. In: *Cystic Fibrosis Medical Care*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams&Williams. 2000:5 – 19.

Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Vandamme P. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol*. 2013 Oct;36(7):483-9. doi: 10.1016/j.syapm.2013.06.003. Epub 2013 Jul 16. PubMed PMID:23867250.

Rao S, Grigg J. New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2006; 91: 786 - 88.

Raskin S, Phillips JA 3rd, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, et al. DNA analysis of Cystic Fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie Cards. *Am J Med Genetics*. 1993 Jul; 46 (6):665-9.

Raskin S. Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras (tese doutorado). Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2001.

Rhodes KA, Schweizer HP. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resist Updat*. 2016 Sep;28:82-90. doi: 10.1016/j.drup.2016.07.003. Epub 2016 Jul 30.

Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathology, diagnosis and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2003 Nov; 9 (6):492-7.

Rosenfeld M, Sontag MK, Ren CL. Cystic Fibrosis Diagnosis and Newborn Screening. *Pediatr Clin North Am*. 2016 Aug;63(4):599-615. doi:10.1016/j.pcl.2016.04.004.

Rosenstein B, Cutting G. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132:589-95.

Saiman L, Siegel J and the Cystic Fibrosis 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. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24(5 Suppl):S6-52.

Shelly DB(1), Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol*. 2000 Aug;38(8):3112-5.

Silva Filho LV, Veloso LF, Bento CNO, Gytin E, Tateno AF, Levi JE, ET al. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2002 44 (4):203 – 8

Stauffer K, Halilbasic E, Trauner M, Kazemi-Shirazi L. Cystic fibrosis related liver disease--another black box in hepatology. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug 4;15(8):13529-49. doi: 10.3390/ijms150813529.

Steinkamp G, Wiedemann B. Relationship between nutritional status and lung function in cystic fibrosis: cross sectional and longitudinal analyses from the German CF quality assurance (CFQA) project. *Thorax*. 2002 Jul;57(7):596-601.

Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Syst Appl Microbiol*. 2011; 34:87-95

World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS. 2004. Disponível em: <http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_TOC.pdf>. Acesso em 21/06/2013.

Zemanick ET, Harris JK, Conway S, Konstan MW, Marshall B, Quittner AL, Retsch-Bogart G, Saiman L, Accurso FJ. Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: opportunities and challenges to therapy. *J Cyst Fibros*. 2010 Jan;9(1):1-16. doi: 10.1016/j.jcf.2009.09.003. Epub 2009 Oct 14.

APÊNDICE A – *Burkholderia cepacia* complex: clinical course in cystic fibrosis patients

Folescu et al. *BMC Pulmonary Medicine* (2015) 15:158
DOI 10.1186/s12890-015-0148-2

BMC Pulmonary Medicine

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Burkholderia cepacia complex: clinical course in cystic fibrosis patients

Tania Wrobel Folescu^{1*}, Claudia Henrique da Costa², Renata Wrobel Folescu Cohen¹, Orlando Carlos da Conceição Neto³, Rodolpho Mattos Albano⁴ and Elizabeth Andrade Marques⁵

Abstract

Background: Pulmonary deterioration after *B.cepacia* complex (BCC) colonization has a heterogeneous pattern. The aim was to investigate the clinical outcome of BCC colonization in CF patients chronically colonized with *P. aeruginosa*.

Methods: CF patients chronically colonized with *P. aeruginosa* were divided into three groups: intermittent (I), chronic (II) and no colonization (III) with BCC. Body mass index (BMI) percentile and spirometric parameters were analyzed at three different times in each group.

Results: Fifty-six patients chronically colonized with *P. aeruginosa* were included. Of these, 27 also had evidence of BCC colonization (13 intermittent and 14 chronic). BMI percentile was significantly lower among patients chronically colonized by both *P. aeruginosa* and BCC. Mean values of FEV₁ and FVC % were also significantly lower in these patients, both at the time of chronic BCC colonization and 24 months forward.

Conclusions: Chronic BCC colonization is associated with significant loss of lung function. Lower BMI might be a risk factor for chronic BCC colonization, preceding these events.

Keywords: Cystic fibrosis, *Burkholderia cepacia* complex, Respiratory Function Tests, Body mass index

Key messages

- Chronic BCC colonization is associated with significant loss of lung function
- Lower BMI might be a risk factor for chronic BCC colonization

Background

Respiratory disease is the major cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients. The majority of CF patients develop chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*, which is associated with impaired lung function and decreased survival in CF [1].

Burkholderia cepacia complex (BCC) is now recognized as a group of opportunistic pathogens in CF patients, usually associated with poor prognosis and patient-to-patient transmissibility. The exact pathophysiology of BCC

colonization/infection remains unclear, and pulmonary deterioration has a heterogeneous pattern, leading to a fulminant development in almost 30 % of patients [2, 3].

Loss of lung function is still one of the main factors that contribute to mortality in CF [4]. Therefore, spirometric measurements – in particular, forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) % predicted and forced vital capacity (FVC) % predicted – are important surrogate measures of disease progression [4]. Nutritional status has a strong positive association with pulmonary function and survival in CF. Attainment of normal body mass index (BMI) is one of the major goals for CF treatment.

The aim of this study was to investigate the clinical outcome of BCC colonization in CF patients who were previously chronically colonized with *P. aeruginosa*.

Methods

This is a retrospective study performed in two CF centres in Rio de Janeiro, Brazil: Instituto Fernandes Figueira (Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde), for children/adolescents, and Hospital Universitário

* Correspondence: taniafolescu@hotmail.com

¹Department of Pediatric Pulmonology, Instituto Fernandes Figueira (Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde), Av. Rui Barbosa, 716, 2nd floor, Flamengo, Zip Code: 22250-020 Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Folescu et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Pedro Ernesto – HUPE (Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ), for adults. Approval was obtained from the ethics committee on both institutions.

In both institutions, cultures of respiratory secretions were conducted in the Bacteriological Laboratory of HUPE/UERJ, according to standardized protocols established for CF patients, and were performed at least on a 3- monthly basis throughout the study [5]. The clinical samples were plated onto Sheep blood agar, MacConkey agar, Mannitol salt agar (Difco Labs, Detroit, MI, USA) and Burkholderia cepacia medium supplemented (Oxoid, Basingstoke, England). The microorganisms were characterized at the genus and species level by routine conventional physiological methods [6]. In order to identify the distinct genomovars, a 1043 bp PCR product corresponding to the *recA* gene was amplified by PCR. DNA sequence was performed in both directions with the PCR primers and the aid of two additional primers, BCR3 and BCR, as previously described [7, 8].

Patients' inclusion criteria were: CF diagnosis according to *Cystic Fibrosis Foundation* consensus [9, 10]; regular clinical and laboratorial follow-up during the study period; chronic colonization with *P. aeruginosa* diagnosis (i.e., happened before the study period and was diagnosed when *P. aeruginosa* was isolated in more than 50 % of cultures of sputum or throat swabs taken in the previous 12-month period) [11]. Subjects who presented no respiratory colonization or solely *S. aureus* colonization were excluded from the study, as well as those who were being submitted to any kind of *P. aeruginosa* eradication protocol.

These patients (all chronically colonized with *P. aeruginosa*) were divided into the following groups:

- Group I – patients with intermittent colonization with BCC (1 or 2 isolates per year)
- Group II – patients with chronic colonization with BCC (3 or more isolates per year)
- Group III – patients never colonized with BCC

For each patient, medical record data was evaluated, including gender, age, genotype and diagnostic criteria, state of pancreatic insufficiency (fecal fat or fecal elastase or need for exogenous replacement enzymes), CF-related diabetes (CFRD) and liver disease. The clinical outcome of each patient was also evaluated considering the following parameters: spirometric parameters such as forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) % predicted and forced vital capacity (FVC) % predicted, and body mass index (BMI) percentile for patients 2–19 y/o. These data were recorded for all groups during three different times (Fig. 1): Time 1: when patient was diagnosed as having *P. aeruginosa* chronic colonization; Time 2: when group II was diagnosed as having chronic colonization with BCC; since median time between the chronic colonization with *P. aeruginosa* and the chronic colonization with BCC was 3 years, this period of time was used to establish Time 2, for groups I and III; Time 3: all patients were also evaluated 5 years after the *P. aeruginosa* chronic colonization.

Descriptive statistical analyses were performed through construction of tables and charts. Non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare numerical and categorical variables with 2 or 3 categories respectively. The Wilcoxon test was used to analyze statistical significance of temporal variations within each group. The level of significance was set at probability (p) less than 5 % (p < 0.05).

Results

From 2004 to 2013, 56 patients with chronic *P. aeruginosa* colonization were identified. Of these, 27 also had evidence of BCC colonization: 13 had intermittent colonization and 14 had chronic colonization. Clinical data is described in Table 1. Age of patients at the inclusion time ranged from 0 to 36 years old, most of them female (n = 38, 67.9 %); the majority were children or adolescents (n = 52; 92.9 %). Diabetes mellitus (CFRD) and liver disease related to CF were uncommon (3.6 and 1.8 %, respectively), whereas pancreatic insufficiency was present

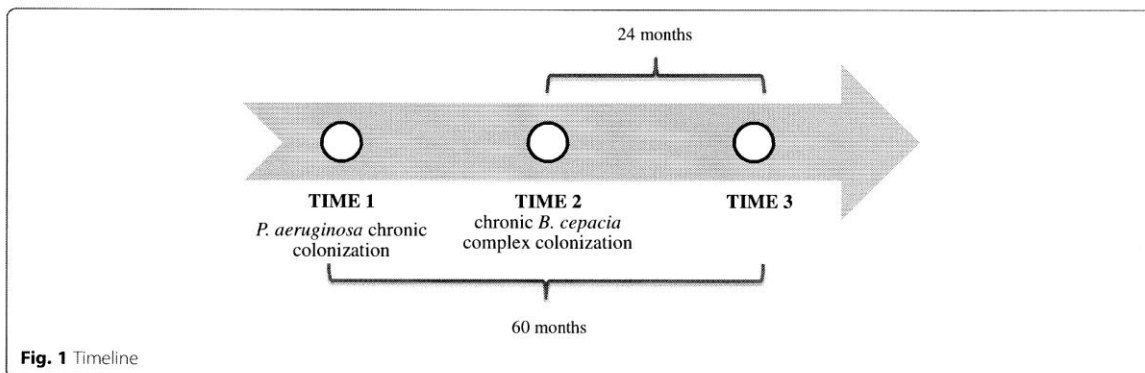


Fig. 1 Timeline

Table 1 Patient data

	Group I	Group II	Group III	p-value
Gender (n)				0.056*
Male	4	8	6	
Female	9	6	23	
Age (mean age at time 1, in years)	9.2	11.1	9.4	0.744**
Mean annual hospital admissions per year	1.2	0.7	0.5	0.601**

*Obtained by χ^2 test

**Obtained by Kruskal-Wallis test; Level of significance: p-value < 0.05

in most of the population (94.6 %). Regarding chronic colonization, no patients were chronically colonized for *H. Influenzae*, *Achromobacter spp* and *Stenotrophomonas spp*. Chronic colonization with *S. aureus* was found in 84.6 % in group I, 28.5 % in group II and 92.6 % in group III. Furthermore, chronic colonization with methicillin-resistant *S. aureus* was found in 7.7 % in group I, 0 % in group II and 7.4 % in group III.

The average number of hospital admissions per year was 0.7, with no statistical difference among the groups. At each hospital admission, patients received intravenous antibiotic treatment. All patients with new growths of BCC were treated with a regimen of 3 intravenous antibiotics (meropenem + ceftazidime + amikacin) for 2 weeks, followed by 3 consecutive months of nebulised tobramycin. If BCC is isolated after initial colonization, patients received another course of step I. For further CBC isolation, therapeutic management was discussed by the multidisciplinary team. Death occurred in 7 patients (2 in group I and 5 in group II). No patient died in group III during the 5 years of observation.

Spirometric data (FEV₁ % and FVC % predicted) and BMI percentile were evaluated for all groups in the three different times previously described. Spirometric data were obtained from 49 of the 56 patients involved in the study: 10 of 13 patients in group I, 13 of the 14 patients in group II and 26 of the 29 patients in group III. The limiting factors for spirometry performance were: age less than six years old (6 patients), and neurological problems (1 patient).

There was no statistically significant difference between the groups for FEV₁ % predicted (p-value: 0.267) or FVC (p-value: 0.911) at the time of *P. aeruginosa* chronic infection. However, at this time, patients of group II (who would course with chronic colonization with BCC 3 years later) already presented BMI percentiles significantly lower (mean: 17.8) than the other groups (mean: 41.4 and 53.9), and p-value was 0.002 (Table 2).

Three years later, when patients from group II were diagnosed with chronic infection by BCC, mean values of FEV₁ % predicted, FVC % predicted and BMI percentile were lower in group II, without statistical significance (p-value >0.05) (Table 2).

Five years later, mean values of FEV₁ % predicted and FVC % predicted were significantly lower in patients chronically colonized with BCC (52.3 %; 67.8 %) when compared with those with intermittent colonization by BCC and those never colonized with BCC (p-values 0.004 and 0.032, respectively). Surprisingly, mean values of FEV₁ % predicted and FVC % predicted for patients with intermittent BCC colonization were higher than those who were never colonized by BCC. At the end of the study (5 years after the *P. aeruginosa* chronic colonization), the mean value of the BMI percentile was significantly lower in patients with chronic BCC (21.1) than it was in groups I and III (45.4 and 45.6, respectively) with p-value 0.035 (Table 2).

Mean annual rates of decline for spirometric data (FEV₁ and FVC % predicted) were statistically different between the groups. While group I (intermittent colonization with BCC) and III (never colonized with BCC) showed mean FEV₁ % predicted annual rates of decline of 0 ± 2.9 % and -2.6 ± 2.9 % respectively, patients chronically colonized with BCC presented with a mean FEV₁ % predicted annual rate of decline of -6 ± 6.0 %. When assessing FVC % predicted, mean annual rates of decline in intermittent or never colonized patients with BCC were 0.6 ± 2.5 % and -2.2 ± 2.9 %, respectively, while patients chronically colonized with BCC presented with -6 ± 7.9 % (Table 3).

In a subanalysis restricted to patients chronically colonized with *B. cepacia* complex bacteria, it was found that most of them had *B. cenocepacia* (n = 8) and *B. vietnamiensis* (n = 5). Analyzing spirometric data of FEV₁ and FVC % predicted, there were no statistical differences between species in this group of patients. However, we noted a greater number of deaths in *B. cenocepacia* chronically colonized patients.

Discussion

Previous studies have found that CF patients chronically colonized with BCC have a greater deterioration of lung function, require more frequent antibiotic therapy and also display increased mortality compared to patients colonized with *P. aeruginosa* [12, 13].

Table 2 Spirometric and BMI percentile data

Parameters	Groups	TIME 1			TIME 2			TIME 3		
		Mean values	Standard deviation	P-value	Mean values	Standard deviation	P-value	Mean values	Standard deviation	P-value
FEV ₁ %	I	78.9	27.0	0.267	82.9	27.9	0.176	86.6	22.3	0.004
	II	70.6	17.2		66.4	22.4		52.3	20.1	
	III	81.5	22.2		72.6	22.3		67.0	18.8	
	Total	78.2	21.8		73.1	23.7		66.7	22.5	
FVC %	I	85.5	24.2	0.911	88.9	23.4	0.426	93.6	18.7	0.032
	II	86.5	18.3		80.8	18.7		67.8	21.2	
	III	89.3	19.2		82.0	19.4		78.0	16.7	
	Total	87.9	19.4		83.1	19.9		78.1	19.9	
BMI percentile	I	41.4	25.4	0.002	43.5	26.9	0.082	45.4	20.8	0.035
	II	17.8	19.5		22.3	20.5		21.1	15.0	
	III	53.9	30.3		45.7	29.2		45.6	28.4	
	Total	42.2	30.6		39.8	28.1		39.8	26.1	

Group I: patients with intermittent colonization with *B. cepacia* complex bacteria (1 or 2 isolates per year)

Group II: patients with chronic colonization with *B. cepacia* complex bacteria (≥ 3 isolates per year)

Group III: patients never colonized with *B. cepacia* complex bacteria

FEV₁ %: forced expiratory volume in 1 s % predicted

FVC %: forced vital capacity % predicted

BMI percentile: body mass index percentile

p-value obtained by Wilcoxon test (level of significance: p-value < 0.05)

Although the clinical outcome after chronic *P. aeruginosa* colonization has been extensively analyzed and associated with deterioration of lung function, few studies have been done with chronic BCC colonization. McCloskey et al [14] assessed the impact of BCC infection in adult CF patients by measuring changes in pulmonary function and BMI in patients previously infected or never infected with *P. aeruginosa*. They concluded that infection with BCC results in a more rapid but variable lung function decline, which may be related to the strain involved. However, in all groups involved, there was no mention about chronicity of infection.

Correia et al [2] carried out a retrospective study of 31 patients with BCC infection who were categorized into two groups (I: intermittent isolations and II: chronic isolations). As expected, in the chronic isolation group, patients had higher mortality and number of hospitalizations and lower FEV₁ values, in line with patients' major deterioration. Some patients from the chronic isolation group had already exhibited deteriorated lung function before becoming infected with BCC, as a result of colonization with other pathogenic agents and disease progression. There was no comparative data between both groups regarding co-infection, lung function or BMI.

Table 3 Spirometric data (Annual rate of decline: FEV₁ % and FVC % predicted)

	Group	Number	Mean	Standard deviation	P-value Kruskal-Wallis
FEV ₁ %	I	10	0.0	2.9	0.002
	II	13	-6.0	6.6	
	III	26	-2.6	2.9	
	Total	49	-3.0	4.6	
FVC %	I	10	0.6	2.5	0.010
	II	13	-6.0	7.9	
	III	26	-2.2	2.9	
	Total	49	-2.6	5.2	

Number: number of patients who performed spirometry

Group I: patients with intermittent colonization with *B. cepacia* complex bacteria (1 or 2 isolates per year)

Group II: patients with chronic colonization with *B. cepacia* complex bacteria (≥ 3 isolates per year)

Group III: patients never colonized with *B. cepacia* complex bacteria

FEV₁ %: forced expiratory volume in 1 s

FVC %: forced vital capacity

Level of significance p-value < 0.05

In our study, a higher number of deaths occurred in the BCC chronically colonized group. All patients in our study were previously diagnosed as having *P. aeruginosa* chronic infection. This aspect is relevant because the deterioration of any criteria in all groups wouldn't be associated with *Pseudomonas aeruginosa*, a bacteria currently known to have impact on CF lung disease, and, therefore, eliminating this possible bias [4].

Patients who developed chronic colonization with BCC demonstrated significant lower FEV₁ and FVC at this time, showing that *B. cepacia* complex chronic colonization might be a risk factor for lung volume decline. Higher mean values of FEV₁ and FVC were found for patients with intermittent *B. cepacia* complex colonization. This might be related to a better patient and family adherence to treatment since first isolation of *B. cepacia* complex. The knowledge of the decrease in long-term survival and fear of progressive invasive bacteremic disease associated with BCC colonization might be responsible for this change in attitude regarding CF treatment.

The rate of decline in FEV₁ % predicted has been studied in CF patients to better understand the progression of lung disease, in order to identify high-risk groups in whom aggressive therapy might be indicated and to assess therapeutic interventions. Risk factors associated with FEV₁ decline include but are not limited to young age, high lung function, female gender, modifier genes, pancreatic insufficiency, poor nutritional status, viral respiratory infections, colonization with *P. aeruginosa* and BCC, and diabetes mellitus. The Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis found that overall rates of FEV₁ % predicted decline were -1.12, -2.39 and -2.34 % per year in 6–8-year-olds, 9–12-year-olds and 13–17-year-olds, respectively [15].

Frangolias et al [16], comparing two groups of adult CF patients (infected and not infected with BCC), found no significant differences in rates of FEV₁ and FVC % predicted decline between cases and controls. In our study, mean rates of FEV₁ % predicted decline were statistically different between the groups, and the group chronically colonized with BCC presented with a mean FEV₁ % predicted decline of -6 % per year, which was much higher than expected in all ages. This shows the negative impact of chronic BCC infection in CF lung disease.

The association of better nutritional status with improvement of lung function is well documented, and poor nutrition is a risk factor for accelerated decline in lung function. However, it is not known whether BMI decline predates FEV₁ decline. A retrospective study by Mc Phail et al [17] compared lung function and nutritional outcome in two CF birth cohorts. They found improvements in lung function and nutritional status in patients from ages

6–12, and a decreased rate of lung function decline associated with a higher baseline BMI (% predicted) and a slower rate of BMI decline. In our study, the BCC chronically colonized group had a lower baseline BMI, which might be a risk factor for chronic BCC colonization and disease progression.

Many studies have shown that in pulmonary colonization with *B. cepacia* complex, the outcome varies considerably, from a rapid fatal decline in lung function and bacteremia to an acceleration of pulmonary function decline or to chronic asymptomatic infection, suggesting that pathogenicity within *B. cepacia* complex varies [12]. In our study, *B. cenocepacia* was more frequent in the chronically colonized group (8/14). In this group, the number of deaths was higher and associated with *B. cenocepacia* colonization in 80 % of cases (4/5). *B. vietnamiensis* was isolated in one patient of group II who died (1/5). Mean time of death after chronic colonization with BCC was 5.2 years. Considering only the four patients with *B. cenocepacia* colonization, this time was reduced to 4.7 years.

Understanding functional consequences of CFTR mutations is important not only for population screening but also CF for management and treatment. McManus et al [18] performed genotype analysis on 59 adult CF patients and evaluated its correlation to *P. aeruginosa* and BCC chronic infection. They concluded that patients homozygous or heterozygous for the deltaF508 deletion are more likely to suffer airway colonization with BCC or *P. aeruginosa*. In our study, CF genotype was not available for all patients. Further evaluation of CF genotype will be useful to understand correlation of CF genotype and BCC colonization.

The retrospective nature of the study and the strict inclusion criteria limited the sample size. However, there are few studies contemplating BCC infection involving children and adults with CF.

Conclusion

In conclusion, this study suggests that in patients previously identified as chronically colonized with *P. aeruginosa*, chronic BCC colonization is associated with lower spirometric data. However, lower BMI might precede spirometric effects of BCC, possibly being a risk factor for chronic colonization.

Abbreviations

BCC: *Burkholderia cepacia* complex; BMI: Body mass index; CF: cystic fibrosis; CFRD: CF-related diabetes; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; HUPE: Hospital Universitário Pedro Ernesto; UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TWF, CHC and EAM conceived the study, its design and coordination. TWF and RWFC collected and analyzed data. OCCN and RMA carried out the

microbiology analysis of respiratory secretions. TWF, CHC, EAM, RWFC, OCCN and RMA participated in the draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Ronir Raggio, PhD, who helped with statistical analysis.

Author details

¹Department of Pediatric Pulmonology, Instituto Fernandes Figueira (Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde), Av. Rui Barbosa, 716, 2nd floor, Flamengo, Zip Code: 22250-020 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Department of Pulmonology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Department of Microbiology, Hospital Central da Aeronáutica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁴Department of Biochemistry, Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Department of Microbiology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Received: 16 July 2015 Accepted: 20 November 2015

Published online: 08 December 2015

References

- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2003; 168(8):918–51.
- Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Sá-Correia I, Barreto C. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev Port Pneumol.* 2008;14(1):5–26.
- Eberl L, Tummeler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int J Microbiol.* 2004;294:123–31.
- Zemanick ET, Harris JK, Conway S, Konstan MW, Marshall B, Quittner AL, et al. Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: opportunities and challenges to therapy. *J Cyst Fibros.* 2010;9(1):1–16.
- Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cumitech 43, cystic fibrosis microbiology. Washington, DC: ASM Press; 2006.
- Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med.* 2014;34(2):197–217.
- Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. 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.* 2000;38:3165–73.
- Carvalho GM, Carvalho AP, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, et al. Transient isolation of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with *Burkholderia vietnamiensis*. *J Cyst Fibros.* 2005;4(4):267–70.
- Rosenstein B, Cutting G. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998;132: 589–95.
- 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;153:54–14.
- Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition of chronic *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2003;2:29–34.
- Courtney JM, Dunbar KEA, Mc Dowel A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, et al. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros.* 2004;3:93–8.
- Correa-Ruiz A, Girón R, Buendía B, Medina-Pascual MJ, Valenzuela C, López-Brea M, et al. *Burkholderia cepacia* complex infection in an adult cystic fibrosis unit in Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(10):649–54.
- McCloskey M, McCaughan J, Redmond AO, Elborn JS. Clinical outcome after acquisition of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Ir J Med Sci.* 2001;170(1):28–31.
- Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2007;151(2):134–9.
- Frangolias DD, Mahenthiralingam E, Rae S, Raboud JM, Davidson AGF, Wittman R, et al. *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: variable disease course. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1972–7.
- McPhail GL, Acton JD, Fenchel MC, Amin RS, Seid M. Improvements in lung function outcomes in children with cystic fibrosis are associated with better nutrition, fewer chronic *pseudomonas aeruginosa* infections, and dornase alfa use. *J Pediatr.* 2008;153(6):752–7.
- McManus TE, Beattie D, Graham C, Moore JE, Elborn JS. Cystic fibrosis genotype and bacterial infection: a possible connection. *Br J Biomed Sci.* 2005;62(2):85–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



APÊNDICE B - Monitoring clinical and microbiological evolution of a cystic fibrosis patient over 26 years: experience of a Brazilian CF centre.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Cystic Fibrosis
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Monitoring clinical and microbiological evolution of a cystic fibrosis patient over 26 years: experience of a Brazilian CF centre.

Article Type: Short Communication

Keywords: Burkholderia vietnamiensis; Burkholderia cepacia complex; cystic fibrosis; microbiome; chronic lung disease; cystic fibrosis-related diabetes

Corresponding Author: Dr. Tania Wrobel Folescu, M.D.

Corresponding Author's Institution: Instituto Fernandes Figueira-FIOCRUZ

First Author: Tania W Folescu, MSC

Order of Authors: Tania W Folescu, MSC; Cassiana F Leite; Renata W Cohen; Mônica C Firmida; Robson S Leão, PhD; Flávia A Freitas; Rodolpho M Albano, PhD; Claudia H Costa, PhD; Elizabeth A Marques, PhD

Abstract: Burkholderia cepacia complex is a group of opportunistic pathogens in CF patients believed to be associated with poor prognosis and patient-to-patient transmissibility. Little is known about clinical outcomes after B. vietnamiensis chronic colonization/infection. We report the case of a 31yo male CF patient known to have chronic infection with B. vietnamiensis for 26 years who presented recent clinical and laboratorial deterioration. Microbiome analysis of respiratory secretions was performed in 3 samples collected in 2014-2015. Clinical deterioration after 26 years of stability overlapped with cystic fibrosis-related diabetes and microbiome composition revealed no significant differences when compared microbiome results to culture dependent methods.

Suggested Reviewers: Fernando A Silva PhD
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
espadaf@terra.com.br

Jose D Ribeiro PhD
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)
dirceu.unicamp@gmail.com

Paulo J Marostica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
pmarostica@hcpa.ufrgs.br

Monitoring clinical and microbiological evolution of a cystic fibrosis patient over 26 years: experience of a Brazilian CF centre.

Tania Wrobel Folescu^{a*}, Cassiana da Costa Ferreira Leite^{b*}, Renata Wrobel Folescu Cohen^a,
Mônica de Cássia Firmida^c, Robson Souza Leão^b, Flávia Alvim Dutra de Freitas^d, Rodolpho
Mattos Albano^d, Cláudia Henrique da Costa^c, Elizabeth Andrade Marques^b

*These authors contributed equally to this work.

^a Instituto nacional de saúde da mulher da criança e do adolescente Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz (IFF/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Doenças do Tórax, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author. Instituto nacional de saúde da mulher da criança e do adolescente Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo - Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel: +55 21 2554-1700; Fax: +55 21 2553-6730
E-mail address: tania.folescu@gmail.com (T.W. Folescu).

Keywords:

Burkholderia vietnamiensis; *Burkholderia cepacia* complex; cystic fibrosis; microbiome; chronic lung disease; cystic fibrosis-related diabetes

Abstract

Burkholderia cepacia complex is a group of opportunistic pathogens in CF patients believed to be associated with poor prognosis and patient-to-patient transmissibility. Little is known about clinical outcomes after *B. vietnamiensis* chronic colonization/infection. We report the case of a

31yo male CF patient known to have chronic infection with *B. vietnamiensis* for 26 years who presented recent clinical and laboratorial deterioration. Microbiome analysis of respiratory secretions was performed in 3 samples collected in 2014-2015. Clinical deterioration after 26 years of stability overlapped with cystic fibrosis-related diabetes and microbiome composition revealed no significant differences when compared microbiome results to culture dependent methods.

1. Introduction

Burkholderia cepacia complex (Bcc) is a group of opportunistic pathogens, with at least 20 distinct genomovars/species (1), believed to be associated with poor prognosis and patient-to-patient transmissibility in cystic fibrosis (CF). *B. cenocepacia* and *B. multivorans* are more prevalent but in Brazil *B. vietnamiensis* colonization/infection, it was identified as the second most prevalent species (2).

In comparison with *B. cenocepacia*, the clinical significance of infection with the other Bcc species is much less clear. *B. multivorans*, for example, has not been associated with an increased mortality or accelerated decline when compared with those associated with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection (3,4,5). However, little is known about clinical outcomes after chronic colonization with others species.

Based on these considerations we describe the clinical, laboratorial and microbiological follow-up of a CF patient colonized with *B. vietnamiensis* during 26 years, who experienced progressive clinical worsening in the last 3 years. This case raised several issues regarding factors influencing clinical deterioration and the possible impact of changes in lung microbiome composition.

2. Case history

A 31 yo male patient had his CF diagnosis by 7 yo: two positive sweat tests with chloride 136,6mEq/L and 129,8mEq/L and homozygous for G85E. Before this time, he had recurrent pneumonia during infancy and was submitted to lobectomy (left upper lobe) at 6yo.

After diagnosis, he presented chronic sinopulmonary disease characterized by chronic cough, recurrent wheezing and gastrointestinal impairment with pancreatic insufficiency and failure to thrive. *P. aeruginosa* was first isolated in sputum samples by 8yo (1990). Chronic colonization (mucoïd and non mucoïd *P. aeruginosa*) was recognized at 10yo (1992). Three years later (13yo - 1995), Bcc was first isolated, having fulfilled chronic colonization criteria (6) by 15yo. In the following 16 years (1997-2013) there was intermittent isolation of *P. aeruginosa* and continuous isolation of Bcc, identified as *B. vietnamiensis* (7) (**Figure 1**). Clinical and laboratorial data were registered during each evaluation at the CF center including: body mass index (BMI) and spirometric measurements (forced expiratory volume in 1s (FEV₁) % predicted, forced vital capacity (FVC) % predicted).

At the moment of chronic *P. aeruginosa* colonization he presented a BMI:18, FEV₁: 72% and FVC: 87%. At the moment of the first isolation of Bcc he presented a BMI:16, FEV₁: 70% and FVC: 85%. When chronic Bcc isolation was identified, a BMI:16,91, FEV₁: 60,4% and FVC: 80% were recorded. From 1995 to 2013 he remained clinically stable, required annual hospital admissions and presented BMI:16,9 – 18,1, FEV₁ (%) and FVC (%) annual rate of decline of 1,61% and 1,35%, respectively.

However, from 2013 to 2015, there was significant clinical and lung function deterioration: FEV₁% and FVC% annual rate of decline was 3% and 4.1%/year respectively while BMI decreased from 18.1 to 17.1. Since June/2014, episodes of hemoptysis and respiratory exacerbations (with hospital admissions) became more frequent. CF related diabetes (CFRD) was diagnosed (fasting glicemia: 116mg/dL, oral glucose tolerance test: 305mg/dL). He was on regular use of alpha dornase, short and long action inhaled bronchodilators, inhaled corticosteroids, azithromycin, pancreatic enzymes and insulin replacement. By this time, the patient showed poor adherence to treatment and received oral ciprofloxacin for 14 days (Jun/11-25/2014) and IV meropenem (September 3-16, 2014) during hospitalization.

Available high resolution computed tomography (HRCT) evaluation through modified Bhalla score (8) presented the following total score: 9 in 1992, 17 in 2000 and 25 in 2015. The last HRCT scan (2015) highlights the increase in severity of bronchiectasis, thickening of bronchial walls, mosaic pattern, air trapping and detection of diffuse ground glass images (**Figure 2**).

Because of the severity of the disease in the last years (2014 – 2015), in addition to traditional microbiological surveillance, microbiome analysis by next generation sequencing was performed on respiratory secretions at three clinical visits (Jun/27/2014, Sep/26/2014 and Jan/09/2015). Aerobic cultures from these sputum samples presented two main microorganisms related to lung infection/colonization in the CF patient: *P. aeruginosa* and Bcc (identified as *B. vietnamiensis* by PCR and sequencing of the recA gene). The first two samples presented Bcc and *P. aeruginosa* (non mucoid type), while *P. aeruginosa* (non mucoid type) and Bcc with both mucoid and non mucoid morphotypes were identified in the third sample.

Microbiome analysis of sputum samples was performed by sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene in an Illumina MiSeq instrument (9). The following data was obtained from the three samples collected from June 2014 to January 2015 (six months period): 97% of the

bacterial genera identified were attributed to genus *Burkholderia* (98.7%, 98.6% and 92.3% of each sputum sample, respectively). Although *Burkholderia* was remarkably predominant, other genera related to CF lung infections were also found: *Pseudomonas* (0.71%), *Rothia* (1.65%), *Staphylococcus* (0.07%), *Haemophilus* (0.29%), *Ralstonia* (0.002%) (**Table 1**).

3. Discussion

Despite advances in Bcc taxonomy, predicting prognosis in infected CF patients is challenging. Previous studies have shown that CF patients chronically colonized with Bcc present greater deterioration of lung function, require frequent antibiotic therapy and display increased mortality when compared to patients colonized with *P. aeruginosa* (10,11). However, no studies have described the clinical evolution of CF patients chronically colonized with *B. vietnamiensis*. In our case, a CF patient chronically colonized with *B. vietnamiensis* remained in stable conditions for 26 years and experienced significant clinical deterioration in the last 3 years.

For CF lung disease, risk factors associated with FEV₁ decline include (but are not limited to) young age, high lung function, female gender, modifier genes, pancreatic insufficiency, poor nutritional status, viral respiratory infections, colonization with *P. aeruginosa* and Bcc, and diabetes mellitus (12). Mean rate of FEV₁% predicted decline in CF patients chronically colonized with Bcc was significantly higher than expected in all ages (6), although there was no correlation to Bcc species. In our report, chronic Bcc colonization and clinical stability had been present over a long period. Lung function deterioration started over the last three years, when CFRD was diagnosed. CFRD is an important cause of morbidity in CF since insulin insufficiency and hyperglycemia, promoting oxidative stress, inflammation and infection, negatively affect CF lung disease. Nutritional status and pulmonary function begin to decline in CF patients several years before the actual diagnosis of CFRD, when minimal hyperglycemia is present. Abnormal glucose tolerance relates to insulin insufficiency and insulin resistance (13). Since insulin is an anabolic hormone, insulin insufficiency may reduce inspiratory and diaphragm muscle function, further worsening lung function (14). The deterioration of the reported CF patient lung function overlaps with CFRD diagnosis and, in fact, hyperglycemia may have started before and strongly contributed to clinical deterioration.

In addition to all clinical factors that might justify clinical deterioration, culture-independent techniques could be of use to allow a greater understanding of the respiratory microbiome in this

CF patient. This analysis confirmed that *Burkholderia* was the predominant genus. *Pseudomonas* appeared in low relative abundance in the three sputum samples, suggesting that the status of *P. aeruginosa* on routine microbiological cultures, usually referred as the major CF pathogen, could be overstated

In conclusion, clinical factors such as CFRD surely may have contributed to lung function deterioration. Although the small number of samples used for culture- independent analysis limits our understanding of the lung microbiome of this patient there was a good agreement with sputum cultures that showed chronic colonization with Bcc.

Acknowledgments: This report didn't receive any funding

Table 1 - Presence in aerobic cultures and microbiome analysis of collected sputum samples

	June 27th 2014		September 26th 2014		January 9th 2015	
	Presence in Culture	Microbiome Analysis	Presence in Culture	Microbiome Analysis	Presence in Culture	Microbiome Analysis
<i>Burkholderia</i>	Yes	98,7%*	Yes	98,6%	Yes	92,6%
<i>Rothia</i>	No	0,53%	No	0,67%	No	4,6%
<i>Pseudomonas</i>	Yes	0,57%	Yes	0,47%	Yes	1,27%
Unclassified Enterobacteriaceae	No	0%	No	0%	No	0,04%
Unclassified Burkholderiaceae	-	0%	-	0,02%	-	0%
Unclassified Burkholderiales	-	0%	-	0%	-	0,25%
Unclassified Alcaligenaceae	-	0%	-	0,006%	-	0,02%
<i>Haemophilus</i>	No	0%	No	0%	No	1,12%
<i>Staphylococcus</i>	No	0,08%	No	0,04%	No	0,13%

* Relative proportion

Figure 1- Timeline

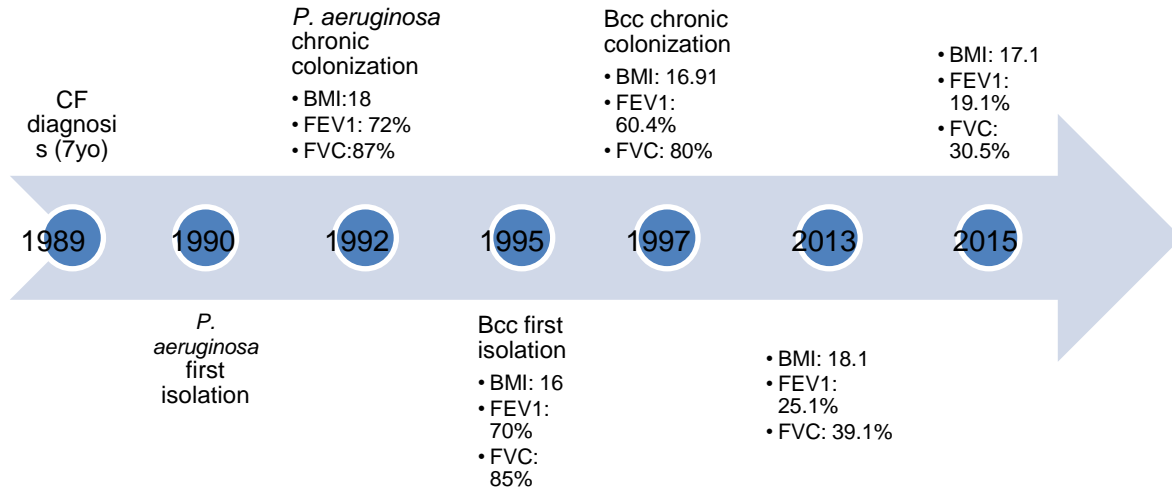


Figure 2- HRCT images



Figure 2 - HRCT images: 1992 (A), 2000 (B), 2015 (C)

References

1. Smet BD, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JL, 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 *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Bacteriol* 2015; 65: 2265-2271.
2. Vicenzi FJ, Pillonetto M, Souza HAPHM, Palmeiro JK, Riedi CA, Rosario-Filho NA, Dalla-Costa LM. Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia* complex species isolated from children with cystic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 111(1): 37-42.
3. Courtney JM, Dunbar KEA, Mc Dowel A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, et al. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 93-98.
4. Jones AM, Dodd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* 2004; 59: 948-951.
5. Kalish LA, Waltz DA, Dovey M, Potter-Bynoe G, McAdam AJ, LiPuma JJ, Gerard C, Goldmann D. Impact of *Burkholderia dolosa* on Lung Function and Survival in Cystic Fibrosis. *Am J Respir CritiCare Med* 2006; 173 (4): 421-425.
6. Folescu TW, Costa CH, Cohen RWF, Neto OCC, Albano RM, Marques EA. *Burkholderia cepacia* complex: clinical course in cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med* 2015; 15: 158-163.
7. Carvalho GM, Carvallho AP, Folescu TX, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, et al. Transient isolation of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonizes with *Burkholderia vietnamiensis*. *J Cyst Fibros* 2005; 4(4): 267-270.
8. Judge EP, Dodd JD, Masterson JB, Gakkagher CG. Pulmonary abnormalities on high-resolution CT demonstrate more rapid decline than FEV1 in adults with cystic fibrosis. *Chest* 2006; 130(5): 1424-1432.
9. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gromley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6(8): 1621-1624.
10. McCloskey M, McCaughan J, Redmond A, Elborn JS. Clinical outcome after acquisition of *Burkholderia cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Ir J Med Sci* 2001; 170 (1): 28-31.
11. Correia S, Nascimento C, Pereira L, Cunha MV, Sá-Correia I, Barreto C. The clinical course of *Burkholderia cepacia* complex bacteria respiratory infection in cystic fibrosis patients. *Rev. port. pneumol.* 2008; 14(1):5-26.

12. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2007;151(2): 34-39.
13. Moran A, Becker D, Casella SJ, Gottlieb PA, Kirkman MS, Marshall BC, Slovis B. Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33(12): 2677-2683.
14. Alves CAD, Aguiar RA, Alves ACS, Santana MA. Diabetes mellitus in patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 2007; 33(2): 213-221.

ANEXO A - Declaração de aprovação no comitê de ética do Instituto Fernandes Figueira

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PROJETO DE PESQUISA

Título: Complexo Burkholderia cepacia: Impacto clínico em pacientes com fibrose cística acompanhados no Rio de Janeiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02867612.1.0000.5269

Pesquisador: Tania Wrobel Foiescu

Instituição: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 112.944

Data da Relatoria: 27/09/2012

Apresentação do Projeto:

A fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva multisistêmica que atinge 1:2500 nascidos vivos caucasianos. No Rio de Janeiro, os últimos estudos estimam que a incidência esteja em torno de 1:6900. Apesar dos progressos no entendimento da base molecular e fisiopatologia da FC, as infecções respiratórias recorrentes são a maior causa de morbimortalidade da doença. A medida que aumenta a sobrevivência dos portadores de FC, cresce o número de pacientes que receberam vários esquemas de antibióticos, favorecendo a emergência de organismos resistentes, tais como bactérias do complexo Burkholderia cepacia (CBC), *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans*. A colonização por bactérias do CBC tem sido associada a pior prognóstico e infecção cruzada entre pacientes com FC. Atualmente identificam-se 17 espécies no complexo Burkholderia cepacia, com prevalências distintas em centros de referência para FC. Além disso, a transmissão das bactérias do complexo Burkholderia cepacia tem sido bem documentada e vem resultando em programas de controle de infecção. O objetivo principal deste estudo é conhecer a frequência de colonização por bactérias do complexo Burkholderia cepacia em pacientes com FC acompanhados no Instituto Fernandes Figueira e no Hospital Universitário Pedro Ernesto e avaliar seu impacto na progressão da doença pulmonar. Com base em culturas de escarro e/ou de swab de orofaringe realizados de rotina serão identificados pacientes colonizados por bactérias do complexo Burkholderia cepacia no período entre 2004 e 2012. Estes serão separados em 2 grupos: I- portadores de colonização intermitente (1 ou 2 culturas positivas em 12 meses) e II- portadores de colonização crônica (3 ou mais culturas positivas em pelo menos 12 meses). Os pacientes dos dois grupos serão avaliados e comparados quanto ao estado nutricional (relação peso/estatura ou índice de massa corporal - IMC), função pulmonar (VEF1), e alterações tomográficas (score de Bhatta modificado). Visando avaliar o impacto clínico, os dados dos indivíduos colonizados por bactérias do complexo B. cepacia serão comparados aos de um grupo controle de colonizados crônicos por *P. aeruginosa* sem colonização por bactérias do complexo B. cepacia. O pareamento dos grupos será feito por idade, gênero, VEF1 ($\pm 10\%$) e índice de massa corporal (IMC).

Endereço: RUI BARBOSA
Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: 2115-5417 Fax: 2115-5284 E-mail: cepiff@ff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a frequência e a repercussão clínica da colonização pelas diferentes espécies do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com FC, vinculados ao Instituto Fernandes Figueira e ao Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Objetivo Secundário:

Avaliar a frequência de colonização pelas diferentes espécies de bactérias do CbC na população selecionada. Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das diferentes espécies do CbC. Avaliar as características demográficas e clínicas de cada paciente no momento da colonização. Avaliar a evolução clínica através do confedimento do estado nutricional, função pulmonar (VEF1) e alterações tomográficas (score de Bhatta modificado) dos dois grupos colonizados pelas diferentes espécies do CbC e comparar com um grupo controle de colonizados crônicos por *P. aeruginosa* sem colonização por bactérias do complexo *B. cepacia*. 2

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de uma pesquisa em prontuários mas os responsáveis serão consultados para obtenção do TCLE. Os pacientes estão em acompanhamento no IFF e os dados serão basicamente colhidos dentro das consultas registradas. Privacidade dos pacientes está considerada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de coorte com coleta de dados retrospectiva e prospectiva (entrevistas)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Recomendações:

Obter o crédito do CEP no TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

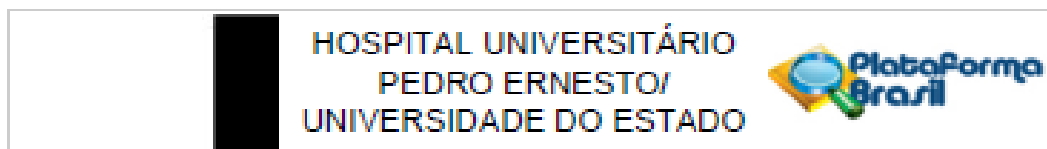
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais e critério do CEP:

aprovado

ANEXO B - Declaração de aprovação no comitê de ética do Hospital Pedro Ernesto

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Complexo Burkholderia cepacia: Impacto clínico em pacientes com fibrose cística acompanhados no Rio de Janeiro

Pesquisador: Tania Wrobel Folescu

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 1

CAAE: 02867612.1.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 120.539

Data da Relatoria: 10/10/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto bem estruturado, detalhado e claro. É um projeto de doutorado e o seu projeto na Integra (anexo) esclarece todos os pontos necessários para sua avaliação

Objetivo da Pesquisa:

Avallar a frequência e a repercussão clínica da colonização pelas diferentes espécies do complexo Burkholderia cepacia em pacientes com fibrose cística

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nenhum risco, uma vez ser um estudo observacional. A coleta de dados para análise será feita no prontuário do paciente de acordo com os laudos e descrições existentes, descritas pela equipe médica assistencial.

Benefício: além de aumentar o conhecimento sobre a doença (FC) avallar a possibilidade de determinado tipo de colonização bacteriana influenciar no prognóstico da FC

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum

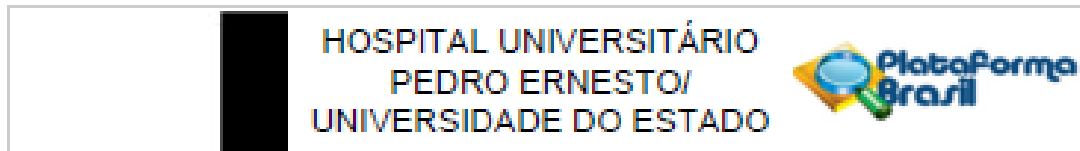
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado e bem estruturados

Recomendações:

Nenhuma

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Tênis
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2288-8253 Fax: (21)2284-0853 E-mail: cep-hufe@uerj.br



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 11 de Outubro de 2012

Assinador por:
WILLE OIGMAN
 (Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2888-8253 Fax: (21)2884-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br