

Trabajos de Especialización

Prevalencia y sensibilidad antimicrobiana de especies del complejo burkholderia cepacia en muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística del Hospital Infantil Municipal de Córdoba.

Prevalence and antimicrobial sensibility of species of the burkholderia cepacia complex in respiratory samples of patients with cystic fibrosis of the Municipal Children's Hospital of Córdoba.

Por Bioq. Garcia Ana Paula ^{*1}, Dra. Morello Ana², Prieto Mónica³, Bioq. Esp. González Liliana Lorena⁴.

1. Bioquímica. Postulante a Especialista en Bacteriología UNC. Servicio Bacteriología, Lab. Hosp. Infantil Municipal de Córdoba.
2. Médica Especialista en Neumonología Pediátrica. Servicio de Neumonología, Hosp. Infantil Municipal de Córdoba.
3. Servicio Bacteriología Especial. INEI - ANLIS. "Dr. Carlos G. Malbrán"
4. Bioquímica Especialista en Bacteriología Clínica. Servicio Bacteriología, Lab. Hosp. Infantil Municipal de Córdoba.

Laboratorio de Bacteriología – Hospital Infantil Municipal. Lavalleja 3050 – Córdoba, Argentina.

*Garcia Ana Paula, anitapaugarcia@hotmail.com, Tel: 0351-157552907

RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad hereditaria que afecta a numerosos órganos y sistemas, siendo las infecciones respiratorias la principal causa de morbilidad y mortalidad. Existe una gran diversidad de microorganismos implicados en la colonización-infección del tracto respiratorio y generalmente siguen un patrón cronológico característico. El complejo *Burkholderia cepacia* (CBC) es un grupo de bacterias gram negativas ampliamente distribuidas en el medio ambiente; las infecciones por estos microorganismos en niños con FQ pueden causar la disminución de la función pulmonar e incrementar la mortalidad. El diagnóstico y seguimiento microbiológico en estos pacientes son fundamentales para detectar la infección, instaurar un tratamiento antibiótico adecuado y retrasar la progresión del daño pulmonar. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la prevalencia y perfil de sensibilidad antimicrobiana del CBC en el período comprendido entre enero 2011 y diciembre 2018 en pacientes con FQ. Se estudiaron un total de 1093 muestras de secreciones respiratorias pertenecientes a 63 pacientes de 2 meses a 18 años de edad. La prevalencia del CBC en los pacientes atendidos fue de 14,3%. En cuanto al perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos estudiados, trimetoprima-sulfametoxazol mostró el mayor porcentaje de no sensibilidad (33,3 %), seguido por ceftazidima (22,2%) y meropenem (22,1 %).

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disorder that affects numerous organs and systems, with respiratory infections being the main cause of morbidity and mortality. There is a great diversity of microorganisms involved in the colonization-infection of the respiratory tract, which usually follow a characteristic chronological pattern. The

Burkholderia cepacia complex (CBC) is a group of gram-negative bacteria widely distributed in the environment. Infections by these microorganisms in children with CF can cause impaired lung function and increased mortality. The diagnosis and microbiological follow-up in these patients are fundamental to detect the infection, establish an adequate antibiotic treatment and delay the progress of lung damage. The objective of this study is to study the prevalence and profile of antimicrobial sensitivity of the CBC in the period between January 2011 and December 2018 in patients with CF. A total of 1093 samples of respiratory secretions belonging to 63 patients from 2 months to 18 years of age were studied. The prevalence of the CBC was 14.3%. Regarding the antimicrobial sensitivity profile of the isolates studied, trimetoprima-sulfamethoxazole showed the highest percentage of non-sensitivity (33.3%) followed by ceftazidime (22.2%) and meropenem (22.1%).

Palabras clave: *Fibrosis Quística *Complejo *Burkholderia cepacia* *Diagnóstico microbiológico * Prevalencia *Sensibilidad antimicrobiana

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad genética autosómica recesiva más frecuente en la población de origen caucásico, siendo la primera causa de afección pulmonar en la infancia. La incidencia estimada es de 1/2500 recién nacidos vivos, aunque se observan diferencias según los distintos grupos raciales^(1, 2). En Argentina se informa que 1/4000 nacidos padece la enfermedad, estimando que alrededor de 300 – 400 niños nacen por año con FQ⁽²⁾.

La edad media de sobrevivencia ha aumentado mundialmente. En países desarrollados la esperanza de vida para los pacientes fibroquísticos puede superar los 60 años, lo cual está asociado directamente con un tratamiento adecuado⁽²⁾.

La enfermedad es causada por mutaciones en un gen del brazo largo del cromosoma 7, el cual codifica una proteína reguladora de la conductancia de transmembrana: "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR) que se expresa en células epiteliales y sanguíneas, e interviene en el balance de fluidos actuando como un canal para el transporte de cloro e inhibiendo la absorción de sodio. Su deficiencia causa un desbalance iónico, lo que conduce a la deshidratación de las secreciones en las mucosas, afectando principalmente a órganos como pulmones, páncreas, intestino e hígado. La colonización e infección broncopulmonar son las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ^(3, 4).

En los primeros años de vida los microorganismos relacionados a los pacientes con FQ son *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*, luego aparecen bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, Complejo *Burkholderia cepacia* (CBC), *Stenotrophomonas maltophilia*, y *Achromobacter spp.* entre otros bacilos no fermentadores de glucosa. Este patrón permite definir el concepto de cronoinfección, por el cual los pacientes sufren colonizaciones o infecciones siguiendo una secuencia dependiente de la edad^(5 - 8). Las

infecciones son polimicrobianas, lo cual dificulta el manejo y tratamiento de la enfermedad⁽⁷⁻⁹⁾.

El CBC es un grupo de bacterias gram negativas ampliamente distribuidas en el medio ambiente, son microorganismos oportunistas que representan un riesgo significativo para la salud de los pacientes con FQ. Comprende un conjunto de 20 especies (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia*, *B. ubonensis*, *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans*, *B. lata*, *B. pseudomultivorans*, *B. stagnalis* y *B. territorii*) con fenotipos similares y algunas diferencias genotípicas, por lo cual su identificación definitiva se debe realizar por técnicas de biología molecular.⁽¹⁰⁻¹³⁾

Actualmente a nivel mundial las especies más frecuentes son *B. multivorans* y *B. cenocepacia*, a diferencia de nuestro país que presenta una epidemiología local particular con alta prevalencia de *B. contaminans*, seguida de *B. cenocepacia*^(1, 10, 11, 14, 15, 16).

Las especies del CBC son intrínsecamente resistentes a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en la clínica, tales como aminoglucósidos, quinolonas, polimixinas y β-lactámicos lo que dificulta el tratamiento. El aislamiento e identificación rápida y apropiada resulta un paso crítico para el control de la enfermedad y tienen un impacto significativo en el pronóstico y la epidemiología de las infecciones en pacientes con FQ^(2, 11, 16).

El objetivo de este trabajo es determinar la prevalencia de especies del CBC en pacientes pediátricos con FQ atendidos en el Hospital Infantil Municipal de Córdoba en el período enero 2011- diciembre 2018 y conocer el perfil de sensibilidad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras Estudiadas

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Municipal Infantil de Córdoba, desde enero de 2011 a diciembre de 2018 sobre un total de 1093

muestras respiratorias (esputo expectorado, esputo inducido, e hisopados faríngeos profundos) ⁽¹⁷⁾ pertenecientes a 63 pacientes entre 2 meses y 18 años de edad (34 mujeres y 29 hombres) con FQ pertenecientes al Servicio de Neumonología.

Análisis Microbiológicos.

Las muestras fueron procesadas para la observación microscópica mediante tinción de Gram para evaluar aptitud, reacción inflamatoria, y presencia de microorganismos ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Se cultivó semi-cuantitativamente por descarga en cuatro estrías. Los medios de cultivo utilizados fueron Agar Chocolate incubado en 5% de CO₂ a 35-37°C durante 2 días; LEVINE y Chapman (Agar Manitol Salado) en aerobiosis, a 35-37°C, durante 4 días; Medio Burkholderia cepacia selective agar (BCSA) incubado en aerobiosis a 35-37 °C, durante 2 días y posteriormente a 25°C durante 2 días adicionales ⁽²¹⁻²³⁾.

Aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad.

La identificación bioquímica se realizó según técnicas bioquímicas convencionales y API 20 NE (Biomerieux); los aislamientos identificados presuntivamente como CBC fueron confirmados mediante técnicas de biología molecular (secuenciación del gen recA y 16SrDNA) y MALDI-TOF (datos no mostrados), por el Servicio de Bacteriología Especial del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI-ANLIS). Las pruebas de sensibilidad a los distintos antibacterianos se realizaron utilizando el método de difusión en disco de Kirby – Bauer en agar Mueller Hinton según normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), y siguiendo el protocolo de trabajo Whonet Argentina (Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos) ^(24, 25). Los antibióticos ensayados fueron trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), minociclina (MIN), ceftazidima (CAZ), y meropenem (MER). Como control de calidad se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 25318, *Pseudomonasaeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Análisis de datos

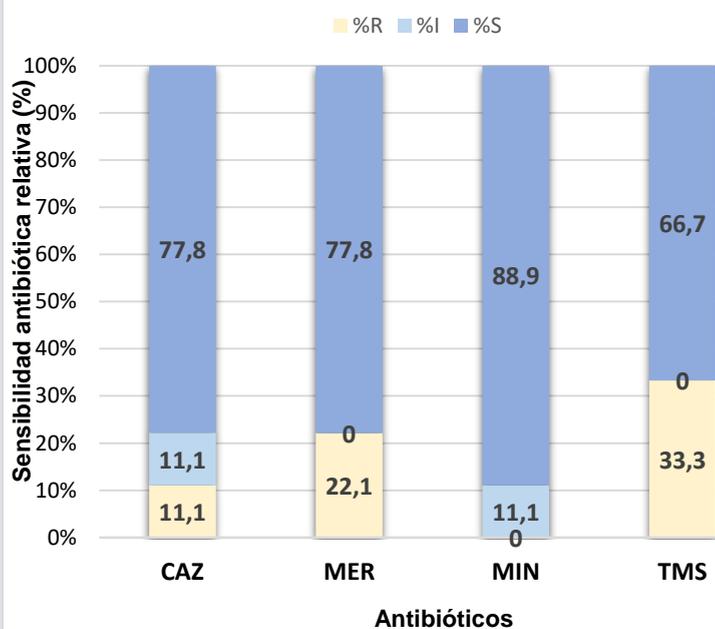
Se utilizó para la recolección de los datos el sistema Epicenter™ V5.69 (Becton Dickinson), siendo luego exportados al software WHONET 5.6 proporcionado por la Organización Mundial de la Salud para el análisis de número de muestras totales y número de muestras positivas para CBC. Para el estudio de sensibilidad antimicrobiana se seleccionó un aislamiento de CBC por episodio o resistencia fenotípica con el resultado de mayor resistencia para cada antibiótico, mediante aplicación de dos filtros del software. Se analizaron porcentajes de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia a cada antibiótico ensayado, en frecuencia relativa.

RESULTADOS

Del total de 1093 muestras analizadas, 33 resultaron positivas para CBC pertenecientes a 9 pacientes (6 mujeres y 3 varones). La prevalencia de las especies del CBC en pacientes pediátricos del Hospital Infantil Municipal de Córdoba fue del 14,3 % en el período comprendido entre enero 2011 a diciembre 2018. La distribución de especies en este grupo fue la siguiente: 8 cepas de *B. contaminans* y 1 cepa de *B. cenocepacia*.

En los ensayos de sensibilidad antibiótica, el 33,3% de las cepas aisladas presentó resistencia a TMS, el 22,2% a MER y el 11,1% a CAZ, mientras que no se encontró resistencia a MIN. Se aislaron cepas con sensibilidad intermedia a CAZ (11,1%) y MIN (11,1%). Todos los resultados se detallan en la Figura 1.

Figura 1. Sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas de Complejo Burkholderia cepacia



%R: porcentaje de cepas resistentes; %I: porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia; %S: porcentaje de cepas sensibles.

DISCUSIÓN

La infección por el *CBC* en pacientes con FQes de suma gravedad por lo que el aislamiento e identificación apropiada resulta un paso crítico y es necesario para realizar un diagnóstico rápido e instaurar un tratamiento adecuado.

Debido al gran daño pulmonar que puede provocar la infección por el *CBC* resulta de interés conocer la prevalencia y sensibilidad antimicrobiana de este microorganismo.

Los últimos estudios de vigilancia sobre la distribución de especies del *CBC* en pacientes con fibrosis quística a nivel mundial, mostraron una mayor prevalencia de *B. multivorans* y *B. cenocepacia*. Por el contrario algunas investigaciones recientes revelan que en Argentina existe una epidemiología local particular, con alta prevalencia de *B. contaminans* seguida de *B. cenocepacia*^(13, 26).

En este trabajo, el *CBC* mostró una prevalencia del 14,3 %, siendo *B. contaminans* la especie más frecuente tal como lo demuestra la epidemiología local de nuestro país.

La mayoría de los estudios indican para el tratamiento de las infecciones por *CBC* combinaciones sinérgicas de antimicrobianos combinando dos o tres drogas. Meropenem es uno de los antibióticos más activos contra el *CBC* y puede asociarse a TMS o ciprofloxacina. Otros antibióticos con actividad demostrada *in vitro* son minociclina y ceftazidima^(27, 28). En cuanto al perfil antimicrobiano de las cepas estudiadas, CAZ, MIN Y MER presentaron buenos parámetros de sensibilidad, por lo que podrían ser considerados para los esquemas terapéuticos empíricos.

Conocer la prevalencia del *CBC* y su perfil de sensibilidad es fundamental para el correcto manejo del paciente, permitiendo instaurar terapias empíricas dirigidas tanto en la propia institución como a nivel nacional; y así lograr una mayor expectativa y calidad de vida.

AGRADECIMIENTOS

.A Liliana González, directora del proyecto y tutora y al equipo de trabajo del laboratorio del Hospital Infantil Municipal.

.A la Dra. Ana Morello.

.A la Microbióloga Mónica Prieto y al Servicio de Bacteriología Especial del Instituto Nacional de Referencia INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aquino R, Gonzales E, Samaniego S, Rivera J Cedeño V, Urbina Y, Diringier B. Caracterización molecular de bacterias patógenas de las vías respiratorias de pacientes peruanos con fibrosis quística. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* (2017); 34(3):423-35.
2. Martina P. Francisco, Bosch M. Alejandra, Yantorno M. Osvaldo. Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al Complejo Burkholderia cepacia recuperados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Univ. Nac. De La Plata. (2013).
3. Busquets Natalia P., Baroni María R., Ochoteco María C., Zurbriggen María L., Virgolini Stella, Meneghetti Fernando G. Aislamientos bacterianos de muestras respiratorias de pacientes pediátricos con fibrosis quística y su distribución por edades. *Revista Argentina de Microbiología* (2013) 45: 44-49
4. Prieto C.I., Palau M.J., Martina P, Achiary C, Achiary A., Bettiol M, y col. *Cystic Fibrosis Cloud database*: Un sistema informático para el almacenamiento y manejo de datos clínicos y microbiológicos del paciente con fibrosis quística. *Rev. Argentina de Microbiología* (2016); 48(1):27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.11.002>
5. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (2003); 168: 918–51
6. Burns JL, Rolain JM. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? *Journal of Cystic Fibrosis*, (2014); 1:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.09.004>
7. Matthew E. Levison and Larry M. Bush. *Cystic Fibrosis. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8^o edition. Elsevier. (2015), p. 874-885.
8. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con

fibrosis quística. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, (2009); 27(2):89-104.

9. Jones AM, Webb AK. Recent advances in cross-infection in cystic fibrosis: *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA and *Pandoraea spp.* *J R Soc. Med* (2003): 96 (Suppl. 43): 66-72.

10. Soloaga R, Guelfand L. Bacilos no Fermentadores de la Glucosa. Curso Diagnóstico microbiológico de enfermedades infecciosas: de la teoría al caso clínico. Parte IV. Organizado por la Asociación de Bioquímicos de la Ciudad de Buenos Aires. Argentina. Directores: Dr. Rolando Soloaga - Dra. Liliana Guelfand, 2016; p.45-50.

11. Oderiz S, Palau MJ, Del Palacio P, Lewis MC, Bettioli MP, Martina P, Bosch A, Yantorno OM, Gatti BM. Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación del complejo *Burkholderia cepacia* aislados de muestras clínicas. *Revista Argentina de Microbiología* (2011) 43: 168-175

12. Rojas – Rojas FU, et al. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Rev. Argent Microbiol.*(2018)

13. Galanternik L. *Burkholderia cepacia*: el camino recorrido desde el año 2000. XII Congreso Argentino de Microbiología, p. 6, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, (Argentina).2010

14. Martina P, Bettioli M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, Vay C, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O, Lagares A, Bosch A. Genetic Diversity of *Burkholderia contaminans* Isolates from Cystic Fibrosis Patients in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*. (2013) p. 339-344.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02500.12>

15. Barrado L, Martinez MT, Villa J, Orellana MA, Viedma E, Chaves F. Clonal diversity among *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic

fibrosis patients in a reference unit. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* (2013); 31(10): 665-668
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.04.025>

16. Cipolla L, et al. Prevalencia de especies del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística en Argentina durante el período 2011-2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* (2017).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2017.09.002>

17. Hoppe, J. E., Towler, E., Wagner, B. D., Accurso, F. J., Sagel, S. D., & Zemanick, E. T. Sputum induction improves detection of pathogens in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, (2015) 50(7), 638-46.

18. Calvo JB, Peinado MA, Oliver A, de la Bellacasa JP. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, (2007). Seimc.

19. Nair, B., Stapp, J., Stapp, L., Bugni, L., Van Dalfsen, J., & Burns, J. L. Utility of gram staining for evaluation of the quality of cystic fibrosis sputum samples. *Journal of clinical microbiology*, (2002) 40(8), 2791-4.

20. Campbell, S., & Forbes, B. A. The Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, (2011) 49(9 Suppl), S30-S33.

21. Henry, D. A., Campbell, M. E., LiPuma, J. J., & Speert, D. P. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *Journal of clinical microbiology*, (1997) 35(3), 614-9.

22. Miller, M. B., & Gilligan, P. H. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, (2003) 41(9), 4009-15.

23. SILVA FILHO, Luiz V.F. da, VELLOSO, Luciana de F., BENTO, Christina N.O., GYTIN, Edelyn, TATENO, Adriana F., LEVI, José E., RODRIGUES, Joaquim C., & RAMOS, Sonia R.T.S. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, (2002) 44(4), 203-208.

24. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; (2019)

25. Protocolo de Trabajo Red WHONET – Argentina.

26. Jordá-Vargas, L., Degrossi, J., Castañeda, N. C., D'Aquino, M., Valvano, M. A., Procopio, Galanternik, L.,... Centrón, D. Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. *Journal of clinical microbiology*, (2008) 46(3), 1151-2.

27. Comités Nacionales de Neumonología, Nutrición, Gastroenterología y Grupo de Trabajo de Kinesiología. Consenso: Guía de diagnóstico y tratamiento de pacientes con fibrosis quística. Actualización (2014). Argentina.

28. Zhou, J., Chen, Y., Tabibi, S., Alba, L., Garber, E., & Saiman, L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, (2006) 51(3), 1085-8.