

## Artículo original

## Prevalencia de *Burkholderia cepacia* en un centro de atención de fibrosis quística

Dres. Eduardo Lentini\*, Liliana Rosaenz\*\*, Ana María Lores\*,  
María Rosa Pesciullesi\* y Carlos Stran\*

### Resumen

**Introducción.** La recuperación de *Burkholderia cepacia* (anteriormente *Pseudomonas cepacia*), se describe desde hace 20 años en pacientes con fibrosis quística atendidos en centros especializados.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la flora bacteriana de esputo o hisopados faríngeos en la totalidad de los enfermos con fibrosis quística que concurren a nuestro servicio y conocer la prevalencia de *B. cepacia* en esta población de 50 pacientes, mediante un medio de cultivo selectivo (agar selectivo *Burkholderia cepacia*).

**Población, material y métodos.** Se trata de un trabajo prospectivo analítico que abarcó los 50 enfermos fibroquísticos que se atienden en nuestro centro, desde julio del año 2000 hasta la actualidad. Se procesaron todas las muestras de esputo o hisopado de fauces usando los siguientes métodos de laboratorio: a) agar selectivo *Burkholderia cepacia*; b) métodos bioquímicos: xilosa, movilidad, lactosa y lisina; c) identificación fenotípica con el API-20 N.E.; d) para la identificación genética en genomas se utilizó la reacción en cadena de polimerasa (PCR) efectuada en el University of Michigan Medical Center, EE.UU. (Dr. John Lipuma).

**Resultados.** En abril y mayo del 2001 se identificaron dos cepas que se clasificaron en la Universidad de Michigan como genotipo (GNMV) II (*B. multivorans*) en el enfermo N° 1, y GNMV IV (*B. stabilis*), en el enfermo N° 2, lo que resulta en una prevalencia de *B. cepacia* del 4% en nuestra población.

**Conclusiones.** Es de gran importancia desarrollar las técnicas de laboratorio apropiadas para la detección de la *B. cepacia* en todos los centros de fibrosis quística, por las importantes repercusiones que este germen tiene en la morbimortalidad y por las medidas de control epidemiológico que deben implementarse para evitar la transmisión cruzada. También el desarrollo creciente de trasplantes pulmonares hace imprescindible su clasificación genética a la hora de indicar o contraindicar este procedimiento.

**Palabras clave:** *Burkholderia cepacia*, genotipo, fibrosis quística, agar selectivo *Burkholderia cepacia*.

### Summary

*Burkholderia cepacia* (formerly known as *Pseudomonas cepacia*) was described in patients with cystic fibrosis that attended to specialized centers nearly 20 years ago. The objective of this study was to examine bacterial flora in sputum and pharyngeal swabs in patients with cystic fibrosis seen in our service, and to determine the prevalence of *B. cepacia* in this population of 50 patients by means of a selective culture medium (*Burkholderia cepacia* selective agar).

**Population, material & methods.** This was a prospective analytical study that included the 50 patients with cystic fibrosis seen in our center since July 2000. All the samples of sputum or pharyngeal swabs were studied with the following examinations: a) *Burkholderia cepacia* selective agar; b) biochemical methods: xylose, motility, lactose and lysine; c) phenotypical identification with the AOI-20 N.E.; d) for genetic identification in genomas, the polymerase chain reaction performed in The University of Michigan Medical Center, in U.S.A., (John Lipuma, M.D.), was used.

**Results.** On April and May 2001, two strains were classified as Genomovar II (*B. multivorans*) and Genomovar IV (*B. stabilis*), with an overall prevalence of infection with *B. cepacia* of 4% in our population.

**Conclusions.** It is very important to develop appropriate laboratory techniques in order to detect *B. cepacia* in all the centers that assist patients with cystic fibrosis, as these infections have a major impact on morbidity and mortality, and because of the epidemiologic control measures that should be adopted in order to avoid cross-infections. Besides these considerations, the increasing use of lung transplantation constitute a mandatory indication for genetic classification of these infections in order to indicate or contraindicate this procedure.

**Key words:** *Burkholderia cepacia*, genotipo, cystic fibrosis, *Burkholderia cepacia* selective agar.

### INTRODUCCIÓN

"Sentémonos ante los 'hechos' como lo hacen los niños en su inocencia, estemos listos a dejar de lado nuestros preconceptos, sigamos humildemente a la naturaleza a todos los abismos que nos presente, o no aprenderemos nada."

T.H. HUXLEY

La infección por *Burkholderia cepacia* (*Bc*) ha sido reconocida en pacientes con fibrosis quística. A pesar de que nuestro centro tiene una experiencia de 15 años en el seguimiento de pacientes fibroquísticos que han sido sometidos a intensas terapias con antibióticos durante mucho tiempo, nos llamaba la atención

\* Servicio de Neumonología y Fibrosis Quística.

\*\* Laboratorio de Bacteriología. Hospital de Niños Notti, Mendoza, Argentina.

Correspondencia: Dr. Eduardo Lentini. Paso de los Andes 55. (5500) Mendoza, Argentina. elentini@arnet.com.ar

no haber detectado este germen hasta el momento. Su hallazgo es citado por la bibliografía desde hace 20 años,<sup>1,2</sup> en centros del hemisferio norte.

Antiguamente clasificada como una especie de *Pseudomonas*, estudios de su biología molecular, epidemiología y virulencia sugieren que es biológicamente diferente de la *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>3</sup> Es un germen gramnegativo que se desarrolla en individuos con compromiso inmunológico, particularmente en pacientes con fibrosis quística. Según el registro nacional de pacientes de la Fundación de Fibrosis Quística de EE.UU. (1996) su prevalencia es de 3,6%.<sup>4</sup>

Se han descrito cinco variedades genéticas (genomovares), cuyo conjunto se denomina "complejo *Burkholderia cepacia*". Tres de ellos tienen ya asignados nombres de especie, otros aún no están tipificados exactamente con características propias de transmisibilidad y frecuencia de hallazgos en cultivos<sup>3,5</sup> (Tabla 1).

La veracidad de la falta de hallazgos de *Burkholderia cepacia* en nuestros pacientes era cuestionable y, teniendo en cuenta la observación de manifestaciones clínicas sospechosas (descensos espirométricos muy rápidos, cuadros febriles prolongados)<sup>5-8</sup> y ante la sospecha de que los medios de cultivo podían ser la causa de la falta de detección, se elaboró el agar específico para *Burkholderia cepacia* (ASBC) de acuerdo a las sugerencias del Dr. John Lipuma, de la Universidad de Michigan, EE.UU.

Los importantes cambios terapéuticos, epidemiológicos (aislamiento del paciente) y de pronóstico que implica el hallazgo de estos gérmenes,<sup>5,6,9</sup> justifican que todos

los centros de fibrosis quística enfoquen con seriedad este problema.

El objetivo del presente trabajo fue: 1) conocer la prevalencia de aislamiento de *Burkholderia cepacia* en los pacientes con fibrosis quística seguidos en nuestro servicio; 2) tomar las medidas apropiadas desde el punto de vista terapéutico y de control epidemiológico.

## POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió con cultivos apropiados la totalidad de los enfermos seguidos por nuestro centro. El número total de pacientes fue de 50 y sus edades, de 6 meses a 24 años. Nuestro centro controla a pacientes de Mendoza y provincias aledañas desde hace 15 años, habiéndose formado un equipo multidisciplinario para la atención global de esta compleja patología.

Se trata de un trabajo prospectivo analítico que abarcó todo nuestro universo de pacientes fibroquísticos. Los pacientes fueron diagnosticados por medio de la prueba del sudor (por lo menos 2 determinaciones positivas) y coincidencia con la clínica.

Desde julio del año 2000, en todos los enfermos se utilizó el ASBC<sup>5,10,11</sup> para cultivar la muestra de esputo, o hisopado faríngeo si no podían expectorar. Se procesó un número variable de muestras por paciente (2 a 8), con un total de 220 muestras.

Antes de esa fecha, las muestras se procesaban con los medios de cultivo habituales para el aislamiento de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Haemophilus* (agar cetrimida, agar manitol salado, agar sangre de carnero y agar chocolate).

Para la identificación de la *Burkholderia cepacia* en nuestro laboratorio se utilizaron los siguientes métodos:

- El ASBC,<sup>10,11</sup> constituido por: CINa, sacarosa, lactosa, rojo fenol, violeta cristal, peptona triptasa, extracto de levadura y agar, pH del medio: 7. Después de someterlo a autoclave por 20 minutos se agrega polimixina, gentamicina y vancomicina a los cuales la *Bc* es resistente. De esta manera sólo el patógeno crece en este medio, produciendo un viraje del naranja al rojo.
- Para la tipificación bioquímica se utilizaron pruebas de: xilosa (+), movilidad (+), lactosa al 10% (+) y lisina (+).

Tabla 1. Clasificación genética de la *B. cepacia*

Características de las variedades genéticas (genomovares) del complejo <i>Burkholderia cepacia</i>					
	Genomovar I	Genomovar II	Genomovar III	Genomovar IV	Genomovar V
Nombre especie	No clasif.	<i>B. multivorans</i>	No clasif.	<i>B. stabilis</i>	<i>B. vietnamensis</i>
Transmisibilidad en FQ	(-)	(+)	(++++)	(-)	(-)
Frecuencia de cultivos + en FQ	(+)	(+++)	(++++)	(++)	(+)

Modificada de Speert D. Infect Med 2001; 18:49-56.

- Para la identificación fenotípica se utilizó el API 20 N.E (Bio-Merieux S.A. Marcy l'Etoile-Francia).

En el laboratorio de *Burkholderia cepacia* Research and Laboratory and Repository, del Centro Médico de la Universidad de Michigan, en EE.UU., donde fueron enviadas las dos cepas encontradas en un medio de transporte apropiado, se utilizaron los mismos métodos bioquímicos, agregándose la clasificación genética en genomovares por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las pruebas de sensibilidad según normas NCCLS no dan puntos de corte para bacilos no fermentadores, con excepción de *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizó una estimulación cualitativa por formación de halos de antibiótico.

## RESULTADOS

Se encontró *B. cepacia* sólo en 2 de los 50 enfermos estudiados. En la Tabla 2 se presentan los resultados de los estudios bacteriológicos. Se enviaron muestras de dos cepas ya estudiadas en Mendoza por medio de ASBC, reacciones bioquímicas y API 20 N.E (bioquímico). En ambos enfermos se corroboró la presencia de *B. cepacia*, que se clasificaron en genomovares por medio de PCR. El enfermo N° 1 presentó el genotipo II (*B. multivorans*) y el N° 2, el genotipo IV (*B. stabilis*).

Tabla 2. Hallazgos en cultivo (ASBC) y métodos bioquímicos (Laboratorios en Mendoza y EE.UU.)

Hallazgos bacteriológicos en los dos enfermos con <i>B. cepacia</i>		
Medio utilizado	Enfermo N° 1	Enfermo N° 2
Crecimiento en ASBC	+	+
<i>Análisis bioquímico</i>		
Oxidasa	+	+
ONPG	+	+
Lisina decarboxilasa	+	+
<i>Producción de ácido</i>		
De sacarosa	-	-
De lactosa	+	+
PCR	+ ( <i>B. multivorans</i> )	+ ( <i>B. stabilis</i> )

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Universidad de Michigan. Lab. Dr. J. Lipuma.

## Paciente 1

Sexo: masculino. Edad: 14 años. Relación peso-talla (P/T): 95% en 1999. P/T: 87% al alta en 2001.

Espirometrías: en 1999 tenía un volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>), porcentaje de lo teórico (PDT) de 101%. En abril 2001, al detectarse el germen, llegó a su nivel más bajo histórico: VEF<sub>1</sub> (PDT): 37%. VEF<sub>1</sub> (PDT): 86% al alta, después del tratamiento.

Radiología: puntaje de Brassfield= 15 durante los años 2000 y 2001. (Máximo normal 25). (Un valor de 15 indica importantes lesiones radiológicas).

Hemograma: GR 4.620.000/mm<sup>3</sup>, leucocitos: 7.600/mm<sup>3</sup>, neutrófilos 54%. Eritrosedimentación (ESD): 15 mm.

Cultivos de esputo: en 1999 se halló *Staphylococcus aureus* meticilinosensible (MS) por lavaje broncoalveolar (LBA). La técnica de tinción con anticuerpos monoclonales en el mismo LBA fue negativa para micobacterias atípicas, *Pneumocystis carinii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamidia* (genérico) y *Legionella pneumophila*. En abril de 2001 se detectó la *Burkholderia cepacia* (*B. multivorans*), que ha permanecido en sus secreciones hasta la redacción de este informe.

Sensibilidad del germen: Sensible a: cefoperazona (cfp), meropenem (mr), piperacilina-tazobactam (taz), ceftazidima (caz), aztreonam (azt), cefepime (fep). Resistente a: amikacina (akn), polimixina (poli).

Tratamiento: ceftazidima-amikacina durante 15 días. Este tratamiento se había iniciado y completado antes de la certificación del hallazgo de la *Bc*.

Evolución: durante el año 1999 experimentó sólo dos exacerbaciones de su enfermedad y fue internado una vez. Durante el año 2000 consultó en dos oportunidades y no se detectaron exacerbaciones. En el 2001 se comprobaron cuatro exacerbaciones, dos de las cuales requirieron internación.

## Paciente 2

Sexo femenino. Edad 9 años. P/T: 110% en el año 2000. La relación P/T se ha mantenido en esa cifra.

Espirometrías: VEF<sub>1</sub> (PDT): 89% (año 2000), VEF<sub>1</sub> (PDT): 69% (año 2001).

Radiología: Puntaje de Brassfield 23 (año 2000), puntaje de Brassfield: 16 (año 2001).

Cultivos de esputo: Durante el año 2000 se realizó LBA que fue negativo para bacterias. Fue positivo para *Pneumocystis carinii* (tinción por anticuerpos monoclonales). Durante el año 2001 se encontró *Staphylococcus aureus* MS. Un segundo LBA detectó *Chlamydia* (genérico) por tinción con anticuerpos monoclonales. En mayo de 2001 se detectó *Burkholderia cepacia* (*B. stabilis*). Después del tratamiento, no se detectó *B. cepacia* a partir de agosto del mismo año, ni en las sucesivas muestras.

Sensibilidad de *B. cepacia*: sensible a: cfp, mer, taz, azt, imipenem, caz. Resistente: akn, poli.

Tratamiento: ceftazidima-amikacina 15 días. Ya estaba terminando el tratamiento cuando se confirmó la *B. cepacia*.

Evolución: Durante el año 2000 experimentó gran cantidad de exacerbaciones pulmonares de su enfermedad (n= 9) y fue internada 4 veces. Durante el año 2001 la evolución clínica fue similar.

## CONCLUSIONES

Se detectaron dos enfermos con *B. cepacia* en su esputo, sobre 50 estudiados que constituyen el universo de pacientes fibroquísticos de nuestro centro. Esto determina una prevalencia de 4%, lo cual coincide con los hallazgos en otros lugares.<sup>4</sup>

## DISCUSIÓN

La *Burkholderia cepacia* es un germen gramnegativo, no fermentador, cuya búsqueda en los enfermos fibroquísticos es imprescindible por las consecuencias clínicas, terapéuticas y epidemiológicas que genera.

Se han descrito tres formas clínicas en los enfermos colonizados por *B. cepacia* que se resumen del siguiente modo: a) muchos pacientes se mantienen estables a pesar de la colonización, b) 20% fallece por neumonía necrotizante rápidamente progresiva y c) otros presentan el "síndrome de la *cepacia*", que consiste en una severa falla respiratoria con bacteriemia.<sup>5,12</sup>

Creemos que el descenso del VEF<sub>1</sub> en nuestros enfermos se relacionó con la colonización por *B. cepacia*, ya que anteriormente este valor se había mantenido mucho más estable, aunque, al ser la fibrosis quística una enfermedad determinada por

numerosas variables, esto es imposible de afirmar con total seguridad.

Es fundamental, también, proceder a la clasificación genética en genomovares, ya que ésta tiene incidencia directa en la comprensión de la evolución clínica de los enfermos, su pronóstico, tratamiento y directivas de aislamiento epidemiológico. Esta clasificación genética también tiene importancia para las indicaciones o contraindicaciones de trasplante pulmonar.

Se sugiere rechazar como candidatos a los pacientes con el Grupo III dado que presentan una incidencia de septicemia, insuficiencia respiratoria progresiva (síndrome de la *cepacia*) y mortalidad postrasplante del 50%.<sup>5,13-15</sup>

El progresivo desarrollo de centros de estudio y tratamiento de la fibrosis quística en nuestro país conlleva la responsabilidad simultánea de la complejidad de los tratamientos, el desarrollo de técnicas de laboratorio y un control epidemiológico responsable. El ingreso de centros como el nuestro a planes de trasplante pulmonar o cardiopulmonar hace aún más necesario determinar el perfil bacteriológico de los enfermos en lista de espera, para permitir a los centros de trasplante tomar la decisión correcta,<sup>13,14,16</sup> junto con el centro de diagnóstico y tratamiento de la fibrosis quística. La multiresistencia de la *Bc*, en especial a los aminoglucósidos, crea problemas especiales para su control,<sup>17-19</sup> si se tiene en cuenta el deterioro acelerado que presentan en su cuadro algunos grupos de enfermos afectados por este patógeno.<sup>3,5</sup>

La ubicación de la *Burkholderia cepacia* en la naturaleza hace prever que se encontrará en otros centros de tratamiento si se la busca cuidadosamente.

La creación del medio especial ASBC no es compleja y debería ser rutinaria su aplicación en todos los centros de seguimiento de la enfermedad fibroquística. La *Burkholderia cepacia* a menudo se clasifica erróneamente.<sup>10,20</sup> A partir del hallazgo de este germen hemos debido separar los días de control de los enfermos afectados, aislándolos del resto, que ya habíamos agrupado en diferentes días de consultorio externo, según tuvieran o no *Pseudomonas aeruginosa*, como se realiza en otros hospitales. También ha sido necesario modificar la asigna-

ción de camas en la internación para mantenerlos separados, ya que se ha comprobado la transmisión de paciente a paciente.<sup>15,21,22</sup> Para la deambulaci3n por el hospital, se requiere mascarilla y haberse lavado las manos antes de salir de la sala.<sup>23</sup> Las diferentes cepas de *Burkholderia cepacia* identificadas sugieren que estos enfermos no se contagiaron entre s3.

## BIBLIOGRAFÍA

- Blessing J, Walker J, et al. *P. Aeruginosa* and *maltophilia* in the C. fibrosis patient. Am Rev Respir Dis 1979; 119(Suppl):262. [abstract]
- Laraya-Cuasay LR, Lipstein M, Huang NN. *P. cepacia* in the respiratory flora of patients with c. fibrosis. Pediatr Pulmonol 1977; 11:502. [abstract]
- Speert David P. Understanding B. Cepacia: Epidemiology, genomovars, and virulence. Infect Med 2001; 18:49-56.
- Cystic Fibrosis Foundation. National Cystic Fibrosis Patient Registry, published data. Respiratory culture results (1996).
- Lipuma JJ. *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights. Clin Chest Med 1998; 19(3):473-486.
- Govan JRW, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in c. fibrosis. Lancet 1993; 342:15.
- Isles A, et al. *P. cepacia* infection in cystic fibrosis. An emerging problem. J Pediatr 1984; 104:206.
- Tablan OC, Martone WJ, et al. Colonization of the respiratory tract with *P. cepacia* in c. fibrosis. Risk factors and outcomes. Chest 1987; 91:527.
- Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoïd *P. aeruginosa* and *B. cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60:539.
- Henry DA, Campbell ME, Lipuma J et al. identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. J Clin Microbiol 1997; 35:614.
- Henry D, Campbell M, McGimpsey C, et al. Comparison of isolation media for recovery of *B. cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 1004.
- Muhdi K, Edenborough FP, et al. Outcome for patients colonised with *B. cepacia* in a Birmingham adult cystic fibrosis clinic and the end of an epidemic. Thorax 1996; 51:374.
- Aris RM, Gilligan PH, Neuringer IP, et al. The effect of panresistant bacteria in cystic fibrosis patients on lung transplant outcome. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:1699.
- Steinbach S, Sun L et al. Transmissibility of *P. cepacia* infection in clinic patients and lung transplant recipients with c. fibrosis. N Engl J Med 1994; 331:981.
- Mallory George Jr. Children's Hospital. Houston. Texas. U.S.A. [Comunicaci3n personal]
- Snell GI, de Hoyos A, et al. *P. cepacia* in lung transplant recipients with cystic fibrosis. Chest 1993; 103:466.
- Burns JL, Lien DM, et al. Isolation and characterization of dihydrofolate reductase from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant *P. cepacia*. Antimicrob Agent Chemother 1989; 33: 1247.
- Burns JL, Wasdworth CD, et al. Nucleotide sequence analysis of a gene from *B. cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. Antimicrob Agent Chemother 1996; 40:307.
- Chiesa C, Labrozzi PH, et al. Decreased baseline B-lactamase production and inducibility associated with increased piperacilin susceptibility of *P. cepacia* isolated from children with c. fibrosis. Pediatr Res 1986; 20:1174.
- Burdge DR, Noble MA, Campbell ME, et al. *Xantomonas maltophilia* misidentified as *P. cepacia* in cultures of sputum from patients with c. fibrosis. A diagnostic pitfall with major clinical implications. Clin Infect Dis 1995; 20:445.
- Lipuma JJ, Dasen SE, et al. Person-to-person transmission of *P. cepacia* between patients with c. fibrosis. Lancet 1990; 336:1094.
- Pegues DA, Schidlow DV, et al. Possible nosocomial transmission of *P. cepacia* in patients with cystic fibrosis. Arch Pediatr Adolesc Med 1994; 149:805.
- Doring G, Jansen S, et al: Distribution and transmission of *P. aeruginosa* and *B. cepacia* in a Hospital ward. Pediatr Pumonol 1996; 21:90.