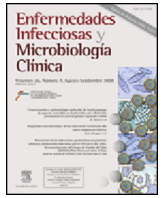




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Prevalencia de especies del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística en Argentina durante el período 2011-2015



Lucía Cipolla^{a,*}, Florencia Rocca^a, Claudia Martínez^a, Lorena Aguerre^a, Rubén Barrios^b y Mónica Prieto^a

^a Servicio Bacteriología Especial, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Servicio Bacteriología, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 26 de junio de 2017

Aceptado el 5 de septiembre de 2017

On-line el 18 de octubre de 2017

Palabras clave:

Complejo *Burkholderia cepacia*

Fibrosis quística

recA

R E S U M E N

Introducción: En la actualidad el complejo *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) está compuesto por 20 especies filogenéticamente muy relacionadas. Algunas especies han emergido como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos y son responsables de brotes intrahospitalarios. El complejo *B. cepacia* es un reconocido patógeno respiratorio en pacientes con fibrosis quística. *B. cenocepacia* y *Burkholderia multivorans* (*B. multivorans*) son las especies prevalentes en el mundo, según la literatura. Sin embargo, grupos de investigación en Argentina han descrito una epidemiología local particular, con prevalencia de la especie *Burkholderia contaminans* (*B. contaminans*).

Métodos: Se estudiaron 68 aislamientos del complejo *B. cepacia* aislados de 46 pacientes con fibrosis quística de 14 hospitales distribuidos en 9 provincias del país. La identificación se llevó a cabo por métodos fenotípicos convencionales y fue confirmada por secuenciación parcial del gen *recA*. Los alineamientos de las secuencias se realizaron mediante el programa BLAST y fueron comparadas con las secuencias de las cepas tipo de cada una de las especies del complejo *B. cepacia*. Se determinó el perfil de sensibilidad a 4 agentes antimicrobianos para los aislamientos de las especies más prevalentes, según lo recomendado por la norma CLSI M45.

Resultados: La especie prevalente resultó *B. contaminans* (49%, n = 33) seguida por *B. cenocepacia* (25%; n = 17). El resto de las especies identificadas fueron: *Burkholderia seminalis* (*B. seminalis*) (7%; n = 5), *B. cepacia* (7%; n = 5), *B. multivorans* (6%; n = 4), *Burkholderia vietnamsis* (5%, n = 3) y *Burkholderia pyrrocinia* (1%; n = 1).

El 46% de los aislamientos de *B. contaminans* fueron resistentes a SXT y el 76% sensible a MIN, MEM y CAZ. Los aislamientos de *B. cenocepacia* fueron 100% resistentes a SXT y MIN, y el 47% a CAZ y MEM. En *B. seminalis* se observa un alto nivel de resistencia a TMS (80%), CAZ (60%) y MIN (60%), y un 60% de los aislamientos mostraron sensibilidad intermedia a MEM.

Conclusión: Los únicos países que han documentado la prevalencia de *B. contaminans* en infecciones respiratorias de pacientes fibroquísticos por complejo *B. cepacia* son Argentina, España y Portugal, y recientemente se reportó un caso de 2 pacientes con fibrosis quística en Irlanda. Debido a la alta frecuencia con que *B. contaminans* es aislada en nuestro país, es necesario promover la investigación de las posibles fuentes de infección y comprender los factores y mecanismos implicados en la aparente mayor transmisibilidad de esta especie. Se observaron distintos patrones de sensibilidad entre las especies estudiadas.

© 2017 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lcipolla@anlis.gov.ar (L. Cipolla).

Prevalence of *Burkholderia cepacia* complex species in cystic fibrosis patients in Argentina during the period 2011–2015

A B S T R A C T

Keywords:
Burkholderia cepacia complex
 Cystic fibrosis
recA

Introduction: *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) complex is composed of 20 phylogenetically closely related bacterial species. Some species have emerged as opportunistic pathogens in immunocompromised patients and are responsible for nosocomial outbreaks. The *B. cepacia* complex is a recognized respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans* (*B. multivorans*) are the most prevalent species in the world, according to the literature. However, research groups in Argentina have described a particular local epidemiology, with prevalence of *Burkholderia contaminans* (*B. contaminans*).

Methods: A total of 68 isolates of *B. cepacia* complex recovered of 46 cystic fibrosis patients attended at 14 hospitals distributed in 9 provinces of the country were studied. Identification was carried out by conventional phenotypic methods and was confirmed by *recA* gene sequencing. Sequences were analysed using the BLASTN program and comparing with *B. cepacia* complex type strains sequences deposited in GenBank. Antibiotic susceptibility tests were performed on isolates of the most prevalent species according to CLSI M45 guidelines.

Results: The prevalent specie was *B. contaminans* (49%, n = 33) followed by *B. cenocepacia* (25%; n = 17). The remaining species were *Burkholderia seminalis* (*B. seminalis*) (7%, n = 5), *B. cepacia* (7%, n = 5), *B. multivorans* (6%, n = 4), *Burkholderia vietnamensis* (5%, n=3) and *Burkholderia pyrrocinia* (1%; n = 1).

The 46% of *B. contaminans* isolates were resistant to SXT and 76% sensitive to MIN, MEM and CAZ. The isolates of *B. cenocepacia* were 100% resistant to SXT and MIN and 47% to CAZ and MEM. *B. seminalis* showed high levels of resistance to TMS (80%), CAZ (60%) and MIN (60%), and 60% of the isolates showed intermediate sensitivity to MEM.

Conclusion: Previous reports have described the prevalence of *B. contaminans* isolation from cystic fibrosis patients in Argentina, Spain and Portugal, and a case of two patients with cystic fibrosis in Ireland has recently been reported. Due to the high frequency with which *B. contaminans* is isolated in our country, it is necessary to promote the investigation of possible sources of infection and to understand the factors and mechanisms involved in the apparent greater transmissibility of this species. Different antimicrobial resistance profiles were detected between the species.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Las bacterias que conforman el complejo *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) son patógenos oportunistas capaces de causar enfermedades en plantas, humanos y animales¹. En humanos pueden establecer infecciones crónicas y frecuentemente severas, a las cuales resultan particularmente sensibles los pacientes con fibrosis quística, enfermedad granulomatosa crónica e inmunocomprometidos². En el mundo, dentro del complejo *B. cepacia*, las especies *Burkholderia multivorans* (*B. multivorans*) y *Burkholderia cenocepacia* (*B. cenocepacia*) son las más frecuentemente halladas en estos pacientes, aunque la prevalencia descrita para cada especie varía dependiendo del país y el centro de salud bajo estudio^{3,4}.

En Argentina, los primeros aislamientos del complejo *B. cepacia* recuperados de pacientes fibroquísticos fueron documentados en la década del 90. En ese momento, en forma esporádica y con una prevalencia muy baja (< 0,1%), se detectaban microorganismos gramnegativos a los que solo podía asignarse el género *Burkholderia* spp. La detección de estos microorganismos comenzó a aumentar durante los últimos 15 años con valores del 0,2 hasta el 3,6%. A principios de 2004, comenzaron a describirse brotes por complejo *B. cepacia* en centros de atención hospitalaria y se observó un aumento de la proporción de pacientes fibroquísticos (19–36%), de los cuales se recuperaban aislamientos pertenecientes al complejo *B. cepacia*. En la actualidad, con la aplicación de estrictos procedimientos de control para prevenir las infecciones, la incidencia de *Burkholderia* spp. en estos pacientes se redujo aproximadamente a un 10%⁴.

Dentro del complejo *B. cepacia*, *B. cenocepacia* es considerado el patógeno más severo, altamente virulento y transmisible y junto

a *B. multivorans* representan la mayoría (80%) de las infecciones en pacientes con fibrosis quística alrededor del mundo, aunque su prevalencia varía de acuerdo al país en estudio⁴. La especie *Burkholderia contaminans* (*B. contaminans*), formalmente descrita en 2009⁵, tiene una baja prevalencia en pacientes con fibrosis quística alrededor del mundo, con marcadas excepciones en Argentina^{4,6,7}, España^{8,9} y Portugal¹⁰, y recientemente fue reportado un caso en Irlanda¹¹. La frecuencia con que *B. contaminans* es aislada en Argentina y España podría ser el resultado de la transmisión paciente a paciente, así como también a la exposición a fuentes de infección como el medio ambiente y productos farmacéuticos¹².

Dado que las especies del complejo *B. cepacia* son intrínsecamente resistentes a la mayoría de los antimicrobianos disponibles clínicamente, como aminoglucósidos, quinolonas, polimixinas y β-lactámicos, este tipo de infecciones resultan extremadamente dificultosas de tratar¹³.

El objetivo del estudio es identificar las especies del complejo *B. cepacia* aisladas de muestras respiratorias de pacientes fibroquísticos recibidos en el laboratorio de referencia durante el período 2011–2015 y conocer el patrón de sensibilidad a los antimicrobianos de las especies prevalentes.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos

Un total de 68 aislamientos identificados presuntivamente como complejo *B. cepacia* fueron derivados al Laboratorio Nacional de Referencia Servicio Bacteriología Especial, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán durante el período 2011–2015. Los mismos provenían de 14 hospitales

Tabla 1
Resultados de sensibilidad obtenidos de los 55 aislamientos estudiados

Agente antimicrobiano	SXT			CAZ			MIN			MEM		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
<i>B. contaminans</i> (N = 33)	36	18	46	76	6	18	76	0	24	76	0	24
<i>B. cenocepacia</i> (N = 17)	0	0	100	53	0	47	0	0	100	47	6	47
<i>B. seminalis</i> (N = 5)	20	0	80	40	0	60	20	20	60	40	60	0

CAZ: ceftazidima; I: intermedio; MEM: meropenem; MIN: minociclina; N: número de aislamientos; R: resistente; S: sensible; SXT: trimetoprima-sulfametoxazol.

distribuidos entre 9 provincias del país. Los aislamientos fueron conservados como parte de la Colección de Cultivos del Servicio Bacteriología Especial, perteneciente a la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC).

Identificación fenotípica

Los aislamientos fueron recuperados de muestras de esputo de 47 pacientes fibroquísticos tomadas durante los episodios de exacerbación respiratoria o de deterioro clínico. Hubo 13 pacientes de los cuales fueron remitidos más de un aislamiento a lo largo del período estudiado 2011–2015. De estos pacientes, 7 tuvieron infección crónica, es decir, con cultivos positivos durante más de un año con la misma especie del complejo *B. cepacia*.

La caracterización bioquímica de los aislamientos se realizó según descrito por Henry et al.¹⁴, junto al uso de galerías miniaturizadas API® 20NE (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) según las instrucciones del fabricante.

Identificación genotípica

Se utilizó el método de extracción de ADN por lisis alcalina según descrito por Storms et al.¹⁵. La amplificación del gen *recA* fue realizada según el protocolo descrito por Mahenthiralingam et al.¹⁶. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Bioneer Corporation, Corea), según las recomendaciones del fabricante. Los productos purificados fueron utilizados inmediatamente o almacenados a –20 °C hasta su uso. Para la secuenciación de los amplicones se utilizó el cebador BCR3¹⁶ y se empleó el método de secuenciación cíclica con el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EE. UU.) y el secuenciador ABI PRISM® 3.0 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EE. UU.). Las secuencias fueron realizadas en el Servicio de Neurovirología, Departamento de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán.

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas y corregidas con el programa Chromas 2.4.3 (Technelysium Pty. Ltd., Helensvale, Australia) y comparadas con las secuencias disponibles en GenBank. El criterio de aceptación para la asignación de especie fue > 99% respecto de las secuencias de las cepas tipo depositadas en la base de datos del NCBI descritas por Kong et al.¹⁷.

Susceptibilidad antibiótica

A las especies más frecuentemente identificadas, *B. contaminans*, *B. cenocepacia* y *Burkholderia seminalis* (*B. seminalis*), se les ensayó la sensibilidad por el método de difusión por disco a los siguientes antibióticos: ceftazidima (CAZ), minociclina (MIN), meropenem (MEM) y trimetoprima-sulfametoxazol (SXT). Los aislamientos fueron clasificados como susceptibles, intermedios o resistentes, según los criterios de interpretación indicados por la norma CLSI M45¹⁸.

Resultados

Todos los aislamientos fueron indistinguibles bioquímicamente. Los resultados obtenidos por secuenciación parcial del gen *recA* y por comparación con la base de datos en línea, la especie prevalente resultó *B. contaminans* (49%, n = 33) seguida por *B. cenocepacia* (25%; n = 17). El resto de las especies identificadas se distribuyeron homogéneamente: *B. seminalis* (7%; n = 5), *B. cepacia* (7%; n = 5), *B. multivorans* (6%; n = 4), *Burkholderia vietnamensis* (5%, n=3) y *Burkholderia pyrrocinia* (1%; n=1). Todos los aislamientos identificados por el método molecular como *B. contaminans* exhibieron pigmento verdoso y hemólisis positiva.

Las especies asociadas a los 7 pacientes fibroquísticos con infección crónica fueron *B. cenocepacia* (un paciente), *B. multivorans* (2 pacientes), *B. contaminans* (3 pacientes) y *B. seminalis* (un paciente).

Respecto a la sensibilidad, el 46% (n = 15) de los aislamientos de *B. contaminans* fueron resistentes a SXT y en su mayoría sensibles (76%; n=25) a MIN, MEM y CAZ. La resistencia a SXT y MIN de *B. cenocepacia* se observó en todos los aislamientos, mientras que el 47% (n = 8) fueron resistentes a CAZ y MEM. *B. seminalis* mostró un alto nivel de resistencia a TMS (80%; n = 4), CAZ (60%; n = 3) y MIN (60%; n = 3), y un 60% (n = 3) de los aislamientos mostraron sensibilidad intermedia a MEM. Todos los resultados se detallan en la tabla 1.

Discusión

El aislamiento y la identificación apropiada de los patógenos involucrados en pacientes con fibrosis quística resultan un paso crítico para el control de la enfermedad y tienen un impacto significativo en el tratamiento antimicrobiano, el cuidado del paciente, la prevención de nuevas infecciones y el control de las unidades de cuidado, así como en la mejora de su calidad de vida.

La gravedad de la enfermedad por infección con complejo *B. cepacia* en pacientes con fibrosis quística es sustancialmente más alta que con otras bacterias y es dramática la heterogeneidad en el pronóstico de estos pacientes, ya que mientras algunos tienen una declinación fulminante de la función pulmonar, otros portadores de CBC no tienen efectos adversos obvios por largos períodos.

Dado que *B. cenocepacia* y *B. multivorans* son las especies prevalentes en el mundo, la mayoría de los estudios dedicados a la patogenia del complejo *B. cepacia* están enfocados en estas 2 especies, por lo que falta información respecto del impacto de las otras especies. Cabe destacar que la literatura¹⁹ demuestra que todas las especies del complejo *B. cepacia* producen un empeoramiento clínico, que incluye desde infecciones crónicas o transitorias hasta el síndrome cepacia.

A diferencia de lo descrito en otros países, en particular en Argentina, España y Portugal, *B. contaminans* presenta una mayor prevalencia en pacientes fibroquísticos. Recientemente fue descrito un caso en Irlanda que involucró a 2 hermanos con esta enfermedad. Si bien las infecciones por *B. contaminans* en los pacientes con fibrosis quística son usualmente de naturaleza transitoria y, por lo tanto, causan la colonización del tracto respiratorio más que infección verdadera, Nunvar et al.²⁰ documentaron un

caso de un paciente cuyo deceso fue asociado a septicemia por *B. contaminans*.

Debido a la alta frecuencia con que *B. contaminans* es aislada en Argentina, es necesario promover la investigación de las posibles fuentes de infección y sobre todo comprender los factores y los mecanismos implicados en la aparente mayor transmisibilidad de esta especie o distribución medioambiental.

La secuenciación del gen *recA* continua siendo el método patrón de oro para la identificación a nivel de especie dentro del complejo *B. cepacia*. Es importante la utilización de secuencias de cepas tipo o cepas de referencia bien caracterizadas para determinar los porcentajes de similitud. No obstante, con la descripción de nuevas especies probablemente sea necesaria la incorporación de nuevos genes o técnicas que permitan la diferenciación entre ellas.

Los resultados de la sensibilidad antibiótica de *B. cenocepacia* y *B. seminalis* mostraron resistencia a más de 2 antibióticos, confirmando el rasgo de multirresistencia que caracteriza al complejo *B. cepacia*. *B. contaminans*, la especie prevalente en la población fibroquística en Argentina, mostró un patrón que aún conserva altos niveles de sensibilidad a CAZ, micociolina y MEM. No se observaron cambios en los patrones de sensibilidad en los aislamientos de los pacientes con infección crónica documentada a lo largo del tiempo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de Laboratorios Britania S.A. Argentina, por la provisión de discos para los estudios de sensibilidad a los antimicrobianos.

Bibliografía

- Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 2003;5:719–29.
- Coenye T, Lipuma JJ. Molecular epidemiology of *Burkholderia* species. *Front Biosci.* 2003;8:55–67.
- Coutinho CP, Barreto C, Pereira L, Lito L, Melo Cristino J, Sá-Correia I. Incidence of *Burkholderia contaminans* at a cystic fibrosis center with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. *J Med Microbiol.* 2015;64:927–35.
- Martina P, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, et al. Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. *J Clin Microbiol.* 2013;51:339–44.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, de Brandt E, LiPuma JJ, et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:102–11.
- Jordá-Vargas L, Galanternik L, Centrón D. Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1151–2.
- Bloodworth RA, Selin C, Lopez de Volder MA, Drevinek P, Galanternik L, Degrossi J, et al. Draft genome sequences of *Burkholderia contaminans*, a *Burkholderia cepacia* complex species that is increasingly recovered from cystic fibrosis patients. *Genome Announc.* 2015;3 [artículo 4].
- Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, Saéz-Nieto JA. Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:150–6.
- Barrado L, Martínez MT, Jennifer Villa J, Orellana MA, Viedma E, Chavesa F. Clonal diversity among *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic fibrosis patients in a reference unit. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:665–8.
- Cunha MV, Leitão JH, Mahenthalingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, et al. Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: A 7-year study. *Int J Clin Microbiol.* 2003;41:4113–20.
- Power R, Linnane B, Martin R, Power N, Harnett P, Casserly B, et al. The first reported case of *Burkholderia contaminans* in patients with cystic fibrosis in Ireland: From the Sargasso Sea to Irish children. *BMC Pulm Med.* 2016;16:57.
- Haim MS, Mollerach M, van Domselaar G, Teves SA, Degrossi J, Cardona ST. Draft genome sequences of *Burkholderia contaminans* FFI-28, a strain isolated from a contaminated pharmaceutical solution. *Genome Announc.* 2016;4 [artículo 5].
- Speert D. Medscape. Understanding *Burkholderia cepacia*: Epidemiology, genomics and virulence. *Infect Med.* 2001;18:49–56.
- Henry DA, Mahenthalingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1073–8.
- Storms V, van den Vreken N, Coenye T, Mahenthalingam E, LiPuma JJ, Gillis M, et al. Polyphasic characterisation of *Burkholderia cepacia*-like isolates leading to the emended description of *Burkholderia pyrrocinia*. *Syst Appl Microbiol.* 2004;27:517–26.
- Mahenthalingam 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.
- Kong Q, Xiao M, Kong F, Yuen M, Brown M, Ng J, et al. Assignment of *recA* reference sequence types for enhanced identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Pathol.* 2012;44:373–5.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria M45-A2, 30, 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- 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;1 [art. 12].
- Nunvar J, Kalferstova L, Bloodworth RAM, Kolar M, Degrossi J, Lubovich S, et al. Understanding the pathogenicity of *Burkholderia contaminans*, an emerging pathogen in cystic fibrosis. *PLoS ONE.* 2016;11.