

MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS DE PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

Bioq. A. Isasmendi¹, Técs. Lab. J. L. Pinheiro¹, B. Campos², G. Pérez¹, Bioq. C. Hernández¹

RESUMEN

La fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la infancia. Se caracteriza por presentar una evolución crónica, progresiva y compromiso multisistémico. El objetivo de este trabajo fue conocer la frecuencia de los microorganismos implicados en las infecciones respiratorias de pacientes fibroquísticos atendidos en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan durante el año 2012 y su resistencia a los antimicrobianos. Para la identificación bacteriana se utilizaron pruebas bioquímicas convencionales, sistemas automatizados y semiautomatizados. En la identificación de miembros del complejo *Burkholderia cepacia* se utilizaron además métodos moleculares. De esta manera se pudo lograr la clasificación genética de las especies incluidas dentro de ese complejo presentes en los pacientes fibroquísticos de nuestro medio. Este trabajo nos permitió conocer la situación microbiológica actual de las infecciones respiratorias en los pacientes fibroquísticos. Tanto el estudio minucioso de los cultivos convencionales como la caracterización molecular de las especies de *B. cepacia* deben seguirse en los pacientes colonizados por microorganismos multirresistentes y son imprescindibles en el control postratamiento después del aislamiento de estos patógenos.

Palabras clave: Fibrosis quística, bacterias, *Burkholderia cepacia*, resistencia.

Medicina Infantil 2014; XXI: 85-89.

ABSTRACT

Cystic fibrosis is the most common lethal autosomal recessive disease in childhood. It is characterized by a chronic, progressive evolution and multisystemic involvement. The aim of this study was to assess the incidence of the microorganisms involved in respiratory infections of patients with cystic fibrosis seen at the Pediatric Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan in 2012 and their resistance to antimicrobial agents. To identify the microorganisms conventional biochemical tests with automatized and semiautomatized systems were used. For the identification of members of the Burkholderia cepacia complex molecular studies were additionally used. Species of this complex found in cystic fibrosis patients in our setting were genetically classified allowing for the definition of the current microbiological situation of respiratory infections in cystic fibrosis patients. Careful study of conventional cultures as well as molecular typing of the B. cepacia species should be routinely performed in patients colonized by multiresistant microorganisms and is fundamental in the post-treatment monitoring after the isolation of these pathogens.

Key words: Cystic fibrosis, bacteria, *Burkholderia cepacia*, resistance.

Medicina Infantil 2014; XXI: 85-89.

INTRODUCCION

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la infancia, de evolución crónica, progresiva y compromiso multisistémico. Presenta grandes variaciones fenotípi-

1 Servicio de Microbiología.

2 Laboratorio Central.

Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

Correspondencia: Adela Isasmendi - adela_isasmendi@hotmail.com

Pichincha 1850 - CABA (1245) - Argentina

cas según los diversos grupos étnicos estudiados. La incidencia de FQ en el hemisferio norte es de alrededor de 1/2.000-1/2.500 nacidos vivos¹. La FQ se produce como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica el regulador de la conductancia transmembrana situado en el brazo largo del cromosoma 7. Este regulador actúa como canal de cloro y se encuentra en todos los tejidos exocrinos. El defecto en el transporte del ion cloro causa que estos pacientes tengan un sudor característicamente salado y conduce a una deshidratación de las secreciones del tracto respiratorio, pancreáticas, hepáticas, intestinales y genitourinarias aumentando su viscosidad. Las principales manifestaciones clínicas se producen a nivel respiratorio, gastrointestinal y genitourinario^{2,3,4}.

La infección pulmonar en el paciente fibroquístico con frecuencia es crónica, difícil de tratar con antimicrobianos debido a la multiresistencia y se asocia en algunos pacientes con complicaciones y mortalidad. Como consecuencia del tratamiento antimicrobiano repetido en los pacientes y del deterioro de la función pulmonar, se favorece el desplazamiento de los patógenos habituales⁵.

Es frecuente que el proceso de infección-colonización en el paciente con FQ sea polimicrobiano. Sin embargo, la infección pulmonar crónica se asocia con un número limitado de microorganismos: *S. aureus* y *P. aeruginosa* son los más frecuentes. El primero de ellos se aísla principalmente en los pacientes de menor edad mientras que el segundo, en su morfotipo mucoso, en el 80% de los adultos y se asocia, en la mayoría de los casos, con una colonización-infección crónica⁶.

S. aureus es el microorganismo colonizador inicial. La tercera parte de los pacientes está infectada al realizarse el diagnóstico de la enfermedad y la infección puede persistir por largos períodos^{7,8}. Estos pacientes habitualmente se colonizan con cepas de *S. aureus* provenientes de la comunidad y generalmente no son tratados con antibióticos, salvo que estén sintomáticos, con la función pulmonar deteriorada o que concomitantemente se aislen otros patógenos, como *P. aeruginosa*. Este es el patógeno predominante al finalizar la primera década de la vida aunque puede evidenciarse infección por este microorganismo ya en niños menores de 5 años de edad⁹. La infección y colonización por *P. aeruginosa* constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes fibroquísticos. Estas infecciones traen como consecuencia: lesiones broncopulmonares, alteraciones respiratorias, daño respiratorio irreversible y muerte del paciente¹⁰. La virulencia de esta bacteria se debe a diversos atributos patogénicos como la resistencia a los antibióticos, la habilidad para formar *biofilms*, la producción de una gran variedad de toxinas y la capacidad de adquirir fenotipos mucoides. Todo esto

contribuye a la resistencia de este microorganismo a su erradicación¹¹. Debido a que las infecciones por *P. aeruginosa* son difíciles de tratar por la elevada resistencia de esta bacteria a los fármacos, frecuentemente se producen fracasos de tratamiento que pueden comprometer la vida del paciente.

Los microorganismos del complejo *B.cepacia* (BCC) en los últimos años, han cobrado importancia como agentes etiológicos de las infecciones pulmonares. Desde hace algunos años se han comenzado a buscar en los pacientes con FQ debido a su alto nivel de resistencia antibiótica intrínseca, su propensión a la transmisión de paciente a paciente y a su capacidad de causar inflamación profunda y enfermedad invasora fatal.

La infección por BCC puede resultar en portación asintomática o declinación progresiva de la función pulmonar o en el "síndrome cepacia", que ocurre en el 20% de los infectados y que se caracteriza por bacteriemia y sepsis. El pronóstico de la enfermedad pulmonar, ocasionada por el BCC en pacientes con FQ, es variable y depende de algunos factores tales como: la especie de la cepa infectante, la capacidad patogénica de una misma especie y la transmisibilidad de la cepa^{12,13}. Por esto es importante la identificación correcta y rápida de la bacteria para evaluar el riesgo, el pronóstico y la epidemiología de las infecciones por bacterias del BCC en pacientes con FQ¹⁴. Es fundamental, también, proceder a la clasificación genética, ya que ésta tiene incidencia directa en la comprensión de la evolución clínica de los enfermos, su pronóstico, tratamiento y directivas de aislamiento epidemiológico¹⁵. Esta clasificación genética también tiene importancia para la inserción del paciente en el programa de trasplante pulmonar.

De forma ocasional se pueden hallar enterobacterias en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ, aunque raramente generan una infección crónica¹⁶. Esta situación se produce como consecuencia de tratamientos prolongados con colistina en aerosol, que seleccionan ciertas especies de enterobacterias: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens*, con resistencia natural a este antimicrobiano.

El aumento tan importante de la supervivencia de los pacientes con FQ en los últimos años se debe en gran parte a la disponibilidad de nuevos tratamientos de la enfermedad pulmonar y en especial de las infecciones respiratorias.

En nuestro país, se estima que la incidencia es de 1/6.000 nacidos vivos, aunque este dato es sólo una aproximación y probablemente no represente la realidad epidemiológica. Existen al menos 151 pacientes con FQ registrados que se siguen a través del servicio de Neumonología de este hospital, de los cuales 69 (45,7%) son mayores de 10 años.

El objetivo del presente trabajo fue conocer la

frecuencia de los microorganismos implicados en las infecciones respiratorias de pacientes fibroquísticos en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan durante el año 2012 y su resistencia a los antimicrobianos.

MATERIALES Y METODOS

Población

Se realizó un estudio sobre muestras de secreciones respiratorias de todos los pacientes con diagnóstico de FQ que fueron atendidos en el hospital de Pediatría Juan P. Garrahan en el período comprendido entre el 01/01/2012 y el 31/12/2012 (N=125; 71 varones y 54 mujeres). La mediana de la edad fue de 11 años y el rango fue de 1-20 años.

Procesamiento de las muestras

Se realizó la tinción de Gram para valorar el esputo para el cultivo. El cultivo habitualmente se realiza con los esputos que presentan más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo de 100 aumentos. Sin embargo, en los pacientes con FQ no se consideró este criterio, puesto que puede no ser suficientemente ilustrativo de la calidad de la muestra. El hecho es que se pueden formar acúmulos de células inflamatorias en las secreciones, que no siempre se distribuyen de forma homogénea. Se estima que con los criterios habituales de valoración de la tinción de Gram hasta el 40% de las muestras de esputo de los pacientes con FQ se podrían interpretar como inadecuadas para el cultivo y sin embargo ofrecen resultados valorables¹⁷. Por lo tanto, y de acuerdo a nuestra norma de trabajo habitual para este tipo de pacientes, se cultivaron todas las muestras enviadas. Las mismas se sembraron en agar sangre, agar chocolate, agar manitol salado, agar BCSA (*Burkholderia cepacia* Selective Agar), agar CLDE (cistina-lactosa deficiente en electrolitos) y caldo cerebro-corazón e incubadas a 37 °C por un período de 24 a 72 hs. A las 24 hs de incubación el caldo cerebro-corazón fue subcultivado en agar cetrinida con el objeto de aumentar la recuperación de cepas de *P. aeruginosa*.

Las colonias desarrolladas fueron seleccionadas según aspecto, consistencia, tamaño, forma y producción de pigmento. Ante la sospecha de *P. aeruginosa* se tomaron varias colonias para su identificación y se evaluaron las cepas mucosas y las cepas no mucosas.

Para la identificación bacteriana se utilizaron pruebas bioquímicas convencionales, sistemas automatizados (Vitek 2C, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y semiautomatizados (API 20 NE, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

En la identificación de miembros del complejo *B. cepacia* se utilizaron además métodos moleculares: se realizó la amplificación del gen *recA* por PCR según lo descrito por Mahenthalingam y col¹⁸.

Posteriormente se realizó la clasificación genética mediante secuenciación de esa porción del ADN.

Los microorganismos se conservaron a -80°C en leche descremada al 5% para lograr contar con su viabilidad en forma indefinida.

Sensibilidad a los antimicrobianos

Las pruebas de sensibilidad a los distintos antimicrobianos se realizaron por el método de difusión con discos (Oxoid, UK), según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁹.

Para determinar la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* se utilizó el disco de cefoxitina de 30 µg¹⁹.

Se evaluó la sensibilidad de *P. aeruginosa* a ciprofloxacina y gentamicina para conocer el patrón de sensibilidad dado que son antibióticos habitualmente utilizados en el tratamiento de las infecciones respiratorias.

También fue realizada la sensibilidad a la colistina por difusión con discos de 10 µg en agar Mueller-Hinton, según el método de Kirby-Bauer, utilizando los puntos de corte para *P. aeruginosa*, según el CLSI¹⁹.

Finalmente, se estudió la sensibilidad antibiótica de miembros del complejo *Burkholderia cepacia* (BCC). El CLSI propone puntos de corte para un limitado número de antibióticos, entre ellos ceftazidima, minociclina, trimetoprima-sulfametoxazol, meropenem, y levofloxacina. Para este último sólo se indican puntos de corte para la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM)¹⁹.

RESULTADOS

El porcentaje de pacientes colonizados o infectados por diferentes microorganismos se aprecia en la Figura 1.

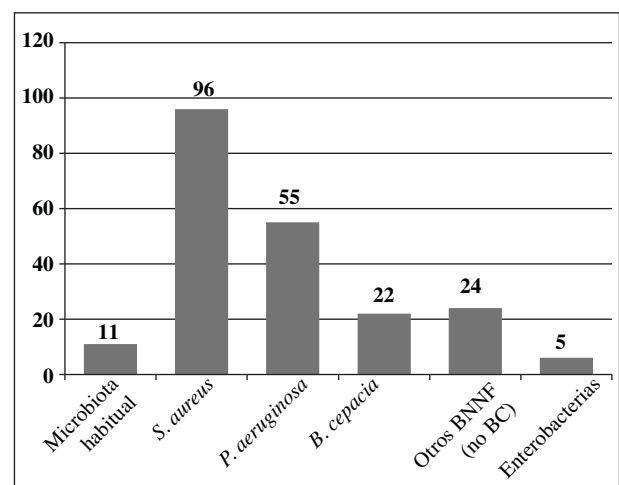


Figura 1. Prevalencia de microorganismos en pacientes con fibrosis quística. BNNF: bacilos gramnegativos no fermentadores. BC: *Burkholderia cepacia*

En 11 de los 125 pacientes estudiados no se aislaron microorganismos implicados en la colonización-infección broncopulmonar crónica. Se obtuvo desarrollo *S. aureus* en 96 pacientes, 25 (26,0%) de los cuales se hallaban colonizados-infectados por *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR) mientras que los restantes 71 (74%) lo estaban por aislamientos sensibles a dicho antibiótico (SAMS). En 55 de los 125 pacientes estudiados (44,0%) se aisló *P. aeruginosa*. Veintisiete de ellos (49,1%) presentaron el fenotipo no mucoso, 22 (40,0%) el fenotipo mucoso, mientras que en 6 pacientes (10,9%) se observó la presencia de ambos fenotipos. En total se recuperaron 78 aislamientos diferentes de *P. aeruginosa* a partir de esos 55 pacientes. Setenta y cuatro de ellos fueron sensibles a ciprofloxacina (94,9%), un aislamiento (1,3%) presentó sensibilidad intermedia y 3 (3,8%) resultaron ser resistentes. Por otra parte, 53 aislamientos fueron sensibles a gentamicina (67,9%), 7 (9%) presentaron sensibilidad intermedia y 18 (23,1%) fueron resistentes (Figura 2).

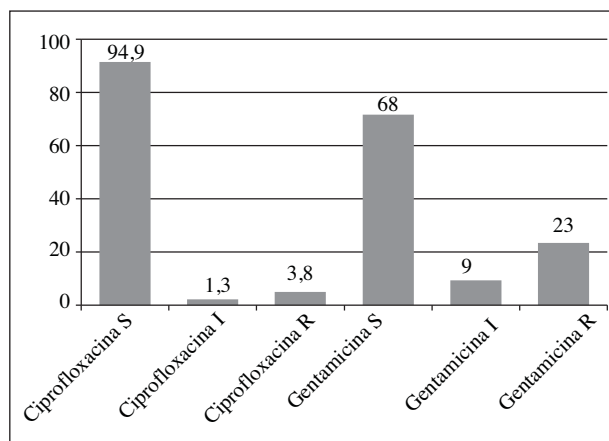


Figura 2: Sensibilidad a ciprofloxacina y gentamicina en *Pseudomonas aeruginosa*. **S:** sensible; **I:** con sensibilidad intermedia; **R:** resistente.

En el presente estudio, en 22 muestras se identificaron integrantes del BCC como único aislamiento (Figura 1). De este modo fue posible la clasificación genética de miembros del BCC. Este trabajo nos permitió conocer las especies que están comprendidas dentro del complejo BCC que se encontraban en el tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos de nuestro medio. Bacterias de este complejo fueron aisladas de 21 pacientes. Contrariamente a lo que sucede en otras regiones geográficas, en la Argentina la especie del BCC que predomina es *Burkholderia contaminans*, la cual estaba presente en 12 pacientes. *Burkholderia vietnamiensis* se aisló de 3 pacientes, *Burkholderia cepacia* propiamente dicha de otros 3, *Burkholderia multivorans* en uno y *Burkholderia cenocepacia* en otro (Figura 3).

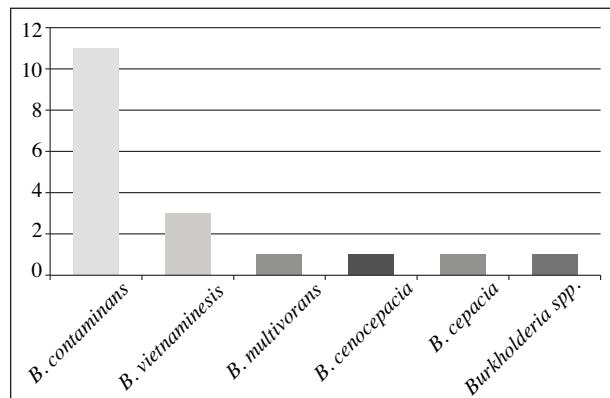


Figura 3. Distribución de especies de *Burkholderia* spp. entre pacientes FQ en el Hospital Garrahan.

En un paciente se obtuvo un microorganismo de este complejo cuya secuencia hasta el momento no se corresponde con ninguna de las descritas en la literatura. En tres de los 18 pacientes infectados y/o colonizados por *B. contaminans* se encontró resistencia a los cinco antibióticos. El resto de los aislamientos de *B. contaminans* fueron sensibles. Este hecho permite pensar que en este proceso de resistencia a los antimicrobianos intervienen numerosos factores, como por ejemplo el estado clínico del paciente, el número de tratamientos realizados, la especie involucrada, etc. La evolución clínica de los pacientes colonizados y/o infectados con *B. contaminans* fue variable. Cinco de los 18 pacientes infectados y/o colonizados por *B. contaminans* requirieron internación y recibieron tratamiento antibiótico endovenoso. Tres pacientes recibieron tratamiento antibiótico por vía oral y no requirieron internación; mientras que en los restantes (6 pacientes) no se observó ningún cambio significativo, sugiriendo la cronicidad del proceso infeccioso. Dos pacientes colonizados y/o infectados por *B. contaminans* fallecieron.

También se aislaron otros microorganismos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, y otros bacilos gram negativos no fermentadores cuya participación en la patología respiratoria de estos pacientes es incierta. En este contexto, en 24 pacientes se aislaron bacilos negativos no fermentadores diferentes de *P. aeruginosa* y *B. cepacia*: *Achromobacter xylosoxidans* (n=7), *Achromobacter denitrificans* (n=1), *Chryseobacterium meningosepticum* (n=1), *Chryseobacterium indologenes* (n= 4), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=8), *Ralstonia picketti* (n=1), *Delftia acidovorans* (n=1), *Pseudomonas fluorescens* (n=1), *Sphingobacterium multivorum* (n=1) y *Ochrobactrum anthropi* (n=1) (Figura 1).

En 6 pacientes se aisló *S. marcescens*, aunque se desconoce la importancia de este microorganismo en la patología respiratoria de los pacientes con FQ.

DISCUSION

La frecuencia con la que deben realizarse los cultivos microbiológicos depende de la edad del paciente, de su situación clínica y del tipo de tratamiento al que esté sometido. Se recomienda realizar un cultivo microbiológico al menos cada tres meses a cada paciente y en cualquier momento en el que se produzca un deterioro de su estado clínico. Esta práctica debe seguirse en los pacientes colonizados por microorganismos multirresistentes y es imprescindible en el control postratamiento tras el aislamiento de estos patógenos.

El presente trabajo nos permitió conocer la situación microbiológica actual de las infecciones respiratorias en niños con FQ. Dada la importancia de *S. aureus* como colonizante inicial, nos pareció útil conocer el nivel de resistencia a metilina (26%) en la población estudiada. Es importante realizar el diagnóstico de la infección por *S. aureus* ya que puede persistir por largos períodos y favorecer el posterior desarrollo de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa es un patógeno que se destaca entre el resto de las bacterias que colonizan la vía aérea del paciente con FQ por provocar un franco deterioro de la función pulmonar. Por ello es necesario establecer medidas que eviten la colonización inicial y faciliten su detección lo antes posible tras la primocolonización, momento en el cual la terapia antibiótica todavía puede erradicarla. La persistencia de esta bacteria se asocia con su crecimiento en biopelículas, un desarrollo de resistencia a los antimicrobianos y una evolución más rápida de la enfermedad.

Del total de pacientes con *P. aeruginosa*, en el 40% se aisló el fenotipo mucoso, de tratamiento dificultoso. Según la literatura internacional, aproximadamente el 30% de los niños con FQ padecen colonización-infección con *P. aeruginosa* antes de los dos años⁴. En el presente trabajo, 8 (14,5%) de los 55 pacientes colonizados-infectados con *P. aeruginosa* tenían menos de 2 años de edad; 20 (36,4%) tenían entre 3 y 9 años, mientras que 27 (49,1%) eran mayores de 10 años. El manejo del paciente con FQ debe asegurar un control sistemático de la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*. En este contexto se observó la sensibilidad de casi un 95% a ciprofloxacina y de casi un 70% a gentamicina (Figura 2).

La infección respiratoria por *B. cepacia*, demostró ser menos prevalente que la producida por *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Figura 1). Sin embargo, debido a su mayor transmisibilidad, virulencia y su marcada resistencia a los antibióticos, se hace necesario su diagnóstico microbiológico rápido y eficaz, como así también el tratamiento de la infección y las medidas de prevención. El pronóstico de la enfermedad pulmonar en pacientes con FQ, ocasionada por el BCC varía y depende de algunos

factores tales como: la especie involucrada, la capacidad patogénica, la transmisibilidad de la cepa como así también la coinfección con *P. aeruginosa*.

Las exacerbaciones infecciosas respiratorias en la FQ contribuyen al deterioro pulmonar y afectan la supervivencia de estos enfermos. Es importante la vigilancia microbiológica periódica de rutina y en las reactivaciones, así como el reconocimiento clínico de los signos y síntomas que indiquen una exacerbación infecciosa. El tratamiento agresivo con antibióticos y el control integral de la enfermedad broncopulmonar es fundamental para la vida de estos enfermos²⁰.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José de Grossi de la cátedra de Higiene y Sanidad de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por sus aportes y comentarios.

REFERENCIAS

1. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361: 681-9.
2. Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. N Engl J Med 1997; 336: 487-91.
3. Rosentein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. J Pediatr 1998; 132: 589-99.
4. 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.
5. Whittier S. Update on the microbiology of cystic fibrosis: traditional and emerging pathogens. Clin Microbiol Newsl 2001; 23:67-71.
6. Hauser A, Jain M, Bar-Meir M, et al. Clinical significance of microbial infection an adaptation in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2011; 24: 29-70
7. Ramphal R. The role of bacterial adhesion in cystic fibrosis including the staphylococcal aspect. Infection 1990;18:61-4.
8. Ulrich M, Herbert S, Berger J, et al. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;19:83-91.
9. Govan JRW, Brown PH, Maddison J, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. Lancet 1993;342:15-9.
10. Brennan AL, Geddes DM. Cystic fibrosis. Curr Opin Infect Dis 2002; 15: 175-82.
11. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 194-222.
12. Soni R, Marks G, Henry DA, et al. Effect of *Burkholderia cepacia* infection in the clinical course of patients with cystic fibrosis: a pilot study in a Sydney clinic. Respirology 2002; 7: 241-5.
13. Melo, H. *Burkholderia cepacia* complex: Virulence characteristics, importance and relationship with cystic fibrosis. Indian J Med Sci. 2007; 61: 422-9.
14. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, 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: 614-9.
15. LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis? Transpl Infect Dis 2001; 3:149-60.
16. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 1991;4:35-51.
17. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, et al. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27: 89-104.
18. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, et al. DNA-based diagnostic approaches for the 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.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement M100-S19. CLSI. Wayne, Pa, EE.UU, 2009.
20. González Valdés J, Abreu Suárez G. Infecciones respiratorias en la fibrosis quística. Acta Médica 2000;9:39-4.