

**Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia*  
complex  
en pacientes con fibrosis quística**

**Tesis doctoral**

Antonio Mirambell Viñas

2015







Universitat Autònoma de Barcelona  
Departament de Genètica i Microbiologia  
Facultat de Biociències

## **Aspectos microbiológicos de *Burkholderia cepacia* complex en pacientes con fibrosis quística.**

Tesis doctoral presentada por Antonio Mirambell Viñas para optar  
al grado de Doctor en Microbiología

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Vall  
d'Hebron de Barcelona, Grupo de Investigación del Institut de Recerca del  
Hospital Vall d'Hebron,

Bajo la dirección de

**Dr. Juan José González López**

Director

Dr. Juan José González López

Tutor

Dr. Guillem Prats Pastor

Si está permitido caerse, es  
obligatorio levantarse.

## **Agradecimientos**

Nunca se que decir en estos casos. Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y apoyo que han realizado multitud de personas. A todos ellos les quiero agradecer todo lo que han hecho.

Sinceramente esta tesis no hubiese sido posible sin la ayuda de mi director de tesis Dr. Juan José González López. A ti Juanjo te debo el 100% de este trabajo y de todo lo que he aprendido todos estos años, sin tu ayuda, sin tus consejos, sin tu experiencia, sin tus correcciones que me llevaban días y días de trabajo, este proyecto no hubiera sido posible. Además de cómo no, de agradecerte los buenos momentos que hemos pasado en todos los congresos y en el laboratorio. Sinceramente muchas gracias.

También quiero agradecer y con mucho cariño, a usted don Dr. Prats. Sin usted aún no habría escrito ni el índice de la tesis. Además de que es usted un pozo de sabiduría le agradezco especialmente sus continuos consejos en la redacción y realización de este trabajo, sinceramente a su lado he aprendido muchísimo. Por otro lado es imposible no mencionar la importancia que ha tenido usted en la superación de los momentos de agobio o desanimo; sus historias, bromas, comentarios, no sé exactamente como definirlo, han sido y forman parte del grato recuerdo que me llevo. Gracias.

Como no agradecer a la Dra. Bartolomé todo lo que ha hecho por mí. No tengo palabras para agradecerle toda mi gratitud. Es usted una persona muy importante en mi vida, sin usted no hubiera estado ni conocido todo este magnífico grupo de personas. También debo agradecerle su plena disponibilidad a ayudarme para cualquier cosa, por difícil que fuera. Moltes gràcies Rosa.

Siguiendo con el Servicio de Microbiología debo agradecer toda su ayuda a todos los departamentos y compañeros que trabajan diariamente en este edificio, especialmente quisiera agradecer a la Dra. Larrosa su apoyo y sus magníficas enseñanzas sobre Microbiología de las cuales también he aprendido mucho.

Por otra parte me gustaría agradecer a todas las personas que forman parte del servicio de fibrosis quística del hospital Vall d'Hebron, especialmente a la Dra. Gartner y al Dr. Moreno

por toda la ayuda prestada para hacer posible que este trabajo sea una realidad. También sería injusto no agradecer a la Dra. Ferrer por ser una de las personas que inició todo este proyecto. Aprovecho para agradecer la ayuda desinteresada y que compartieran su conocimiento científico conmigo las personas que encontré en el laboratorio de Taxonomía, del Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III de Madrid (Majadahonda), en especial a Juan Antonio Sáez Nieto, M<sup>a</sup> José Medina, Silvia Valdezate, Pilar Villalón, Noelia Garrido, Gema Carrasco y Ana Vindel.

Tampoco puedo ni debo olvidarme de todos los compañeros y muchos de ellos amigos del Laboratorio de Recerca 202. Primero de todo quisiera darle las gracias a Alicia que aunque fue breve aprendí mucho. Como no, también quisiera agradecerle a Natalia que me enseñara tanto cuando yo era un recién llegado, y bastante hacia con no romper nada. Tampoco podría olvidarme de Oihane y sus invitaciones a cafés, y los grandes momentos que pasamos y que estoy seguro que pasaremos (me debes una). No me olvido de Yola y esos momentos compartidos en el cemento y en el laboratorio. Alba mil gracias, pese a que seas del X, he reído y disfrutado discutiendo contigo, además estoy muy contento de que seas de las pocas que me haya “escuchado”. Mari es imposible que me olvide de las amplias conversaciones que tanto amenizaban las pesadas tardes, gracias. Judit como no agradecerte a ti, tus NO consejos que me transmitías durante las sesiones de Sálvame Deluxe, además de traer siempre alegría entre los integrantes del Laboratorio 202 que a mí francamente siempre me han ido y me va muy bien. Finalmente creo que me quedan dos personas, a cual más fantástica. Thais, muchas gracias por todo, por las visitas al cemento, por hacer ver que me escuchabas cuando necesitaba desfogarme, por haberme ayudado tanto y tanto, sinceramente podría escribir libros y libros de todas las tonterías que hemos dicho. Muchísimas gracias de verdad. ¿A ver cuando hacemos una paella en St Joan Samora no? NURIA que decir de vos, aparte de que soy muy fan de tus bolsos, gracias por enseñarme tanto de alta costura. A parte debo darte las gracias principalmente por aguantarme y te pido perdón por sacarte de tus casillas y hacer salir la verdadera Nuria. Podría extenderme más pero el rollo sería tremendo. Francamente a vosotras dos os debo mucho. Muchas gracias.

Desde estas líneas ya las ultimas doy las gracias a mis dos actuales compañeros, fieles y grandes amigos Lucas y Codi. Gracias por esos grandes momentos vividos, aunque estoy fascinado pensando en los que vendrán, gracias por soportarme y ser un apoyo para mí en los

malos momentos, Gracias amigos. También te doy las gracias a ti, Cris, que en los inicios de este proyecto fuiste y jugaste un papel muy importante, esto en parte también es tuyo.

Finalmente agradecer el papel importantísimo que ha jugado mi familia en todo este proyecto. Especialmente a mis padres los cuales han realizado tantos esfuerzos para que este trabajo y esta persona pudiera ser una realidad. Mi gratitud es inmensa hacia todo lo que habéis hecho por mí, espero algún día poderos devolver algo de todo lo que habéis hecho, aunque muy a mí pesar se quedará en muy poco en comparación con lo que habéis hecho. Gracias. Por último quisiera dar las gracias a otros dos soportes fundamentales para mí. Ander y Rosa, ambos me habéis ayudado y apoyado en los buenos y malos momentos, vuestros abrazos, vuestras sonrisas, vuestra sola presencia me reconforta, me hace sentirme estable y confiado. Es imposible detallar todo lo bueno que me aporta toda esta familia. Gracias de corazón, a todos.



# Índice

## 1. Introducción

<b>1.1 Fibrosis quística.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Fibrosis quística .....	3
1.1.2 Infecciones respiratoria en la Fibrosis quística .....	6
<b>1.2 Infecciones por el complejo <i>Burkholderia cepacia</i>.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Infecciones por el complejo <i>Burkholderia cepacia</i> en la fibrosis quística.....	9
1.2.2 Otras infecciones oportunistas.....	9
<b>1.3 Aspectos microbiológicos del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Concepto y taxonomía.....	12
1.3.2 Características microbiológicas. ....	15
1.3.3 Hábitat, difusión y transmisión interhumana.....	17
1.3.4 Técnicas de aislamiento.....	19
1.3.5 Métodos de identificación.....	20
1.3.6 Estudios de clonalidad y epidemiología. ....	24
<b>1.4 Factores de virulencia y capacidad patogénica.....</b>	<b>25</b>
1.4.1 Islas de patogenicidad y elementos genéticos móviles.....	25
1.4.2 Quorum sensing. ....	27
1.4.3 Biofilm.....	28
1.4.4 Adhesinas y fimbrias.....	28
1.4.5 Movilidad.....	29
1.4.6 Lipopolisacárido y exopolisacárido.....	30
1.4.7 Resistencia al estrés oxidativo y evasión del sistema inmune. ....	31
1.4.8 Fosfolipasas, lipasas, sideróforos, metaloproteasas y factores sigma. ....	32
<b>1.5 Sensibilidad del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....</b>	<b>34</b>

1.5.1 Patrón de sensibilidad de las cepas salvajes. Resistencia natural.....	34
1.5.2 Mecanismos de resistencia de resistencia del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> a los antimicrobianos.....	34
1.5.3 Epidemiología de la resistencia adquirida.....	36
<b>1.6 Biofilm .....</b>	<b>39</b>
1.6.1 Importancia del biofilm en la patología infecciosa. ....	39
1.6.2 Formación y desarrollo de las estructuras de biofilm .....	41
1.6.3 Características del biofilm. ....	43
1.6.4 El biofilm en el complejo <i>Burkholderia cepacia</i> . ....	44

## 2. Objetivos

<b>2.1 Objetivos .....</b>	<b>49</b>
----------------------------	-----------

## 3. Material y Métodos

<b>3.1 Ámbito del estudio .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Pacientes y periodo del estudio .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Cultivos microbiológicos para la obtención de aislados del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> de esputos de pacientes con FQ .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Homogenización y fluidificación de las muestras.....	54
3.3.2 Medios de cultivo para el aislamiento de aislados del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	34
3.3.2 Conservación de los aislamientos .....	55
<b>3.4 Identificación mediante técnicas genéticas de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....</b>	<b>56</b>
3.4.1 Obtención del DNA bacteriano.....	56
3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
3.4.2.1 Reactivos utilizados .....	56
3.4.2.2 Oligonucleótidos utilizados .....	57
3.4.2.3. Condiciones de la PCR .....	57
3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	57

3.4.4 Secuenciación del gen <i>recA</i> .....	58
3.4.5 Análisis de secuencias .....	59
<b>3.5 Identificación mediante espectrometría de masas MALDI-ToF MS .....</b>	<b>60</b>
3.5.1 Identificación mediante VITEK MS .....	60
3.5.2 Identificación mediante Daltonics Microflex LT .....	61
<b>3.6 Estudio de clonalidad.....</b>	<b>62</b>
3.6.1 Selección de aislados de Bcc para el estudio de clonalidad .....	62
3.6.2 Electroforesis en gel con campo pulsante (PFGE) .....	62
3.6.2.1. Preparación de la suspensión bacteriana.....	62
3.6.2.2. Preparación de los moldes de agarosa.....	63
3.6.2.3. Lisis celular .....	63
3.6.2.4. Lavados de moldes de agarosa.....	63
3.6.2.5. Digestión del DNA.....	63
3.6.2.5.1 Digestión con <i>XbaI</i> .....	64
3.6.2.5.2 Digestión con <i>SpeI</i> .....	64
3.6.2.6. Preparación de la electroforesis en gel con campo pulsante .....	64
3.6.2.7 Electroforesis en campo pulsante .....	67
3.6.2.8 Tinción del gel de agarosa. ....	68
3.6.2.9. Visualización del perfil de restricción.....	69
3.6.2.10. Análisis informático .....	69
<b>3.7 <i>Multilocus sequence typing (MLST)</i>.....</b>	<b>70</b>
3.7.1 Selección para el estudio de MLST .....	70
3.7.2 Obtención del DNA bacteriano.....	70
3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	70
3.7.3.1 Reactivos .....	70
3.7.3.2 oligonucleótidos .....	70
3.7.3.3 Condiciones PCR.....	71
3.7.4 Electroforesis del gel de agarosa.....	72
3.7.5 Secuenciación .....	72

3.7.6 Análisis de las secuencias .....	72
3.7.7 Algoritmo <i>Based Upon Related Sequence Types</i> (BURST) .....	72
<b>3.8 Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....</b>	<b>73</b>
3.8.1 Selección de aislados para el estudio de sensibilidad .....	73
3.8.2 Antibiograma .....	73
3.8.3 Interpretación del antibiograma .....	74
<b>3.9 Evaluación de la capacidad de formar biofilm de aislados pertenecientes al complejo <i>Burkholderia cepacia</i> obtenidos de esputos de pacientes con FQ.....</b>	<b>75</b>
3.9.1 Estandarización de la metodología para realizar el estudio <i>in vitro</i> de la capacidad de formar biofilm.....	75
3.9.1.1 Formación de biofilm .....	75
3.9.1.2 Tinción con cristal violeta.....	76
3.9.1.3 Resuspensión de las bacterias formadoras de biofilm.....	76
3.9.1.4 Cuantificación del biofilm.....	76
3.9.2 Determinar la capacidad de formar biofilm <i>in vitro</i> de los aislados del Bcc .....	77
3.9.3 Análisis estadísticos.....	77

## 4. Resultados

<b>4.1 Identificación y estudio epidemiológico de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> obtenidas de muestras respiratorias de pacientes con FQ.....</b>	<b>81</b>
<b>4.2 Identificación de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> mediante espectrometría de masas por <i>matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i> (MALDI-ToF) .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3 Estudio de la relación clonal de los aislados del Bcc obtenidos de pacientes con FQ.....</b>	<b>86</b>
<b>4.4 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST) .....</b>	<b>90</b>
<b>4.5 Relación epidemiológica de los distintos ST .....</b>	<b>91</b>
<b>4.6 Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de los aislados del Bcc .....</b>	<b>96</b>
4.6.1 Evolución de la resistencia a antimicrobianos por parte de los clones de Bcc.....	100
4.6.2 Evolución de los perfiles de sensibilidad entre las distintas especies del Bcc.....	104

<b>4.7 Cuantificación del biofilm formado por los aislados pertenecientes al complejo <i>Burkholderia cepacia</i> obtenidos de muestras respiratorias de pacientes con FQ. ....</b>	<b>106</b>
4.7.1 Estandarización de la metodología para cuantificar <i>in vitro</i> el biofilm formado por bacterias.....	106
4.7.2 Determinar la capacidad de formar biofilm de los aislados del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	108

## 5. Discusión

<b>5.1 Identificación y estudio epidemiológico de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> en pacientes con fibrosis quística .....</b>	<b>122</b>
<b>5.2 Identificación de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> mediante espectrometría de masas por <i>matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i> (MALDI-ToF) .....</b>	<b>125</b>
<b>5.3 Estudio de la relación clonal de los aislados del Bcc obtenidos de pacientes con FQ.....</b>	<b>127</b>
<b>5.4 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST) .....</b>	<b>129</b>
5.4.1 Relación epidemiológica de los ST encontrados.....	131
<b>5.5 Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de los aislados del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> obtenidos de pacientes con FQ .....</b>	<b>133</b>
<b>5.6 Evolución de la resistencia a antimicrobianos por parte de los clones del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> que colonizan o infectan las vías respiratorias de los pacientes con FQ.....</b>	<b>134</b>
<b>5.7 Evaluación de los diferentes perfiles de sensibilidad observados entre las distintas especie de Bcc aisladas. ....</b>	<b>136</b>
<b>5.8 Capacidad de formar biofilm de aislados pertenecientes al complejo <i>Burkholderia cepacia</i>.....</b>	<b>137</b>

## 6. Conclusiones

<b>6.1 Conclusiones. ....</b>	<b>143</b>
-------------------------------	------------

## **7. Bibliografía**

<b>6.1 Bibliografía .....</b>	<b>147</b>
-------------------------------	------------

## **8. Índice de Ilustraciones y Tablas**

<b>8.1 Índice de ilustraciones .....</b>	<b>165</b>
--	------------

<b>8.2 Índice de tablas .....</b>	<b>167</b>
-----------------------------------	------------

## **9. Anexo**

<b>9.1 Anexo .....</b>	<b>170</b>
------------------------	------------



# **Introducción**

## **1. Introducción**

El complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) comprende un conjunto de bacterias bacilo gramnegativas muy versátiles y ubicuas en el ambiente con una relación genética muy estrecha, y fenotípicamente muy similares; en consecuencia, su identificación y diferenciación mediante técnicas microbiológicas convencionales es de una elevada complejidad. Con la descripción de dos nuevas especies en abril de 2015, en la actualidad este complejo está compuesto por 20 especies diferentes, aunque probablemente este se ampliará en un futuro.

Algunas especies de este complejo tienen un gran potencial biotecnológico debido a sus características como agentes bioremediadores o como promotores del crecimiento en vegetales. Otras cepas son fitopatógenas y patógenas en humanos, pues si bien se conocen principalmente por infectar a pacientes con fibrosis quística (FQ) y con enfermedad granulomatosa crónica, también es considerado como un patógeno nosocomial.

Este conjunto de bacterias destaca por tener una elevada resistencia natural a un gran número de agentes antimicrobianos, incluyendo a gran parte de los  $\beta$ -lactámicos y a las cefalosporinas de primera y segunda generación. Por otra parte es muy frecuente que las cepas pertenecientes a Bcc adquieran resistencias a otros antimicrobianos. Por ello su erradicación en pacientes con FQ o inmunodeprimidos infectados o colonizados por esta especie es de gran dificultad.

## 1.1 Fibrosis quística

### 1.1.1 Fibrosis quística.

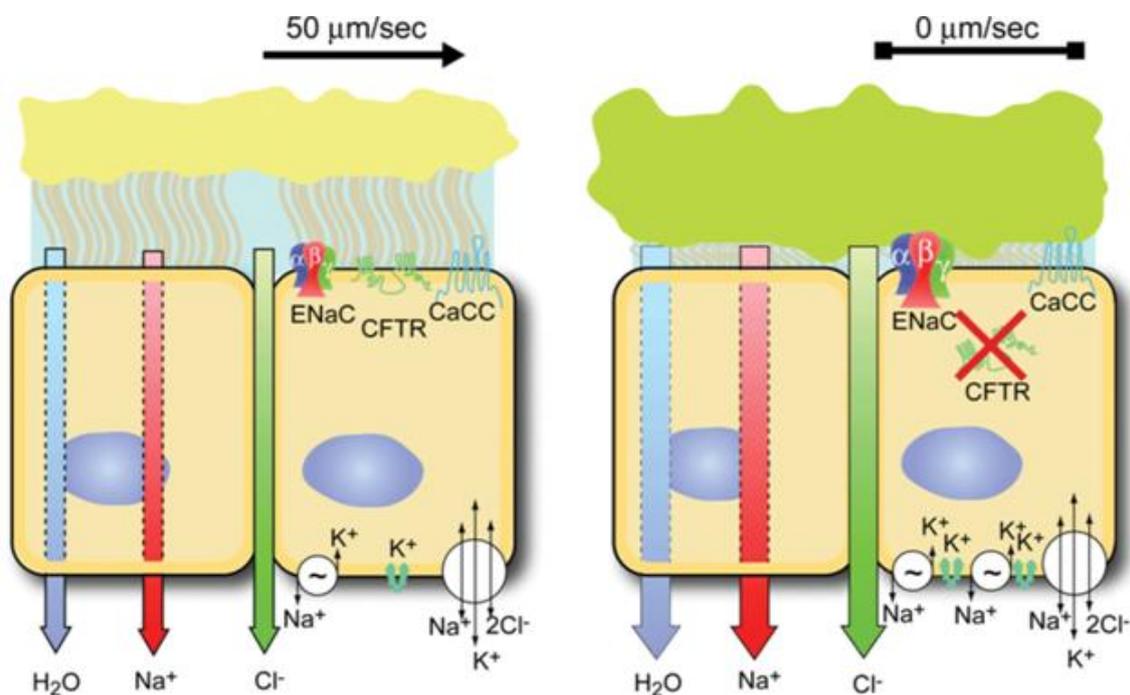
La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta principalmente a las vías respiratorias, pero también al páncreas, hígado e intestino. El nombre de fibrosis quística se introdujo como consecuencia de las lesiones fibróticas y quísticas que se producen en el páncreas, que fueron descritas de modo preciso por Dorothy Andersen en 1938. Sin embargo, debido al carácter viscoso de las secreciones, también se ha denominado a la enfermedad mucoviscidosis.

Los síntomas más graves de esta enfermedad son los respiratorios; consecuencia de las lesiones broncopulmonares por la persistente colonización microbiana e infecciones de las vías respiratorias y la consecuente disminución de la capacidad pulmonar.

En las vías respiratorias de las personas sanas las células epiteliales tienen la capacidad de absorber y secretar sales. En concreto el epitelio pulmonar ajusta la absorción de iones  $\text{Na}^+$  y la excreción de iones  $\text{Cl}^-$ , junto con el movimiento osmótico del agua en respuesta al gradiente generado por el intercambio de sales; de esta manera se ajusta la hidratación del moco para su eliminación o renovación. La eliminación mecánica de las secreciones mucosas, mediante los cilios del epitelio pulmonar, se considera la primera defensa innata de las vías respiratorias. En los pacientes con FQ esta excreción de moco hacia el exterior es anormal debido a que se produce una deshidratación del moco provocando que este sea denso y poco fluido incapacitando que los cilios puedan transportarlo hacia el exterior (1).

Específicamente los pacientes con FQ tienen defectuosa la proteína reguladora de la conductancia a través de la membrana (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR). Esta proteína, formada por una sola cadena polipeptídica de 1480 aminoácidos es miembro de la familia de proteínas transportadoras de tipo ABC (*ATP-binding cassette (ABC) transporters*) (2). A diferencia de la mayoría de proteínas transportadoras ABC y pese a tener una gran similitud estructural, la proteína CFTR tiene como función principal actuar como canal de transporte de iones  $\text{Cl}^-$ . A su vez la proteína CFTR tiene implicaciones en el transporte de  $\text{Na}^+$  ya que actúa como inhibidor de la proteína *epithelial sodium channel* (ENaC) (3). La principal hipótesis de la patofisiología de las células epiteliales de las vías respiratorias

de los pacientes con FQ es la imposibilidad de secretar iones  $\text{Cl}^-$  mediante la proteína CFTR y el aumento de absorción de  $\text{Na}^+$ , a causa de la incapacidad para inhibir la proteína ENaC, disminuye el agua presente en las secreciones mucosas de la superficie pulmonar. Esta deshidratación de las secreciones mucosas provoca la adhesión del moco a la superficie del epitelio haciendo que estas secreciones no puedan ser renovadas y eliminadas mediante los mecanismos mucocilares o físicos como las expectoraciones (Figura 1) (1,2,4).



**Figura 1.** Dibujo representativo de una célula normal y una célula de un paciente con FQ con la proteína CFTR defectuosa. Imagen tomada de Boucher (4).

La eliminación mecánica de las secreciones mucosas, es de gran importancia para el sistema inmunitario, de hecho se considera la primera defensa innata de las vías respiratorias. Este mecanismo permite que los posibles agentes infecciosos que acceden a las vías respiratorias no se establezcan y puedan ser secretados al exterior. Para ello es fundamental que la composición del moco sea la correcta y los movimientos mucociliares sean funcionales. En los pacientes con FQ esta eliminación o renovación de las secreciones mucosas no se produce, comprometiendo parte del sistema inmunitario. Además el estancamiento de las secreciones mucosas resulta ser un perfecto medio de cultivo para los microorganismos (4,5).

Además de la afectación pulmonar, los pacientes con FQ tienen afectados el tracto gastrointestinal y el sistema urogenital; de hecho la FQ se considera una enfermedad multisistémica. La deficiencia de la proteína CFTR en el páncreas afecta principalmente a la excreción de enzimas, mientras que a nivel hepático las secreciones biliares y la vesícula biliar se pueden encontrar afectadas. A nivel digestivo las obstrucciones intestinales son relativamente frecuentes. En cuanto al aparato genitourinario el 95% de hombres padecen de azoospermia debido a la obliteración de los conductos eferentes mientras que en el caso de las mujeres pese a no tener ninguna anomalía reproductiva estructural, la infertilidad ha sido relacionado con la malnutrición, las infección crónica de las vías respiratorias y la ausencia del ciclo menstrual; además el moco cervical es muy espeso y puede bloquear la migración de los espermatozoides. Sin embargo, en general, con una buena nutrición y función pulmonar, las tasas de fertilidad pueden acercarse a la de la población general (4).

Otras afectaciones de los pacientes con FQ se producen en las glándulas sudoríparas; aunque el volumen de sudor secretado por estos pacientes es el habitual, la ausencia de la proteína CFTR inhabilita la absorción de  $\text{Cl}^-$  y en consecuencia no se puede reabsorber parte del  $\text{NaCl}$  secretado por las glándulas, ocasionando que el sudor de estos pacientes sea más salino del habitual. De hecho una de las pruebas que puede indicar que un paciente padece FQ es encontrar en el sudor una concentración de  $\text{Cl}^-$  superior a 70 meq/L (4).

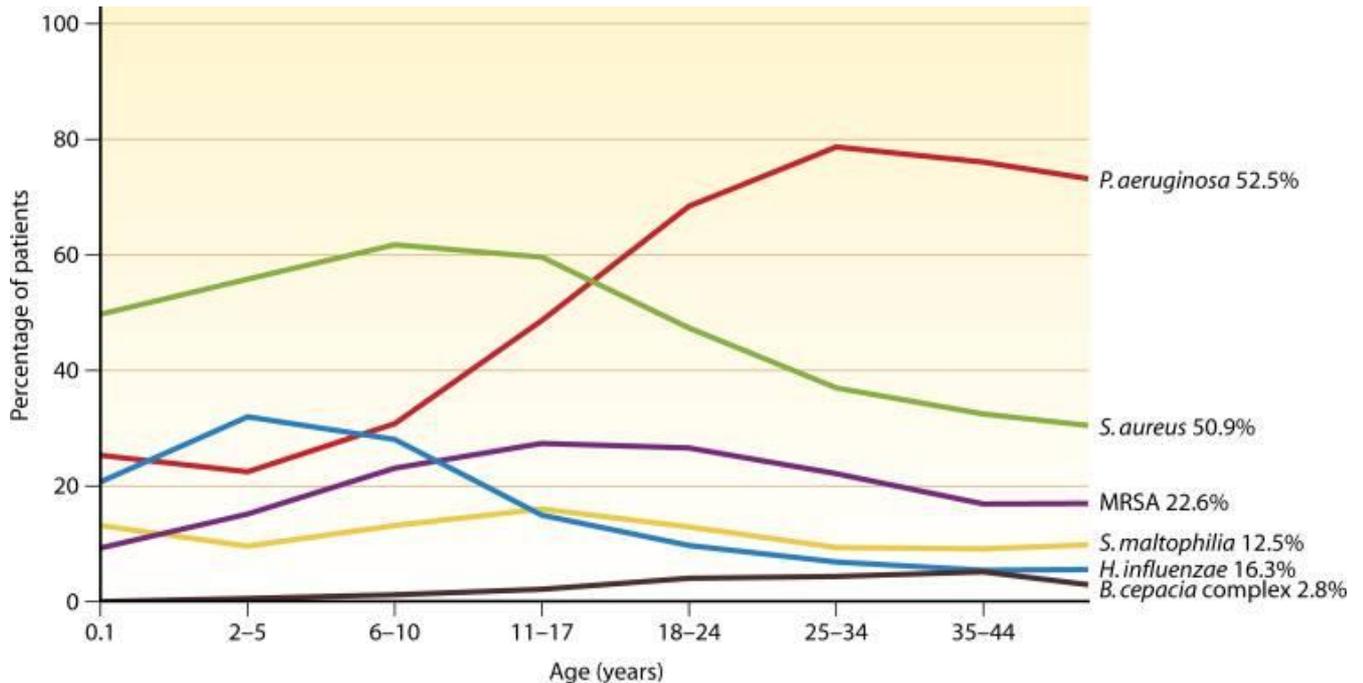
El gen que codifica la proteína CFTR, posee 250 kb y se encuentra en el cromosoma siete. Se han descrito cerca de 1800 mutaciones del gen *CFTR*, que se distribuyen en seis grandes clases (I-VI): a) En las mutaciones de clase I la proteína CFTR no es sintetizada, debido a la prematura presencia de codones stop en la secuencia del gen. b) las mutaciones de clase II son aquellas en las que la proteína es sintetizada, pero en una forma inmadura siendo su estructura conformacional incorrecta, por ello las propias proteasas de las células la degradan, c) las mutaciones de clase III la proteína CFTR se sintetiza y transporta a la membrana, pero la activación de esta por el ATP o  $\text{AMP}_c$  es defectuosa, d) las mutaciones de clase IV la proteína CFTR se sintetiza y transporta a la membrana, pero una disfuncionalidad de esta provoca que el transporte de aniones sea menor al habitual, e) las mutaciones de clase V se caracterizan por una reducción del número de proteínas CFTR, debido a un *splicing* erróneo produciéndose proteínas funcionales y aberrantes, en este caso la gravedad de la enfermedad dependerá del órgano y paciente, f) las mutaciones de clase VI son aquellas donde la proteína CFRT pierde la

capacidad de anclarse y retenerse en la membrana. La pérdida de la cola N-terminal de la proteína imposibilita el anclaje de esta en el citoesqueleto de la célula, impidiendo la correcta incorporación de la proteína a la membrana. La mutación más común entre los enfermos de FQ es una mutación de clase II que da lugar a la delección de 3-pb, lo que comporta una ausencia del aminoácido fenilalanina en la posición 508 ( $\Delta F_{508}$ )(6,7).

La FQ es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen caucásico; siendo rara en personas de otras etnias. Según datos de la *European Cystic Fibrosis Society* solo en Europa hay aproximadamente 32.248 personas diagnosticadas de FQ (8). La prevalencia de esta enfermedad varía según las áreas geográficas; su incidencia estimada en Europa oscila entre 1 de cada 2.500 a 1 de cada 5.000 recién nacidos vivos; detectándose un máximo en Irlanda y un mínimo en Finlandia (6). La mayor causa de morbilidad y mortalidad es por afectación pulmonar (4,5).

### 1.1.2 Infecciones respiratorias en la fibrosis quística.

La causa más importante de morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ son las infecciones respiratorias y las bacteriemias causadas por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y algunas de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc). En los pacientes con FQ es habitual encontrar más de una bacteria colonizando simultáneamente las vías respiratorias, pero por lo general, *P. aeruginosa* y *S. aureus* son las especies aisladas con mayor frecuencia. En los recién nacidos y niños se ha observado que la mayoría de infecciones están producidas por *S. aureus*, seguido de *H. influenzae* y *P. aeruginosa*. La frecuencia de cultivos positivos para *P. aeruginosa* va en aumento a medida que estos pacientes superan la veintena de años. En cambio, a medida que los pacientes alcanzan la treintena se observa un descenso de las infecciones por *P. aeruginosa*, y aumentan las infecciones por especies del complejo de *Burkholderia cepacia* (9) (Figura 2). Estas infecciones pueden ser transitorias, pero muchos de estos microorganismos causan infecciones persistentes, que pueden perdurar muchos años. Además, como se ha señalado anteriormente, las coinfecciones por más de un microorganismo son habituales (5,10). Basándose en los cultivos de las muestras respiratorias es difícil determinar si un microorganismo aislado esta colonizando o causando infección.



**Figura 2.** Prevalencia de las infecciones más comunes en pacientes con FQ en función de su edad. Imagen tomada de Hauser *et al.* (9).

Aparte de las bacterias convencionales señaladas, otros microorganismos que colonizan e infectan con frecuencia a los pacientes con FQ son las micobacterias no tuberculosas (MNT). El primer caso descrito de infección por una MNT fue en la década de los 70 (11). A partir de este caso, se empezó a relacionar estos microorganismos con los pacientes con FQ. Estudios recientes muestran que la prevalencia de infección por MNT en pacientes con FQ es bastante variable, pudiendo oscilar entre el 2% y 28% (12). En dos estudios realizados, en Francia y EE.UU, en más de 1000 pacientes con FQ, la prevalencia de MNT fue 6.6% y 13% respectivamente. En ambos casos los agentes más frecuentes fueron *Mycobacterium avium* complex y *Mycobacterium abscessus* (13,14).

Las colonizaciones e infecciones en los pacientes con FQ por especies del género *Nocardia* son poco frecuentes. Pese a ello, se han descrito algunos casos, siendo las especies de *Nocardia asteroides* complex las aisladas mayoritariamente (15,16).

Junto a la gran variedad de agentes bacterianos capaces de colonizar e infectar las vías respiratorias de los pacientes con FQ, estos también pueden padecer infecciones fúngicas, siendo *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* los hongos con mayor prevalencia (9,12). Con relación a los virus, se ha observado que los virus de la gripe, adenovirus, virus respiratorio

sincicial y virus parainfluenza son los que se encuentran con mayor frecuencia en las muestras respiratorias de los pacientes con FQ. Sin embargo, cabe constatar que no se han observado grandes diferencias entre la población normal y los pacientes con FQ (9,12).

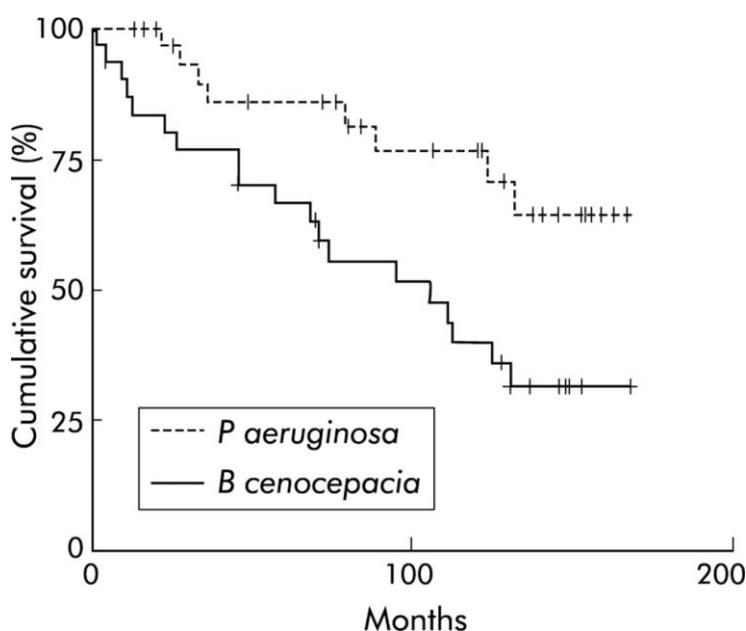
Al revisar estos datos se detecta que pese a la gran cantidad de microorganismos potencialmente capaces de colonizar o infectar estos pacientes, su susceptibilidad a la colonización/infección está sujeta a varios factores, entre los que se encuentran; la edad, el tratamiento antibiótico previo y el área geográfica donde se encuentran.

## 1.2 Infecciones por el complejo *Burkholderia cepacia*.

Las especies incluidas en el complejo *Burkholderia cepacia* son patógenas oportunistas con capacidad de causar una gran variedad de infecciones, como neumonía y bacteriemia entre otras. Las colonizaciones e infecciones por Bcc se detectan cada vez con más frecuencia, probablemente por su facilidad para diseminarse entre los pacientes con FQ y con enfermedad granulomatosa crónica (17).

### 1.2.1 Infecciones por el complejo *Burkholderia cepacia* en la fibrosis quística.

Cerca del 5% de los pacientes con FQ, principalmente adultos, se encuentran colonizados/infectados por bacterias del complejo *Burkholderia cepacia*, causando infecciones agudas e infecciones crónicas. Las infecciones por Bcc se dan en su mayoría en personas adultas en las que el tejido pulmonar ya se encuentra alterado. Diferentes estudios demuestran que los pacientes con FQ colonizados o infectados por las especies del Bcc se asocian a un deterioro pulmonar y una mortalidad superior a la causada por otras especies, incluyendo *P. aeruginosa* (Figura 3). Por lo general, en las infecciones crónicas por Bcc la capacidad pulmonar de los pacientes acostumbra a ser inferior a las de los pacientes infectados por otras especies (18,19).



**Figura 3.** Supervivencia de pacientes con fibrosis quística según si están infectados por *B. cenocepacia* o *P. aeruginosa*. Imagen tomada de Jones *et al.* (18)

La infección por Bcc, se ha vinculado al denominado “síndrome cepacia”. Este síndrome desde sus primeras descripciones a principios de los años 80 destacó por la frecuencia con que la infección pulmonar se asociaba a bacteriemia, hecho nada común entre los pacientes con FQ no infectados por Bcc (20,21). Además de la bacteriemia, este síndrome se ha asociado a fiebre, neumonía necrotizante e inestabilidad hemodinámica, que evoluciona hacia un rápido deterioro, con un desenlace mortal en más del 62% de los pacientes. Este síndrome puede darse a las pocas semanas, meses, o ocasionalmente años de haber adquirido la infección por Bcc (22–24). Algunos estudios muestran el potencial invasivo de las cepas Bcc, con capacidad migratoria a través de la barrera epitelial para invadir la mucosa respiratoria, el parénquima pulmonar y los capilares (25,26).

En los pacientes con FQ infectados por Bcc el porcentaje de supervivencia de los pacientes trasplantados es entre un 15 y 63 % menor que los pacientes con FQ no infectados por este microorganismo. Algunos centros excluyen los pacientes colonizados por Bcc de los programas de trasplante pulmonar, debido al mal pronóstico post-operatorio (27). Sin embargo, otros autores consideran que se debería estudiar individualmente cada paciente, para evaluar la infección por las diferentes especies del complejo. En muchos casos los pacientes con desenlace mortal fueron aquellos que estuvieron infectados por la especie *Burkholderia cenocepacia*, mientras que los pacientes trasplantados, pero infectados por otras especies del complejo tuvieron una supervivencia similar a la de los demás pacientes trasplantados (28).

### **1.2.2 Otras infecciones oportunistas.**

Las especies del complejo *Burkholderia cepacia* causan infecciones oportunistas en pacientes con otras patologías. Las bacteriemias causadas por Bcc se asocian a la presencia de un catéter endovascular en los pacientes hemodializados. Normalmente estas bacteriemias son de carácter polimicrobiano (29,30). Por otra parte, las neumonías causadas por estos bacilos que se producen en pacientes sin FQ se relacionan con algún factor predisponente, como la ventilación mecánica o el tratamiento previo con antibióticos de amplio espectro, como las fluoroquinolonas o ceftazidima (31). Se han descrito infecciones causadas por Bcc en la piel y en tejidos blandos en pacientes con quemaduras o heridas quirúrgicas (31). También

se han producido casos de endoftalmitis vinculados a infecciones oculares post-quirúrgicas (32). Asimismo, se han descrito infecciones urinarias que en la mayoría de ocasiones se han vinculado a la presencia de sondas (17).

Debido a la gran resistencia a los antibióticos y desinfectantes y a su capacidad para sobrevivir durante tiempos prolongados en soluciones de estos medicamentos, las especies del Bcc pueden ser contaminantes de preparaciones farmacéuticas, así como también de equipos e instrumentos médicos. La contaminación de desinfectantes como la polividona yodada o la clorhexidina, ha sido relacionada con la aparición de brotes. También se han descrito casos de contaminación en cremas hidratantes y nebulizadores (33–37).

### 1.3 Aspectos microbiológicos del complejo *Burkholderia cepacia*.

#### 1.3.1 Concepto y taxonomía

El género *Burkholderia* contiene cerca de 70 especies distintas (LPSN; <http://www.bacterio.net>), en su mayoría son bacterias fitopatógenas y solo un pequeño número de ellas se han aislado en humanos, incluyendo *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia mallei*. Ambas son patógenas primarias para los animales y los humanos, y se caracterizan por causar la meloidiosis y el muermo, respectivamente. Estas especies son endémicas del sudeste asiático, subcontinente indio, Oceanía y China, y cabe destacar que raramente se encuentran en los países occidentales (38). Otras especies del género *Burkholderia* con capacidad patógena para las plantas, pero oportunistas para los humanos son *Burkholderia gladioli* y las especies del complejo *Burkholderia cepacia*.

En el año 1950 Walter Burkholder describió a un fitopatógeno causante de la podredumbre de las cebollas como *Pseudomonas cepacia* (39); sin embargo no se introdujo en la lista de nuevas especies hasta el 1981 a partir del trabajo realizado por Palleroni y Holmes (40). En el año 1992 a partir del estudio de Yabuuchi *et al.* basado en el análisis de secuencias de la subunidad 16S del RNA ribosomal, se estableció un nuevo género denominado *Burkholderia*; en este nuevo género se incluyó la especie *Burkholderia cepacia* (anteriormente *Pseudomonas cepacia*) (41). En el año 1995 se describió la especie *Burkholderia vietnamiensis* (42). En el año 1996 se determinó que muchas de las cepas identificadas como *B. cepacia* mediante sistemas comerciales, constituían al menos cinco genomovariaciones diferentes (Recuadro 1), incluida la especie *B. vietnamiensis* (43). Ya en el año 1997 durante la conferencia *Third International Burkholderia cepacia working group* (Victoria, British Columbia, Canadá) se decidió denominar *Burkholderia cepacia* complex a estas cinco genomovariaciones (I-V), incluida la especie *B. vietnamiensis*. Ese mismo año en un estudio realizado por Vandamme *et al.* se describió la genomovariación II como especie *Burkholderia multivorans* (44). En el año 2000 se denominó a la genomovariación IV como *Burkholderia stabilis*, mientras que en los años 2001 y 2002 se describieron cuatro nuevas genomovariaciones (genomovariaciones IV a IX) las cuales se denominaron *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia anthina*, *Burkholderia pyrrocina* y *Burkholderia dolosa*; esta última descrita el año 2004 (45–48). Un estudio realizado por Vandamme *et al.* en el año 2003 permitió describir a la

genomovariedad III como *Burkholderia cenocepacia*. Finalmente, tres estudios realizados en los años 2008, 2009 y 2013 basados en el análisis y comparación del gen *recA*, el cual codifica la proteína recombinasa A, y mediante técnicas de *multilocus sequence analysis* permitieron la descripción de nueve especies más dentro del complejo *Burkholderia cepacia* (49–51). Por el momento se han descrito un total de 20 especies, referidas en conjunto como complejo *Burkholderia cepacia* (Tabla 1), aunque en un futuro no se descarta la posibilidad de nuevas descripciones.

**Recuadro 1.**

La denominación “genomovar” se introdujo para referirse a cepas que no pueden diferenciarse fenotípicamente pero muestran diferencias genéticas compatibles con su división en especies, es decir, fenotípicamente iguales pero genotípicamente diferentes, y engloba términos como especies genómicas, geno-especies, genomoespecies o grupos genómicos (41). Sin embargo aunque representan especies distintas no se les puede adjudicar formalmente un nombre hasta que se constaten diferencias fenotípicas entre los diferentes “genomovars”.

**Tabla 1.** Especies del complejo *Burkholderia cepacia*. Adaptada de LiPuma 2010 (12).

Especies	Antigua designación genovariedad	Año identificación y/o denominación	Referencia(s)
<i>B. cepacia</i>	I	1950, 1997	(39,44)
<i>B. multivorans</i>	II	1997	(44)
<i>B. cenocepacia</i>	III	1997, 2003	(44,52)
<i>B. stabilis</i>	IV	1997, 2000	(44,53)
<i>B. vietnamiensis</i>	V	1995, 1997	(42,44)
<i>B. dolosa</i>	VI	2001, 2004	(48,54)
<i>B. ambifaria</i>	VII	2001	(45)
<i>B. anthina</i>	VIII	2002	(47)
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	2002	(47)
<i>B. ubonensis</i>		2000, 2008	(49,55)
<i>B. latens</i>		2008	(49)
<i>B. diffusa</i>		2008	(49)
<i>B. arboris</i>		2008	(49)
<i>B. seminalis</i>		2008	(49)
<i>B. metallica</i>		2008	(49)
<i>B. contaminans</i>		2009	(50)
<i>B. lata</i>		2009	(50)
<i>B. pseudomultivorans</i>		2013	(51)
<i>B. stagnalis</i>		2015	(56)
<i>B. territorii</i>		2015	(56)

### 1.3.2 Características microbiológicas

Los microorganismos del complejo *Burkholderia cepacia*, actualmente formado por 20 especies, son bacilos gramnegativos, móviles debido a la presencia de uno o más flagelos, no formadores de esporas, aeróbios y no fermentadores de la glucosa. Su tamaño varía entre 1 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho. Todas las especies de este complejo se caracterizan por tener un genoma de gran tamaño (6 - 9 Mb) distribuido en dos o tres replicones cromosómicos, y en algunos casos puede existir un plásmido (57,58). Por ejemplo, la cepa *B. cenocepacia* ET-12 contiene en total 8 Mb en tres cromosomas de 3.8, 3.2 y 0.8 Mb, y un plásmido de 92.7 kb (31)

Las cepas pertenecientes al complejo Bcc son fenotípicamente muy similares, diferenciar una especie de otra es una tarea de gran dificultad. Solo centros especializados son capaces de llevar a cabo una identificación correcta. La mayoría de las cepas de este complejo son catalasa positiva y oxidasa positiva, aunque la reacción en algunos casos es débil; mientras que en las especies *B. contaminans*, *B. lata* y *B. pyrocinia* la oxidasa es variable. Por lo general todas las especies del complejo *Burkholderia cepacia* oxidan la maltosa, lactosa y xilosa, y en su mayoría no son hemolíticas (17). Otras características se detallan en la tabla 2.

Todas las especies del complejo *Burkholderia cepacia* crecen en agar usual y medios selectivos como agar Mc Conkey y *B. cepacia selective agar* (BCSA). Normalmente las colonias de Bcc se pueden percibir a simple vista a las 24h de incubación, aunque en algunos casos es necesario esperar hasta el tercer día. En medios como agar usual o medios selectivos como BCSA, las colonias son lisas, ligeramente elevadas y en algunos casos pueden tener un aspecto mucoide. Todas las especies crecen bien a 30°C y 37 °C, aunque algunas cepas pueden tener un crecimiento óptimo a 42°C. La mayoría de los aislados clínicos no son pigmentados, pero en presencia de un medio que contenga hierro pueden producir un pigmento amarillo brillante. Los aislados de este complejo también se caracterizan por producir un olor muy característico (17).

**Tabla 2.** Principales características bioquímicas de las especies que forman el complejo *Burkholderia cepacia*. Adaptada de LiPuma *et al.* 2011, Peeters *et al.* 2013 y De Smet *et al.* 2015 (17,51,56).

Prueba	<i>Burkholderia cepacia</i> complex																				
	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. anthina</i>	<i>B. arboris</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. contaminans</i>	<i>B. diffusa</i>	<i>B. dolosa</i>	<i>B. lata</i>	<i>B. latens</i>	<i>B. metallica</i>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. pseudomultivorans</i>	<i>B. pyrrocinia</i>	<i>B. seminalis</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. stagnalis</i>	<i>B. terrorii</i>	<i>B. ubonensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	
Oxidasa	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento:																					
Mc Conkey	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V
BCSA <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	V	V	V	V	V	V	V	+	-	+	+	+	+	V	+	-	+	+	+	+	+
Pigmento:																					
Amarillo	V	-	V	-	V	V	-	-	V	-	V	-	-	V	V	-	-	-	-	-	-
Marrón	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	V β	-	V β	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	V β	-	-	-	-	-	V β	V β
Acidificación:																					
Maltosa	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	V
Sacarosa	+	V	V	+	V	+	V	-	V	+	V	-	V	V	V	-	+	+	+	+	+
Adonitol	+	V	+	V	V	+	V	+	V	+	+	+	V	+	+	+	-	+	-	-	-
Reducción nitratos	V	V	V	V	-	V	+	+	V	-	-	+	V	V	-	-	-	-	-	V	V
Lisina decarboxilasa	+	V	V	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+
Ornitina decarboxilasa	-	-	+	V	V	-	-	-	V	-	-	-	-	V	V	+	-	-	-	-	-
Hidrólisis de esculina	V	-	-	V	V	V	-	-	V	-	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	-	+	V	V	+	V	-	V	V	+	-	-	V	+	+	+	+	-	-	-
PNPG o ONPG <sup>b</sup>	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	+

+ > El 90 % de los aislados son positivos; V, 10 al 90 % son positivos; - <10% aislados son positivos. <sup>a</sup> *Burkholderia cepacia* selective agar. <sup>b</sup> Pruebas de la detección de la enzima β-galactosidasa. PNPG: p-nitrofenil-β-D-galactósido; ONPG: o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido.

### 1.3.3. Hábitat, difusión y transmisión interhumana.

El hecho de tener un genoma estable de gran tamaño, y distintos elementos genéticos móviles (como secuencias de inserción e islas de patogenicidad), permite a las especies de Bcc tener una gran versatilidad para establecerse en diferentes ecosistemas (59). Debido a esta gran adaptabilidad y versatilidad se puede encontrar Bcc en hábitats tan distintos como el agua, la tierra, la rizosfera y en las plantas (17).

Diversos estudios demuestran que Bcc se encuentra en mayor medida en la rizosfera, y especialmente en la rizosfera de cultivos humanos. De hecho se considera a Bcc como las bacterias dominantes en este hábitat, especialmente en cultivos de arroz, maíz, guisantes y algodón (60). La mayoría de estudios se han focalizado en la rizosfera de los cultivos de maíz y en su mayoría, las especies predominantes fueron *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. ambifaria* y *B. pyrrocina*; aunque es importante remarcar que esta distribución puede variar geográficamente (59). Un estudio realizado en China mostró *B. cenocepacia* como la especie más prevalente en la rizosfera de cultivos de maíz y arroz, mientras que *B. ambifaria* no se detectó (61). En cambio estudios realizados en rizosferas de maíz de Estados Unidos e Italia mostraron *B. ambifaria* como la especie más prevalente mientras que *B. cenocepacia* se aisló en menor frecuencia (62,63).

Las bacterias del Bcc se pueden encontrar con cierta frecuencia en aguas dulces como charcas y lagos, y en ocasiones en aguas corrientes como canales y ríos (45,58). En cambio, las aguas marinas no se pueden considerar como hábitat natural de esta especie. Pese a ello en un estudio en el que se analizó el metagenoma del mar de los Sargazos, en el océano Atlántico, se encontró y describió lo que en aquel momento se denominó genoma *Burkholderia* SAR-1 (64) que posteriormente se asignó al genoma de la especie *B. contaminans*. Probablemente se produjo una contaminación de las muestras ya que las cepas pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* tienen un crecimiento muy escaso en aguas marinas o medios con una concentración similar de sal a la existente en el mar (50,65).

Las cepas pertenecientes a Bcc se caracterizan por poseer capacidad para utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. De hecho se utiliza como agente bioremediador debido a su habilidad de degradar sustancias contaminantes presentes en pesticidas y herbicidas (66).

Su capacidad para degradar sustratos aromáticos clorados y contaminantes aromáticos como, el tricloroetileno y el tolueno respectivamente, confieren a este microorganismo especial interés en la industria agrícola (67). Otro aspecto destacable para la industria es que se ha relacionado la presencia de bacterias del complejo *Burkholderia cepacia* con mejora en el rendimiento de los cultivos. Un estudio realizado en cultivos de arroz demostró que la presencia de *B. vietnamiensis* en la rizosfera incrementaba entre 13 y 22 % la producción de arroz (68). Otro aspecto relevante de las especies de Bcc es su capacidad de producir antifúngicos y antimicrobianos de manera natural. Tienen la capacidad de proteger los cultivos de los daños causados por hongos fitopatógenos como *Aphanomyces euteiches*, *Rhizoctonia solani* y las especies del género *Pythium* que son causantes de enfermedades tan comunes como la podredumbre de la raíces (60).

Las especies del complejo *Burkholderia cepacia* son conocidas como patógenas oportunistas para el hombre y constituyen uno de los principales grupos de agentes infecciosos en los paciente con FQ. Por ello existe una gran controversia sobre el uso de aquellas especies de Bcc; que como se ha señalado en el párrafo anterior, son beneficiosas para la industria agrícola, pero a su vez potencialmente peligrosas para el hombre. Han sido varios los estudios realizados para intentar esclarecer si los pacientes con FQ se infectan mayoritariamente por cepas ambientales o en su caso, son infecciones nosocomiales o por transmisión interhumana. Un estudio realizado en el Reino Unido reveló que la cepa *B. cepacia* ATCC 25416 causante de la podredumbre de la cebolla fue aislada en un paciente con FQ (69). Otro estudio realizado en el este de EE.UU mostró que la cepa *B. cenocepacia* PHDC, una de las más frecuentemente aisladas en pacientes con FQ en esa zona de EE.UU, también se aislaba en suelos agrícolas de la misma región (70). Finalmente un estudio comparó mediante *multi locus sequence typing* (MLST) un conjunto de 381 aislados clínicos de Bcc con 233 aislados ambientales. El resultado fue que el 21.5 % de las cepas clínicas no se diferenciaban a las muestras ambientales (71). Teniendo en cuenta que las cepas Bcc no forman parte de la flora comensal normal humana, no es extraño pensar que los pacientes con FQ, en particular los que no contactan con otros pacientes con FQ, puedan infectarse por cepas Bcc ambientales (66,72). Aún así, son necesarios más estudios para esclarecer y determinar el peso de las cepas ambientales entre los pacientes con FQ.

No obstante, es sabido que parte de las infecciones por Bcc en pacientes con FQ son debidas a la transmisión interhumana. De hecho, las cepas del complejo *Burkholderia cepacia* adquirieron relevancia debido a su gran facilidad de dispersión entre pacientes con FQ; ya en la década de los noventa se observó que las especies pertenecientes al complejo se caracterizaban por su gran capacidad de transmisión entre personas (73,74). Es destacable la capacidad de diseminación de la cepa ET-12 de la especie *Burkholderia cenocepacia*; esta cepa en un primer momento fue aislada en un paciente en Toronto, Canadá; se diseminó por todo este país, para después infectar pacientes en el Reino Unido. Se cree que el contacto persona-persona producido en unas vacaciones de verano entre pacientes con FQ pudo ser una de las causas de su extensa diseminación (9,75,76). Por otro lado, además de la especie *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. multivorans* y *B. dolosa* también son especies capaces de diseminarse fácilmente entre pacientes (77). Sin embargo, la transmisión de Bcc no solo se da entre pacientes con FQ sino que también se han descrito casos de diseminación entre pacientes sin esta patología (78,79).

#### 1.3.4. Técnicas de aislamiento.

Las cepas del complejo *Burkholderia cepacia* crecen bien en agar usual y por tanto en agar sangre y en agar chocolate, medios de utilización cotidiana en los laboratorios clínicos. Estos medios son adecuados para el cultivo de líquidos o tejidos estériles. En el caso de los hemocultivos, la utilización de los métodos estándar con un periodo de incubación de 5 días, es adecuada para obtener hemocultivos positivos por Bcc.

En las muestras de esputo o de otras zonas no estériles, el uso de medios selectivos-diferenciales resulta de gran ayuda. El uso del agar Mc Conkey es de gran utilidad, ya que las cepas del género *Burkholderia* crecen bien en este medio (17). Sin embargo, debido a la frecuente colonización/infección polimicrobiana en estos pacientes se recomienda el uso de medios selectivo-diferenciales con capacidad para evitar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y facilitar el aislamiento de Bcc. Estos medios normalmente incluyen sacarosa, pueden o no contener lactosa, y antibióticos como la polimixina, gentamicina o vancomicina. Por lo general, se utilizan tres medios; *Pseudomonas cepacia* agar (PCA), *Oxidation-fermentation polymyxin bacitracin lactose agar* (OFBL) y *B. cepacia selective agar* (BCSA) (31).

De los tres medios de cultivo el BCSA es el medio que favorece en mayor medida el crecimiento de las diferentes especies del complejo *Burkholderia cepacia* y sobretodo destaca por su capacidad de suprimir el crecimiento de otras especies (80). Otro medio denominado MAST *B. cepacia médium* (Mast group Ltd., Merseyside, Reino Unido), también se ha propuesto como medio selectivo y diferencial para aislar Bcc, pero el medio BCSA sigue siendo más selectivo (81). Ahora bien, cuando las muestras tienen una procedencia de tipo ambiental, los medios señalados tienen un menor rendimiento (82). Por ello se recomienda el uso de otros medios selectivos como *Pseudomonas cepacia azeleic acid* (PCAT) o *Tryptan blue-tetracycline medium* (TB-T) (83,84).

### 1.3.5. Métodos de identificación

Dadas las características biológicas, patogénicas, epidemiológicas y de resistencia de las cepas de este complejo y por ello su trascendencia psicosocial para los enfermos y/o sus familias, es muy importante efectuar un diagnóstico e identificación correcta de estas cepas. Ahora bien la identificación de Bcc en una muestra respiratoria de un paciente con FQ no resulta nada sencilla, de hecho los sistemas de identificación comerciales no son capaces de diferenciar entre especies del complejo, y se producen errores en la identificación; siendo erróneamente identificadas como *B. gladioli*, *Cupriavidus* spp. o *Pandorae* spp. (85,86) . Por ello, se considera que es adecuado efectuar pruebas bioquímicas adicionales a los kits comerciales para confirmar, o determinar la especie del complejo (87). Aún así, en muchos casos y debido a que las especies del complejo *Burkholderia cepacia* son un grupo fenotípicamente muy similar, la diferenciación mediante pruebas metabólicas es poco específica, por ello el uso de técnicas moleculares es de gran ayuda para la identificación y diferenciación de las especies del complejo Bcc (17).

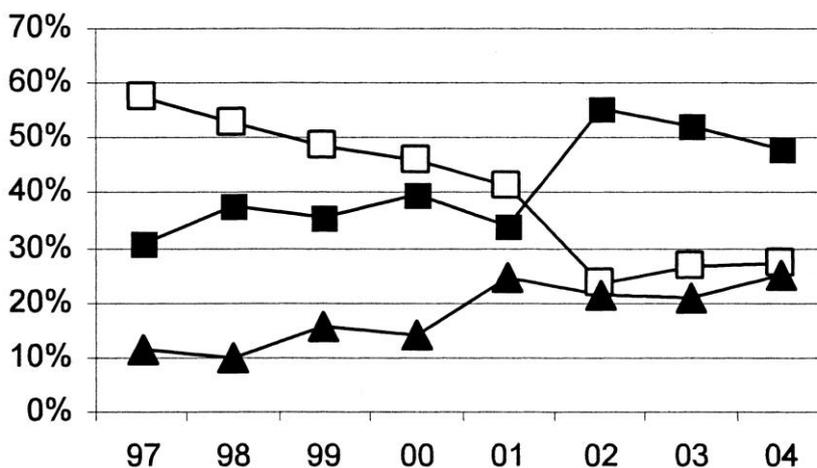
El análisis de todas las proteínas celulares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* [SDS-PAGE]), el análisis del perfil de ácidos grasos y el polimorfismo de fragmentos específicos amplificados (*amplified fragment length polymorphism* fingerprinting [AFLP]) han sido propuestos como técnicas que permiten la identificación de Bcc (44,88–90). Estas técnicas, junto con la amplificación y secuenciación del gen 16sDNA y el estudio del

polimorfismo de los fragmentos de restricción del DNA (*PCR-restriction fragment length polymorphism* [RFLP]) sobre el gen 16sDNA, se consideran útiles para identificar Bcc pero no tienen la suficiente capacidad de discriminación para diferenciar entre especies del complejo *Burkholderia cepacia* (46,91). En cambio otras técnicas como la amplificación y secuenciación del gen *recA*, la técnica RFLP sobre el gen *recA* y *multilocus sequence typing* (MLST) se consideran mucho más apropiadas para identificar las especies del complejo *Burkholderia cepacia* (17,31,90). La técnica MLST consiste en la amplificación, mediante PCR y secuenciación, de siete genes conservados. Los genes estudiados (que citamos en inglés) han sido; *ATP synthase  $\beta$  chain* (*atpD*), *glutamate synthase large unit* (*gltB*), *DNA gyrase B* (*gyrB*), *recombinase A* (*recA*), *GTP binding protein* (*lepA*), *acetoacetyl-CoA reductase* (*phaC*) y *tryptophan synthase subunit B* (*trpB*) (92). El MLST en el caso de Bcc permite determinar y diferenciar entre las especies del mismo complejo, además de suponer una herramienta precisa y reproducible que permite obtener datos epidemiológicos, a nivel global (93). Otros estudios donde se puede aplicar esta técnica es en la comparación de cepas clínicas con ambientales (57), además de que ha permitido describir nuevas especies dentro del complejo *Burkholderia cepacia* (51).

Aún así y pese a las grandes ventajas que ofrece la técnica MLST, su elevado coste y complejidad suponen un impedimento para su utilización en la mayoría de laboratorios clínicos. El uso de *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) ha sido propuesto como una técnica con capacidad de identificar y tipificar aislados clínicos. Su rapidez, precisión y sobretodo su bajo coste hacen de esta técnica una buena herramienta de uso en los laboratorios clínicos (94–96). Estudios recientes mostraron una gran eficiencia del MALDI-TOF MS para identificar Bcc a nivel de género (96,97); sin embargo, otros estudios mostraron que esta técnica presentaba dificultades para determinar las especies (98). Teniendo en cuenta que el MALDI-TOF MS necesita de una base de datos para poder comparar e identificar las especies, es necesario suplementar la base de datos con más cepas referencia de Bcc incluyendo además cepas recientemente descritas, como *B. contaminans*. Con estas modificaciones se ha conseguido mejorar la capacidad de identificar correctamente las especies de un 83% a 98% (94). En este sistema (MALDI-TOF MS) la continua actualización de las bases de datos es de gran importancia para la correcta identificación de las especies microbianas en general.

### 1.3.6. Estudios de clonalidad y epidemiología

Uno de los primeros estudios epidemiológicos de *Burkholderia cepacia*, publicado por Isles *et al.* en 1984, determinó un aumento de la frecuencia de las infecciones de *B. cepacia* en pacientes con FQ de un 10% en el año 1971 a 18% en 1981 (21). En la actualidad, tal y como se ha comentado anteriormente, cerca del 5% de los pacientes con FQ, principalmente adultos se infectan por Bcc. Cabe destacar que todas las especies del complejo *Burkholderia cepacia* han sido aisladas de muestras respiratorias de pacientes con FQ, exceptuando *Burkholderia ubonensis* (12). En la actualidad *B. multivorans* seguida de *B. cenocepacia* son las especies con mayor prevalencia entre los pacientes con FQ (17,31). Ahora bien, esta distribución no se ha mantenido igual a lo largo del tiempo, ni tampoco se da por igual en todos los países. Durante los años noventa y principios del año 2000 en países como Estado Unidos, Canadá, Portugal, Reino Unido, Irlanda e Italia la especie más prevalente fue *B. cenocepacia* (99–103). En cambio, un estudio realizado en Francia durante 1995 a 2000, mostró a *B. multivorans* como la especie más prevalente (104). Aún así esta distribución ha ido evolucionando, un estudio realizado en Estados Unidos en el año 2005 con más de 1200 pacientes con FQ, demostró que entre los años 2001 y 2002 se produjo un cambio, convirtiéndose *B. multivorans* en la especie más prevalente seguida de *B. cenocepacia*, observándose además un ligero aumento de las otras especies (105) (Figura 4).



**Figura 4.** Proporción de aislados obtenidos por primera vez de muestras respiratorias procedentes de pacientes con FQ en EE.UU. entre 1997 y 2004. Figura tomada de Reik *et al.* (105). Los cuadrados blancos corresponden a *B. cenocepacia*, los cuadrados negros a *B. multivorans*, y los triángulos corresponden a otras especies del complejo *Burkholderia cepacia*.

En el Reino Unido se produjo un cambio semejante (57). Se cree que las medidas adoptadas para contener la cepa epidémica *B. cenocepacia* ET-12 (106), que logró diseminarse desde Toronto al resto de Canadá y llegar hasta el Reino Unido, influyó para que descendiera el número de infecciones por esta especie (57). Esta cepa, destaca por su gran capacidad de diseminación, su elevada capacidad patogénica, ya que se relaciona con el “síndrome cepacia” y por consiguiente sus infecciones poseen con frecuencia un mal pronóstico (17,31). Se cree que el estudio realizado por Isles *et al.* en el cual se detecta un gran número de infecciones por Bcc fueron causadas por esta cepa epidémica (57).

La prevalencia de las otras 18 especies comparada con la de *B. multivorans* y *B. cenocepacia*, es menor y variable dependiendo de los países. En Estados Unidos las especies que siguen a *B. multivorans* y *B. cenocepacia* son *B. cepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* y *B. dolosa*, donde suponen cerca del 16% de las infecciones (105), mientras que otros países como Portugal destacaron *B. cepacia* y *B. stabilis*, 36,4% y 18,2% respectivamente (101). En cambio en Brasil se observó *B. cenocepacia* como la especie más prevalente, causando el 67,8% de las infecciones seguida de *B. vietnamiensis* con el 15,2% (107).

Referente a España no existen muchos estudios hasta la fecha que investiguen la epidemiología de Bcc. Un estudio realizado por Medina-Pascual *et al.* con aislados obtenidos entre 1997 y 2010 mostró *B. cenocepacia*, *B. multivorans* y *B. contaminans* como las más prevalentes entre pacientes con FQ (108). En cambio otro estudio desarrollado por Barrado *et al.*, las más prevalentes fueron *B. contaminans* y *B. cepacia* (109). En ambos casos se observó un aumento de la presencia de *B. contaminans* en los últimos años. De hecho en el estudio desarrollado por Medina-Pascual *et al.* de las 28 de *B. contaminans* aisladas en pacientes con FQ, 25 se asilaron durante 2009-2010 (108). Igualmente en el trabajo de Barrado *et al.* la mayoría de los aislados de *B. contaminans* se encontraron entre 2008-2010 (109). Finalmente en Argentina en un periodo de estudio comprendido entre 2004-2010 se observó *B. contaminans* como la especie más prevalente detectándose en el 57,6% de los casos (110).

Ya se ha indicado que estas especies son oportunistas y causan infecciones tanto en pacientes con FQ como en otros con una enfermedad de base diferente; la epidemiología y la distribución de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* es diferente entre estos pacientes. Existe una gran variabilidad en cuanto a las especies de Bcc que infectan a los

pacientes sin FQ. En Italia en un estudio donde la mayoría de muestras eran hemocultivos y heridas quirúrgicas, *B. stabilis* fue la especie más prevalente (111). Mientras que en países como Reino Unido y Estados Unidos, *B. cenocepacia* es la especie más prevalente (57,105). En España *B. stabilis* también resulta ser la especie más prevalente, siendo responsable de provocar diferentes brotes (108).

#### 1.4. Factores de virulencia y capacidad patogénica.

Las infecciones por las especies del complejo *Burkholderia cepacia*, especialmente *B. cenocepacia* y *B. multivorans*, se han relacionado con una mayor morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ (Figura 3; pág. 8). Sin embargo, como los pacientes con FQ suelen infectarse con Bcc más tardíamente que por otras bacterias; existe una cierta controversia sobre si la morbilidad y mortalidad es debida a los factores de virulencia de la bacteria, como apuntan algunos autores, o es causado por el progresivo y elevado deterioro pulmonar acumulado en estos (9,31,112).

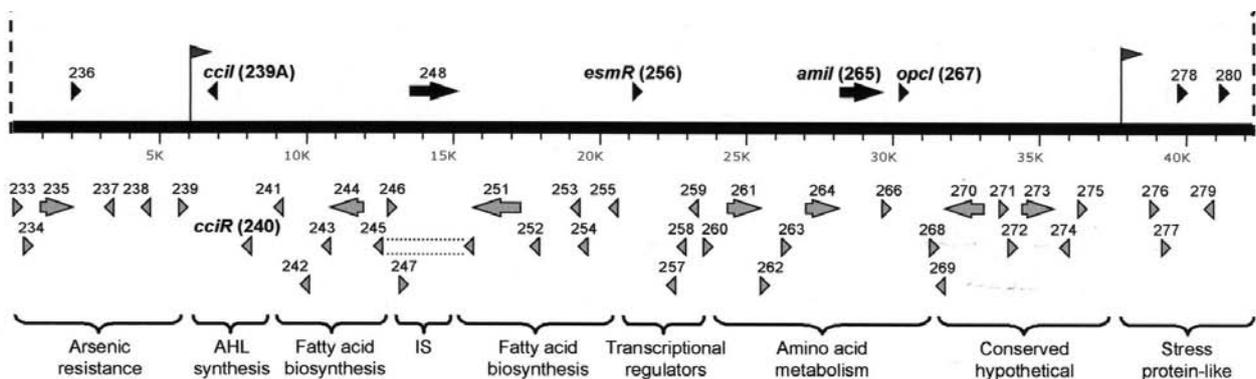
Varios trabajos realizados hasta la fecha han permitido determinar algunos factores de virulencia en estas bacterias. Cabe destacar que la mayoría de los estudios se han realizado en la especie *B. cenocepacia*, con las cepas ET-12 y PHDC, debido a que esta especie se ha relacionado con una mayor virulencia y genio epidémico; aunque, obviamente, el estudio de una sola especie difícilmente puede representar el comportamiento de todo el complejo *Burkholderia cepacia* (113).

Los principales factores de virulencia que se han considerado en estas bacterias son; i) presencia de islas de patogenicidad y elementos genéticos móviles, ii) sistemas de *quorum sensing* (QS), iii) biofilm, iv) pili y adhesinas, v) movilidad, vi) lipopolisacárido y exopolisacárido vi) resistencia al estrés oxidativo y evasión del sistema inmune y vii) fosfolipasas, lipasas, sideróforos, metaloproteasas y factores sigma.

##### 1.4.1. Islas de patogenicidad y elementos genéticos móviles.

A partir de la secuenciación del genoma de la cepa epidémica *B. cenocepacia* ET-12 se determinó la presencia de más de 79 secuencias de inserción, además de catorce islas de patogenicidad repartidas entre tres cromosomas y un plásmido. Esta cepa posee los genes denominados *cbIA* y *esmR*. El gen *cbIA* codifica una proteína que forma parte de la estructura de un gran pili de tipo II que tiene forma de cable, mientras que el gen *esmR* codifica una proteína reguladora transcripcional que se localiza en la isla de patogenicidad denominada como *genomic island II* (114,115).

El gen *esmR*, también se ha denominado *B. cepacia epidemic strain marker* (BCESM), debido a que se relacionó con en la cepa epidémica *B. cenocepacia* ET-12, se utilizó como un marcador clínico de alto riesgo entre los pacientes con FQ; aunque no se ha demostrado que este gen tenga función patogénica (115). Sin embargo, un estudio realizado por Baldwin *et al.* determinó que el gen *esmR* y por tanto el marcador epidémico BCESM, se encontraban dentro de una isla de patogenicidad denominada en un primer momento *B. cenocepacia island* (CCI) de 31.7 kb (116); en la actualidad esta isla de patogenicidad se denomina *genomic island II*. Principalmente esta isla de patogenicidad se ha descrito en *B. cenocepacia* aunque algunos autores también describieron la presencia de BCESM en otras especies de Bcc (103). Esta isla de patogenicidad contiene tanto genes de virulencia como; i) los genes *ccil* y *cciR* que forman parte del sistema *quorum-sensing* (QS), ii) genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo de ácidos grasos, iii) un conjunto de genes que transcriben reguladores transcripcionales, incluido el gen *esmR* y iv) genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo y transporte de aminoácidos, como los genes *amil* y *opcl*, que codifican una amidasa y una porina respectivamente (Figura 5) (116). Sin embargo un estudio posterior realizado por Holden *et al.* concluyó que *genomic island II* tenía un tamaño de 44 kb, incluyendo, genes de resistencia al arsénico, genes asociados a resistencia a los antibióticos, genes con homología a proteínas de respuesta al estrés y genes que codifican proteínas implicadas en el transporte de iones y sulfato; además de los descritos anteriormente por Baldwin *et al.* (58).



**Figura 5.** Detalle de los genes presentes en la isla de patogenicidad que contiene BCESM descrita en las cepa *Burkholderia cenocepacia* ET-12. Imagen tomada de Baldwin *et al* (116).

### 1.4.2. Quorum sensing (QS)

El QS es un mecanismo regulador dependiente de la densidad celular mediante el cual las bacterias coordinan la expresión de algunos genes con la ayuda de moléculas señal difusibles, producidas por la propia bacteria. Todas las especies de Bcc tiene al menos un sistema de QS, homólogo a las proteínas LuxI y LuxR de *Vibrio fischeri*. LuxI sintetiza una molécula señal AHL (lactona N-acil-hemoserina) y LuxR es una proteína receptora de AHL que activa o reprime la expresión de múltiples genes, incluyendo genes de virulencia. Las moléculas señal AHL pueden diferir en cuanto a longitud y cambios en su cadena acil (117). En las especies de Bcc se ha descrito un sistema QS mediado por las proteínas CepI y CepR (118). La proteína CepI está relacionada con la síntesis de la lactona N-octonoyl-hemoserina (C8-HSL) y N-hexanoyl-hemoserinas (C6-HSL), como moléculas señal, mientras que la proteína reguladora CepR es sensible a esas moléculas señal AHL, que a su vez activará o reprimirá la transcripción de múltiples genes (117). Diferentes estudios han mostrado que la alteración de este sistema *cepRI*, incrementa la producción de sideróforos, disminuye las proteasas extracelulares y la actividad de las lipasas (118). Además también se ha observado la relación de este sistema QS con la estabilidad del biofilm así como la movilidad celular (113). Tal y como se ha comentado anteriormente algunas cepas de Bcc como, *B. cenocepacia* ET-12, tiene un segundo sistema de QS integrado en un isla de patogenicidad. En este caso el QS CciIR, la AHL sintasa CciI produce grandes cantidades de C6-HSL y pequeñas cantidades de C8-HSL, siendo ambas moléculas señales afines a la proteína receptora CciR. Ambos sistemas de QS, el sistema CepIR y el CciIR, interactúan entre ellos. Parece ser que CepR regula positivamente la expresión del operón *cciIR*, mientras que CciR reprime la expresión de *cepI*. Es decir, CepR es principalmente un regulador positivo mientras que CciR es un regulador negativo de la expresión génica (113,117). Otro sistema de QS denominado BviIR ha sido descrito en *B. vietnamiensis*, en este caso la AHL sintasa (BviI), produce la lactona N-decanoyl-hemoserina (C10-HSL), y la presencia de CepR es necesaria para la expresión de BviIR (119).

Finalmente, cabe indicar que los genes que codifican las proteínas AHL sintasa y la respectiva proteína receptora se encuentran relativamente cercanos uno del otro en el genoma. Sin embargo, estudios recientes han determinado una elevada presencia de proteínas homologas a LuxR en todo el genoma de Bcc en comparación con las proteínas AHL. En particular se ha descrito un tercer regulador denominado CepR2 aunque no se encuentra

asociado a ninguna proteína AHL. Parece ser que esta proteína homóloga de LuxR “huérfana” de AHL no está involucrada en la regulación de *cciIR* y *cepIR*, aunque CepR parece ser necesario para la producción asociada a la proteína homóloga de LuxR, CepR2, del sideróforo pioquelina (117,120).

### 1.4.3 Biofilm

Es bien sabido que Bcc tiene capacidad de formar biofilm, aunque el proceso exacto de regulación aún queda por determinar. Probablemente están implicados los sistemas de QS, así como el factor sigma RpoN, y reguladores tipo Lys-R. Además, el biofilm, puede verse afectado por la síntesis de exopolisacárido, por la movilidad bacteriana y la presencia de hierro en el medio (31,113). La capacidad de formar biofilm comporta un aumento de la resistencia a los antibióticos así como una barrera protectora del sistema inmune del huésped. En el próximo capítulo se detallan más características de este fenómeno.

### 1.4.4. Adhesinas y fimbrias.

La adherencia de las cepas patogénicas a las células frecuentemente se asocia a la presencia de pili (fimbrias) y adhesinas no fimbriadas. En las cepas de Bcc se han descrito mediante microscopía electrónica hasta cinco tipos de pili morfológicamente diferentes (121). Aunque el más estudiado es el pilus con forma de cable (*cbl*) que se ha relacionado con la cepa epidémica de gran virulencia *B. cenocepacia* ET-12; de hecho, como se ha comentado anteriormente a esta cepa se le asocian los genes *cbIA* y *esmR*. El gen *cbIA*, es un gen que forma parte de un operón que codifica un tipo de pilus de disposición períttrica de una longitud de entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ . El operón denominado *cbl*, contiene siete genes diferentes, de los cuales cuatro son estructurales (*cbIA*, *cbIB*, *cbIC* y *cbID*) y tres tienen función reguladora (*cbIR*, *cbIS* y *cbIT*). El gen *cbIA*, codifica la subunidad más grande del pili; el gen *cbIB*, codifica una chaperonina; el gen *cbIC*, codifica la proteína acomodadora y el gen *cbID*, codifica una subunidad menor dentro de la estructura del pili (31,58). En un primer momento se pensó que este pili en forma de cable tenía la capacidad de adherirse a las células epiteliales del tracto respiratorio, en concreto a la proteína receptora citoqueratina 13 (CK13); cabe destacar que a

diferencia del epitelio normal, el epitelio hiperplásico bronco-alveolar de los pacientes con FQ se encuentra enriquecido en CK13 (122,123). Sin embargo, un estudio reciente demostró que los mutantes defectivos de este operón *cbl* aun tenía la capacidad de adherirse a la CK13, y que la unión estaba mediada por una adhesina denominada adhA de 22KDa. De hecho se concluyó que los mutantes defectivos de este pili perdían un 50% su capacidad de adhesión mientras que los defectivos de la adhesina adhA tan solo se acoplaban a la CK13 entre un 0 y 8% (124). De manera que parece ser que la unión *B. cenocepacia* ET-12 a la CK13 es mediante la adhesina adhA aunque para obtener una óptima adhesión es necesaria la actuación conjunta del pili en forma de cable junto con la adhesina (31,124).

La función de la adhesina y el pili en forma de cable no termina en la adhesión a la citoqueratina 13, un estudio reciente ha relacionado la capacidad de transmigración de *B. cenocepacia* a través del epitelio escamoso con el pili *cbl* y la adhesina adhA. Parece ser que cepas mutantes defectivas de los genes *cblA*, *cblS* y *adhA* perdían la capacidad de emigrar a través del epitelio. Sin embargo, se precisan más estudios para determinar con exactitud qué papel juegan, tanto el pili como la adhesina, en el proceso de emigración a través de las células epiteliales (124). Finalmente parece ser que tanto el pili como la adhesina, expresados por las cepas *B. cenocepacia* ET-12, se relacionan con las infecciones persistentes y su diseminación a través de las vías respiratorias, así como también en la estimulación de la respuesta de la interleucina 8, con la consiguiente inflamación (125).

Además del pili en forma de cable, también destacan la presencia de los pili de tipo FLP y tipo IV que intervienen en una gran variedad de procesos como la adhesión a las células epiteliales, cambios en la movilidad y iniciación y desarrollo del biofilm (58).

#### **1.4.5. Movilidad**

Los flagelos no solo permiten la movilidad de la bacteria sino que además poseen una cierta capacidad de adherencia al epitelio pulmonar, por lo que constituyen un importante factor de virulencia. Además en el caso de *B. cenocepacia* se ha relacionado la presencia de flagelos con la capacidad de invadir las células epiteliales de la vías respiratorias del huésped (126). En *Bcc* se han descrito dos tipos de flagelinas (la subunidad más grande que forma parte

del flagelo) diferenciables por su tamaño (55kDa el tipo I y 45 kDa el tipo II) y por los polimorfismos presentes en los patrones de restricción (RFLP) del gen *fliC* (127).

#### 1.4.6. Lipopolisacárido y exopolisacárido.

La presencia del lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa de estas bacterias también se ha considerado como un factor de virulencia, principalmente por su capacidad de inducir la producción de sustancias proinflamatorias por parte de las células del sistema inmune como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina 6 (IL-6) (128). Se ha observado que el LPS de la especie *B. cepacia* posee una capacidad nueve veces superior que el LPS de *P. aeruginosa* para estimular la producción de estas citoquinas proinflamatorias (129).

Otro aspecto característico en las especies del complejo *Burkholderia cepacia* es la capacidad que tienen la mayoría de ellas de producir un exopolisacárido (EPS) mientras están colonizando las vías respiratorias de un paciente con FQ. Se han descrito hasta siete tipos diferentes de EPS producidos por Bcc, aunque el que se encuentra en mayor número es el denominado “cepacia”. Este polisacárido está compuesto por unidades repetidas de un heptasacárido acetilado altamente ramificado formado por una D-glucosa, una D-ramanosa, una D-manosa, tres D-galactosa, y un ácido D-glucurónico (130). Algunas especies producen un solo tipo de exopolisacárido mientras que otras pueden llegar a formar una mezcla de diferentes tipos de exopolisacáridos. Una sobreproducción de EPS confiere a la bacteria una morfología de tipo mucóide, en cambio si este EPS se produce en baja cantidad o no se produce la morfología de la bacteria es no mucóide siendo generalmente lisa (131,132). En el caso de *P. aeruginosa* también se ha observado la capacidad de formar EPS (alginato) en pacientes con FQ, de hecho en su caso se cree que las cepas en un primer momento que infectan al paciente tienen un fenotipo no mucóide para después convertirse en mucóide. En el caso de *P. aeruginosa* el fenotipo mucóide, y por tanto, la producción de EPS se relaciona con una mayor morbilidad y mortalidad entre los pacientes con FQ (133). En cambio, en el caso de las Bcc el fenotipo no mucóide se relaciona con un peor pronóstico para los pacientes de CF; la cepa epidémica *B. cenocepacia* ET-12 relacionada con el “síndrome cepacia” no es de fenotipo mucóide (134,135). En el caso de las Bcc se produce un cambio en la morfología de mucóide a no mucóide durante el transcurso de una infección crónica, además estudios “in vitro”

mostraron que el uso de antibióticos como la ceftazidima o ciprofloxacina podrían influir en esta conversión (134). Algunos autores apuntan que la producción de EPS por parte de Bcc es necesaria para sobrevivir en el ambiente (134–136). Mientras que un estudio realizado por Bylund *et al.* demostró mediante un experimento *in vitro* que el exopolisacárido producido por las especies de Bcc tiene la capacidad de inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos así como resistir a las especies reactivas de oxígeno (ROS), hecho que ayudaría a la bacteria a persistir en las vías respiratorias (137).

#### **1.4.7. Resistencia al estrés oxidativo y evasión del sistema inmune.**

La capacidad de las especies de Bcc de resistir al estrés oxidativo, está altamente asociada a la capacidad de sobrevivir en los macrófagos. Las dos mayores “armas” de los macrófagos para eliminar los patógenos son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés). Por parte de la bacteria, para promover la detoxificación del superóxido producido por el macrófago, necesita la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno mediante la enzima superóxido dismutasa, seguida de la eliminación del peróxido de hidrógeno, procesos llevados a cabo por catalasas y/o peroxidasas. En el caso de *B. cenocepacia* se ha descrito una enzima superóxido dismutasa, SodC, y dos enzimas catalasas/peroxidasas denominadas KatA y KatB (113). Un estudio reciente mostraba la presencia de genes homólogos a *hmpA* que codifican proteínas que intervienen en la detoxificación del óxido nítrico (58).

Por otra parte se ha descrito la habilidad de *B. cenocepacia* para infectar y sobrevivir intracelularmente en macrófagos, células epiteliales, células dendríticas, neutrófilos y amebas (113). Los mecanismos por los cuales la bacteria es capaz de mantenerse y sobrevivir intracelularmente no están claros, aunque estudios recientes han mostrado que una vez la bacteria entra dentro del macrófago; el fagosoma formado por la entrada de la bacteria en vez de fusionarse con el lisosoma para eliminar la bacteria, consigue dirigirse al retículo endoplasmático cosa permitiendo que la bacteria se replique y sobreviva (129). Cepas mutantes de *B. cenocepacia* defectoras del sistema de secreción tipo IV denominado PtW4SS, son degradadas por los lisosomas, sugiriendo que esta molécula puede intervenir en este proceso (129). Además de prevenir la fusión de los endosomas con los lisosomas, *B. cenocepacia*

también retrasa la maduración de las vacuolas en los macrófagos. Estudios recientes mostraron como retrasando la acidificación de las vacuolas que contienen la bacteria impedían que estas se unieran al lisosoma para ser degradadas (138,139). Sin duda, son necesarias más investigaciones para esclarecer cómo y qué factores de la bacteria permiten modificar las vías endosomáticas normales de la célula para utilizarlas en su propio beneficio, así como qué factores de la bacteria permiten retrasar la acidificación de la vacuola.

Por otra parte estudios recientes en macrófagos murinos determinaron que *B. cenocepacia*, requería de la proteína MgtC para sobrevivir en el fagosoma de los macrófagos, aunque por otro lado parece ser que no es necesaria para resistir *in vitro* a las condiciones que se producen en los macrófagos, como pH ácido y resistencia al estrés oxidativo. En definitiva se requieren más estudios para esclarecer la función de esta proteína (113).

#### **1.4.8. Fosfolipasas, lipasas, sideróforos, metaloproteasas y factores sigma.**

Las fosfolipasas son abundantes en los procariontes, en el caso de *B. cenocepacia* se han descrito un total de cinco fosfolipasas homólogas a la fosfolipasa C de *P. aeruginosa* (58).

Por otro lado, también se ha descrito la capacidad de Bcc de secretar lipasas. Estudios recientes mostraron, como inhibiendo la producción de lipasas en cepas pertenecientes a las especies *B. cenocepacia* y *B. multivorans* disminuían significativamente la capacidad de invasión en las células epiteliales (140).

La capacidad de crecer en condiciones donde el hierro es un factor limitante, es una característica de los patógenos, más teniendo en cuenta que en el huésped el hierro se encuentra unido a quelantes. En las especies de Bcc se han descrito hasta cuatro sideróforos distintos; la pioquelina, la ornibactina, la cepaciaquelina y la cepabactina, siendo el quelante de hierro ornibactina más predominante entre las cepas de *B. cenocepacia* (141).

*B. cenocepacia* produce dos metaloproteasas diferentes, denominadas ZmpA y ZmpB, con capacidad para degradar colágeno y fibronectina, además de tener una gran capacidad

para degradar un gran número de sustancias defensivas del hospedador, como la lactoferrina, inmunoglobinas, interferón- $\gamma$  y péptidos antimicrobianos, entre otros (31,113,129).

Otros factores de virulencia descritos en *B. cenocepacia* son los factores sigma RpoE y RpoN. En un estudio realizado con macrófagos murinos se observó que estos factores sigma eran necesarios para prolongar la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago, debido a que retrasaban la unión del fagosoma al lisosoma. Sin embargo otras funciones se han asociado a estos factores. En cuanto al factor RpoN, se ha relacionado con la movilidad y capacidad de formar biofilm por parte de *B. cenocepacia*, mientras que el factor RpoE, parece ser necesario para la supervivencia de la bacteria en situaciones de estrés extracelular, como la temperatura y la osmolaridad (142,143). Finalmente cabe destacar que la proteína HtrA también es esencial para la supervivencia de Bcc en situaciones de elevadas temperaturas y elevadas concentraciones de sal (144).

En definitiva, las especies de Bcc tienen una gran variedad de factores de virulencia y probablemente actúan conjuntamente infectando de una manera crónica o causando una enfermedad aguda a los hospedadores. Sin embargo, la actividad algunos de ellos solo se han comprobado *in vitro* o en solo un modelo de infección, siendo necesarios más estudios para confirmar esta capacidad patogénica y cómo éstos influyen en el huésped (113).

## 1.5 Sensibilidad del complejo *Burkholderia cepacia* a los antimicrobianos

Las especies del Bcc, destacan por su gran virulencia, que condiciona un mal pronóstico entre los pacientes con FQ. Otra de las causas del mal pronóstico de estos pacientes se relaciona con la elevada resistencia del Bcc a los diferentes antimicrobianos, de hecho, las especies de este complejo están consideradas entre las más resistentes de las aisladas en los laboratorios clínicos (17).

### 1.5.1. Patrón de sensibilidad de las cepas salvajes. Resistencia natural.

Las especies del Bcc son sensibles *in vitro* a la piperacilina, a las cefalosporinas cefotaxima y ceftazidima, al meropenem y al sulbactam o tazobactam asociados a un  $\beta$ -lactámico. También son sensibles al cloranfenicol, a la ciprofloxacina y al trimetoprim-sulfametoxazol. Por el contrario son naturalmente resistentes a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, incluidas las aminopenicilinas, la ticarciclina, la ticarciclina asociada al ácido clavulánico, las cefalosporinas de primera y segunda generación, y al imipenem, aunque en este caso la resistencia acostumbra a ser de bajo nivel. Asimismo son resistentes a los aminoglicósidos y las polimixinas (145).

Además, son muy frecuentes las resistencias adquiridas a la piperacilina, la ceftazidima, el meropenem, a los  $\beta$ -lactámicos asociados con sulbactam, a la ciprofloxacina y al trimetoprim sulfametoxazol. Así pues, las opciones terapéuticas para tratar a los pacientes con FQ infectados/colonizados por Bcc se reducen a los escasos antimicrobianos activos señalados. Dada la posible adquisición de resistencias, cabe estudiar en cada cepa su patrón de sensibilidad mediante el antibiograma (145).

### 1.5.2. Mecanismos de resistencia del complejo *Burkholderia cepacia* a los antimicrobianos.

La característica principal del Bcc es la multirresistencia natural a los  $\beta$ -lactámicos; esta multirresistencia sería la consecuencia de la acción de diferentes mecanismos, como la producción de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas y la disminución de la concentración de

antibióticos en la célula bacteriana por bloqueo de la permeabilidad y/o la expulsión activa de estos.

En un estudio realizado por Holden *et al*, en el cual se realizó la secuenciación del genoma completo de una cepa de *B. cenocepacia*, se detectó la presencia de cuatro posibles  $\beta$ -lactamasas. Dos pertenecían a la clase A, mientras que las otras dos restantes eran de las clases C y D según la clasificación de Ambler (Tabla 3) (58). En un trabajo de Poirel *et al* se estudia en *B. cenocepacia* la presencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible de clase A (PenA) (146,147). La expresión de esta enzima se encuentra regulada por una proteína reguladora de tipo LysR. Esta  $\beta$ -lactamasa tiene actividad hidrolítica para la mayoría de penicilinas, algunas cefalosporinas de amplio espectro y una cierta actividad para el aztreonam. Estos autores señalan la correlación entre las diferentes especies de Bcc y sus correspondientes  $\beta$ -lactamasas (147).

**Tabla 3.** Principales mecanismos de resistencia del complejo *Burkholderia cepacia*. Adaptada de Holden *et al.* 2009 (58).

Tipo de $\beta$ -lactamasa	Actividad	Referencia(s)
Clase A	$\beta$ -lactámicos, ceftazidima y ácido clavulánico	(146,147)
Clase C	$\beta$ -lactámicos	(148)
Clase D	$\beta$ -lactámicos	(149)
Bombas de expulsión		Referencia(s)
ABC	Macrólidos	(150)
RND	Aminoglicósidos, olaquinox, cloranfenicol, trimetoprim y ciprofloxacino.	(151–153)
MATE	Polimixina	(154)
MFS	*	(58)
SMR	*	(58)
FARP	*	(155)

RND, *resistance nodulation división*; MATE (*multidrug and toxic compound extrusión*); MFS, *major facilitator superfamily*; SMR, *small multidrug resistance*; FARP, *fusaric acid resistance family proteins*; \* No se conoce con precisión si estos mecanismos tiene alguna función en la resistencia a los antimicrobianos.

Un estudio realizado por Burns *et al* demuestra la presencia de bombas de expulsión en la membrana de estas especies que confieren resistencia al cloranfenicol, las fluoroquinolonas y el trimetoprim (151). De hecho, tras la secuenciación del genoma completo de *B. cenocepacia*, se constató la presencia de seis de las grandes familias de bombas de expulsión existentes en los procariotas: MFS (*major facilitator superfamily*), ABC (*ATP-binding cassette*), RND (*resistance nodulation división*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusión*), SMR (*small multidrug resistance*) y FARP (*fusaric acid resistance family proteins*) (58). Sin embargo, en algunos casos son necesarios más estudios para conocer con precisión el papel que desempeñan en la resistencia a los antimicrobianos (Tabla 3).

Como se ha comentado anteriormente las especies de Bcc producen un lipopolisacárido (LPS) característico. Este LPS, aparte de ser considerado un factor de virulencia, también tiene un papel determinante en la resistencia intrínseca a diferentes antibióticos, los aminoglicósidos y las polimixinas, al conferir a la bacteria un grado de impermeabilización que impide la entrada de esos agentes antimicrobianos. Las características moleculares del lipopolisacárido de Bcc son substancialmente diferentes a los de otras especies. Es destacable, el bajo número de dominios aniónicos del LPS de Bcc, solo tiene dos fosfatos, mientras que otras especies como *P. aeruginosa* tiene entre 12 y 18. Además, uno de estos fosfatos se encuentra unido a 4-amino-deoxiarabinosa, que presumiblemente forma un puente de sal con el fosfato adyacente. Esto hace que los antibióticos catiónicos no tengan lugar donde unirse (156–158).

### 1.5.3. Epidemiología de la resistencia adquirida

Los pacientes con FQ infectados crónicamente por las especies del complejo *Burkholderia cepacia*, requieren de un tratamiento antimicrobiano intenso que expone a este conjunto de bacterias a prolongados periodos de presión selectiva de los antibióticos. Consecuentemente, en pacientes con FQ es frecuente encontrar cepas resistentes a todos los antibióticos disponibles (17). Un estudio realizado por Bevivino *et al* mostró que el nivel de resistencia de las cepas clínicas era superior al de las cepas ambientales, sugiriendo la relación entre el uso de antibióticos en la práctica clínica y la resistencia adquirida por las cepas (159).

En general, las resistencias están en relación con los antibióticos administrados. En la tabla 4 se muestra la recopilación de diferentes trabajos en los cuales se analizó la resistencia a los antibióticos de aislados de Bcc procedentes de pacientes con FQ. Cabe destacar la elevada resistencia de las cepas del complejo a casi todos los antibióticos; aunque se observan variaciones según el país y el estudio. Por ejemplo en el realizado por Golini *et al*, el trimetoprim-sulfametoxazol fue el menos efectivo, siendo el 80.5% de las cepas resistentes; mientras que en el estudio realizado por Barrado *et al*, solo el 12.5% de las cepas fueron resistentes a este mismo antimicrobiano (103,109). Otros autores en cambio consideran que la resistencia a los antibióticos depende de la resistencia intrínseca del grupo taxonómico a que pertenecían los aislados. Es decir, que no todas las especies tienen el mismo nivel de resistencia a los antibióticos, siendo *B. cenocepacia*, y en particular la cepa epidémica ET-12, más resistente que el resto (160,161). Otros autores han mostrado que *B. multivorans* es también una de las especies más resistentes del complejo (108).

**Tabla 4.** Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos de aislados del complejo *Burkholderia cepacia* procedentes de pacientes con FQ en diferentes países.

País	PTZ	CAZ	IMI	MER	SXT	CIP	LVX	Referencia
Italia	29%	16%	37%	31%	60%	44%	51%	(159)
Italia	35.5%	31.1%	64.4%	NE	80.5%	78.9%	NE	(103)
Portugal	13%	4%	20-33%	NE	20-33%	64.0%	NE	(161)
España	NE	50%	90%	10%	20%	80%	60%	(162)
España	NE	6.2%	NE	31.2%	12.5%	NE	37.5%	(109)
España	NE	35.9%	74.3%	NE	37.9%	NE	45.9%	(108)

PTZ, piperacilina-tazobactam; CAZ, ceftazidima; IMI, imipenem; MER, meropenem; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LVX, levofloxacina; NE, no evaluado.

Durante las infecciones crónicas por Bcc en los pacientes con FQ, los cambios en el patrón de resistencia de cepas se suceden con cierta asiduidad, pudiendo ser en un principio sensibles a algunos antibióticos para luego ser resistentes y viceversa (163). En los pacientes con FQ se pueden producir infecciones por más de una especie o incluso dentro de una misma especie, por distintas subpoblaciones y distintas cepas; estas coinfecciones pueden dar resultado a patrones de resistencia distintos propios de cada una de ellas (164). Asimismo, durante el proceso de infección también puede suceder un reemplazo de la cepa inicial, es decir, que se produzca una segunda infección por una cepa diferente a la que causó infección en un primer momento; con el consiguiente cambio en el patrón de resistencia (165,166).

Otros autores postulan que estas variaciones en los patrones de resistencia no son debido a la presencia de cepas diferentes o a un posible reemplazo de la cepa inicial sino que son cepas isogénicas con distinto fenotipo (161,167). No hay una certeza definitiva de las causas de estas variaciones fenotípicas. Aún así, estudios recientes mostraron como existía una correlación entre los periodos de exacerbación con la existencia de fenotipos resistentes, sin que la presión selectiva de los antibióticos sea un factor determinante; en los periodos estables se aislaron los fenotipos más sensibles a los antimicrobianos (167). Por el contrario, otros autores sí que asocian el aislamiento de fenotipos resistentes con pacientes tratados a largas terapias antimicrobianas durante los periodos de exacerbaciones (161).

La relación entre cepas multirresistentes e hipermutables, ha sido documentada en diferentes patógenos. En concreto en el caso de *P. aeruginosa* las cepas hipermutadoras obtenidas de muestras respiratorias de pacientes con FQ tienen un perfil de multirresistencia superior a las cepas no mutadoras; además de tener una mayor facilidad para adquirir resistencia a otros antibióticos (168,169). En el caso de Bcc, se observó una elevada presencia de cepas hipermutables en pacientes crónicamente infectados; pero a diferencia de *P. aeruginosa*, solo se estableció una relación significativa de las cepas hipermutadoras con la resistencia a ciprofloxacina (170).

En todo caso, estos estudios demuestran la gran capacidad de adaptación que tiene Bcc a los múltiples cambios que se producen en el ambiente de las vías respiratorias de los pacientes con FQ (161). Sin embargo, son necesarios más datos para determinar la regulación que permite a las cepas ser más o menos tolerantes a los antibióticos y qué mecanismos influyen en este proceso.

## 1.6 Biofilm

Los biofilms bacterianos se forman cuando los organismos unicelulares se unen para formar una comunidad que se encuentra fijada en una superficie sólida recubierta por una matriz exopolisacárida. Los biofilms pueden estar compuestos por una o múltiples especies, de hecho los biofilms que se forman en la cavidad bucal pueden llegar a contener más de 500 especies bacterianas distintas (171).

### 1.6.1. Importancia del biofilm en patología infecciosa

La capacidad de formar biofilm por parte de los procariontes ha sido ampliamente demostrada, tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. En el caso de los grampositivos; las bacterias pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, tienen capacidad para formar biofilm. En el caso de las bacterias gramnegativas, la mayoría de enterobacterias como *E. coli*, y los bacilos gramnegativos no fermentadores como *P. aeruginosa*, el complejo *Burkholderia cepacia* y *S. maltophilia*, también tienen capacidad para formar biofilm.

Se han descrito multitud de infecciones en humanos donde el biofilm formado por las bacterias tiene un papel relevante. Por ejemplo se ha descrito la formación de biofilms en endocarditis y en casos de prostatitis crónicas, donde la bacteria ha ascendido desde el uréter hasta la glándula prostática. En las infecciones periodontales también se han descrito casos donde las bacterias aisladas tienen capacidad para formar biofilms (172). Finalmente, en los pacientes con FQ es frecuente aislar bacterias causantes de infecciones pulmonares asociadas a biofilm.

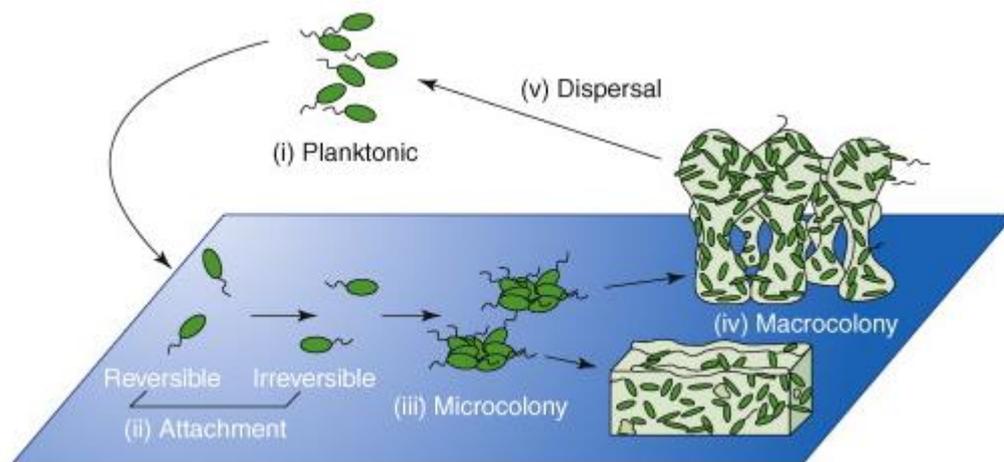
Vista la gran capacidad de las bacterias de producir biofilm en una gran variedad de ambientes, otro de los enclaves donde las bacterias acostumbran a desarrollar estas estructuras son en los dispositivos médicos introducidos en los pacientes. Las válvulas cardíacas protésicas, los catéteres intravasculares y urinarios, las lentes de contacto y los dispositivos intrauterinos son otros dispositivos donde con más frecuencia las bacterias crecen formando biofilm (172). En pacientes con una otitis media crónica con drenaje transtimpánico mediante la inserción de un pequeño tubo en el tímpano también se han descrito en el drenaje

la formación de biofilm. Algunos de estos dispositivos son de vital importancia para la supervivencia del paciente, por ello se han desarrollado algunas estrategias para eliminar el biofilm; como la administración prolongada de antibióticos, o el recubrimiento de estos dispositivos mediante metales con efectos bactericidas o bacteriostáticos como la plata (173).

Una de las principales características del biofilm es una resistencia a los antibióticos. La producción por parte de la bacteria de una matriz exopolisacárida es uno de los elementos característicos de los biofilms. Algunos autores atribuyen a la formación de este exopolisacárido como un elemento que dificulta la penetración de los agentes antimicrobianos a las células que se encuentran en el interior del biofilm, hecho que aumentaría la resistencia de los biofilms (174). Otra característica del biofilm que favorece a la resistencia es el lento crecimiento de las células del interior del biofilm. Cabe destacar que a un cultivo de células cuando les falta un nutriente su crecimiento se ralentiza, durante la transición de la fase exponencial a un crecimiento más lento se produce un incremento a la resistencia de estas células. En el caso de las células que se encuentran en el interior de los biofilms maduros se cree que tienen alguna limitación de nutrientes, de manera que estas también disminuyen la velocidad de crecimiento, este cambio fisiológico de estas células permite que los biofilms incrementen su resistencia a los antimicrobianos. En un biofilm existe una gran heterogeneidad a nivel celular, de manera que la respuesta a los agentes antimicrobianos puede variar según la ubicación de la célula dentro del biofilm (171). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la baja tasa de crecimiento de las células que se encuentran en el interior del biofilm no se debe solo a la limitación de nutrientes, sino también a una respuesta al estrés general iniciado por el crecimiento dentro del biofilm. El regulador central de la respuesta al estrés general es el factor sigma RpoS y tiene un papel importante en situaciones de estrés extracelular por modificaciones de la temperatura y/o la osmolaridad. Parece ser que la expresión de RpoS sucede tanto en la fase estacionaria y como consecuencia de la elevada densidad celular que se produce en los biofilms (175). Sin embargo, en el biofilm no existe un único elemento que determine la resistencia a los agentes antimicrobianos; probablemente es un conjunto de diferentes mecanismos los que permiten que el biofilm sea más resistente.

### 1.6.2. Formación y desarrollo de las estructuras de biofilm

Los análisis microscópicos, realizados principalmente en bacterias gramnegativas, han dado lugar a la descripción general de la formación de biofilm como un proceso temporal que implica la transición a través de distintas etapas de una organización multicelular (176). Estas etapas o fases han sido descritas como una primera etapa planctónica, una segunda fase de anclaje al sustrato; que dará lugar a un proceso de formación de microcolonias, que se desarrollaran formando macrocolonias y a una etapa final de dispersión (Figura 6) (177).

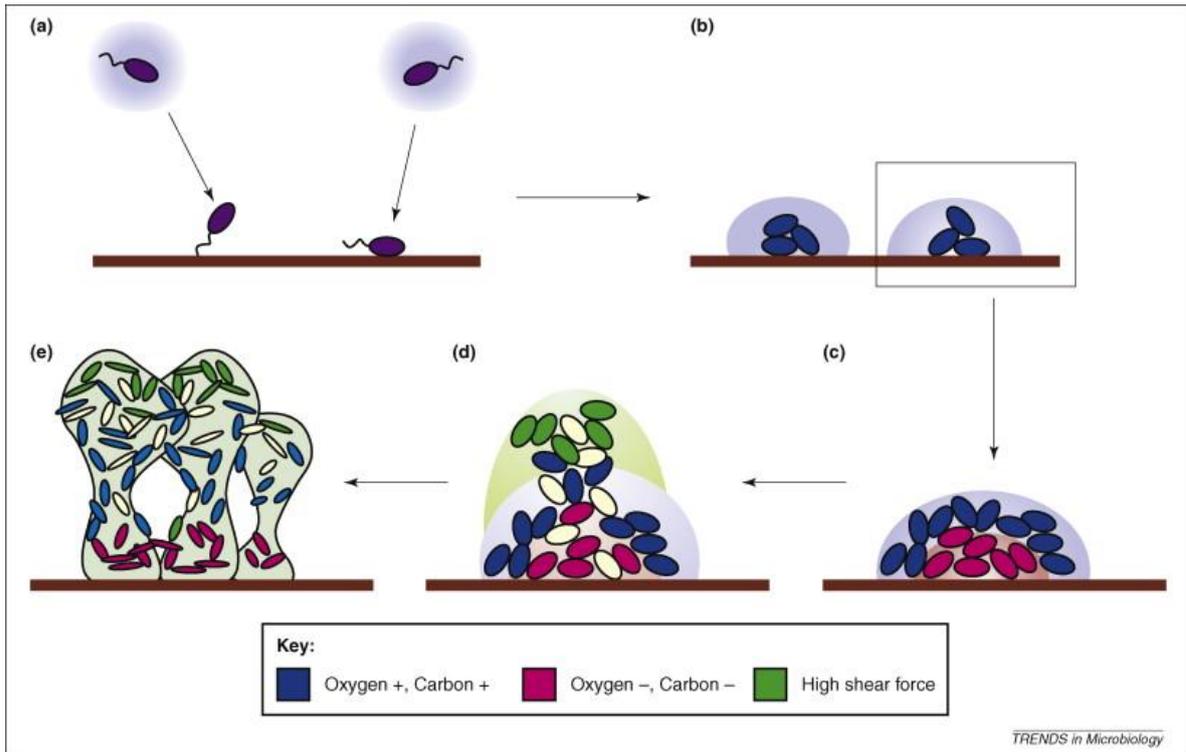


**Figura 6:** Modelo de desarrollo de la formación de biofilm. Imagen tomada de Monds *et al.* (177).

Cabe destacar que la fase de anclaje a menudo se ha subdividido en etapas reversibles e irreversibles debido a que inicialmente la unión inicial de las bacterias con la superficie es débil, siendo necesaria la activación de otros mecanismos por parte de las células para la transición a una asociación más estable con la superficie. La formación de pequeñas células se refiere a la formación de microcolonias, debido al crecimiento clonal de células unidas a la superficie o por la translocación activa de células en toda la superficie. Estas microcolonias crecen en tamaño y se unen para formar macrocolonias. En general morfológicamente estas macrocolonias tienen un aspecto de seta, aunque también pueden darse otras morfologías como la plana; esta fase también se denomina como biofilm maduro. Finalmente, estas macrocolonias en parte pueden llegar a disolverse, desprendiéndose del biofilm algunas células que se encontrarán de nuevo en fase planctónica, pudiéndose iniciar de nuevo este ciclo en una nueva localización (177,178). En conjunto, estas cinco transiciones marcadas morfológicamente y molecularmente probablemente constituyen los puntos de control del

ciclo de desarrollo del biofilm, que una vez superados evitan que las células vuelvan al punto anterior. Es decir, estos puntos de control aseguran las condiciones adecuadas para pasar a la siguiente etapa del desarrollo (177).

No existe un solo modelo que explique la formación y desarrollo del biofilm. Otros autores como Klausen *et al.*, sostienen que no hay ninguna evidencia de que los microorganismos posean un programa genético completo para el desarrollo del biofilm; sino que las asociaciones que se producen en los biofilms son debidas a la culminación de las medidas individuales adoptadas por cada una de las bacterias en respuesta a su ambiente específico (179). En la figura 7 se representa el desarrollo de este tipo de biofilm. En un primer momento y en respuesta a señales apropiadas las células se adhieren a la superficie. Estas células en un ambiente donde el oxígeno y los nutrientes no son limitantes, se reproducen formando microcolonias. Sin embargo, este crecimiento de unas encima de otras provoca que las células de la parte inferior del biofilm tengan una limitación en cuanto a oxígeno y nutrientes. Algunas de estas células de una manera estocástica, empezarán a secretar altos niveles de exopolisacárido (EPS), que a su vez permitirá y promoverá el crecimiento celular formando macrocolonias. Las células que secreten EPS y sus vecinas se beneficiarán de este crecimiento vertical debido a que aumentarán su acceso al oxígeno y nutrientes. Finalmente estas macrocolonias se unirán formando un biofilm maduro (177,179).



**Figura 7:** Modelo teórico de la formación de biofilm basado en la adaptación individual de las células a su ambiente local. El color azul representa a bacterias para las que el oxígeno y los nutrientes no son limitantes. El color rojo representa las bacterias en un ambiente específico donde existe un bajo nivel de oxígeno y nutrientes. El color amarillo representa las bacterias que expresan altos niveles de exopolisacárido (EPS). El color verde representa las bacterias adaptadas a las fuerzas presentes en la parte superior del biofilm, ausentes en otras partes del biofilm; estas fuerzas provocan que estas bacterias en concreto se tenga que adaptar a este particular microambiente, aumentando un grado más la heterogeneidad del biofilm. Imagen tomada de Monds and O'toole. (177).

Pese a los avances realizados en la última década, aún existen grandes lagunas en cuanto a regulación y cuál es la base molecular para la formación del biofilm; es probable que el avance en estas dos áreas permita esclarecer cual de los dos modelos es válido, o en su caso cuál de ellos se aproxima más a la realidad.

### 1.6.3. Características del biofilm.

En casi todos los biofilms, los propios microorganismos tan solo representan el 10% de la masa seca, mientras que los componentes de la matriz pueden llegar a representar el 90%. La matriz es el material extracelular, principalmente producido por los propios organismos, en el que las células se encuentran envueltas. La matriz se compone de un conglomerado de

diferentes tipos de biopolímeros; como los exopolisacáridos (EPS), además de proteínas, DNA extracelular y lípidos. Los EPS son la base para que se realice la arquitectura tridimensional del biofilm y son los responsables de la adhesión a superficies y la cohesión en el biofilm. Estas sustancias EPS no son iguales en todos los biofilms, pudiendo existir grandes diferencias según el microorganismo y las condiciones ambientales. Los EPS inmovilizan a las células, las mantienen en estrecha proximidad, lo que permite que se produzcan interacciones intensas entre las células que forman parte del biofilm, incluyendo su comunicación y la creación de microconsorcios sinérgicos. Cabe destacar que en esta matriz también se retienen enzimas extracelulares de manera que en cierta manera se genera un sistema externo de digestión adicional. Además de estas enzimas también pueden encontrarse proteínas estructurales, que están involucradas en la formación y estabilización de la red de matriz de polisacárido, constituyendo un enlace entre la superficie bacteriana y EPS (180).

Por otra parte esta envoltura también permite retener los componentes de las células lisadas, como el DNA. Este DNA externo puede ser un reservorio de genes para la transferencia horizontal. Sin embargo, probablemente la lisis celular no es la única fuente de obtención de DNA. Algunos autores postulan que este DNA puede ser secretado por las propias células ya que este DNA podría aumentar la estabilidad del biofilm (178).

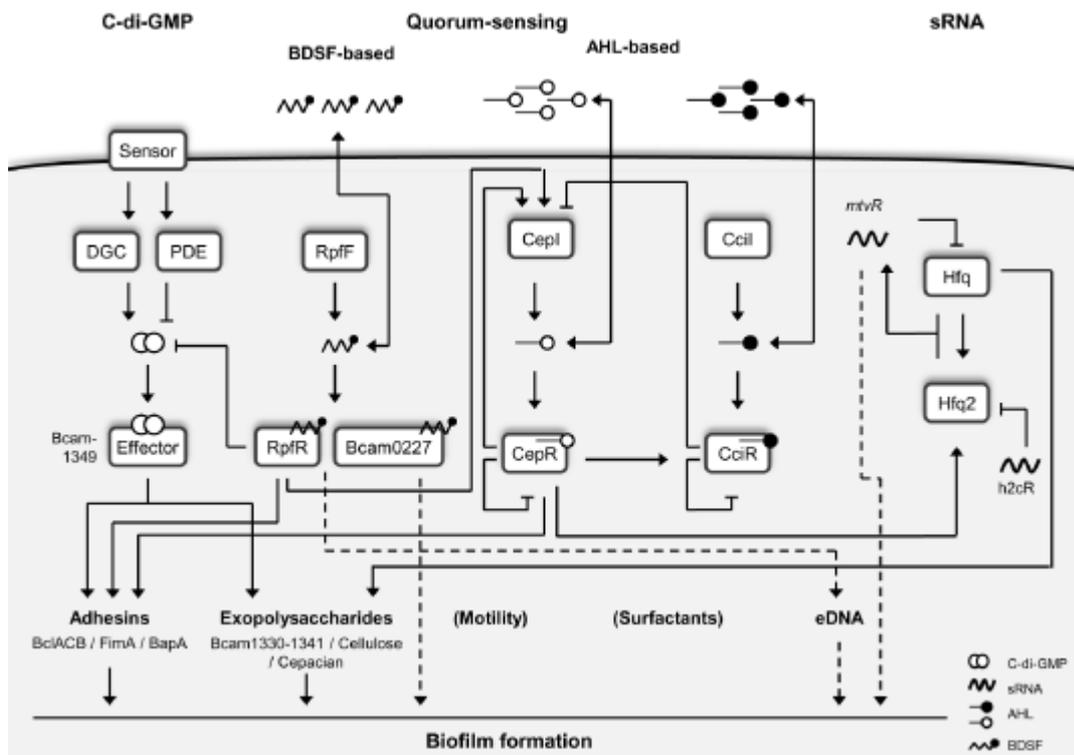
#### **1.6.4. El biofilm en el complejo *Burkholderia cepacia*.**

En la última década se han realizado grandes avances en el conocimiento del papel que juegan los diferentes componentes moleculares en la regulación del biofilm. Se cree que hay tres sistemas principales implicados en la regulación del biofilm; la diguanosina cíclica 5-monofosfato (c-di-GMP), pequeños RNAs (sRNA) y el *quorum-sensing* (QS). Parece ser que la c-di-GMP, interactúa con el regulador transcripcional Bcam 1349 perteneciente a la superfamilia Crp-Fnr, el cual a su vez desencadenará la transcripción de proteínas de unión como las fimbrias. Por otro lado el regulador Bcam 1349 también tendría afinidad para el clúster de genes *Bcam1330-Bcam1341*, los cuales tienen una función en la producción de EPS. Así pues, el c-di-GMP junto con el regulador Bcam1349 podrían estar implicados en la formación de biofilm (181,182).

En cuanto a los sistemas de QS implicados en la formación de biofilm, los sistemas CepIR y CciIR, descritos previamente en el apartado 4 y basados en moléculas señal tipo AHL, tienen una implicación en la formación y estabilidad del biofilm. Un estudio realizado por Huber *et al* mostró que la cepa *B. cenocepacia* H111 defectiva del sistema CepIR perdía la capacidad de desarrollar el biofilm (183), así como también los mutantes defectivos del QS CciIR, también pierden la capacidad de formar biofilm (184). Sin embargo, existe un tercer sistema QS implicado en la formación del biofilm; en este caso la molécula señal sería el ácido cis-2-dodecenoico (BDSF) perteneciente a la familia de los factores señal difusibles (DSF), y sería un sistema independiente a los basados en las moléculas señal AHL. Probablemente en ausencia de los sistemas de QS basados en la molécula señal AHL, este tercer sistema tendría la suficiente capacidad de activar genes con capacidad para formar biofilm (185).

Estudios recientes muestran como existe una relación entre los sistemas AHL y BDSF; BDSF regula positivamente la producción de moléculas AHL regulando *cepI* y *cciI*. Aún así lo más destacable es que existe una relación entre el QS BDSF con c-di-GMP; BDSF regula negativamente los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante la proteína receptora RpfR (186).

En cuanto a los sRNA, los denominados *mtvR* y *h2cR* tendrían un papel directo en la formación de biofilm. La ausencia de *mtvR* causa una pérdida de la capacidad de formar biofilm en *B. cenocepacia*, debido a que *mtvR* regula negativamente HFq el cual a su vez regula positivamente la producción de EPS. En cambio, *h2cR* reduce los niveles de hfq2 el cual se cree que tiene un papel directo en la formación de biofilm. Sin embargo, no se conoce con precisión el papel de estos sRNA, y en especial de HFq y hfq2, ya que se ignora cómo pueden afectar directamente a la formación de biofilm (182). En la figura 8 se observa un esquema resumen de los elementos que puede intervenir en la formación de biofilm.



**Figura 8:** Esquema representativo de los elementos que influyen en la formación de biofilm. Las líneas punteadas representan las posibles vías regulatorias pendientes de confirmación. Imagen tomada de Fazli *et al.* (182).



# **Objetivos**

## **2. Objetivos:**

**2.1. Estudiar la epidemiología-molecular de los aislados bacterianos pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona durante los años 2010 y 2012.**

- i) Identificar mediante métodos genéticos la especie del complejo *B. cepacia* a la que pertenecían los diferentes aislamientos obtenidos de los pacientes con FQ durante el periodo de estudio.
- ii) Determinar la utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de las especies del complejo *Burkholderia cepacia*.
- iii) Establecer la relación clonal de los aislados de Bcc obtenidos de pacientes con FQ, mediante electroforesis en gel por campo pulsante (PFGE).
- iv) Determinar el secuenciotipo (ST) de las cepas de Bcc mediante la técnica *multi locus sequence typing* (MLST).
- v) Estudiar la relación epidemiológica de los diferentes ST identificados.

**2.2 Determinar la sensibilidad a antimicrobianos de los aislados de Bcc obtenidos de pacientes con fibrosis quística en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona a lo largo de los años 2010 y 2012.**

- i) Estudiar la sensibilidad global a los principales antibióticos utilizados en la práctica clínica de pacientes con FQ colonizados o infectados por Bcc.
- ii) Comparar la sensibilidad global a antimicrobianos de los distintos clones identificados en una misma especie del complejo Bcc.

- iii) Evaluar la sensibilidad a los principales antibióticos entre las distintas especies del Bcc.

**2.3 Establecer la capacidad para formar biofilm de aislados bacterianos pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística.**

- i) Estandarizar la metodología para cuantificar *in vitro* el biofilm formado por los aislados del complejo *Burkholderia cepacia*.
- ii) Cuantificar y comparar el biofilm formado por un conjunto de aislados de diferentes especies de Bcc.



# **Material y Métodos**

### **3. Material y Métodos**

#### **3.1 Ámbito del estudio.**

El Hospital Universitario Vall d'Hebron es el complejo hospitalario más grande de Cataluña y uno de los más grandes del Estado español. Ubicado al pie de la sierra de Collserola, al norte de la ciudad de Barcelona, su área de influencia incluye los barrios de Horta-Guinardó, Nou Barris y Sant Andreu, y la ciudad de Montcada i Reixac, prestando servicio a una población de alrededor de 450.000 habitantes. Desde 1971 el centro cuenta con la Unidad de Fibrosis Quística y Neumología Pediátrica creada por el Dr. Nicolás Cobos, siendo la primera en su creación en España. A partir de 1998 pasó a ser una unidad integral multidisciplinaria pionera en la forma de organización tanto funcional como a espacio físico se refiere. Durante más de 40 años que presta servicio, en esta unidad se han diagnosticado y controlado cerca de 500 pacientes con FQ. En la actualidad esta unidad es la más importante de España en cuanto al número de pacientes en seguimiento, aproximadamente unos 300 pacientes y es el único centro español que pertenece a la red de ensayos europeos (CTN, *Clinical Trials Network*) de la Sociedad Europea de Fibrosis Quística (ECFS, *European Cystic Fibrosis Society*).

#### **3.2 Pacientes y periodo del estudio**

Este trabajo es un estudio retrospectivo en el que se incluyen un total de 302 pacientes tanto adultos como pediátricos diagnosticados con FQ, atendidos en la Unidad de Fibrosis Quística y Neumología del Hospital Vall d'Hebron, desde enero de 2010 a diciembre de 2012.

#### **3.3 Cultivos microbiológicos para la obtención de los aislados del complejo *Burkholderia cepacia* de esputos de pacientes con FQ.**

Las muestras de esputos procedentes de pacientes visitados en la Unidad de Fibrosis Quística, fueron analizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall

d'Hebron siguiendo protocolos estandarizados (17,187). A continuación se describen brevemente los procedimientos realizados.

### **3.3.1 Homogenización y fluidificación de las muestras.**

Los esputos procedentes de pacientes con FQ acostumbran a tener una elevada densidad, por ello se realiza una fluidificación con el agente mucolítico N-acetil-L-cisteína (187).

#### Procedimiento

- En el envase que contiene la muestra, añadir 100 µl la cantidad suficiente de N-acetil-L-cisteína a una concentración final de 1mg/ml para lograr la fluidificación del esputo.
- Agitar en el agitador hasta conseguir una fluidificación y homogenización adecuada para el manejo de la muestra.

### **3.3.2 Medios de cultivo para aislamiento de aislados del complejo *Burkholderia cepacia*.**

Se siguió el procedimiento descrito en las guías especializadas, para ello se sembraron las muestras de esputo en medios selectivos y diferenciales (17,187).

- Del esputo realizar una valoración mediante la tinción de Gram observando el morfotipo bacteriano.
- Sembrar las muestras en agar Mc Conkey (Anexo 1), con el fin de identificar bacilos gramnegativos no fermentadores.
- Incubar las placas a 37°C durante 72 h.
- Mediante sistemas bioquímicos (API 20NE, API 20E o Vitek-2; bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France) realizar una presuntiva identificación pendiente de confirmar a posteriori mediante técnicas moleculares.

### **3.3.3 Conservación de los aislamientos.**

·A partir de un cultivo puro de agar Columbia suplementado con 5 % sangre de (Anexo 1), preparar una suspensión de la bacteria en microtubos cónicos de 2 ml con medio de cultivo tripticasa soja suplementado con 20 % de glicerol (TSBG) (Anexo 1).

·Conservar los aislados a -80° C.

### 3.4 Identificación mediante técnica genética de las especies del Bcc.

Para la identificación molecular de los aislados pertenecientes al Bcc, se realizó la amplificación, secuenciación y el posterior análisis informático del gen *recA*. A continuación se detallan los procedimientos realizados para la consecución de tal fin.

#### 3.4.1 Obtención del DNA bacteriano.

- Sembrar por agotamiento en agar columbia suplementado con 5% de sangre de cordero e incubar a 37°C en aerobiosis durante aproximadamente 24h.
- Seleccionar 2-3 colonias y resuspender en 100 µl de agua ultra pura en un microtubo cónico de 200 µl.
- Calentar la suspensión a 95°C durante 10 minutos y posteriormente centrifugar durante 3 minutos a 13.000 rpm.
- Del sobrenadante, realizar una dilución 1:2 con agua ultra pura. Esta suspensión que contiene los ácidos nucleicos bacterianos será la que se emplee en la técnica de amplificación por PCR.

#### 3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

##### 3.4.2.1 Reactivos.

En la tabla 5 se describen los reactivos y las concentraciones utilizadas para la realización de la amplificación del gen *recA*.

**Tabla 5.** Concentraciones de los reactivos necesarios para la realización de PCR.

Reactivos	Concentración
Tampón con MgCl <sub>2</sub> *	1X 15mM
dNTPs*	0,2 mM
<i>recA</i> Fw	0,2 µM
<i>recA</i> Rv	0,2 µM
Taq polimerasa*	0,02U/µl

\*Taq HIFI comercial Roche (Basel, Switzerland; ref 11759078001)

### 3.4.2.2 Oligonucleótidos utilizados.

En la tabla 6 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *recA* en el estudio, los cuales fueron sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland). Estos cebadores fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

**Tabla 6.** Cebadores utilizados para la amplificación del gen *recA*.

Gen	Proteína	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón	Tª de hibridación	Referencia
<i>recA</i>	Recombinasa A	Fw AAGGACGATTCATGGAAGAWAGC	704 pb	58 °C	(188)
		Rv GACGCACYGAYGMRTAGAACTT			

### 3.4.2.3 Condiciones de la PCR.

En la tabla 7 se detallan las condiciones necesarias del termociclador para la amplificación del gen *recA*.

**Tabla 7.** Condiciones del termociclador para la amplificación del gen *recA*.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	30 s	30
Hibridación	58 °C	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Elongación final	72 °C	7 min	
Conservación	4 °C		

### 3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa.

Esta técnica se utilizó para la visualización de la amplificación de los fragmentos de DNA resultantes de la PCR.

#### Procedimiento

- Disolver 1.5 g de agarosa (Roche, Basel, Switzerland; ref 03573788001) en 100 ml de TBE al 1X (Anexo 1).
- Añadir bromuro de etidio (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref E1510) a una concentración final de 0.5 µg/ml.
- Verter la solución en los soportes indicados para la formación del gel.
- Dejar solidificar el gel
- Añadir 2 µl de la solución comercial *6X DNA Loading Dye* (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref R0611) a 10 µl del amplificado obtenido de la PCR, estableciendo una relación final de 1:5.
- A ambos carriles de los extremos del gel de agarosa añadir 10 µl el marcador de peso molecular *GeneRuler 50pb DNA ladder* (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref SM0373), indicado para los fragmentos comprendidos entre 50 y 1000 pb.
- Añadir 700 ml de TBE 0.5 % (Anexo 1) a la cubeta horizontal (BioRad, Hercules, USA; ref 170-4502).
- Realizar la electroforesis a 140 V durante 35 min.
- Realizar la captura fotográfica de los fragmentos de DNA mediante el instrumento Gel Doc XR (BioRad, Hercules, USA; ref 170-8195).

#### 3.4.4 Secuenciación del gen *recA*.

Antes de realizar la secuenciación, las reacciones de PCR fueron tratadas con la combinación de enzimas fosfatasa alcalina y exonucleasa I (ExoSAP-IT), con el objetivo de eliminar los cebadores y nucleótidos no empleados en el proceso de amplificación. La secuenciación del gen *recA* se realizó mediante el servicio externo ofrecido por MacroGen Europe (Amsterdam, Países Bajos).

Procedimiento de preparación de los amplificados por PCR para la reacción de secuenciación:

- Añadir a 10 µl de los amplificados 2 µl de ExoSAP-IT (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK; ref US78202).

- Incubar durante 15 min a 37 °C seguido de 15 min a 80 °C.
- Añadir a 5 µl del amplificado tratado con ExoSAP-IT 5 µl del cebador *recA* Fw a una concentración de 5µM. A otros 5 µl del amplificado tratado con ExoSAP-IT añadir 5 µl del cebador *recA* Rv a una concentración de 5µM.

#### **3.4.5 Análisis de secuencias.**

Las secuencias de ambas hebras de DNA de los productos amplificados se analizaron con el programa informático SeqMan (DNASTAR, Wisconsin, USA), con el objetivo de obtener una secuencia consenso. Esta secuencia se comparó con la base de datos MLST del complejo *Burkholderia cepacia* (<http://pubmlst.org/bcc/>), con el fin de identificar el alelo correspondiente al gen *recA*. Una vez identificado el alelo correspondiente se comparó con todo los alelos de *recA* descritos hasta el momento, con el objetivo de saber a qué especie corresponde el alelo identificado.

### 3.5 Identificación mediante espectrometría de masas MALDI-ToF MS.

Con el objetivo de evaluar la utilidad de la espectrometría de masas MALDI-ToF en la identificación de las especies del complejo *Burkholderia cepacia*, se utilizaron los sistemas VITEK MS (bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France; ref 41895) y Bruker Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA). Estos son los más extendidos actualmente en los laboratorios de microbiología clínica.

#### 3.5.1 Identificación mediante VITEK MS (bioMérieux S.A).

Para la identificación de los aislados mediante VITEK MS (bioMérieux S.A.) se prepararon las muestras siguiendo las indicaciones de la casa comercial utilizando la cepa *Escherichia coli* ATCC 8793 para la calibración del instrumento. Los espectros obtenidos fueron analizados y comparados con la base de datos VITEK MS IVD v2 (bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France).

#### Procedimiento

- A partir de un cultivo fresco del microorganismo en agar columbia suplementado con 5% sangre de cordero, e incubar a 37 °C coger 1-2 colonias y depositarlas en uno de los pocillos de la placa específica de VITEK MS (Figura 9).



**Figura 9.** Imagen de la placa y los pocillos donde se depositan las muestra para su identificación mediante el sistema VITEK-MS.

- Añadir 1-2 colonias de la cepa *Escherichia coli* ATCC 8793 en el pocillo destinado a la calibración.

- Añadir a cada pocillo 1 µl de matriz (ácido α-cyano-4-hydroxycinámico, VITEK MS CHCA; Marcy l'Etoile, France; ref 411071) para cristalizar la muestra inoculada.
- Insertar la placa con las muestras en el MALDI-ToF VITEK MS
- Analizar los espectros obtenidos con el programa informático VITEK MS IVD v2.

### 3.5.2 Identificación mediante Bruker Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH).

Se identificaron 10 aislados correspondientes cada uno a un pulsotipo diferente según el estudio de clonalidad. Para la identificación de los aislados se empleó el instrumento Bruker Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA) junto con el programa informático MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA) Para la preparación de las muestras se siguieron las indicaciones de la casa comercial y se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5α para la calibración del instrumento.

#### Procedimiento

- Sembrar por agotamiento en agar columbia suplementado con 5% sangre de cordero, e incubar a 37 °C durante aproximadamente 24h.
- Añadir 1-2 colonias de los aislados a estudiar en los respectivos soportes.
- Añadir 1-2 colonias de la cepa *Escherichia coli* DH5α para la calibración del aparato.
- Añadir a todas las muestras 1 µl de la mezcla de matriz (ácido α-cyano-4-hydroxycinámico, IVD HCCA Matrix, Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA; ref 8255344).
- Insertar la placa con las muestras en el MALDI-ToF MS (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA).
- Analizar los espectros obtenidos con el programa informático MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA).

Las identificaciones se consideraron correctas a nivel de especie cuando los valores obtenidos a partir de la comparación con la base de datos fueron  $\geq 2.0$ , si estos valores se encontraban entre 1.7 y 1.999 se consideró correcta la identificación a nivel de género.

### 3.6 Estudio de clonalidad

Para establecer el tipo de relación clonal que poseen los aislados bacterianos se digirió el DNA total de la bacteria mediante restricción y posteriormente se utilizó la técnica de electroforesis en gel con campo pulsante (*Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) para la separación de los fragmentos de restricción generados. A continuación se detallan los aspectos necesarios para la realización de esta técnica.

#### 3.6.1 Selección de aislados de Bcc para el estudio de clonalidad

Para llevar a cabo el estudio de epidemiología molecular (PFGE), se seleccionaron todos los aislados de aquellos pacientes con dos o menos cultivos positivos por alguna especie de Bcc. De aquellos pacientes con más de 2 aislados se seleccionaron los aislados obtenidos de muestras tomadas con un intervalo 5 meses, dando como resultado un total de 43 aislados.

A continuación se detallan el procedimiento técnico empleado para estudiar la relación clonal de los aislados.

#### 3.6.2 Electroforesis en gel con campo pulsante (PFGE)

##### 3.6.2.1 Preparación de la suspensión bacteriana.

- Realizar un cultivo de los aislados bacterianos a estudiar en placas de agar columbia suplementado con 5% sangre de cordero.
- Incubar a 37 °C durante 24h.
- Resuspender 3-4 colonias en la solución tamponada *cell suspension buffer* (CSB) a pH 8 (Anexo 1).
- Medir la absorbancia hasta 0.1 con una longitud de onda de 420nm, con el objetivo de preparar un inóculo a  $10^9$  ufc/ml con la misma solución tamponada CBS.
- Añadir proteinasa K (Roche, Basel, Switzerland; ref 03115801001) a una concentración final de 0.5 mg/ml.

### **3.6.2.2 Preparación de los moldes de agarosa.**

- Preparar una suspensión con agarosa de baja electroendosmosis (Seakem Gold agarosa, Lonza, Basel, Switzerland; ref 50150) al 1.2% en TBE 0.5 X (Anexo 1).
- Mantener la agarosa a 56°C.
- Realizar una suspensión celular con una relación 1:1 de suspensión bacteriana y la agarosa al 1.2% preparada previamente.
- Rellenar los soportes que permiten la formación de los moldes (aproximadamente 100 µl por molde) evitando la solidificación de la agarosa.
- Dejar enfriar y solidificar los moldes que contienen el inóculo bacteriano y la agarosa a 4 °C entre 20 y 30 minutos. Realizados los moldes dejar enfriar y solidificar a 4 °C entre 20 y 30 min.

### **3.6.2.3 Lisis celular.**

- Añadir los moldes que vayan a ser lisados en un tubo con tampón de lisis (Anexo 1) y proteinasa K (Roche, Basel, Switzerland; ref 03115801001) a una concentración final de 1 mg/ml durante 24h a 56 °C.
- Descartar la solución de lisis y añadir 10 ml de buffer Tris-EDTA (TE) pH 7.5 (Anexo 1).

### **3.6.2.4 Lavados de los moldes de agarosa.**

- Desechar el buffer TE y añadir de nuevo 10 ml de TE. Repetir el procedimiento entre 8 y 10 veces dejando como mínimo 30 minutos entre cada lavado a 4 °C.
- Los bloques de agarosa se pueden guardar a 4°C durante 6 meses, cambiando el buffer TE una vez al mes.

### **3.6.2.5 Digestión del DNA.**

- Cortar 1/3 de cada molde de agarosa e introducirlo en un microtubo de 2 ml con 100 µl de TE hasta su utilización.

#### **3.6.2.5.1 Digestión con *Xba*I**

- Descartar los 100 µl de TE en los que se encuentra el molde de agarosa conservado.
- Realizar la digestión en 100 µl con una concentración final de *buffer* Tango 1X (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref BY5) y 15 U de *Xba*I (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref ER0681).
- Digerir los moldes de agarosa un mínimo de 3h a 37°C.
- Detener la digestión descartando la solución de digestión y añadir 200 µl TE. Si no se va a proceder de inmediato a la electroforesis, conservar el bloque a 4 °C hasta su uso.

#### **3.6.2.5.2 Digestión con *Spe*I**

- Descartar los 100 µl de TE en los que se encuentra el molde de agarosa conservado.
- Realizar la digestión en 100 µl con una concentración final de *buffer* Tango 1X (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref BY5) y 50 U de *Spe*I (Thermo Scientific, Waltham, USA; ref ER1251).
- Digerir los moldes un mínimo de 4 h a 37 °C.
- Detener la digestión descartando la solución de digestión y añadir 200 µl TE. Si no se va a proceder de inmediato a la electroforesis, conservar el bloque a 4°C hasta su uso.

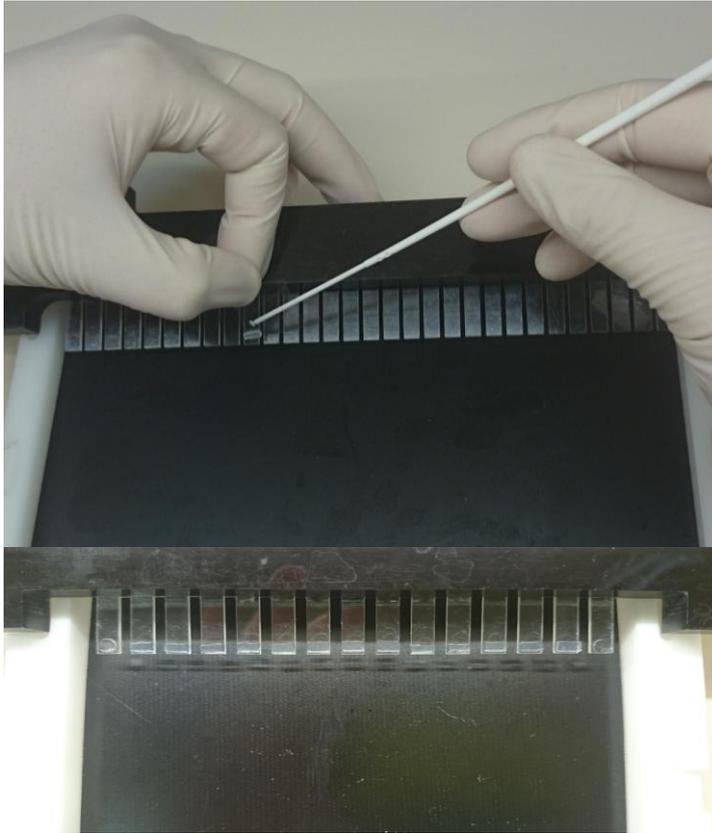
#### **3.6.2.6 Preparación de la electroforesis en gel con campo pulsante.**

- Montar los soportes necesarios para la realización del gel.
- Con el nivelador, equilibrar los soportes y disponer los peines, como puede observarse en la figura 10.



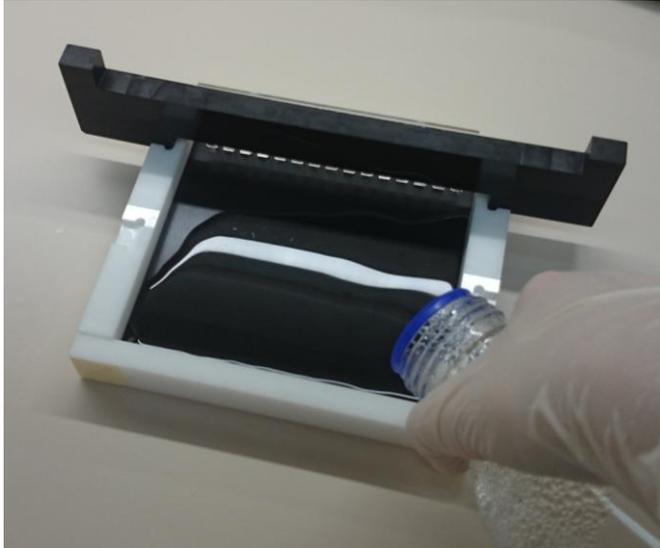
**Figura 10.** Imagen de los soportes para la formación del gel.

- Disponer los bloques digeridos a lo largo de todo el soporte del peine dejando los extremos libres (Figura 11).
- En los dos extremos libres, añadir los marcadores de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England BioLabs Inc., Ipswich, USA; ref N0340S).
- Con la ayuda de papel de filtro, secar los moldes ya depositados en el peine.



**Figura 11.** Imagen donde se observa cómo y dónde se colocan los bloques de agarosa en el soporte.

- Preparar una suspensión de 120 ml o 250 ml, según el número de muestras y tamaño del gel que se desee utilizar, de agarosa de baja electroendosmosis 1.2% con TBE 0.5 X (Anexo 1).
- Dejar atemperar la agarosa hasta los 50°C aproximadamente, a continuación, verter la suspensión en los soportes con los peines y moldes con el DNA digerido (Figura 12).



**Figura 12.** Ejemplo del vertido de agarosa.

- Esperar 15-20 min hasta que se solidifique la agarosa.
- Retirar con precaución el soporte del peine donde se encontraban los bloques de DNA adheridos.
- Sellar los pocillos con una suspensión de agarosa al 2 % con TBE al 1X y de nuevo dejar 15-20 min hasta que solidifique.
- Retirar los soportes del gel y eliminar la agarosa sobrante que pueda haber en la parte inferior del gel.

### **3.6.2.7 Electroforesis en campo pulsante.**

Para llevar a cabo la electroforesis mediante campo eléctrico pulsante, se utilizó el sistema *Contour-clamped homogeneous electric field* (CHEF; CHEF DRII System, BioRad Laboratories, Hercules, USA).

Procedimiento.

- Añadir 3 l de TBE 0,5 X (Anexo 1) en la cubetas de electroforesis.
- Sumergir el gel de agarosa con los bloques de DNA digeridos en la parte central de la cubeta y encajarlo en el hueco dispuesto para su colocación (Figura 13).



**Figura 13.** Imagen del gel en la cubeta de electroforesis sumergido en TBE 0,5 X.

·En la tabla 8 se detallan las condiciones necesarias para realizar la electroforesis del DNA digerido, según la enzima utilizada. En todos los casos la temperatura del tampón de electroforesis se mantuvo a 14 °C y la velocidad de la bomba utilizada para la circulación entre la cubeta y el sistema de refrigeración a 70 (0,75L/min).

**Tabla 8.** Condiciones empleadas para la realización de la electroforesis en PFGE del DNA digerido con las enzimas *XbaI* y *SpeI*.

Enzima	Bloque	Pulso inicial (s)	Pulso final (s)	Tiempo (h)	Voltaje (V/cm)
<i>XbaI</i>	1	2.2	54.2	21 h	6
<i>SpeI</i>	1	1	60	12 h	5.4
	2	10	30	8 h	

### 3.6.2.8 Tinción del gel de agarosa.

· Finalizada la electroforesis, retirar cuidadosamente el gel de la cubeta y sumergirlo en una suspensión con bromuro de etidio a una concentración de 1 mg/ml en 400 ml de TBE 0,5 X durante 30 min (Figura 14).



**Figura 14.** Imagen de la tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio.

·Descartar la solución de bromuro de etidio y sumergir el gel en 400 ml de agua destilada durante 30 min.

#### **3.6.2.9 Visualización del perfil de restricción**

·Para visualizar el perfil de restricción, observar y tomar imágenes a luz UV mediante el sistema Gel Doc XR (BioRad, Hercules, USA; ref 170-8195).

#### **3.6.2.10 Análisis informático**

·El análisis informático de los perfiles de restricción obtenidos se realizó mediante el programa Gel Compar II v.4.6 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). Para la realización de los dendogramas se utilizó el método basado en el agrupamiento no ponderado utilizando la media aritmética (*Unweight pair group method with arithmetic mean*; UPGMA) junto con el coeficiente *Dice* con una tolerancia de 1%. Las cepas se consideraron clonales siempre y cuando el coeficiente de similitud fuera  $\geq 80\%$ .

### **3.7. Multilocus sequence typing (MLST)**

Esta técnica facilita los estudios epidemiológicos entre cepas a nivel global, además de ser una buena herramienta para detectar si algún secuenciotipo en concreto tiene una elevada capacidad de diseminación. El MLST consiste en la amplificación y secuenciación de siete genes conservados; *recA*, *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC* y *trpB* tal y como se define en la página web MLST del complejo *Burkholderia cepacia* (<http://pubmlst.org/bcc/>).

#### **3.7.1 Selección de aislados para el estudio de MLST.**

Para llevar a cabo el estudio de MLST, se seleccionó un aislado por paciente. En el caso de los pacientes que han sido colonizados o infectados por más de una especie se seleccionó una representante de cada una. En total fueron 17 los aislados seleccionados.

#### **3.7.2. Obtención del DNA bacteriano.**

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente en el punto 3.4.1.

#### **3.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

##### **3.7.3.1. Reactivos.**

Se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 3.4.2.1 y la tabla 5.

##### **3.7.3.2 Oligonucleótidos.**

Los cebadores empleados para este estudio y el tamaño de los amplicones se encuentran detallados en la tabla 9.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos utilizados en el estudio MLST.

Gen	Proteína		Cebadores (5'-3')	Tamaño del amplicón	Tª de hibridación	Referencia
<i>recA</i>	Recombinasa A	Fw	AAGGACGATTCATGGAAGAWAGC	704 pb	58 °C	(188)
		Rv	GACGCACYGAYGMRTAGAACTT			
<i>atpD</i>	Subunidad β de ATP sintasa	Fw	ATGAGTACTRCTGCTTTGGTAGAAGG	756 pb	56 °C	(188)
		Rv	CGTGAAACGGTAGATGTTGTCTG			
<i>gltB</i>	Subunidad grande de glutamato sintasa	Fw	CTGCATCATGATGCGCAAGTG	652 pb	58 °C	(188)
		Rv	CTTGCCGCGGAARTCGTTGG			
<i>gyrB</i>	Subunidad B de DNA girasa	Fw	ACCGGTCTGCAYCACCTCGT	738 pb	60 °C	(188)
		Rv	YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC			
<i>lepA</i>	Proteína de unión al GTP	Fw	CTSATCATCGAYTCSTGGTTCG	975 pb	55 °C	(188)
		Rv	CGRTATTCCTTGAACCTCGTARTCC			
<i>phaC</i>	Proteína reductora Acetoacetyl-CoA	Fw	GCACSAGYATYTGCCAGCG	525 pb	58 °C	(188)
		Rv	CCATSTCSGTRCCRATGTAGCC			
<i>trpB</i>	Subunidad B de Triptófano sintasa	Fw	CGCGYTTCCGGVATGGARTG	787 pb	58 °C	(188)
		Rv	ACSGTRTGCATGTCCTTGTCG			

### 3.7.3.3 Condiciones de la PCR

En la tabla 10 se detallan las condiciones necesarias del termociclador para la amplificación de los genes del estudio del MLST. La temperatura de hibridación fue seleccionada según el gen a estudiar.

**Tabla 10.** Condiciones del termociclador para la amplificación de los genes de MLST.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	30 s	30
Hibridación	*	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Elongación final	72 °C	7 min	
Conservación	4 °C		

\* La temperatura de hibridación se utilizó según el cebador utilizado, detallado en la tabla 9.

### 3.7.4 Electroforesis del gel de agarosa.

En este caso se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 3.4.3, para todas las muestras y genes estudiados.

### 3.7.5 Secuenciación.

La secuenciación de los amplificadores de cada gen se realizó de igual manera que en el punto 3.4.4.

### 3.7.6 Análisis de las secuencias

Las secuencias se analizaron con el programa informático SeqMan (DNASTAR, Wisconsin, USA). La secuencia consenso que se obtuvo por cada gen y muestra se comparó con la base de datos MLST del complejo *Burkholderia cepacia* (<http://pubmlst.org/bcc/>). En el caso de alelos y ST descritos por primera vez en este estudio, las secuencias fueron enviadas y validadas por el gestor de la base de datos.

### 3.7.7 Algoritmo *Based Upon Related Sequence Types* (BURST).

El algoritmo BURST permite estudiar la relación clonal de todos los secuenciotipos descritos a nivel global. A su vez permite determinar la evolución filogenética de los diferentes secuenciotipos mostrando cuál de ellos es el posible ancestro.

El algoritmo BURST se realizó mediante el software eburst v3 desarrollado por *The Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London*. (<http://eburst.mlst.net/>). Los datos se obtuvieron de la base de datos de MLST del complejo *Burkholderia cepacia* (<http://pubmlst.org/bcc/>).

### **3.8 Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados del complejo *Burkholderia cepacia*.**

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos se realizó mediante la técnica de disco difusión. Se siguieron las recomendaciones de *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 18th informational supplement (CLSI) y para ello se emplearon placas de agar Muller Hinton (Anexo 1) (189). En total se determinó la sensibilidad a seis antibióticos utilizados en el tratamiento de la infección de vías respiratorias por Bcc; piperacilina-tazobactam, ceftazidima, meropenem, doxiciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. La interpretación de los resultados se realizó según los puntos de corte establecidos por el CLSI (189).

#### **3.8.1 Selección de aislados para el estudio de sensibilidad**

Se estudió la sensibilidad a todos los aislados (63) de Bcc obtenidos tras el cultivo de esputos de pacientes con FQ entre enero de 2010 y diciembre de 2012.

#### **3.8.2 Antibiograma**

Por cada aislado bacteriano se realizó el siguiente procedimiento.

##### Procedimiento

- Sembrar por agotamiento en agar usual la bacteria a estudiar, e incubar a 37 °C durante aproximadamente 24h.
- Seleccionar 3-4 colonias y resuspender en suero salino al 4 % (Anexo 1).
- Preparar una suspensión bacteriana a 0.5 McFarland en suero salino al 8.5% (Anexo 1) con el densitómetro (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France; ref 99234).
- Sembrar uniformemente y en tres direcciones mediante un hisopo estéril la placa de Muller Hinton (Anexo 1).
- Añadir los antibióticos (Tabla 11).
- Incubar las placas durante 24 h a 37 °C.

**Tabla 11.** Antibióticos utilizados en el estudio.

Antibiótico	Contenido del disco	Referencia*
Piperacilina-tazobactam	100/10 µg	77412 N
Ceftazidima	30 µg	64012
Meropenem	10 µg	64312
Doxiciclina	30 µg	63012
Trimetoprim-sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	62212
Ciprofloxacina	5 µg	60812

\*Todos los antibióticos fueron suministrados por la casa comercial Rosco Diagnostica (Taastrup, Dinamarca).

### 3.8.3. Interpretación del antibiograma

Para la interpretación del antibiograma se siguieron los criterios de CLSI para Bcc. Para los antibióticos piperacilina-tazobactam y ciprofloxacina se siguieron las indicaciones del CLSI para *Pseudomonas aeruginosa* (189). En la tabla 12 se detallan las recomendaciones para la interpretación de los antibiogramas según el diámetro del halo obtenido.

**Tabla 12.** Puntos de corte para la interpretación de los antibiogramas Bcc mediante la técnica de disco difusión. Tabla adaptada de CLSI. (189).

Antibiótico	Halo (mm)		
	R	I	S
Piperacilina-tazobactam*	≤ 17	-	≥ 18
Ceftazidima	≤ 17	18-20	≥ 21
Meropenem	≤ 15	16-19	≥ 20
Doxiciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim-sulfametoxazol	≤ 10	11-15	≥ 19
Ciprofloxacina*	≤ 15	16-20	≥ 21

\*Datos extraídos de la interpretación del antibiograma de *P. aeruginosa*.

### **3.9 Evaluación de la capacidad de formar biofilm de aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de esputos de pacientes con fibrosis quística.**

Para este estudio se utilizaron todos los aislados de Bcc utilizados en el estudio de clonalidad. El método empleado para cuantificar la formación de biofilm fue el descrito por Christansen *et al.* 1985, incluyendo las modificaciones descritas posteriormente por Mulet *et al.* 2013 con ligeras variaciones y que se detalla a continuación (190,191).

#### **3.9.1 Estandarización de la metodología para realizar el estudio *in vitro* de evaluación de la capacidad de formar biofilm.**

Para la puesta a punto de esta metodología se utilizaron las cepas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, con gran capacidad para formar biofilm y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228, considerada como cepa no formadora de biofilm (192). Además se incluyó la cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 utilizada anteriormente en estudios similares con el objetivo de validar el procedimiento realizado (193,194).

##### **3.9.1.1 Formación del Biofilm**

- Sembrar las muestras a estudiar por agotamiento en agar usual e incubar a 37°C en aerobiosis durante aproximadamente 24h.
- Seleccionar una colonia y resuspenderla en 10 ml de TSB (Anexo 1).
- Hacer crecer el cultivo ON a 37 °C y en agitación a 120 rpm.
- Ajustar la densidad bacteriana de los cultivos a una absorbancia de 0.1 nm a una longitud de onda de 640 en el espectrofotómetro (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Añadir 100 µl de los respectivos cultivos a los pocillos de una placa de cloruro de polivinilo (PVC) de 96 pocillos (Deltalab, Rubí, España; ref 143022).
- Realizar hasta ocho replicas por cada muestra a estudiar en la misma placa. Incorporar un control interno (B), que solo contenga TSB estéril con el objetivo de determinar si se ha producido alguna contaminación.
- Incubar la placa con los respectivos cultivos a 37°C sin agitación durante 24 h.

### **3.9.1.2 Tinción con cristal violeta.**

- Pasadas las 24h de incubación descartar el cultivo sumergiendo la placa en agua destilada.
- Añadir a cada pocillo 400 µl de PBS (Anexo 1) y posteriormente descartarlo.
- Repetir tres veces el apartado anterior, para eliminar las bacterias en suspensión no adheridas al biofilm.
- Dejar secar la placa a temperatura ambiente al menos 45 minutos.
- Añadir a cada pocillo 125 µl de cristal violeta (CV) al 0.1% (Anexo 1).
- Dejar en reposo durante 10 min con el CV con el objetivo de que las bacterias adheridas a la placa sean teñidas.
- Sumergir la placa en una cubeta con agua destilada tres veces consecutivas, con el fin de descartar el exceso de CV no adherido a las bacterias que forman el biofilm.
- Dejar secar las placas a temperatura ambiente al menos 45 minutos.

### **3.9.1.3 Resuspensión de las bacterias formadoras del biofilm.**

- Añadir a cada pocillo 200 µl de ácido acético al 30 % (Anexo 1) con el fin de resuspender las bacterias teñidas con CV y adheridas a la placa formando el biofilm.

### **3.9.1.4 Cuantificación del biofilm.**

- De los 200 µl que se encuentran en cada pocillo de la placa, transferir 125 µl de la suspensión de bacterias a una nueva placa de 96 pocillos.
- Leer la absorbancia de la suspensión a 595 nm con el espectrofotómetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, Vermont, USA).

Con el objetivo de eliminar el ruido de fondo que pueda producirse al leer las absorbancias con el CV, se restó la media obtenida entre los valores del control interno a todos los valores obtenidos de las muestras evaluadas. El estudio de cuantificación de biofilm se llevó a cabo por triplicado, en tres tiempos diferentes.

### 3.9.2 Determinar de la capacidad de formar biofilm *in vitro* de los aislados de Bcc obtenidos de pacientes con fibrosis quística entre 2010 y 2012.

Se estudió la capacidad de formar biofilm de los aislados incluidos en el estudio de clonalidad por PFGE, para ello se desarrolló el procedimiento descrito en el apartado anterior.

En cada placa se estudió un máximo de nueve aislados diferentes. Se incluyeron 8 replicas de cada una de las cepas control a fin de determinar el buen funcionamiento de la técnica. Asimismo también se introdujeron 8 replicas de TSB estéril como control interno de la técnica. En la tabla 13 se detalla la distribución que se utilizó para todo el estudio.

**Tabla 13.** Representación de la distribución de las muestras y controles en las placas de 96 pocillos.

N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B
N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>6</sub>	N <sub>7</sub>	N <sub>8</sub>	N <sub>9</sub>	C+	C-	B

N<sub>n</sub>, numero de aislados máximos a estudiar en una placa. C+, corresponde a las muestras de la cepa control *S. epidermidis* ATCC 35984 con capacidad para formar biofilm. C-, corresponde a las muestras de la cepa control *S. epidermidis* ATCC1228, no formadora de biofilm. B, control de esterilidad.

Para la cuantificación del biofilm formado en cada pocillo, se restó el valor de la absorbancia media obtenida de los pocillos que únicamente contenían el medio de cultivo (TSB) a los valores de absorbancia obtenidos de los pocillos con crecimiento bacteriano. Se realizaron tres replicas de este procedimiento en tiempos diferentes, para cada aislado a estudiar.

### 3.9.3 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático IBM SPSS Statistics v 19 (IBM, Armonk, New York, USA).

Una vez obtenidos todos los datos se realizó un estudio descriptivo con el fin de comprobar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para ello se utilizó el test estadístico Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene.

En el caso de que los datos siguiesen ambos supuestos, se empleó el test Anova y Tukey para determinar la existencia o ausencia de diferencias significativas. Si los datos cumplían el supuesto de normalidad pero no el de homocedasticidad se aplicó las pruebas estadísticas de Welch y Games-Howell. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas siempre que el nivel de significación fue inferior a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

Cuando los datos obtenidos no siguieron estos supuestos se optó por la realización del test no paramétrico Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre los datos obtenidos de las diferentes especies. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas siempre que el nivel de significación fue inferior a 0.05 ( $p < 0.05$ ).



# **Resultados**

## 4. Resultados

### 4.1 Identificación y estudio epidemiológico de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* obtenidas de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística.

Entre enero de 2010 y diciembre de 2012 se estudiaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron las muestras de esputo de 302 pacientes con FQ visitados en la Unidad de Fibrosis Quística y Neumología de éste hospital. En este transcurso de tiempo en 16 pacientes (5,3%), se aisló alguna de las especies del complejo *Burkholderia cepacia*. Once de estos pacientes (68,75%) eran adultos ( $\geq 18$  años) al inicio del estudio, mientras que cinco (31,25%) pertenecían a la edad pediátrica ( $< 18$  años). Dos pacientes (L y M) tenían un parentesco de primer grado. De los 16 pacientes se habían remitido 237 muestras de esputo para el estudio microbiológico, de las cuales se aisló Bcc en 62 (26,2%). En todos los casos, en cada cultivo realizado, se identificó una única morfología de colonia de Bcc en los medios de cultivo utilizados, excepto en un caso donde se observó la presencia de dos morfologías diferentes. En total por tanto, se obtuvieron e incluyeron en el presente trabajo 63 aislados bacterianos pertenecientes al Bcc procedentes de 62 esputos.

Mediante la amplificación, secuenciación y posterior análisis informático de la secuencia del gen *recA* se determinó la especie de Bcc. En la tabla 14 se detallan todos los resultados obtenidos. *B. multivorans* fue identificada en 25 aislados de 7 pacientes, *B. contaminans* en 12 aislados de 6 pacientes, *B. cepacia* en 24 aislados de tres pacientes y *B. stabilis* en dos aislados de un mismo paciente (Tabla 14).

Durante el periodo del estudio, en aquellos pacientes en los que Bcc se aisló en más de una muestra, se identificó la misma especie en todas las muestras remitidas de cada paciente, respectivamente, exceptuando en un caso (paciente P). En este paciente, en los cuatro primeros aislados (obtenidos entre septiembre 2010 y diciembre 2011, se identificó *B. contaminans*, mientras que en los dos últimos (obtenidos entre marzo 2012 y agosto 2012) se identificó la *B. stabilis* (Tabla 14).

**Tabla 14.** Tabla de los resultados obtenidos de la identificación mediante la amplificación y secuenciación del gen *recA* de los 63 aislados obtenidos de 16 pacientes con FQ.

Paciente	Aislado	Fecha	Especie
A	BCC030	14/02/2011	<i>B. multivorans</i>
	BCC029	06/09/2011	<i>B. multivorans</i>
	BCC054	11/01/2012	<i>B. multivorans</i>
B	BCC011	28/01/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC013	15/07/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC055	08/11/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC012	14/03/2011	<i>B. multivorans</i>
	BCC056	10/07/2011	<i>B. multivorans</i>
C	BCC001	01/12/2010	<i>B. multivorans</i>
D	BCC020	04/02/2011	<i>B. multivorans</i>
	BCC052	05/10/2011	<i>B. multivorans</i>
E	BCC008	18/02/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC057	02/06/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC009	25/09/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC010	30/06/2011	<i>B. multivorans</i>
F	BCC049	25/09/2012	<i>B. multivorans</i>
G	BCC034	10/02/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC005	30/09/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC058	24/11/2010	<i>B. multivorans</i>
	BCC006	23/03/2011	<i>B. multivorans</i>
	BCC059	05/05/2011	<i>B. multivorans</i>
	BCC035	07/03/2012	<i>B. multivorans</i>
	BCC036	07/03/2012	<i>B. multivorans</i>
	BCC060	12/04/2012	<i>B. multivorans</i>
BCC044	11/08/2012	<i>B. multivorans</i>	
H	BCC007	28/05/2010	<i>B. cepacia</i>
	BCC061	02/08/2010	<i>B. cepacia</i>
	BCC051	04/12/2012	<i>B. cepacia</i>
I	BCC026	30/11/2010	<i>B. cepacia</i>
	BCC027	20/02/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC062	02/03/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC028	14/04/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC063	11/05/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC033	22/02/2012	<i>B. cepacia</i>
	BCC064	03/04/2012	<i>B. cepacia</i>
	BCC065	17/04/2012	<i>B. cepacia</i>
	BCC037	27/04/2012	<i>B. cepacia</i>
	BCC038	16/05/2012	<i>B. cepacia</i>
	BCC041	30/07/2012	<i>B. cepacia</i>
BCC047	19/12/2012	<i>B. cepacia</i>	
J	BCC018	14/09/2010	<i>B. cepacia</i>
	BCC066	30/11/2010	<i>B. cepacia</i>
	BCC053	02/03/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC067	17/03/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC068	06/04/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC069	25/05/2011	<i>B. cepacia</i>
	BCC032	14/03/2012	<i>B. cepacia</i>
	BCC043	18/08/2012	<i>B. cepacia</i>
BCC048	19/12/2012	<i>B. cepacia</i>	

K	BCC003	10/11/2010	<i>B. contaminans</i>
	BCC004	09/02/2011	<i>B. contaminans</i>
L	BCC022	28/05/2010	<i>B. contaminans</i>
	BCC024	18/10/2010	<i>B. contaminans</i>
M	BCC023	30/07/2010	<i>B. contaminans</i>
	BCC017	10/12/2010	<i>B. contaminans</i>
N	BCC045	12/09/2012	<i>B. contaminans</i>
O	BCC050	05/10/2012	<i>B. contaminans</i>
	BCC015	08/09/2010	<i>B. contaminans</i>
P	BCC016	25/05/2011	<i>B. contaminans</i>
	BCC025	16/10/2011	<i>B. contaminans</i>
	BCC070	09/12/2011	<i>B. contaminans</i>
	BCC040	28/03/2012	<i>B. stabilis</i>
	BCC042	14/08/2012	<i>B. stabilis</i>
Total	16	63	

Teniendo en cuenta un aislado-especie por paciente, *B. multivorans* (43,8 %) fue la especie más prevalente, seguida de *B. contaminans* (37,5 %), *B. cepacia* (18,8 %) y *B. stabilis* (6,3 %) (Tabla 15).

**Tabla 15.** Tabla resumen por especies de los resultados obtenidos de la identificación mediante la amplificación y secuenciación del gen *recA* de todos los aislados estudiados, junto con las prevalencias resultantes.

Especie	Aislados	Pacientes*	Prevalencia
<i>B. multivorans</i>	25	7	43,8 %
<i>B. cepacia</i>	24	3	18,8 %
<i>B. contaminans</i>	12	6	37,5 %
<i>B. stabilis</i>	2	1	6,3 %
Total	63	16	

\* En un mismo paciente de 6 aislados obtenidos 4 fueron identificados como *B. contaminans* y 2 *B. stabilis*.

#### 4.2 Identificación de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* mediante espectrometría de masas por *matrix assisted laser desorption ionization time of flight* (MALDI-ToF MS).

Se evaluó la capacidad del sistema VITEK MS, (*bioMérieux S.A.*) junto con el programa informático VITEK MS IVD (versión 2) y el sistema Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA) con el programa informático Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Massachusetts, USA) para identificar los aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*. Para este estudio se analizaron mediante VITEK MS IVD los 43 aislados seleccionados para el estudio de clonalidad, y 10 aislados representativos de cada pulsotipo obtenidos mediante Daltonics Microflex LT.

En la tabla 16 se detallan los resultados obtenidos de la identificación mediante los dos instrumentos MALDI-ToF junto con los resultados de la secuenciación del gen *recA*. Todos los aislados fueron identificados a nivel de género por ambos instrumentos. No obstante el sistema VITEK MS solo identificó a nivel de especie 30 de los 43 aislados (69,8%), de los cuales todos los aislados fueron identificados como *B. multivorans* y *B. cepacia* con un nivel de confianza del 99,9%. Los otros 13 aislados (30,2%), fueron descritos de *B. contaminans* anteriormente como *B. contaminans* (pulsotipo IV) y *B. stabilis* (pulsotipo VIII). En siete aislados de *B. contaminans* (BCC022, BCC024, BCC023, BCC017, BCC050, BCC015 y BCC016) MALDI-ToF VITEK MS determinó que los aislados podían ser de las especies *B. vietnamiensis* o *B. cepacia* (49,9% de nivel de confianza cada uno); mientras que en dos aislados (BCC003 y BCC025) estableció a las especies *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* y *B. gladioli* (33,3% de nivel de confianza) como posibles identificaciones. Por el contrario los aislados BCC004 y BCC045 fueron identificados como *B. cepacia* (99,9% de nivel de confianza ambos). Finalmente los dos aislados pertenecientes a *B. stabilis* (BCC040 y BCC042), VITEK MS estableció a las especies *B. cepacia* y *B. stabilis* (49,9% de confianza) como posibles identificaciones (Tabla 16).

El sistema Daltonics Microflex LT identificó a nivel de especie los seis aislados de *B. multivorans*, el aislado perteneciente a *B. stabilis* y a uno de los dos aislados pertenecientes a *B. cepacia* (pulsotipo V). Sin embargo, el aislado perteneciente a *B. contaminans* (pulsotipo IV) y *B. cepacia* (pulsotipo IX), fueron identificados como *B. cepacia* y *B. cenocepacia* respectivamente (Tabla 16).

**Tabla 16.** Tabla resumen de la identificación de Bcc mediante VITEK MS (43 aislados) y Daltonics Microflex LT (10 aislados). En negro los aislados no identificados correctamente.

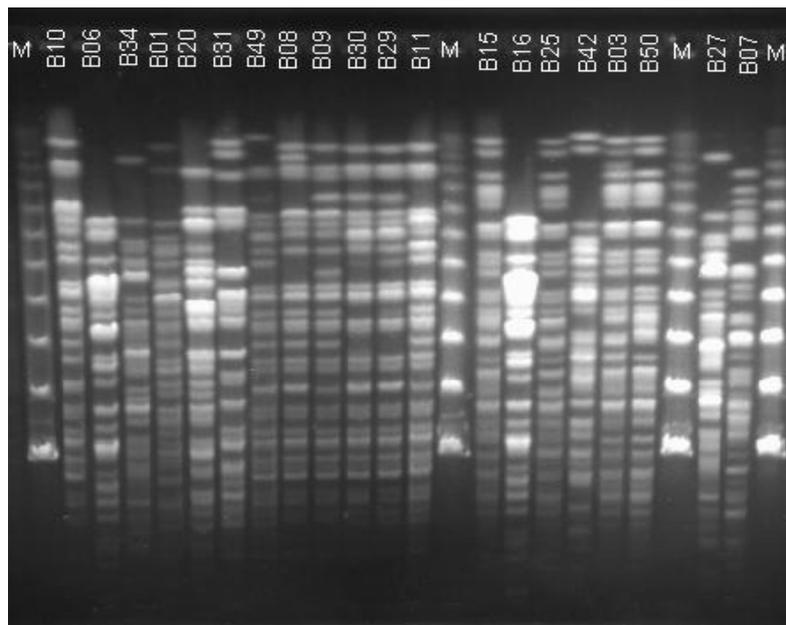
Pte*	Pulsotipo	Daltonics		VITEK MS (Nivel de confianza)	recA
		Aislado	Microflex LT		
A	VI	BCC030		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC029		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
B	VI	BCC011		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC012	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC013		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
C	VII	BCC001	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
D	X	BCC020	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC052		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
E	I	BCC008		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC009		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC010	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
F	II	BCC049	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
G	III	BCC005		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC006	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC035		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC036		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC034		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
		BCC044		<i>B. multivorans</i> (99,9)	<i>B. multivorans</i>
H	IX	BCC007		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC051	<b><i>B. cenocepacia</i></b>	<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
I	V	BCC026		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC028		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC033	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC041		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC047		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC018		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
J	V	BCC032		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC043		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC048		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
K	V	BCC053		<i>B. cepacia</i> (99,9)	<i>B. cepacia</i>
		BCC003		<b><i>B. vietnamiensis</i> (33,3)/ <i>B. cepacia</i> (33,3)/ <i>B. gladioli</i> (33,3)</b>	<i>B. contaminans</i>
		BCC004		<b><i>B. cepacia</i></b>	<i>B. contaminans</i>
L	V	BCC022		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
		BCC024		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
M	IV	BCC023		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
		BCC017		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
N	IV	BCC045	<b><i>B. cepacia</i></b>	<b><i>B. cepacia</i> (99,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
O	V	BCC050		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
		BCC015		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
		BCC016		<b><i>B. vietnamiensis</i> (49,9)/ <i>B. cepacia</i> (49,9)</b>	<i>B. contaminans</i>
P	VIII	BCC025		<b><i>B. vietnamiensis</i> (33,3)/ <i>B. cepacia</i> (33,3)/ <i>B. gladioli</i> (33,3)</b>	<i>B. contaminans</i>
		BCC040		<b><i>B. cepacia</i> (49,9)/ <i>B. stabilis</i> (49,9)</b>	<i>B. stabilis</i>
	VIII	BCC042	<i>B. stabilis</i>	<b><i>B. cepacia</i> (49,9)/ <i>B. stabilis</i> (49,9)</b>	<i>B. stabilis</i>

\*Pte; paciente.

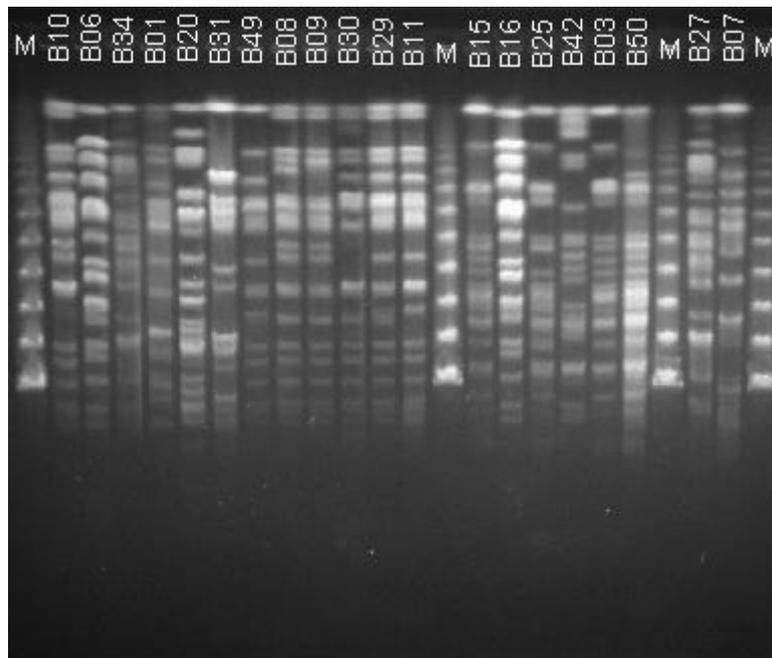
### 4.3 Estudio de la relación clonal de los aislados de Bcc obtenidos de pacientes con FQ.

A fin de determinar qué relación clonal tenían las cepas de Bcc aisladas en pacientes con FQ se realizó un estudio de macrorestricción de todo el genoma de cada aislado bacteriano utilizando las enzimas *Xba*I y *Spe*I. En la figura 15 se muestra un conjunto de aislados de Bcc que han sido sometidos a macrorestricción con cada una de las enzimas comentadas y posterior electroforesis por campo pulsante (PFGE).

A



B



**Figura 15.** A, imagen del resultado de la macrorestricción con la enzima *Xba*I de aislados de Bcc. B, imagen del resultado de la macrorestricción con la enzima *Spe*I. M, corresponde a los marcadores de peso molecular.

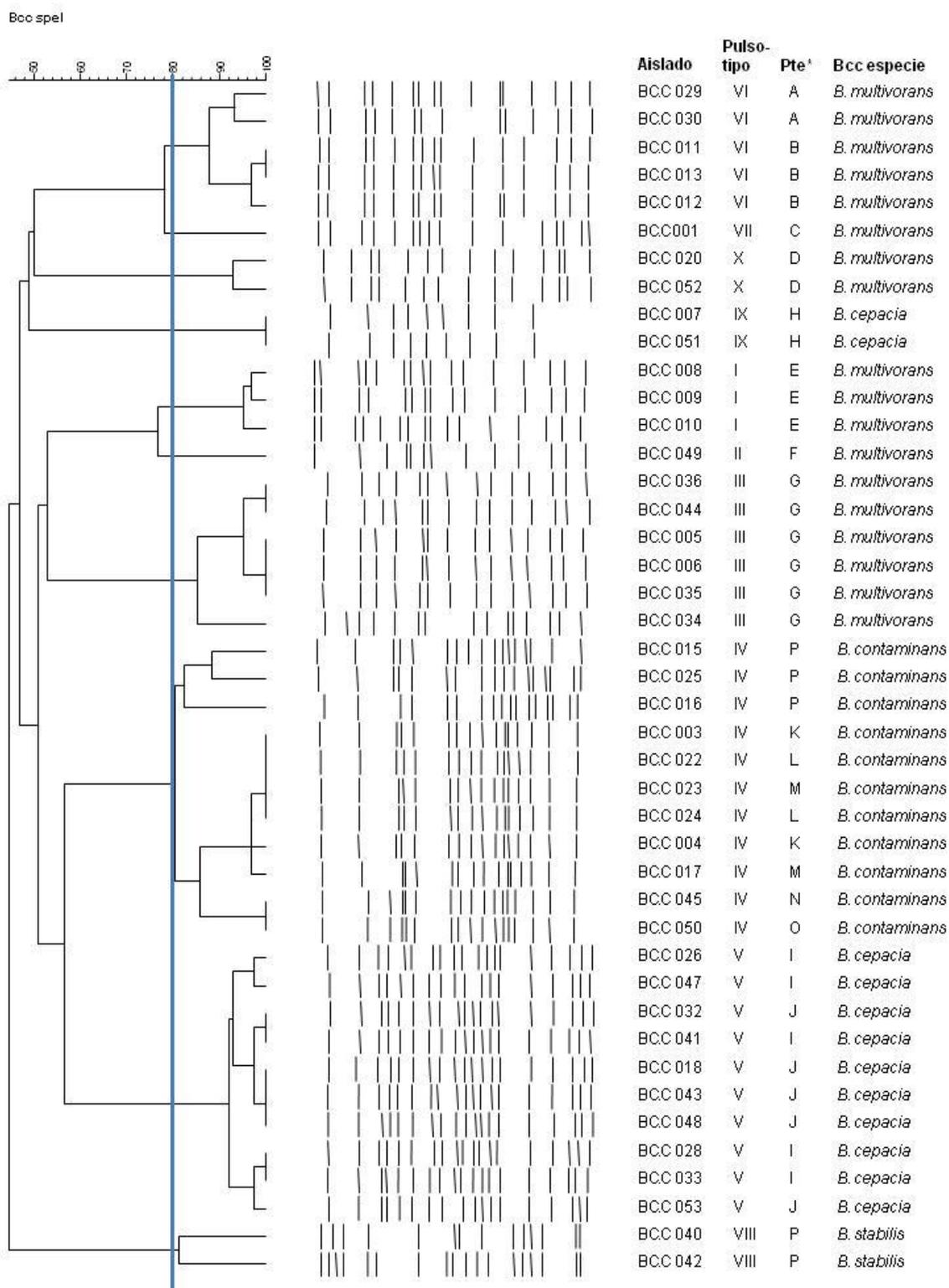
El número de fragmentos de restricción obtenidos mediante la enzima *SpeI* ( $15,9 \pm 2,29$ ) es menor que el obtenido por la enzima *XbaI* ( $24,1 \pm 2,64$ ). Se optó por el uso de la enzima *SpeI* para establecer la relación clonal de los aislados estudiados.

Siguiendo los criterios de inclusión, señalados en la sección de material y métodos, para este estudio se seleccionaron 43 aislados de los 16 pacientes con FQ que estaban colonizados o infectados por Bcc. Se consideró que los aislados eran clonales cuando el coeficiente de similitud fue  $\geq 80\%$ . El resultado final del estudio de clonalidad se muestra en la figura 16 en la que se representa el dendograma final de todos los aislados estudiados.

En total, de los 43 aislados seleccionados de los 16 pacientes en los que se aisló Bcc, se obtuvieron un total de 10 pulsotipos diferentes. En aquellos pacientes en los que había más de un aislado de una misma especie, todos ellos pertenecían a un mismo pulsotipo.

En cuanto a los pacientes colonizados o infectados por *B. multivorans*, el clon identificado en cada uno de ellos era diferente al de los demás (pulsotipos; I-III, VI, VII y X), excepto el que se encontró en dos pacientes (A y B, pulsotipo VI). *B. cepacia* se identificó en tres pacientes (I, J y H) de los cuales dos compartía el mismo clon (pacientes I y J; pulsotipo IX), mientras que el aislado del tercer paciente (H) pertenecía a un pulsotipo diferente (pulsotipo IX).

El resultado de la macrorestricción de los aislados pertenecientes a la especie *B. contaminans* reveló que todos ellos pertenecían a un mismo clon (pulso tipo IV). Finalmente los dos únicos aislados de *B. stabilis* obtenidos de un mismo paciente eran clonales entre si (pulsotipo VIII) (Figura 16 y Tabla 17).



**Figura 16.** Dendrograma obtenido a partir del perfil de restricción del DNA mediante la enzima *SpeI* de cada uno de los 43 aislados. Los aislados se consideraron clonales cuando el coeficiente de similitud fue  $\geq 80\%$ . \* Pte; paciente.

**Tabla 17.** Resumen del resultado del estudio de clonalidad de los 43 aislados de Bcc estudiados por paciente.

Paciente	Bcc	Aislados	Pulso tipo
A	<i>B. multivorans</i>	2	VI
B	<i>B. multivorans</i>	3	VI
C	<i>B. multivorans</i>	1	VII
D	<i>B. multivorans</i>	2	X
E	<i>B. multivorans</i>	3	I
F	<i>B. multivorans</i>	1	II
G	<i>B. multivorans</i>	6	III
H	<i>B. cepacia</i>	2	IX
I	<i>B. cepacia</i>	5	V
J	<i>B. cepacia</i>	5	V
K	<i>B. contaminans</i>	2	IV
L	<i>B. contaminans</i>	2	IV
M	<i>B. contaminans</i>	2	IV
N	<i>B. contaminans</i>	1	IV
O	<i>B. contaminans</i>	1	IV
P	<i>B. contaminans</i>	3	IV
	<i>B. stabilis</i>	2	VIII
Total	16	43	

#### 4.4 Multi locus sequence typing (MLST).

Dado que el estudio de macrorestricción reveló que todos los aislados de las especies de Bcc obtenidos de las muestras de esputo de cada paciente eran clonales entre si, para el estudio de MLST se seleccionaron un total de 17 cepas; es decir, una cepa por paciente, a excepción del paciente P del cual se estudió una cepa de cada una las dos especies identificadas.

##### 4.4.1 Distribución de los ST de Bcc entre los pacientes con FQ del Hospital Vall d'Hebron.

Cada pulstotipo identificado mediante el estudio de PFGE correspondió a un secuenciotipo (ST) diferente (Tabla 18). Los ST identificados fueron el ST17, ST450, ST723, ST724, ST725 y ST814, en *B. multivorans*, los ST9 y ST726 en *B. cepacia*, el ST482 en *B. contaminans* y ST51 en *B. stabilis*. De los 17 ST hallados, 5 se describieron por primera vez en este estudio; el ST723, ST724, ST725 y ST814) en *B. multivorans* y el ST726 en *B. cepacia* (Tabla 18).

**Tabla 18.** Resumen de los perfiles alélicos obtenidos junto con los pulso tipos del estudio PFGE.

Paciente	Cepa	Bcc	PFGE tipo	ST	Perfil alélico						
					<i>atpD</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>trpB</i>
A	BCC029	<i>B. multivorans</i>	VI	<b>725</b>	7	50	532	158	7	96	5
B	BCC013	<i>B. multivorans</i>	VI	<b>725</b>	7	50	532	158	7	96	5
C	BCC001	<i>B. multivorans</i>	VII	17	97	50	4	79	37	63	55
D	BCC020	<i>B. multivorans</i>	X	450	220	205	170	237	276	35	67
E	BCC010	<i>B. multivorans</i>	I	<b>724</b>	7	50	531	158	7	96	5
F	BCC049	<i>B. multivorans</i>	II	<b>814</b>	7	50	532	141	7	96	5
G	BCC006	<i>B. multivorans</i>	III	<b>723</b>	10	50	285	81	137	35	362
H	BCC007	<i>B. cepacia</i>	IX	9	91	93	96	103	42	1	21
I	BCC026	<i>B. cepacia</i>	V	<b>726</b>	2	354	533	2	1	62	48
J	BCC018	<i>B. cepacia</i>	V	<b>726</b>	2	354	533	2	1	62	48
K	BCC004	<i>B. contaminans</i>	IV	482	151	192	245	152	158	173	151
L	BCC022	<i>B. contaminans</i>	IV	482	151	192	245	152	158	173	151
M	BCC023	<i>B. contaminans</i>	IV	482	151	192	245	152	158	173	151
N	BCC045	<i>B. contaminans</i>	IV	482	151	192	245	152	158	173	151
O	BCC050	<i>B. contaminans</i>	IV	482	151	192	245	152	158	173	151
p*	BCC025	<i>B. contaminans</i>	IV	482	151	192	245	152	158	173	151
	BCC040	<i>B. stabilis</i>	VIII	51	26	18	42	21	70	10	16
Total	16			17							

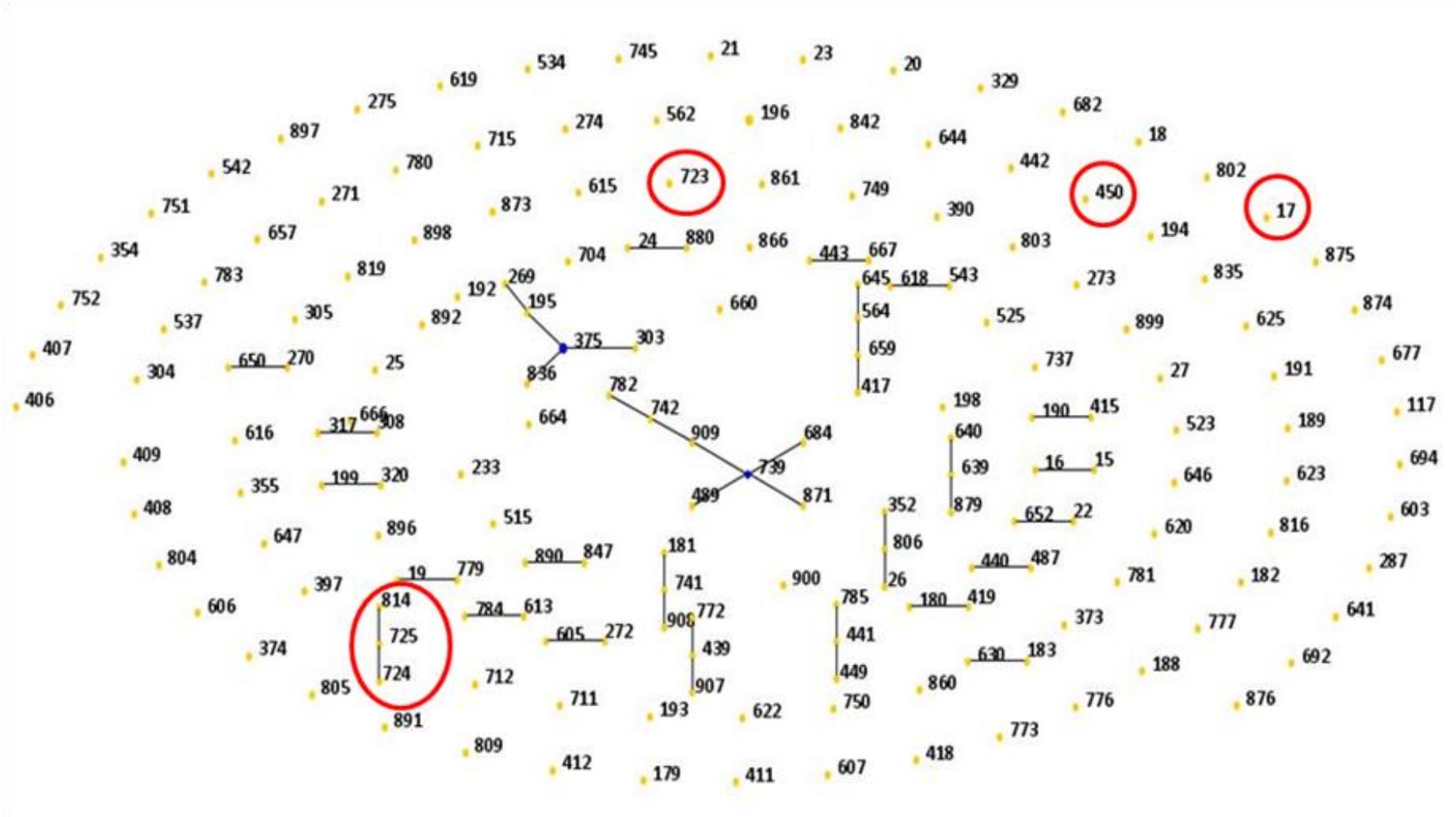
\*Al paciente P se analizaron dos muestras por cada uno de los pulstotipos descritos anteriormente en el PFGE. Los números en negrita señalan aquellos secuenciotipos descritos por primera vez en este estudio.

#### 4.5 Relación epidemiológica de los distintos ST.

Una buena manera para estudiar la relación de los distintos ST obtenidos mediante MLST es la realización del algoritmo BURST. Normalmente se representan las relaciones entre los aislados de una misma especie bacteriana mediante dendogramas, sin embargo estos modelos proporcionan una escasa información con aislados de genotipos muy similares además de que no es fácil la interpretación sobre la ascendencia o vías de ascendencia evolutiva reciente. En cambio el algoritmo BURST permite establecer una relación evolutiva entre los aislados identificando cuál de ellos es el secuenciotipo fundador, a partir del cual se han ido sucediendo los diferentes ST. En general los aislados de un mismo ST no se diferenciaban pero con el paso del tiempo es probable que alguno de ellos adquiriera alguna mutación en alguno de los siete locis del MLST convirtiéndose este supuesto aislado en un ST diferente al original denominado *single locus variant* (SLV). Probablemente si se produce una mayor diversificación alguno de los ST diferirá en dos loci de los siete respecto al ST fundador que pasará a denominarse *doble locus variant* (DLV) y así sucesivamente. En consecuencia probablemente el ST fundador será aquel que tenga un mayor número de SLV. Por el contrario puede darse que algún ST en concreto no pueda ser relacionado con otro, o en su caso con algún grupo o complejo clonal (CC), estos ST aislados se denominan *singletons* (195,196).

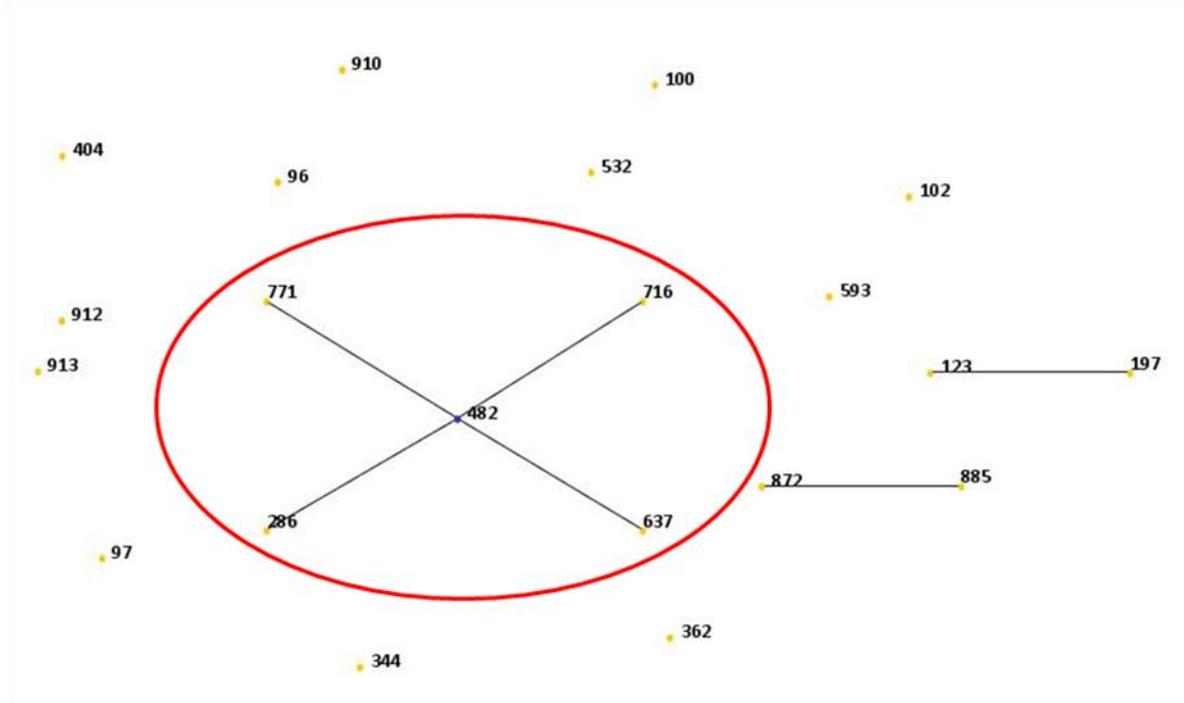
A fecha de 26 Agosto 2015 se han descrito un total de 913 secuenciotipos diferentes en el complejo *Burkholderia cepacia*. En general los secuenciotipos diferentes que se encuentran en mayor número son los que pertenecen a las especies *B. cenocepacia* y *B. multivorans*, 214 y 179 respectivamente. Mientras que especies como *B. cepacia*, con 56 secuenciotipos y *B. stabilis* junto con *B. contaminans* con 21 secuenciotipos descritos hasta este momento se encuentran en menor número.

En la figura 17 se representa el diagrama obtenido a partir del algoritmo BURST de todos los ST de la especie *B. multivorans*. En la figura se puede apreciar un elevado número de *singletons* entre los que se encuentran los ST descritos en este estudio ST17, ST450 y ST723. Por el contrario los otros tres ST descritos por primera vez en este estudio, sí que tienen alguna relación clonal formando un pequeño CC, en el cual el ST725 tiene dos SLV, correspondientes a los ST724 y ST814. También puede observarse la presencia de dos CC en los cuales ST375 y ST739 son los secuenciotipos fundadores.



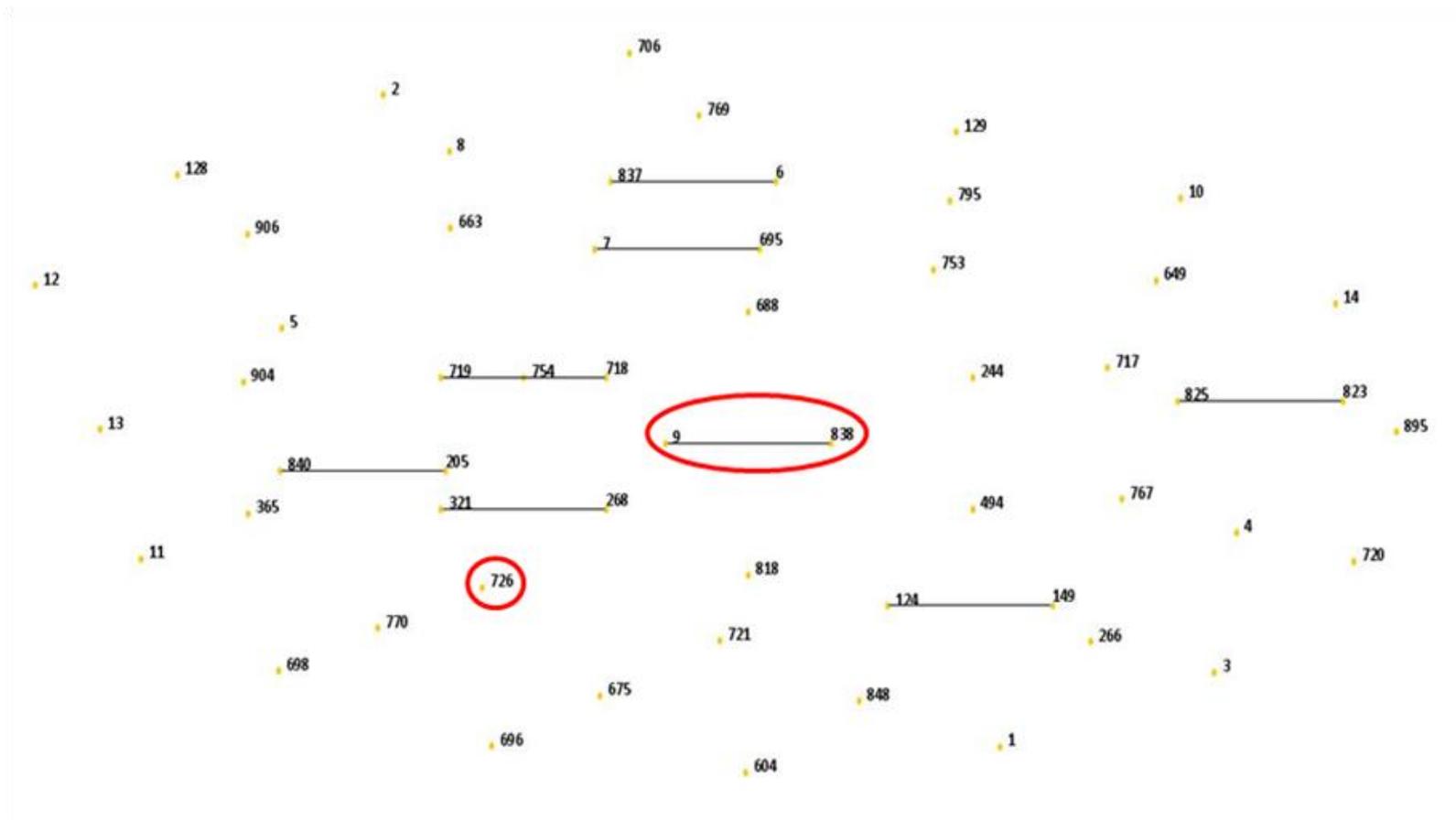
**Figura 17.** Representación del algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie *B. multivorans*. En círculo rojo se determinan los ST descritos en este estudio (ST17, ST450, ST723, ST724, ST725 y ST814).

Referente a los ST pertenecientes a la especie *B. contaminans*, solo nueve tienen algún tipo de relación clonal. En concreto se distingue un complejo clonal en el cual el ST482, descrito en este estudio, es el fundador a partir del cual se han ido sucediendo los cuatro SLV (ST286, ST637, ST 716 y ST771) que posee (Figura 18).



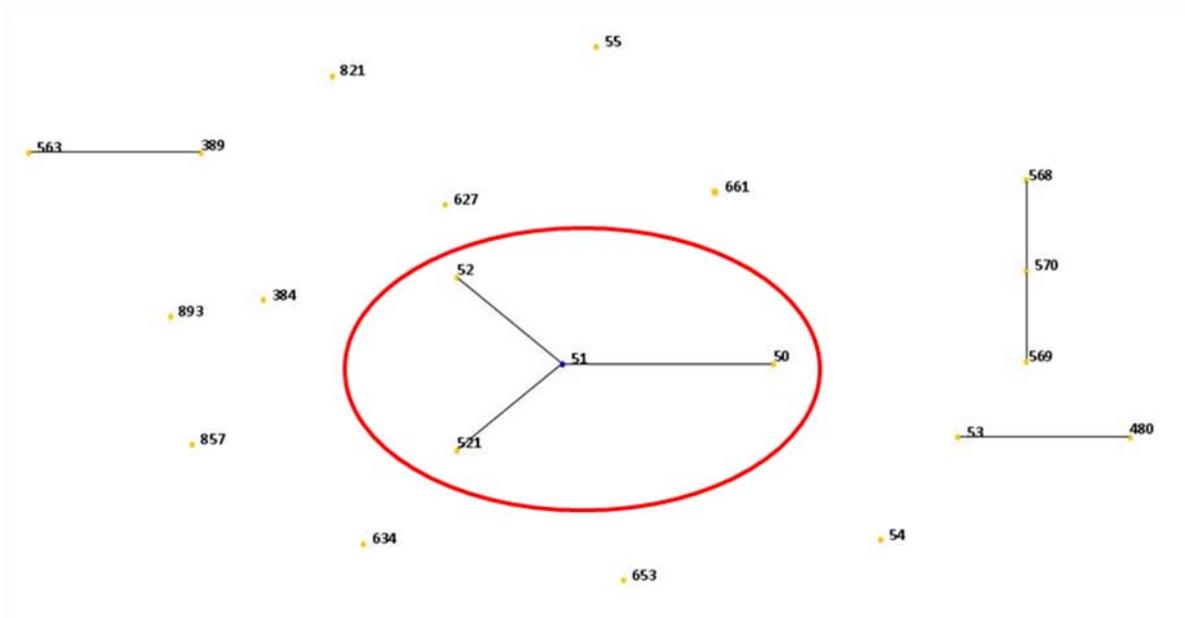
**Figura 18.** Representación del algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie *B. contaminans*. En círculo rojo se determinan el ST descrito en este estudio (ST482).

En la figura 19 se representan los 56 ST descritos hasta el momento de la especie *B. cepacia*. La representación del algoritmo BURST muestra que la mayoría de ST son *singletons*, y por tanto no tienen relación clonal entre ellos. Los secuenciotipos *B. cepacia* descritos en este estudio el ST726 es un *singleton*, no establece ninguna relación clonal, mientras que el ST9 tiene un SLV que corresponde al ST838.



**Figura 19.** Representación del algoritmo BURST de todos los secuentipos descritos del complejo *Burkholderia cepacia*. En círculo rojo se determinan los ST descritos en este estudio (ST9, ST17, ST51, ST723, ST724, ST725, ST726 y ST814).

En la figura 20 se representan los 21 ST descritos hasta el momento de la especie *B. stabilis*. Se observa un CC formado por cuatro ST diferentes, de los cuales los secuenciotipos ST50, ST52 y ST521 son SLVs del ST51 fundador, descrito este ultimo en este estudio.

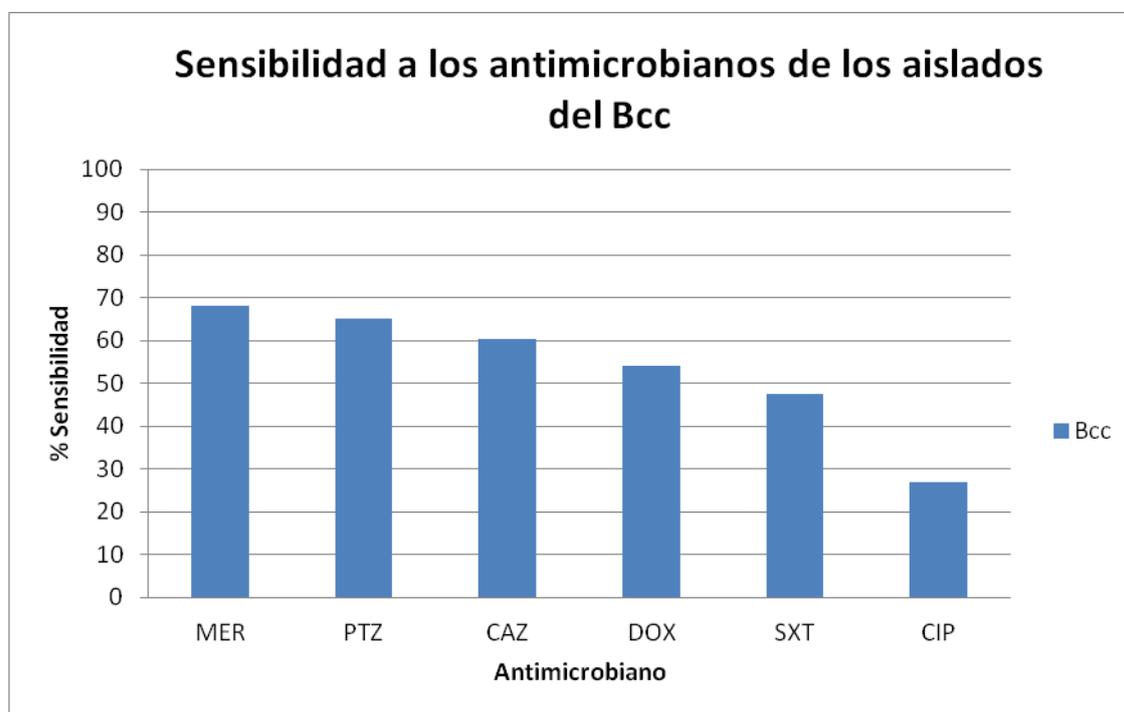


**Figura 20.** Algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie *B. stabilis*. En círculo rojo se determinan el ST descrito en este estudio (ST51).

#### 4.6. Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de los aislados del Bcc.

Para abordar este objetivo, se estudiaron los 63 aislados de 16 pacientes mediante la técnica de disco difusión siguiendo las recomendaciones de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

De los 63 aislados estudiados 43 fueron sensibles a meropenem (68,2%), 41 a piperacilina-tazobactam (65,1%), 38 a ceftazidima (60,3%), 34 a doxiciclina (54,6%), 30 a trimetoprim-sulfametoxazol (47,6%) y 17 a ciprofloxacina (26,9%) (Figura 21).



**Figura 21.** Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de 63 aislados obtenidos de 16 pacientes con FQ. Piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), meropenem (MER), doxiciclina (DOX), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP).

En la tabla 19 se exponen los resultados obtenidos de los 63 aislados estudiados junto con el porcentaje de sensibilidad de los aislados por paciente. Los pacientes colonizados o infectados por *B. multivorans*, del paciente A los 3 aislados fueron sensibles a meropenem. Los dos primeros aislados fueron resistentes a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, doxiciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Por el contrario el último aislado fue sensible a doxiciclina. Los cinco aislados del paciente B fueron sensibles a doxiciclina y resistentes a

meropenem, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Del paciente E todos los aislados fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, meropenem y doxiciclina, en cambio todos fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Solo dos aislados fueron sensibles a ceftazidima. En cuanto al paciente G de los nueve aislados obtenidos todos fueron sensibles a doxiciclina. Dos aislados de este paciente obtenidos de una misma muestra de esputo mostraron un perfil de sensibilidad diferente; ambos aislados fueron sensibles a doxiciclina y resistentes a meropenem y ciprofloxacina, por el contrario difirieron en la sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol, piperacilina-tazobactam y ceftazidima.

Los pacientes colonizados o infectados por *B. cepacia*, del paciente H se obtuvieron 3 aislados entre mayo 2010 y diciembre 2012, los dos primeros fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, ceftazidima y meropenem y resistentes a doxiciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Por el contrario el último aislado fue resistente a todos los antimicrobianos. De los 12 aislados del paciente I todos fueron sensibles a piperacilina-tazobactam y meropenem. Sin embargo el último aislado fue resistente a todos los antimicrobianos. Los 10 aislados del paciente J fueron los aislados que mostraron unos mayores niveles de resistencia, de los cuales cuatro fueron resistentes a todos los antimicrobianos; todos los aislados fueron resistentes a doxiciclina.

Los pacientes colonizados o infectados por *B. contaminans*, los dos aislados obtenidos del paciente K fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, ceftazidima y meropenem y resistentes a ciprofloxacina; uno de ellos fue resistente a doxiciclina y trimetoprim-sulfametoxazol mientras que el restante fue sensible a estos antimicrobianos. En cuanto al paciente L se obtuvieron dos aislados, el primero fue sensible a todos los antimicrobianos mientras que el segundo fue resistente a ceftazidima, doxiciclina y ciprofloxacina. Referente al paciente M el primer aislado fue sensible a todos los antimicrobianos y el segundo fue resistente a doxiciclina y trimetoprim-sulfametoxazol. Del paciente P se obtuvieron seis aislados, los cuatro primeros pertenecían a *B. contaminans* mientras que los dos últimos a *B. stabilis*. El primer de ellos fue sensible a todos los antimicrobianos, por el contrario los cuatro últimos fueron resistentes a ciprofloxacina; todos los aislados de este paciente fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, meropenem y trimetoprim-sulfametoxazol. Finalmente del paciente D sus dos aislados tuvieron el mismo patrón de resistencia siendo ambos resistentes a ciprofloxacina (Tabla 19).

**Tabla 19.** Distribución de los aislados de complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de 16 pacientes con FQ, fecha de la obtención de la muestra con el patrón de resistencia.

Paciente	Cepa	Fecha	Bcc especie	PTZ	CAZ	MER	DOX	SXT	CIP
A	BCC030	14/02/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	S	R	R	R
	BCC029	06/09/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	S	R	R	R
	BCC054	11/01/2012	<i>B. multivorans</i>	R	R	S	S	R	R
	Sensibilidad		3	0%	0%	100%	33,3%	0%	0%
B	BCC011	28/01/2010	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	R	R
	BCC013	15/07/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	I	S	R	R
	BCC055	08/11/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	R	S	R	R
	BCC012	14/03/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	R	R
	BCC056	10/07/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	R	R
Sensibilidad		5	40%	40%	0%	100%	0%	0%	
E	BCC008	18/02/2010	<i>B. multivorans</i>	S	R	S	S	R	R
	BCC057	02/06/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	R	R
	BCC009	25/09/2010	<i>B. multivorans</i>	S	R	S	S	R	R
	BCC010	30/06/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	R	R
Sensibilidad		4	100%	50%	100%	100%	0%	0%	
G	BCC034	10/02/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	I
	BCC005	30/09/2010	<i>B. multivorans</i>	R	S	S	S	S	S
	BCC058	24/11/2010	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	S	S
	BCC006	23/03/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC059	05/05/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	I	S	S	S
	BCC035	07/03/2012	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	S	I
	BCC036	07/03/2012	<i>B. multivorans</i>	S	S	R	S	R	R
	BCC060	12/04/2012	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC044	11/08/2012	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	I
Sensibilidad		9	55,6%	66,7%	55,6%	100%	88,9 %	55,6%	
H	BCC007	28/05/2010	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	R
	BCC061	02/08/2010	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	I
	BCC051	04/12/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R
	Sensibilidad		3	66,7%	66,7%	66,7%	0%	0%	0%
I	BCC026	30/11/2010	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC027	20/02/2011	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC062	02/03/2011	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	S	S
	BCC028	14/04/2011	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC063	11/05/2011	<i>B. cepacia</i>	S	I	S	I	S	I
	BCC033	22/02/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	R	R
	BCC064	03/04/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	R	R
	BCC065	17/04/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	R
	BCC037	27/04/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC038	16/05/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	R	R
BCC041	30/07/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	R	

	BCC047	19/12/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R
		Sensibilidad	12	91,7%	83,3%	91,7%	58,3%	50%	38,5%
J	BCC018	14/09/2010	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	S	R
	BCC066	30/11/2010	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	S	R
	BCC053	02/03/2011	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R
	BCC067	17/03/2011	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R
	BCC068	06/04/2011	<i>B. cepacia</i>	R	R	S	R	R	R
	BCC069	25/05/2011	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	R
	BCC032	14/03/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R
	BCC043	18/08/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R
	BCC048	19/12/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	S
		Sensibilidad	10	11,1%	11,1%	22,2%	0%	22,2%	11,1%
K	BCC003	10/11/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	R	R
	BCC004	09/02/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	R
		Sensibilidad	2	100%	100%	100%	50%	50%	0%
L	BCC022	28/05/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC024	18/10/2010	<i>B. contaminans</i>	S	R	S	R	S	I
		Sensibilidad	2	100%	50%	100%	50%	100%	50%
M	BCC023	30/07/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC017	10/12/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	R	S
		Sensibilidad	2	100%	100%	100%	50%	50%	50%
P	BCC015	08/09/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	S
	BCC016	25/05/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	S	S
	BCC025	16/10/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	S	R
	BCC070	09/12/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	R
	BCC040	28/03/2012	<i>B. stabilis</i>	S	S	S	R	S	R
	BCC042	14/08/2012	<i>B. stabilis</i>	S	S	S	S	S	R
		Sensibilidad	6	100%	100%	100%	50%	100%	33,3%
C	BCC001	01/12/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	R	S	R
D	BCC 020	04/02/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	R
	BCC 052	05/10/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	R
		Sensibilidad	3	100%	100%	100%	100%	100%	0%
F	BCC049	25/09/2012	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	R	R	R
N	BCC045	12/09/2012	<i>B. contaminans</i>	R	R	R	R	R	I
O	BCC050	05/10/2012	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	S	S

Piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), meropenem (MER), doxiciclina (DOX), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP).

#### 4.6.1 Evolución de la resistencia a antimicrobianos por parte de los clones de Bcc.

Con el fin de estudiar la evolución de la resistencia de los diferentes clones del Bcc, en la tabla 20 se exponen los resultados obtenidos de la sensibilidad a antimicrobianos según el pulsotipo obtenido del estudio de clonalidad de los 43 aislados previamente seleccionados .

A continuación se detallan los resultados de aquellos pulsotipos con más de un aislado estudiado. De la especie *B. multivorans* se analizó la resistencia a antimicrobianos de los pulsotipo VI, I, III y X (Tabla 20).

Del pulsotipo VI se analizaron los cinco aislados (BCC011, BCC013, BCC030, BCC012 y BCC029), obtenidos entre enero 2010 y septiembre 2011, de los pacientes A y B. Se observa como la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina se mantiene en todos los aislados. El aislado BCC013 fue sensible a piperacilina-tazobactam y ceftazidima, por el contrario los otros aislados fueron resistentes. La sensibilidad a meropenem y doxiciclina fue variable entre los aislados (Tabla20).

Del pulsotipo I se analizaron tres aislados (BCC008, BCC09 y BCC010), obtenidos entre febrero 2010 y junio 2011, del paciente E. Se determinó como la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina, se mantiene entre todos los aislados. Los aislados BCC008 y BCC009 fueron resistentes a ceftazidima. Por el contrario todos los aislados fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, meropenem y doxiciclina (Tabla 20).

Del pulsotipo III se analizaron seis aislados (BCC034, BCC005, BCC006, BCC035, BCC036 y BCC044), obtenidos entre febrero 2010 y agosto 2012, del paciente G. Tres aislados, BCC035, BCC036 y BCC044, obtenidos entre marzo y agosto de 2012 fueron resistentes a ciprofloxacina. Todos los aislados fueron sensibles a doxiciclina (Tabla 20).

Del pulsotipo X se analizaron dos aislados (BCC020 y BCC052), obtenidos en febrero y octubre 2011, del paciente D. Ambos aislados tuvieron el mismo patrón de resistencia siendo solo resistentes a ciprofloxacina (Tabla20).

De la especie *B. cepacia* se analizó la resistencia a antimicrobianos de los pulsotipo IX y V (Tabla 20).

Del pulsotipo IX se analizaron dos aislados (BCC007 y BCC051), obtenidos en mayo 2010 y diciembre 2012, del paciente H. Ambos aislados mostraron ser resistentes a doxiciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. El aislado, BCC007, obtenido en mayo 2010 fue sensible a piperacilina-tazobactam, ceftazidima y meropenem; mientras que el aislado BCC051 fue resistente.

Del pulsotipo V se analizaron diez aislados (BCC018, BCC026, BCC053, BCC028, BCC033, BCC032, BCC041, BCC043, BCC047 y BCC048), obtenidos entre septiembre 2010 y diciembre 2012, de los pacientes I y J. Dos aislados, BCC043 y BCC047 obtenidos entre agosto de 2012 y diciembre 2012, fueron resistentes a todos los antimicrobianos. Los cinco aislados (BCC032, BCC041, BCC043, BCC047 y BCC048) obtenidos entre marzo 2012 y diciembre 2012 fueron resistentes a doxiciclina. Seis aislados (BCC033, BCC032, BCC041, BCC043, BCC047 y BCC048) obtenidos entre febrero 2012 y diciembre 2012 fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol. Cuatro aislados BCC033, BCC032, BCC041, BCC043 y BCC047 del mismo clon obtenidos cronológicamente entre febrero y diciembre de 2012 fueron resistentes a ciprofloxacina.

De la especie *B. contaminans* se analizó la resistencia a antimicrobianos del pulsotipo IV (Tabla 20). Del pulsotipo IV se analizaron once aislados (BCC022, BCC023, BCC015, BCC024, BCC003, BCC017, BCC004, BCC016, BCC025, BCC045 y BCC050), obtenidos entre mayo de 2010 y octubre 2012, de los pacientes K, L, M, N, O y P. Cuatro aislados obtenidos entre mayo 2011 y octubre 2012 fueron resistentes a doxiciclina. Los aislados BCC024 y BCC45 fueron los únicos resistentes a ceftazidima. Diez de los once aislados fueron sensibles a piperacilina-tazobactam y meropenem, solo el aislado BCC045 obtenido en septiembre de 2012 fue resistente a los mencionados antimicrobianos. La sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina fue dispar entre los aislados.

Finalmente de la especie *B. stabilis* se analizó la resistencia a antimicrobianos del pulsotipo VIII (Tabla 20). Del pulsotipo VIII se analizaron dos aislados (BCC040 y BCC042), obtenidos en marzo y agosto de 2012 respectivamente, del paciente P. Los dos aislados fueron resistentes a ciprofloxacina. El aislado BCC040 fue resistente a doxiciclina, a diferencia del aislado BCC042 que fue sensible. Los dos aislados fueron sensibles a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, meropenem y trimetoprim-sulfametoxazol.

**Tabla 20.** Distribución de los 43 aislados ordenados cronológicamente del complejo *Burkholderia cepacia* según el pulsotipo obtenido en el estudio de clonalidad, fecha de la obtención de la muestra y patrón de resistencia.

Cepa	Fecha	Bcc especie	PTZ	CAZ	MER	DOX	SXT	CIP	Pulsotipo
BCC011	28/01/2010	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	R	R	VI
BCC013	15/07/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	I	S	R	R	
BCC030	14/02/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	S	R	R	R	
BCC012	14/03/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	R	R	
BCC029	06/09/2011	<i>B. multivorans</i>	R	R	S	R	R	R	
BCC008	18/02/2010	<i>B. multivorans</i>	S	R	S	S	R	R	I
BCC009	25/09/2010	<i>B. multivorans</i>	S	R	S	S	R	R	
BCC010	30/06/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	R	R	
BCC034	10/02/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	I	III
BCC005	30/09/2010	<i>B. multivorans</i>	R	S	S	S	S	S	
BCC006	23/03/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	S	
BCC035	07/03/2012	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	S	S	I	
BCC036	07/03/2012	<i>B. multivorans</i>	S	S	R	S	R	R	
BCC044	11/08/2012	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	I	
BCC001	01/12/2010	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	R	S	R	
BCC 020	04/02/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	R	X
BCC 052	05/10/2011	<i>B. multivorans</i>	S	S	S	S	S	R	II
BCC049	25/09/2012	<i>B. multivorans</i>	R	R	R	R	R	R	
BCC007	28/05/2010	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	R	IX
BCC051	04/12/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R	
BCC018	14/09/2010	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	S	R	V
BCC026	30/11/2010	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	S	S	
BCC053	02/03/2011	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R	
BCC028	14/04/2011	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	S	S	
BCC033	22/02/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	S	R	R	
BCC032	14/03/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R	
BCC041	30/07/2012	<i>B. cepacia</i>	S	S	S	R	R	R	
BCC043	18/08/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R	
BCC047	19/12/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	R	
BCC048	19/12/2012	<i>B. cepacia</i>	R	R	R	R	R	S	
BCC022	28/05/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	S	IV
BCC023	30/07/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	S	
BCC015	08/09/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	S	
BCC024	18/10/2010	<i>B. contaminans</i>	S	R	S	R	S	I	
BCC003	10/11/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	R	R	
BCC017	10/12/2010	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	R	S	
BCC004	09/02/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	S	S	R	
BCC016	25/05/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	S	S	
BCC025	16/10/2011	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	S	R	

---

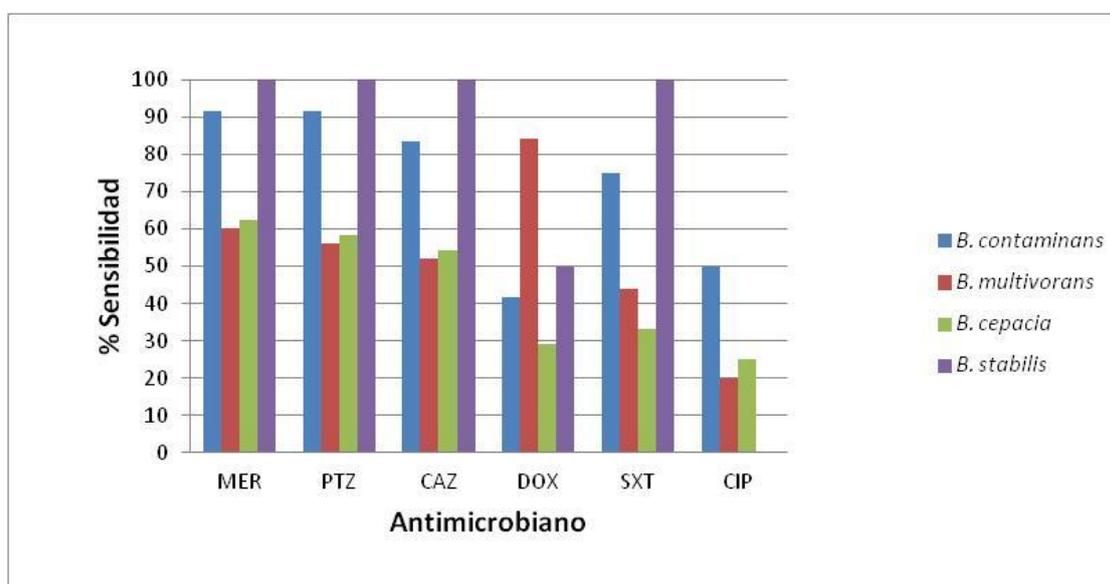
BCC045	12/09/2012	<i>B. contaminans</i>	R	R	R	R	R	I	
BCC050	05/10/2012	<i>B. contaminans</i>	S	S	S	R	S	S	
BCC040	28/03/2012	<i>B. stabilis</i>	S	S	S	R	S	R	VIII
BCC042	14/08/2012	<i>B. stabilis</i>	S	S	S	S	S	R	

Piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), meropenem (MER), doxiciclina (DOX), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP).

#### 4.6.2 Estudio de los perfiles de sensibilidad entre las distintas especies de Bcc

Para evaluar los diferentes perfiles de sensibilidad de las distintas especies del Bcc se agruparon por especies los resultados obtenidos del estudio de sensibilidad a antimicrobianos de los 63 aislados obtenidos de Bcc.

Los aislados obtenidos de *B. contaminans* el 91,7% fueron sensibles a meropenem y piperacilina-tazobactam, el 83,3% a ceftazidima, el 75% a trimetoprim-sulfametoxazol, el 41,7% a doxiciclina y el 50% fueron sensibles a ciprofloxacina. Los aislados de *B. multivorans* fueron sensibles a doxiciclina el 84%, el 60% a meropenem, el 56% a piperacilina-tazobactam, el 52% a ceftazidima, el 44% a trimetoprim-sulfametoxazol y el 20% fue sensible a ciprofloxacina. Por lo que respecta a los aislamientos de *B. cepacia* el 62,5% de fueron sensibles a meropenem, el 58,3% a piperacilina-tazobactam, el 54,2% a ceftazidima, el 33,3% a trimetoprim-sulfametoxazol, el 29,2% a doxiciclina y el 25% a ciprofloxacina. Finalmente las dos aislamientos de *B. stabilis* fueron sensibles a meropenem, piperacilina-tazobactam, ceftazidima y trimetoprim-sulfametoxazol; uno de ellos fue resistente a doxiciclina y ambas fueron resistentes a ciprofloxacina (Tabla 21). En la figura 22 se exponen los resultados gráficamente.



**Figura 22.** Sensibilidad antimicrobiana de los 63 aislados del Bcc agrupados por especie. Meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), doxiciclina (DOX), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP).

**Tabla 21.** Tabla resumen de los resultados obtenidos del estudio de sensibilidad a antimicrobianos de los 63 aislados del Bcc agrupados por especie.

	N <sup>o</sup> aislados	Porcentaje de sensibilidad					
		MER	PTZ	CAZ	DOX	SXT	CIP
<i>B. contaminans</i>	12	11 (91,7%)	11 (91,7%)	10 (83,3%)	5 (41,7%)	9(75%)	6(50%)
<i>B. multivorans</i>	25	15(60%)	14 (56%)	13 (52%)	21 (84%)	11 (44%)	5(20%)
<i>B. cepacia</i>	24	15(62,5%)	14(58,3%)	13(54,2%)	7(29,2%)	8(33,3%)	6(25%)
<i>B. stabilis</i>	2	2(100%)	2(100%)	2(100%)	1(50%)	2(100%)	0

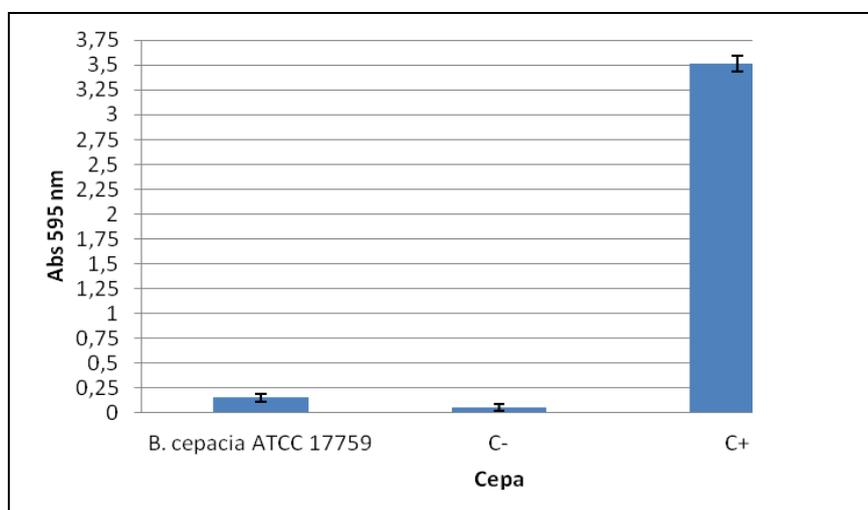
Meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PTZ), ceftazidima (CAZ), doxiciclina (DOX), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y ciprofloxacina (CIP).

#### 4.7 Cuantificación del biofilm formado por los aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de muestras respiratorias de pacientes con FQ.

##### 4.7.1 Estandarización de la metodología para cuantificar *in vitro* el biofilm formado por bacterias.

Para estandarizar la cuantificación del biofilm, se emplearon las cepas de referencia *S. epidermidis* ATCC 35984, con gran capacidad de formar biofilm, y *S. epidermidis* ATCC 1228 como no formadora de biofilm. También se incluyó la cepa *B. cepacia* ATCC17759 utilizada anteriormente en estudios similares con el objetivo de validar el procedimiento realizado.

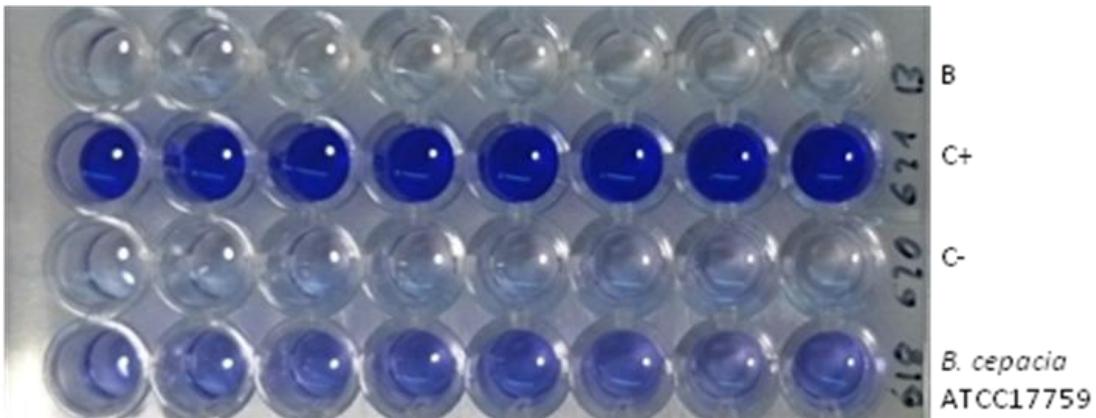
Los resultados obtenidos de la cuantificación del biofilm siguiendo la metodología señalada mostraron que la cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 fue la que presentó una mayor capacidad de formar biofilm (absorbancia  $3,512 \pm 0,08$  a 595 nm) mientras que la cepa *S. epidermidis* ATCC 1228 fue la que menor biofilm formó (absorbancia  $0,056 \pm 0,029$  a 595 nm). En cuanto la cepa *B. cepacia* ATCC 17759, se obtuvo una absorbancia de  $0,153 \pm 0,039$  a 595 nm (Figura 23).



**Figura 23.** Gráfico donde se representa la cuantificación del biofilm mediante la técnica de cristal violeta de las cepas control. *S. epidermidis* ATCC 35984, C+; *S. epidermidis* ATCC 1228, C- y la *B. cepacia* ATCC 17759, aislado perteneciente al complejo *Burkholderia cepacia* evaluado en el estudio.

En la figura 24 se muestra el resultado final del proceso de cuantificación de biofilm de las cepas control. Como se puede observar, la tinción con cristal violeta de las bacterias adheridas al pocillo pone de manifiesto como la cepa control positivo *S. epidermidis* ATCC

35984, muestra un color violeta mucho más intenso que el de la cepa control negativo *S. epidermidis* ATCC 1228.

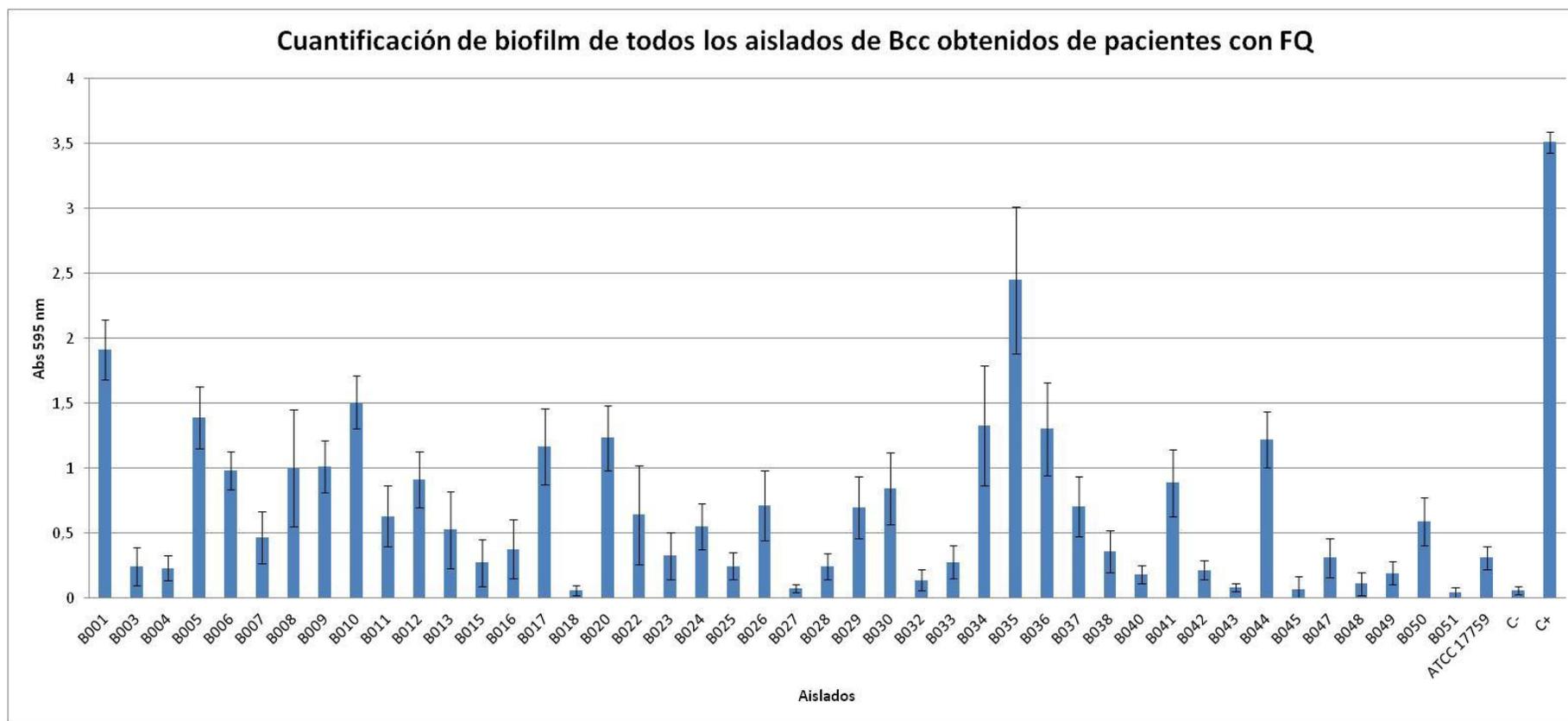


**Figura 24.** Imagen del estudio de la cuantificación de biofilm de las cepas control mediante la técnica de cristal violeta. *S. epidermidis* ATCC 35984, C+; *S. epidermidis* ATCC 1228, C-; blanco, B; *B. cepacia* ATCC17759, aislado perteneciente al complejo *Burkholderia cepacia* testado en el estudio.

#### **4.7.2 Determinar la capacidad de formar biofilm de los aislados del complejo *Burkholderia cepacia*.**

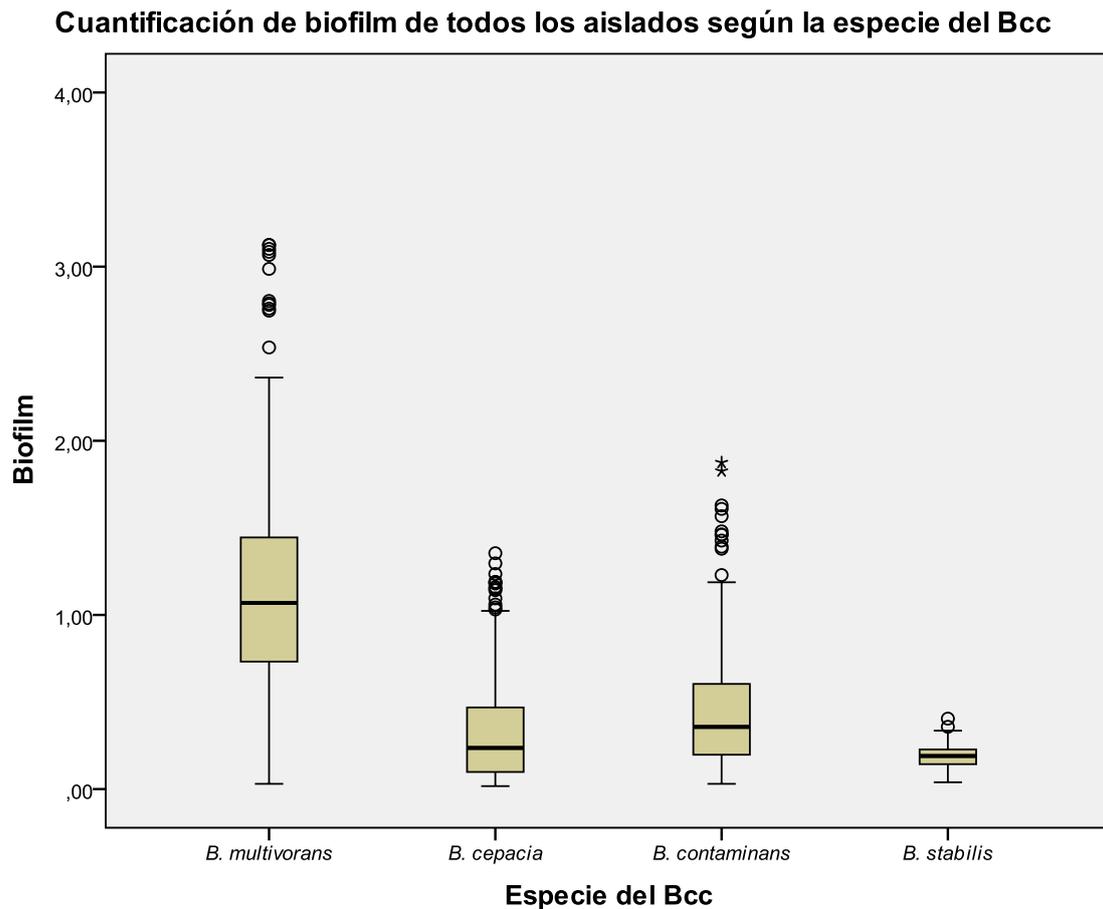
El estudio de la capacidad de formar biofilm de aislados del Bcc se realizó en 44 aislados. En la figura 25 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación realizada de todos los aislados, en ninguno de ellos la absorbancia obtenida fue superior a los resultados exhibidos por la cepa control *S. epidermidis* ATCC 35984 ( $3,512 \pm 0,08$ ).

Los aislados con una absorbancia de  $\geq 1,5$  a 595nm se consideraron con gran capacidad de formar biofilm, por el contrario aquellos aislados en los que la absorbancia fuera  $\leq 0,1$  a 595nm se consideraron como no formadores de biofilm. Los aislados se consideraron como formadores de biofilm si la cuantificación de biofilm a 595 nm tenía un valor de absorbancia superior 0,1 e inferior a 1,5. Según los puntos de corte establecidos, tres aislados (6,8%) BCC010, BCC001 y BCC035 ( $1,507 \pm 0,203$ ;  $1,91 \pm 0,232$  y  $2,45 \pm 0,567$  a 595 nm, respectivamente), mostraron una gran capacidad para formar biofilm. Cinco aislados (11,36%), BCC051, BCC018, BCC045, BCC027 y BCC043 ( $0,04 \pm 0,045$ ;  $0,057 \pm 0,037$ ;  $0,066 \pm 0,097$ ;  $0,075 \pm 0,032$ ; y  $0,082 \pm 0,034$  respectivamente) se consideraron como no formadores de biofilm. Los 36 aislados restantes se consideraron como formadores de biofilm (81,8%) (Figura 25).



**Figura 25.** Gráfica representativa de la cuantificación del biofilm mediante la técnica de cristal violeta de aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* de pacientes con FQ. *S. epidermidis* ATCC 35984, C+; *S. epidermidis* ATCC 1228, C-; *B. cepacia* ATCC17759.

La especie que mostró una mayor cuantificación de biofilm en sus aislados fue *B. multivorans* ( $1,069 \pm 0,592$ ) seguido de, *B. contaminans* ( $0,357 \pm 0,355$ ), *B. cepacia* ( $0,236 \pm 0,301$ ) y *B. stabilis* ( $0,19 \pm 0,08$ ). Los resultados obtenidos de cada especie mostraron que entre todas ellas existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). A su vez ninguna especie se consideró como no formadora de biofilm (Figura 26).



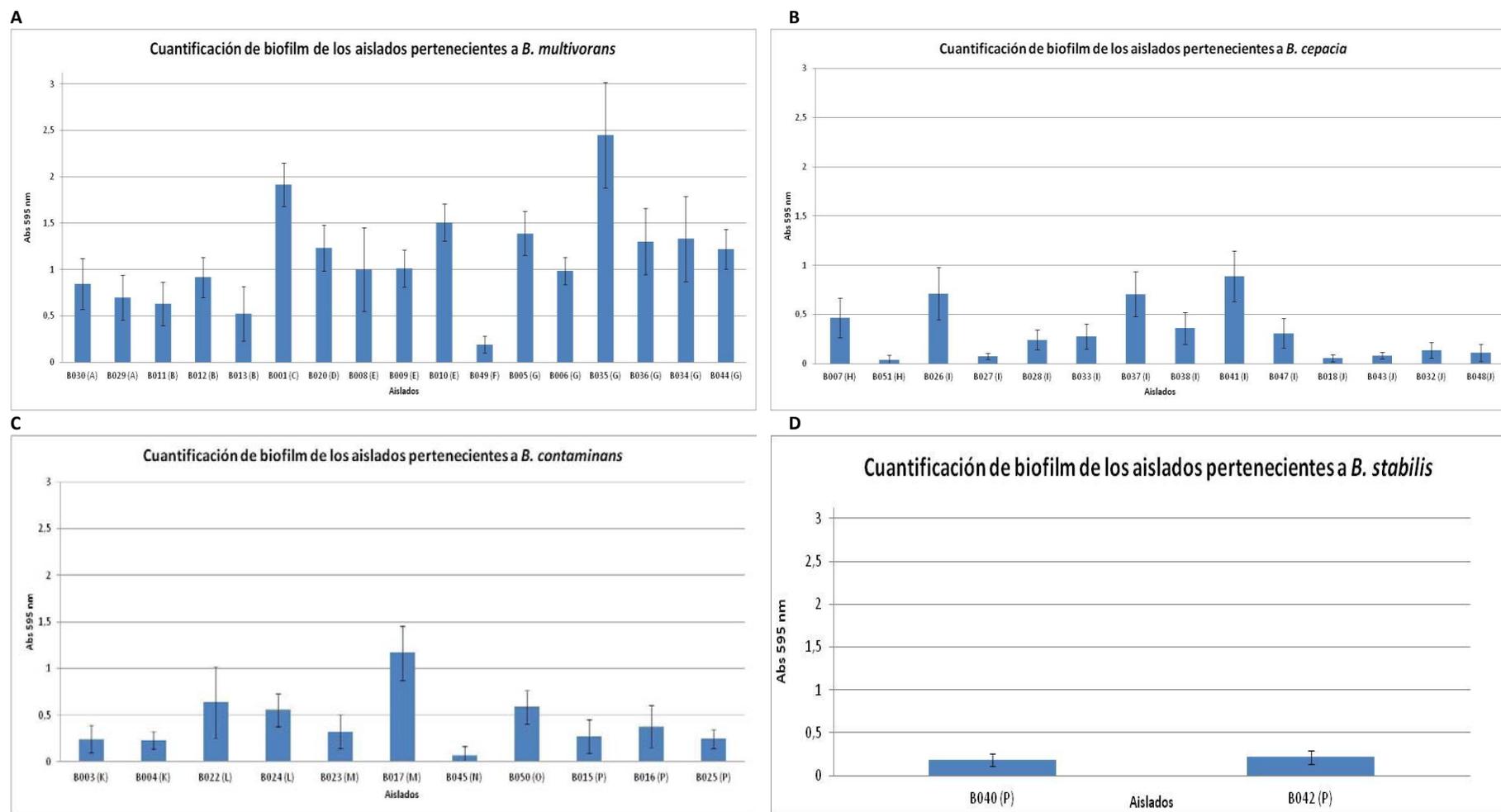
**Figura 26.** Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de todos los aislados distribuidos por especies. Los círculos representan los valores atípicos, los cuales se encuentran alejados 1,5 veces del rango intercuartílico. Las estrellas representan los valores extremos, los cuales se encuentra alejados 3 veces o más del rango intercuartílico.

Al comparar la capacidad para formar biofilm a nivel intraespecie se observan diferencias entre la capacidad de formar biofilm de los aislados de una misma especie (Figura 27). Entre los aislados de *B. multivorans*, tres aislados BCC010, BCC001 y BCC035 mostraron una gran capacidad para formar biofilm ( $1,507 \pm 0,203$ ;  $1,91 \pm 0,232$  y  $2,45 \pm 0,567$  a 595 nm, respectivamente). Ningún aislado de *B. multivorans* fue considerado como no formador de biofilm. No obstante, el aislado BCC0049 fue el que mostró una menor capacidad de formar biofilm ( $0,192 \pm 0,09$ ).

Ninguno de los aislados de *B. cepacia* exhibió una gran capacidad para formar biofilm. Cuatro aislados de *B. cepacia* se consideraron como no formadores de biofilm, BCC051, BCC018, BCC027 y BCC043 ( $0,04 \pm 0,045$ ;  $0,057 \pm 0,037$ ;  $0,075 \pm 0,032$  y  $0,082 \pm 0,034$  a 595nm respectivamente). Los diez aislados restantes se consideraron formadores de biofilm; el aislado BCC0041 ( $0,887 \pm 0,257$ ) fue el que mostró la capacidad de formar biofilm más elevada (Figura 27).

En ningún aislado de *B. contaminans* se cuantificó una gran capacidad para formar biofilm. Solo un aislado, BCC045 ( $0,066 \pm 0,097$ ), se considero como no formador de biofilm. Diez aislados de *B. contaminans* se consideraron formadores de biofilm. El aislado BCC017 fue el que exhibió una capacidad más elevada de formar biofilm ( $1,167 \pm 0,290$ ) (Figura 27).

Finalmente entre los dos aislados de *B. stabilis*, BCC040 y BCC042, se consideró que ambos tenían capacidad para formar biofilm ( $0,180 \pm 0,07$  y  $0,214 \pm 0,073$  respectivamente) (Figura 27).



**Figura 27.** Cuantificación de biofilm de los distintos aislados agrupados por especie. Cuantificación de biofilm de los aislados pertenecientes a; **A**, *B. multivorans*; **B**, *B. cepacia*; **C**, *B. contaminans*; **D**, *B. stabilis*. Cada letra representa a cada uno de los 16 pacientes.

A continuación se detallan los resultados obtenidos entre los aislados de un mismo paciente. En consecuencia se describen los resultados de los pacientes A, B, E, G, H, I, J, K, L, M y P, los cuales se estudió la capacidad de formar biofilm en más de un aislado (Figura 27 y Tabla 22).

A los pacientes A, B, E y G, se estudió más de un aislado de la especie *B. multivorans*. Del paciente A se cuantificó la capacidad de formar biofilm de dos aislados BCC029 y BCC030 ( $0,695\pm 0,240$  y  $0,842\pm 0,275$  respectivamente), todos los aislados de este paciente fueron formadores de biofilm. Se determinaron diferencias significativas entre los dos aislados ( $p\leq 0,05$ ).

Del paciente B se estudió la capacidad de formar biofilm de tres aislados, BCC011, BCC012 y BCC013 ( $0,629\pm 0,235$ ;  $0,915\pm 0,217$  y  $0,524\pm 0,295$  respectivamente) considerados como formadores de biofilm. Se determinó que existían diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre, los aislados BCC011 y BCC012, y entre los aislados BCC012 y BCC013. Sin embargo entre los aislados BCC011 y BCC013 no se determinaron diferencias significativas en la cuantificación de biofilm ( $p>0,05$ ).

Del paciente E se estudió la capacidad de formar biofilm tres aislados, BCC008, BCC009 y BCC010 ( $0,999\pm 0,451$ ;  $1,01\pm 0,200$  y  $1,507\pm 0,203$  respectivamente). El aislado BCC010 tuvo una gran capacidad de formar biofilm, mientras que los otros dos aislados se considerando como formadores de biofilm. No se observaron diferencias significativas entre los aislados BCC008 y BCC009 ( $p>0,05$ ), pero si con el aislado BCC010 ( $p\leq 0,05$ ).

Del paciente G se estudiaron seis aislados, BCC005, BCC006, BCC035, BCC036, BCC034 y BCC044 ( $1,389\pm 0,239$ ;  $0,983\pm 0,148$ ;  $2,450\pm 0,567$ ;  $1,302\pm 0,356$ ;  $1,33\pm 0,459$  y  $1,221\pm 0,215$  respectivamente). El aislado BCC035 tuvo una gran capacidad de formar biofilm, los demás aislados se consideraron como formadores de biofilm, siendo el aislado BCC006 el que mostró una menor capacidad de formar biofilm ( $0,983\pm 0,148$ ). Ambos aislados BCC035 y BCC006 mostraron diferencias significativas con los demás aislados ( $p\leq 0,05$ ). No obstante, entre los cuatro aislados restantes, BCC005, BCC006, BCC036, BCC034 y BCC044, no se observaron diferencias significativas entre ellos ( $p>0,05$ ).

A los pacientes H, I y J, se estudió más de un aislado de la especie *B. cepacia*.

Del paciente H, se determinó la capacidad de formar biofilm de dos aislados, BCC007 y BCC051 ( $0,467 \pm 0,2$  y  $0,04 \pm 0,045$  respectivamente). El aislado BCC051 se calificó como no formador de biofilm mientras que el BCC007 se consideró como formador de biofilm. Entre estos dos aislados existieron diferencias significativas en la cuantificación de biofilm ( $p \leq 0,05$ ).

Del paciente I se estudiaron ocho aislados, BCC026, BCC027, BCC028, BCC033, BCC037, BCC038, BCC041 y BCC047 ( $0,713 \pm 0,266$ ;  $0,075 \pm 0,032$ ;  $0,241 \pm 0,101$ ;  $0,278 \pm 0,130$ ;  $0,706 \pm 0,228$ ;  $0,361 \pm 0,163$ ;  $0,887 \pm 0,257$  y  $0,310 \pm 0,151$  respectivamente). El aislado BCC027 se determinó como no formador de biofilm mientras que los demás se consideraron como formadores de biofilm. Los aislados con mayor capacidad de formar biofilm BCC026, BCC037 y BCC041 no mostraron ninguna diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ellos pero si con los demás cinco aislados ( $p \leq 0,05$ ). Los cuatro aislados BCC028, BCC033, BCC038 y BCC047 no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Finalmente el aislado BCC027 mostró diferencias significativas en la cuantificación de biofilm con los otros aislados ( $p \leq 0,05$ ).

Del paciente J se analizó la capacidad de formar biofilm de 4 aislados; BCC018, BCC043, BCC032 y BCC048 ( $0,057 \pm 0,037$ ;  $0,082 \pm 0,034$ ;  $0,136 \pm 0,08$  y  $0,111 \pm 0,087$  respectivamente). Los aislados BCC018 y BCC043, se consideraron como no formadores de biofilm, mientras que el resto se consideraron como formadores de biofilm. Entre los aislados formadores de biofilm y no formadores se determinaron diferencias significativas en la cuantificación de biofilm ( $p \leq 0,05$ ). En cambio en los aislados BCC0018 y BCC043 no se apreciaron diferencias significativas en la capacidad de formar biofilm ( $p > 0,05$ ), de igual manera tampoco se observaron diferencias significativas entre los aislados BCC032 y BCC048 ( $p > 0,05$ ).

A los pacientes K, L, M y P, se estudió más de un aislado de la especie *B. contaminans*. Del paciente K, se estudiaron dos aislados BCC003 y BCC004 ( $0,244 \pm 0,145$  y  $0,231 \pm 0,095$ ) considerados ambos formadores de biofilm y de los cuales no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

El paciente L, del cual también se estudiaron dos aislados, BCC022 y BCC024 ( $0,64 \pm 0,038$  y  $0,554 \pm 0,176$  respectivamente) se consideraron como formadores de biofilm, aunque no se observaron diferencias significativas en la cuantificación de biofilm ( $p > 0,05$ ).

Del paciente M se estudiaron dos aislados BCC023 y BCC017 ( $0,324\pm 0,184$  y  $1,167\pm 0,290$ ), ambos aislados se consideraron como formadores de biofilm y se determinaron diferencias significativas en la cuantificación de biofilm ( $p\leq 0,05$ ).

Los aislados pertenecientes a *B. contaminans* del paciente P; BCC015, BCC016 y BCC025 ( $0,271\pm 0,181$ ;  $0,378\pm 0,224$  y  $0,246\pm 0,101$  respectivamente), se consideraron como formadores de biofilm. El análisis estadístico determinó que no existían diferencias significativas en la capacidad de formar biofilm de estos aislados ( $p>0,05$ ).

Del pacientes P, también se obtuvieron dos aislados de *B. stabilis*. Los aislados BCC040 y BCC042 ( $0,180\pm 0,07$  y  $0,214\pm 0,073$  respectivamente) se consideraron como formadores de biofilm y se determinó que existían diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) en la capacidad de formar biofilm.

De los resultados obtenidos de biofilm se decidió determinar si existían diferencias en la cuantificación de biofilm entre los pulsotipos de una misma especie.

De la especie *B. multivorans* se describieron seis pulsotipos diferentes (I, II, III, VI, VII y X). Se determinó que no existieron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los aislados de los pulsotipos I y X, y, III y X. Por el contrario sí que existieron diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) entre los demás pulsotipos (II, III, VI, VII) (Tabla 22).

De la especie *B. cepacia* se describieron dos pulsotipos diferentes (V y XI). En la cuantificación de biofilm los aislados de los dos pulsotipos no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) (Tabla 22).

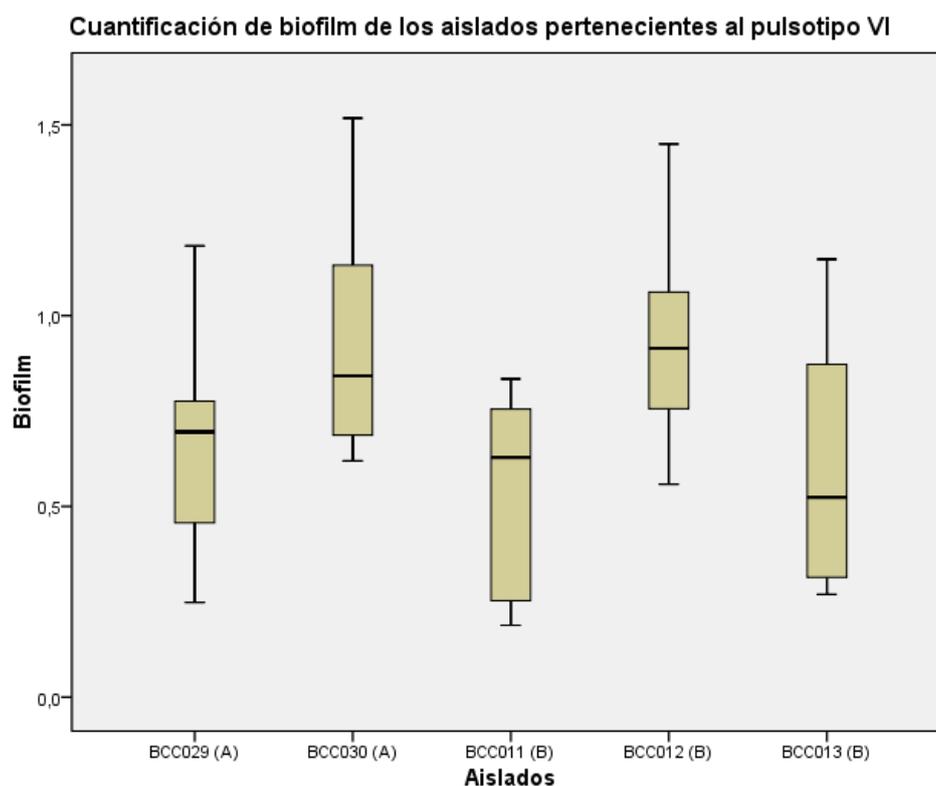
**Tabla 22.** Resultados obtenidos de la cuantificación de biofilm de los aislados estudiados mediante la técnica de cristal violeta.

Paciente	Aislado	Biofilm ( $M_e \pm SD$ )	Pulso tipo	Especie de Bcc*
A	BCC029	0,695 $\pm$ 0,240	VI	<i>B. multivorans</i> <sup>a</sup>
	BCC030	0,842 $\pm$ 0,275		
B	BCC011	0,629 $\pm$ 0,235	VI	
	BCC012	0,915 $\pm$ 0,217		
C	BCC013	0,524 $\pm$ 0,295	VII	
	BCC001	1,914 $\pm$ 0,232		
D	BCC020	1,233 $\pm$ 0,248	X	
	BCC008	0,999 $\pm$ 0,451		
E	BCC009	1,01 $\pm$ 0,200	I	
	BCC010	1,507 $\pm$ 0,203		
F	BCC049	0,192 $\pm$ 0,09	II	
	BCC005	1,389 $\pm$ 0,239		
G	BCC006	0,983 $\pm$ 0,148	III	
	BCC035	2,450 $\pm$ 0,567		
	BCC036	1,302 $\pm$ 0,356		
	BCC034	1,33 $\pm$ 0,459		
	BCC044	1,221 $\pm$ 0,215		
H	BCC07	0,467 $\pm$ 0,2	IX	
	BCC051	0,04 $\pm$ 0,045		
I	BCC026	0,713 $\pm$ 0,266	V	
	BCC027	0,075 $\pm$ 0,032		
	BCC028	0,241 $\pm$ 0,101		
	BCC033	0,278 $\pm$ 0,130		
	BCC037	0,706 $\pm$ 0,228		
	BCC038	0,361 $\pm$ 0,163		
	BCC041	0,887 $\pm$ 0,257		
	BCC047	0,310 $\pm$ 0,151		
J	BCC018	0,057 $\pm$ 0,037	V	
	BCC043	0,082 $\pm$ 0,034		
	BCC032	0,136 $\pm$ 0,08		
K	BCC048	0,111 $\pm$ 0,087	V	
	BCC003	0,244 $\pm$ 0,145		
L	BCC004	0,231 $\pm$ 0,095	V	
	BCC022	0,64 $\pm$ 0,38		
M	BCC024	0,554 $\pm$ 0,176	IV	
	BCC023	0,324 $\pm$ 0,184		
N	BCC017	1,167 $\pm$ 0,290	IV	
	BCC045	0,066 $\pm$ 0,097		
O	BCC050	0,590 $\pm$ 0,182	VIII	
	BCC015	0,271 $\pm$ 0,181		
	BCC016	0,378 $\pm$ 0,224		
	BCC025	0,246 $\pm$ 0,101		
	BCC040	0,180 $\pm$ 0,07		
P	BCC042	0,214 $\pm$ 0,073	VIII	
	BCC042	0,214 $\pm$ 0,073		

\* Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad de formar biofilm entre las diferentes especies,  $p \leq 0.05$ . <sup>a</sup> Se determinó que entre los pulsotipos I y X; III y X, de *B. multivorans* no existieron diferencias significativas,  $p > 0.05$ ; mientras que los otros pulsotipos de esta misma especie si que reflejaron diferencias significativas,  $p \leq 0.05$ . <sup>b</sup> No se determinaron diferencias significativas entre los pulso tipos IX y V pertenecientes a la especie *B. cepacia*,  $p > 0.05$ .

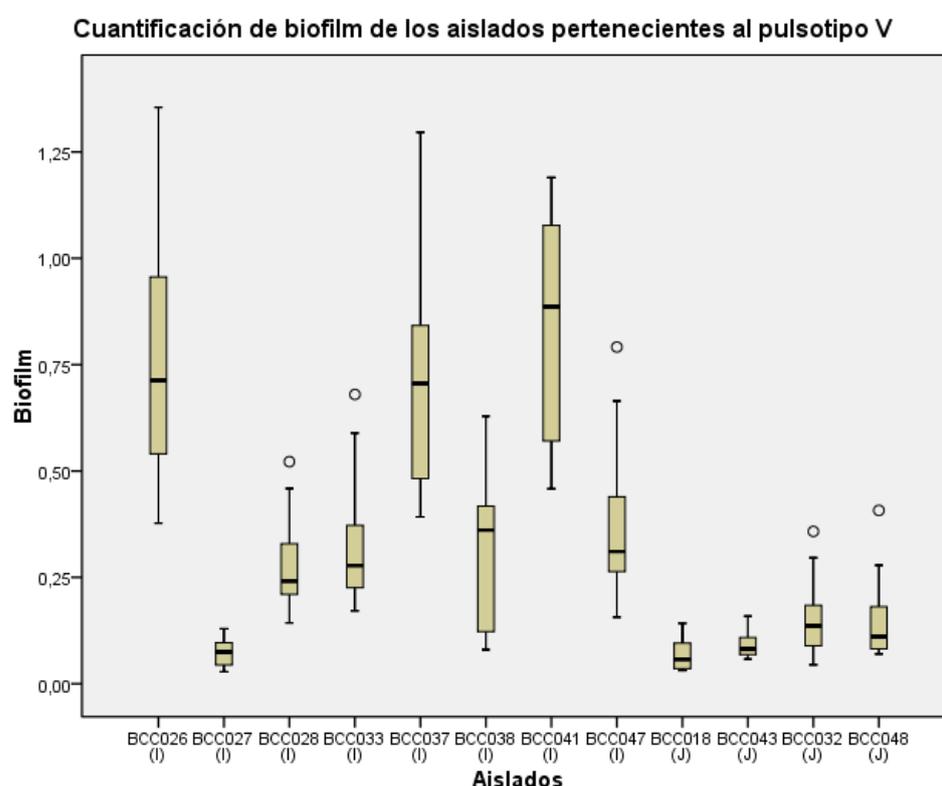
Finalmente se comparó si los aislados de un mismo pulsotipo tienen la misma capacidad de formar biofilm. Por ello se detallan los resultados obtenidos de los aislados de los pulsotipo IV, V y VI, los cuales engloban aislados de pacientes diferentes.

Del pulsotipo VI pertenecen cinco aislados de *B. multivorans* de los pacientes A y B. Se determinó que no existían diferencias significativas entre los aislados BCC030 y BCC012 ( $0,842\pm 0,275$  y  $0,915\pm 0,217$  respectivamente) ( $p>0,05$ ). Sin embargo estos dos aislados tenían diferencias significativas ( $p\leq 0,05$ ) con los tres aislados que tuvieron una menor capacidad de formar biofilm, BCC029, BCC011 y BCC013 ( $0,695\pm 0,240$ ;  $0,629\pm 0,235$  y  $0,524\pm 0,295$ , respectivamente). Entre estos últimos aislados no se determinó que existieran diferencias significativas ( $p>0,05$ ) (Figura 28).



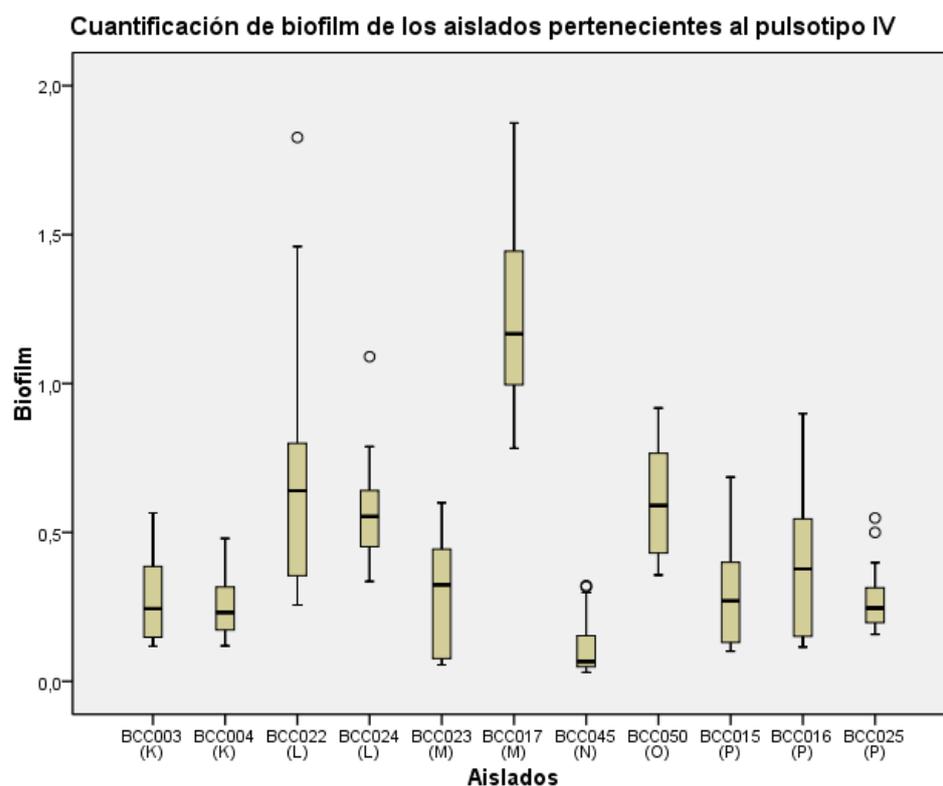
**Figura 28:** Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de los aislados del pulsotipo VI. A, corresponde a los aislados testados del paciente A; B, corresponde a los aislados testados del paciente B.

Entre todos los aislados del pulsotipo V, pertenecientes a la especie *B. cepacia* y a los pacientes I y J, los aislados con mayor capacidad de formar biofilm fueron BCC026, BCC037 y BCC041 ( $0,713\pm 0,266$ ;  $0,706\pm 0,228$  y  $0,887\pm 0,257$  respectivamente); no mostraron ninguna diferencia significativa ( $p>0,05$ ) entre ellos pero si con los demas nueve clones ( $p\leq 0,05$ ). Los tres aislados en los cuales se obtuvo una menor cuantificación, BCC027, BCC018 y BCC043 ( $0,075\pm 0,032$ ;  $0,057\pm 0,037$  y  $0,082\pm 0,034$  respectivamente), se observó que las diferencias no eran significativas ( $p>0,05$ ). Los cuatro clones restantes, BCC028, BCC033, BCC038 y BCC047 ( $0,241\pm 0,101$ ;  $0,278\pm 0,130$ ;  $0,361\pm 0,163$  y  $0,310\pm 0,151$  respectivamente) no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre ellos excepto entre los aislados BCC028 y BCC047 ( $p\leq 0,05$ ) (Figura 29).



**Figura 29:** Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de los aislados del pulsotipo V. I, corresponde a los aislados estudiados del paciente I; J, corresponde a los aislados estudiados del paciente J. Los círculos representan valores atípicos, los cuales se encuentran alejado 1,5 veces del rango intercuartílico.

Todos los aislados del pulsotipo IV son de la especie *B. contaminans*, y se obtuvieron de los pacientes K, L, M, N, O y P. El aislado con una cuantificación mayor biofilm es el BCC017 ( $1,167 \pm 0,290$ ) el cual mostró diferencias significativas en la capacidad de formar biofilm con los otros aislados ( $p \leq 0,05$ ). Igualmente el aislado BCC045 ( $0,66 \pm 0,097$ ), con una cuantificación menor de biofilm exhibió diferencias significativas con los demás aislados ( $p \leq 0,05$ ). Excepto entre los aislados BCC04 y BCC016 ( $0,231 \pm 0,095$  y  $0,378 \pm 0,224$  respectivamente) que mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ); entre los aislados BCC003, BCC023, BCC015, BCC025 ( $0,244 \pm 0,145$ ;  $0,324 \pm 0,184$ ;  $0,271 \pm 0,181$  y  $0,246 \pm 0,101$  respectivamente) y los anteriormente mencionados BCC016 y BCC04, no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Mediante el análisis estadístico se pudo determinar que entre estos últimos aislados y los otros cinco sí que se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Finalmente los otros tres aislados BCC022, BCC024 y BCC050 no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ) pero sí con los distintos aislados de este mismo pulsotipo ( $p \leq 0,05$ ), salvo el aislado BCC024 que se mostró significativamente igual al aislado BCC016 ( $p > 0,05$ ) (Figura 30).



**Figura 30:** Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de los aislados del pulsotipo IV. K, corresponde a los aislados estudiados del paciente K; L, corresponde a los aislados estudiados del paciente L; M, corresponde a los aislados estudiados del paciente M; N, corresponde al aislado estudiado del paciente N; O, corresponde al aislado estudiados del paciente O; P, corresponde a los aislados estudiados del paciente P. Los círculos representan valores atípicos, los cuales se encuentran alejado 1,5 veces del rango intercuartílico.



# **Discusión**

## 5. Discusión

### 5.1 Identificación y estudio epidemiológico de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística.

El estudio realizado por Isles *et al.* en la década de los 80 fue uno de los primeros estudios epidemiológicos de Bcc el cual demostró la importancia de este complejo de especies en las infecciones respiratorias de los pacientes con FQ (21). A partir de este trabajo, se han ido realizando múltiples estudios en distintos países; como Estados Unidos, Canadá, Italia, Francia y Portugal. Referente a España, como se ha comentado en capítulos anteriores, no existen muchos estudios, y en concreto en el caso de Cataluña no existe ningún trabajo (108,109,197). Por ello el primer objetivo fue identificar qué especies del complejo *Burkholderia cepacia*, colonizan o infectan mayoritariamente a los pacientes con FQ.

En este estudio la prevalencia de los pacientes colonizados o infectados por aislados pertenecientes al Bcc entre pacientes con FQ fue del 5,3%. Estos datos se asemejan a los estudios realizados en otros países, que oscilan entre 2,6% y 17% de pacientes colonizados o infectados (Tabla 23). Hay que tener en cuenta que entre estos trabajos existe una variabilidad en el número de pacientes estudiados; siendo una de las causas de estas diferencias. No obstante, nuestros resultados reafirman la certeza de que las infecciones por Bcc no son las de mayor número entre los pacientes con FQ; que en este caso corresponden a *P. aeruginosa* y *S. aureus* (9).

**Tabla 23.** Tabla representativa donde se expone los datos de prevalencia del Bcc en pacientes con FQ de diferentes países.

País	Prevalencia <sup>a</sup>	Ref
EE.UU	2,80%	(9)
Canadá	< 5%	(198)
Argentina	0,2 -2,6%	(110)
Reino Unido	3,60 %	(199)
Portugal	7,20%	(101)
Italia	7,50%	(200)
España	7,2 %	(109)
España	17,10%	(162)
Estudio*	5,3%	

<sup>a</sup> Prevalencia de las infecciones de Bcc entre pacientes con FQ.

\* Datos extraídos del presente estudio.

Mediante la identificación molecular se determinó que entre los pacientes de FQ la especie con mayor prevalencia es *B. multivorans* 43,8% seguida de *B. contaminans* 37,5%, *B. cepacia* 18,8% y *B. stabilis* 6,3% (Tablas 15 y 16; pág. 82). Actualmente *B. multivorans* y *B. cenocepacia* son las especies con mayor prevalencia en EE.UU y Canadá (17,31). Referente a los estudios realizados en Europa, en el Reino Unido, Francia, Portugal e Italia, también predominan las infecciones por *B. cenocepacia* y *B. multivorans* (101,103,104,200,201).

Esta distribución que se observa en la actualidad ha cambiado desde principios de este siglo. En países como el Reino Unido, EEUU y Canadá, en los años 90 *B. cenocepacia* era la especie más prevalente seguida de *B. multivorans* (105,201,202). Sin embargo en Italia y Portugal, *B. cenocepacia* continua siendo la especie más prevalente; no obstante no hay estudios a posteriori del 2002 (101,103,200). En países del hemisferio sur como Australia y Nueva Zelanda *B. cenocepacia* (45,7%) fue la especie más predominante seguido por *B. multivorans* (29,3%). Asimismo, en Brasil *B. cenocepacia* (67,8%) también fue la especie más prevalente seguida de *B. vietnamiensis* (15,2%) (107,203). En Argentina, un estudio determinó que entre 2004 y 2010 las especies más prevalentes fueron *B. contaminans* (57,6 %) seguida de *B. cenocepacia* (15%)(110) (Tabla 24).

**Tabla 24.** Tabla comparativa de las especies de Bcc más prevalentes en diferentes países.

País	Periodo <sup>a</sup>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. contaminans</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. lata</i>	Ref
EE.UU	97-07	37%	ND	3%	31 %	ND	5 %	ND	(12)
Canadá	01-11	61,3%	1,6%	1,6%	22,6%	-	11,3%	-	(202)
Francia	95-00	51,6%	ND	0%	45,1%	1,3%	0,6%	ND	(104)
Portugal	95-02	9,8%	ND	24,1%	48,2%	17%	0 %	ND	(101)
Italia	97-02	5%	ND	8,3 %	85,70%	0%	3,3%	ND	(103)
Italia	97-03	6,3%	ND	7,7%	61,10%	6,30%	1%	ND	(200)
Aus y NZ <sup>+</sup>	99-03	29,3%	ND	11,20%	45,70%	ND	5,2%	ND	(203)
Brasil	95-98	10,2%	ND	-	67,8%	ND	15,2%	ND	(107)
Argentina	04-10	6%	57,6%	7,5%	15%	5%	5%	0%	(110)
Estudio*	10-12	43,8%	37,5%	18,80%	-	6,30%	-	-	

+ AUS, Australia; NZ, Nueva Zelanda. <sup>a</sup> Periodo en que se llevo a termino los estudios. ND, No se pudo determinar. \* Datos extraídos de este estudio.

No son muchos los estudios publicados que discuten sobre la distribución de las especies del Bcc entre pacientes con FQ del territorio español. El trabajo realizado por Medina *et al.* en 148 pacientes con FQ, entre los años 1997 y 2010, mostró las especies *B. cenocepacia* y *B. contaminans* como las más prevalentes (19,1% ambos) seguido de *B. multivorans* (14,1%) (108). Asimismo el estudio realizado por Correa-Ruiz *et al.* entre 2001 y 2011, en 12 pacientes

con FQ, las especies más prevalentes fueron *B. cenocepacia* y *B. contaminans* (33,3% y 25%) mientras que *B. multivorans* tan solo infectó o colonizó a un paciente (8,3%) (162). Barrado *et al.* reportó que las especies más prevalentes fueron *B. contaminans* y *B. cepacia* (43,7% y 37,5%) entre 16 pacientes con FQ (109). Medina *et. al* reveló entre 2008 y 2012 *B. contaminans* (36,5%) y *B. multivorans* (17,7%) como las especies más prevalentes (204) (Tabla 25). Cabe destacar que en todos los trabajos realizados a nivel español, incluido el presente, se presenta una elevada prevalencia de las infecciones por *B. contaminans*.

**Tabla 25.** Tabla comparativa de los trabajos realizados en España sobre las especies de Bcc con mayor prevalencia entre los pacientes con FQ.

Periodo <sup>a</sup>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. contaminans</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. lata</i>	Ref
97-10	14,9%	19,1%	ND	19,1%	ND	ND	ND	(108)
02-11	6,25%	43,7%	37,5%	6,25%	6,25%	-	-	(109)
01-11	8,3%	25%	8,30%	33,3%	16,70%	16,70%	8,3%	(162)
08-12	17,7%	36,5%	ND	12,5%	ND	ND	ND	(204)
10-12	43,8%	37,5%	18,80%	-	6,30%	-	-	*

<sup>a</sup> Periodo en que se llevo a termino los estudios. ND. No se pudo determinar con exactitud. \* Datos extraídos de este estudio.

Este aumento de *B. contaminans* entre los pacientes de FQ puede ser debido a que la descripción de esta especie se realizó en el año 2009. Todos los trabajos realizados anteriormente pueden tener una desviación al analizar la distribución de las especies, ya que no podían identificar con exactitud a especies como *B. contaminans*. Todos los estudios posteriores a 2010, exceptuando el estudio en Canadá el cual abarca un periodo de tiempo muy extenso, la prevalencia de *B. contaminans* es siempre superior al 25% incluido el nuestro.

Con estos resultados parece ser que los estudios más recientes muestran un incremento de *B. contaminans* a en países como España y Argentina. Sería interesante reevaluar los estudios anteriores a la descripción de *B. contaminans* para determinar si su presencia es actual o no. No obstante, en estudios realizados recientemente (2013) en EEUU muestran que las especies *B. multivorans* y *B. cenocepacia* siguen siendo las más prevalentes (205).

## 5.2 Identificación de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* mediante *matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-ToF MS).

El estudio realizado por Anhalt y Fenselau en 1975 fue de los primeros en relacionar la proteómica con la identificación microbiológica (206).

El MALDI-ToF es un instrumento que se basa en el uso de la proteómica para la identificación de bacterias. Entre los cuales se encuentran los patógenos que colonizan e infectan a los pacientes con FQ. El MALDI-ToF es una técnica, rápida, sencilla y económica, con el que se podría extender las identificaciones de las especies del Bcc en otros laboratorios microbiológicos. Hasta el momento la técnica de referencia para identificar y diferenciar las especies del complejo *Burkholderia cepacia* es la secuenciación del gen *recA*. No obstante esta es compleja y costosa estando al alcance de poco laboratorios (94–96).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran como los dos instrumentos VITEK MS (bioMérieux S.A) y Daltonics Microflex LT (Bruker Daltonics) MALDI-ToF MS empleados en este estudio han identificado a todos los aislados del Bcc a nivel de género. En general todos los trabajos que existen sobre la materia destacan la correcta identificación a nivel de género (96–98,207,208). Sin embargo, los dos instrumentos no han identificado todos los aislados a nivel de especie (Tabla 16).

El instrumento MALDI-ToF Daltonics Microflex LT, no identificó a nivel de especie un aislado de *B. cepacia* y un *B. contaminans* (Tabla 16). Resultados similares fueron descritos por Desai *et al.* y Fehlberg *et al.*, ambos estudios mediante el mismo instrumento MALDI-tof y programa informático, identificaron a nivel de género de todos los aislados de Bcc pero tampoco determinaron a nivel de especie los aislados pertenecientes a *B. contaminans* y la identificación de *B. cepacia* no llegó al 50% de los aislados testados (96,98).

El instrumento VITEK MS no identificó correctamente los aislados de *B. contaminans* y *B. stabilis* (Tabla 16). En la literatura solo se halló un trabajo que analizase la capacidad de identificación de aislados del Bcc mediante el instrumento VITEK MS, sin embargo no analizaron ningún aislado perteneciente a las especies *B. contaminans* y *B. stabilis*.

Comparando los dos instrumentos ninguno identificó *B. contaminans*. Daltonics Microflex LT identificó *B. stabilis* y VITEK MS no. Por el contrario VITEK MS identificó los aislados de *B. cepacia* y Microflex LT, solo identificó a un aislado de los dos estudiados. En un estudio realizado por Lambiese *et al.* reveló una correcta identificación a nivel de especie de 12 aislados de *B. stabilis* mediante el mismo instrumento Daltonics Microflex LT (209). No obstante, un estudio realizado por Marko *et al.* detalló que VITEK MS tenía una mayor precisión que Daltonics Microflex LT en la identificación de especies del Bcc (208); sin embargo en este estudio no analizaron ningún aislados de *B. contaminans* y *B. stabilis*. Otro estudio realizado por Fernández-Olmos *et al.* determinó una identificación correcta de todos los aislados del Bcc mediante Microflex LT, sin embargo de nuevo no se testó la identificación de aislados de *B. contaminans* y *B. stabilis* (97).

Cabe destacar que nuestro numero de aislados estudiados no es muy elevado, especialmente los aislados *B. stabilis*. Por otro lado y visto el resultado del estudio de clonalidad, todos los aislados estudiados de la especie *B. contaminans* y *B. stabilis* resultan ser la misma cepa; por tanto, hay que tomar con cierta cautela los resultados obtenidos, ya que en definitiva solo se ha estudiado una cepa de ambas especies.

Para que la técnica MALDI-ToF sea eficaz es de gran importancia que tenga una base de datos lo más actualizada y extensa posible. Probablemente el hecho de que *B. contaminans* haya sido descrita como especie recientemente (2009) haya dificultado la obtención de espectros que faciliten la identificación. De hecho un estudio realizado por Degan *et al.* describió un incremento de un 83% a un 98% de los aislados identificados correctamente a nivel de especie, utilizando una base de datos complementada con algunas cepas referencia del Bcc. No obstante, en ningún momento se analizaron aislados de *B. contaminans* (94).

En definitiva, parece ser que MALDI-ToF es un buen instrumento para la identificación debido a su rapidez y bajo coste, aún así es de gran importancia la continua actualización de las bases de datos, más aún cuando no es capaz de identificar especies como *B. contaminans*, especie que está aumentando su presencia entre los pacientes con FQ. De momento es necesaria una técnica complementaria al MALDI-ToF para identificar y diferenciar entras las especies de Bcc.

### 5.3 Distribución clonal de las cepas del Bcc aisladas de los pacientes con FQ.

La distribución de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* entre pacientes con FQ es variable según la región; por otra parte también destacan en algunos países por la elevada presencia de una determinada cepa concreta. Asimismo, diferentes cepas de Bcc han sido ampliamente asociadas a brotes en pacientes con y sin FQ. Por ello, y con el objetivo de determinar con mayor precisión la distribución clonal de los aislados de Bcc entre los pacientes con FQ se decidió realizar una macrorestricción del genoma de todos los aislados.

Se realizó la macrorestricción mediante la enzima *SpeI* en electroforesis en campo pulsante (PFGE), en la cual se obtuvo aproximadamente una media de 16 fragmentos por aislado; suficientes como para poder discriminar entre diferentes cepas y facilitando su posterior análisis (Figura 15).

Entre los 16 pacientes infectados o colonizados por aislados de Bcc se determinó la presencia de 10 clones diferentes (Figura 16 y Tabla 17). Todos los aislados analizados por PFGE determinaron que los pacientes A y B fueron colonizados o infectados por un mismo clon de *B. multivorans* (pulsotipo VI). Igualmente de los pacientes I y J también se aisló un mismo clon perteneciente a *B. cepacia* (pulsotipo V). De seis pacientes K, L, M, N, O y P, todos los aislados analizados pertenecían a un mismo clon (pulsotipo IV).

Mediante la amplificación y secuenciación del gen *recA* se determinó que los cuatro primeros aislados del paciente P, obtenidos entre septiembre 2010 y diciembre 2011, pertenecían a la especie *B. contaminans*; mientras que los otros dos aislados, obtenidos entre marzo 2012 y agosto 2012, se identificó *B. stabilis* (Tabla 14). Debido a los resultados obtenidos de la macrorestricción del genoma de estos aislados se han confirmado los resultados obtenidos anteriormente, el paciente P fue infectado o colonizado por dos cepas diferentes; inicialmente fue infectado o colonizado por el mismo clon *B. contaminans* y posteriormente por un segundo clon totalmente diferente que pertenece a la especie *B. stabilis*. Entre los pacientes de FQ no es infrecuente que se produzcan casos de reemplazamiento entre diferentes especies o clones, de hecho en un estudio realizado por Bernhardt *et al.* entre 347 pacientes con FQ infectados por Bcc se determinó que el 6,9% de

estos pacientes eran sujetos a algún cambio en la especie causante de la infección (165); un porcentaje similar al obtenido en nuestro estudio (6,25%).

Por otra parte el análisis PFGE reveló que todos los aislados *B. contaminans* pertenecen al mismo pulsotipo (IV), es decir a un mismo clon; en total fueron seis pacientes los que fueron infectados por la misma cepa clonal. Cabe destacar que los pacientes L y M tienen un parentesco de primer grado, sin embargo la diseminación de este clon en otros 4 pacientes sugiere una elevada transmisibilidad de este clon o bien la existencia de una fuente común de infección de los pacientes.

En la literatura se han descrito diferentes casos donde la especie *B. contaminans* fue relacionada como causante de diferentes brotes, ocasionando bacteriemias e infecciones en la vías respiratorias. Las fuentes de infección en estos casos fueron la contaminación de aerosoles nasales y soluciones intravenosas (210,211). Sin embargo, también se han aislado cepas ambientales de Bcc produciendo infecciones en pacientes con y sin FQ (71). En concreto un estudio realizado por Li Puma *et al.* determinó la existencia de clones pertenecientes a la cepa epidémica *B. cenocepacia* PHDC en suelo agrícola, siendo los mismos que infectaban a los pacientes con FQ (70), dando a entender que estos pacientes también pueden ser infectados por especies del Bcc procedentes del ambiente.

Este clon de *Burkholderia contaminans* podría tener algún factor de virulencia particular que facilitase su diseminación entre los pacientes con FQ. Casos como la cepa *Burkholderia cenocepacia* ET-12 en la cual se describió, entre otros factores de virulencia, la presencia de grandes pilus permitió que esta cepa llegase a diseminarse a nivel global (125). No obstante, más estudios son necesarios para confirmar esta hipótesis en el caso de *B. contaminans*.

## 5.2 *Multi locus sequence typing (MLST)*

La técnica MLST es una herramienta que está siendo ampliamente utilizada en multitud de laboratorios con el fin de poder tipificar y realizar estudios epidemiológicos a nivel global.

En este trabajo se han descrito por primera vez cinco secuenciotipos (ST) diferentes. Cuatro correspondían a la especie *B. multivorans*, ST723, ST724, ST725 y ST814, y una a *B. cepacia*, ST726 (Tabla 18).

*B. multivorans* es una de las especies con mayor presencia entre los pacientes con FQ a nivel global. En concreto el ST17 hasta el momento se había localizado en países como EE.UU, Nueva Zelanda y Australia mientras que el ST450 había sido descrito previamente en Nueva Zelanda (93). Por primera vez en este estudio se describen ambos secuenciotipos en España y Europa, estos datos destacan la dispersión de estos secuenciotipos.

El ST9 perteneciente a la especie *B. cepacia*, en un primer momento fue aislado de un paciente sin FQ en Canadá, sin embargo, recientemente esta misma cepa fue descrita en España, e igualmente en este estudio, en pacientes con FQ (109). Destacando que este secuenciotipo también se encuentra entre pacientes con FQ.

El ST482 de *B. contaminans* que en nuestro estudio ha infectado o colonizado a 6 pacientes diferentes, destaca por su gran dispersión a nivel global. Esta cepa fue aislada por primera vez en EE.UU de un paciente sin FQ, aunque posteriormente fue localizada en República Checa y Australia en pacientes con FQ. No obstante, esta cepa también ha sido descrita en territorio español, de hecho en un estudio reciente realizado por Medina *et al.* destaca que más del 50% de aislados descritos del ST482 se localizan en España (109,204). A los que habría añadir los encontrados en este trabajo.

La siguiente pregunta a resolver por parte de los investigadores es determinar que características de esta cepa permite que se localice a nivel global y concretamente que motivos existen para que este secuenciotipo se encuentre principalmente en España. No hay

que descartar que esta cepa se localice en un ambiente común y de fácil acceso para los pacientes con FQ.

El ST51 de *B. stabilis* ha sido descrito anteriormente en Suecia, Rusia y Nueva Zelanda y fue relacionada en pacientes sin FQ. En Bélgica y República Checa en pacientes con FQ. En este trabajo se describe por primera vez en España en un paciente con FQ. El ST51 también fue aislado en EE.UU de muestras industriales, aludiendo una vez más, a la fuente ambiental en ausencia de la transmisión entre pacientes como posible reservorio de las infecciones por *B. stabilis* ST51 (71).

Actualmente existe una base de datos accesible (<http://pubmlst.org/bcc>) en la cual se puede comprobar la distribución de los diferentes secuenciotipos del Bcc. Se puede observar que los secuenciotipos ST32 de la especie *B. cenocepacia* y el ST102 de la especie *B. contaminans*, son dos de las cepas con mayor diseminación a nivel global estando presentes en 9 y 8 países, respectivamente. Ambas cepas han sido descritas tanto en el continente Americano como en el Europeo, en concreto el ST32 se ha relacionado con Canadá, Estados Unidos, Méjico, Reino Unido, Francia, Bélgica, Alemania, República Checa e Italia; mientras que el ST102 se ha vinculado con Estados Unidos, Brasil, Bélgica, República Checa, Rusia, Austria, Italia y España. Probablemente esta técnica permita mantener un mayor control de las cepas epidémicas, posibilitando la toma de medidas para impedir su diseminación entre diferentes países, evitando así casos como la cepa epidémica *B. cenocepacia* ET-12 estrechamente relacionada con el síndrome cepacia (106).

Como se puede observar esta técnica permite realizar estudios epidemiológicos a nivel internacional, permite determinar si una cepa en particular tiene una mayor presencia en el contexto global. A diferencia de otras técnicas como el PFGE la comparación entre distintas cepas entre diferentes laboratorios es más sencilla y factible de realizar. El MLST nos permite comparar las cepas analizando 7 genes, no obstante la macrorestricción de todo el DNA nos permite comparar las cepas analizando todo el DNA. Por tanto, pese a las grandes ventajas del MLST ambas técnicas son complementarias y necesarias en este tipo de estudios.

#### 5.4.1 Relación epidemiológica de los ST encontrados.

Actualmente en la base de datos de MLST existen un total de 913 secuenciotipos diferentes pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*, incluidos los ST descritos en este estudio (<http://pubmlst.org/bcc>). Mediante los ST obtenidos por el MLST se puede realizar el algoritmo BURST que permite establecer la relación clonal entre los diferentes secuenciotipos descritos en la base de datos.

Los secuenciotipos descritos en este estudio, ST724, ST725 y ST814 de la especie *B. multivorans* tienen una estrecha relación clonal, siendo probablemente el ST725 el fundador de los secuenciotipos ST724 y ST814; debido a que en ambos ST solo existe una variación en un loci respecto al ST fundador, siendo ellos *single locus variant* (SLV) (Figura 17). Por el contrario los otros tres secuenciotipos descritos en este estudio ST17, ST450 y ST723 no tienen ninguna relación con otro ST como la gran mayoría de de ST descritos de *B. multivorans*.

El ST482 de la especie *B. contaminans*, hallado en este estudio, es el ST fundador del único complejo clonal (CC) existente. Este complejo clonal tiene 4 SLVs (ST286, ST637, ST716 y ST771) (Figura 18). El ST286 es el único ST descrito hasta el momento fuera de Europa, ha sido descrito en EE.UU, mientras que los ST637 y, los ST716 y ST771, han sido descritos en Francia el primero de ellos y en España los otros dos. El hecho de que el ST482 sea el fundador del único CC entre los ST de *B. contaminans* confirma que se trata de un ST de suma importancia ya que este es el ancestro de los demás ST los cuales se encuentran ampliamente diseminados a nivel mundial incluido el ST482.

El ST726, de *B. cepacia*, que infectó o colonizó a dos pacientes en nuestro trabajo no posee ninguna relación clonal con otro ST. En cambio el ST9 también hallado entre las muestras de los pacientes estudiados se observa la existencia de un SLV, el ST838, aislado de pacientes sin FQ en India (Figura 19).

Referente a la especie *B. stabilis* de nuevo se puede observar como el ST 51 descrito en este estudio, también es el fundador del único CC existente entre los ST de esta especie. El ST51 tiene como SLV 3 secuenciotipos diferentes (ST50, ST52 y ST521). El ST50, fue aislado en Bélgica en muestras ambientales y de pacientes con FQ. El ST 52 aislado en el Reino Unido de

muestras ambientales. El ST521 aislado en Nueva Zelanda y de un paciente con FQ en EE.UU (Figura 20).

En todos los algoritmos BURST realizados en este trabajo, se observa una amplia mayoría de secuenciotipos *singletons* entre todas las especies, este hecho muestra la gran variabilidad existente entre los aislados que pertenecen a las diferentes especies del Bcc. No obstante también podría indicar que queda mucho camino por recorrer en cuanto a descripción de ST. Curiosamente el *singleton* ST102 es uno de los ST que se ha aislado con mayor frecuencia entre los pacientes con FQ a nivel global, extrañamente a lo que se podría pensar no se ha descrito a fecha de hoy ningún ST que tenga algún tipo de relación clonal él; probablemente una de las causas de esta ausencia es que aún resten muchos ST pendientes de ser descritos.

### 5.5 Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de los aislados del complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de pacientes con FQ.

Se ha descrito una elevada resistencia de los aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* (17). En nuestro trabajo hemos podido constatar este hecho. En nuestro estudio el mayor número de aislados fueron sensibles a meropenem y piperacilina-tazobactam (el 68,2% y 65,1% de cepas respectivamente), seguido de ceftazidima (60,3%) (Figura 21). En Portugal, un estudio reciente mostró como ceftazidima y piperacilina tazobactam eran los antimicrobianos con mayor porcentaje de aislados sensibles, el 96% y 87% respectivamente (161). En Italia, en cambio dos estudios diferentes determinaron el antimicrobiano ceftazidima como uno de los antibióticos con mejores resultados *in vitro* (103,159). Cabe destacar, que en todos estos estudios el antimicrobiano ciprofloxacina fue de los que mayor número de resistencias tuvo entre todas las cepas, en nuestro estudio solo el 26,9% de los aislados fueron sensibles (Tabla 26). Estos resultados muestran una gran variabilidad en la sensibilidad de los aislados del Bcc a los diferentes antimicrobianos.

**Tabla 26.** Tabla comparativa de la sensibilidad a los antimicrobianos de cepas pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* procedentes de pacientes con FQ de diferentes países.

País	PTZ	CAZ	IMI	MER	SXT	CIP	LVX	Referencia
Italia	71%	84%	63%	69%	44%	56 %	49 %	(159)
Italia	64,5%	68,9%	35,6%	-	19,5%	21,1%	-	(103)
Portugal	87%	96%	67-80%	-	67-80%	36%	-	(161)
España	-	50%	10%	90%	80%	20%	40%	(162)
España	-	93,8%	-	68,8%	87,5%	-	62,5%	(109)
España	-	64,1%	25,7 %	-	62,1%	-	54,1%	(108)
Estudio*	65,1%	60,3%	-	68,2%	47,6%	26,9%	-	

PTZ, piperacilina-tazobactam; CAZ, ceftazidima; IMI, imipenem; MER, meropenem; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LVX, levofloxacina. \*Datos obtenidos en este mismo estudio.

En España, dos estudios diferentes revelaron que los antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol y ceftazidima como los más eficaces, aunque en el estudio realizado por Medina *et al.* el 26% y 29% de las cepas fueron resistentes, mientras que en el estudio de Barrado *et al.* los ratios de resistencia fueron 12,5% para trimetoprim-sulfametoxazol y 6,2% para ceftazidima (108,109). Resultados similares fueron obtenidos por Correa *et al.* el cual describió que el 80% de las cepas fueron sensibles a trimetoprim-sulfametoxazol, aunque en este trabajo meropenem fue el antibiótico más efectivo con el 90% de cepas sensibles (162).

### **5.6 Evolución de la resistencia a antimicrobianos por parte de los clones del complejo *Burkholderia cepacia* que colonizan o infectan las vías respiratorias de los pacientes con FQ.**

A fin de determinar la evolución de la resistencia antimicrobiana de los clones se decidió establecer una comparación entre los patrones de resistencia de los aislados de un mismo clon. En los tres aislados del paciente H se observó que el aislado obtenido en mayo de 2010 es sensible a los antimicrobianos piperacilina-tazobactam, ceftazidima y meropenem, mientras que el último aislado obtenido en diciembre de 2012 fue resistente a todos los antimicrobianos testados. Un acontecimiento similar pudo producirse con la aparición de aislados resistentes en los pacientes L y M. Probablemente la presión selectiva ejercida por la administración continúa de antimicrobianos ha provocado la selección de los fenotipos más resistentes. No obstante, en este estudio no se pudo establecer ningún patrón de comportamiento entre la resistencia de los diferentes aislados con la terapia antimicrobiana de los pacientes. Algunos autores determinaron que las variantes clonales más resistentes fueron aisladas después de una agresiva terapia antimicrobiana (161). Un suceso similar puede explicar la evolución de la resistencia entre los diferentes aislados del paciente I, aunque se observa algún aislado el cual ha perdido las resistencias que presumiblemente había adquirido (Tabla 19). No obstante, otros estudios revelan que los aislados más resistentes se encuentran en procesos de exacerbación, sin que haya existido una presión selectiva de los antimicrobianos (167).

Un estudio reciente determinó que en los pacientes con FQ infectados crónicamente por aislados del Bcc, los cambios en la sensibilidad a los antimicrobianos se producían con elevada frecuencia (161,163). Un claro ejemplo se observa en los aislados del pulsotipo III del paciente G donde la resistencia a piperacilina-tazobactam aparece y desaparece según el aislado. Incluso, analizando concretamente la muestra obtenida en marzo de 2012 en el cual se obtuvieron dos aislados con patrones de sensibilidad diferentes pese a que ambos aislados eran el mismo clon (Tabla 20). La existencia de diferentes variantes fenotípicas es un hecho común y que dificulta el tratamiento de los pacientes con FQ. Probablemente estas variantes fenotípicas sean un reflejo de la heterogeneidad que se produce durante la infección en pacientes con FQ, ya que es habitual que estos pacientes se encuentren colonizados o infectados por diferentes especies e incluso cepas (166). En los pacientes con FQ se pueden

producir infecciones por más de una especie o incluso dentro de una misma especie por, distintas clones y subpoblaciones; estas coinfecciones pueden dar resultado a patrones de resistencia distintos propios de cada una de ellas (164).

Algunos autores han postulado que estos cambios en el patrón de sensibilidad de los aislados son debidos a que se produce un reemplazo de la cepa que infectó en un primero momento, es decir, que se produzca una segunda infección por una segunda cepa con el consiguiente cambio de patrón (165,166). No obstante otros autores describen que estas variaciones en los patrones de resistencia no son debidos a cambios de cepas o reemplazos, sino que son clones isogénicos que muestran variaciones fenotípicas (161,167). Nuestros resultados podrían aportar argumentos en uno y otro sentido, ya que en el paciente P se ha determinado un reemplazo en las especies que infectaban al paciente con el consiguiente cambio de patrón de resistencia. No obstante, la mayoría de pacientes infectados con un mismo clon muestran patrones de resistencia diferentes.

Los métodos utilizados en la actualidad para determinar la resistencia *in vitro*, no tienen en cuenta la capacidad de formar biofilm de los diferentes aislados, como las especies del complejo *Burkholderia cepacia*. Esta capacidad de formar biofilm aumenta la tolerancia de estos microorganismos a los antibióticos, como se ha comentado anteriormente. Por otra parte hay que tener en cuenta la imposibilidad de diferenciar polimorfismos de un solo nucleótido mediante técnicas moleculares como el PFGE, podría explicar las diferencias entre los patrones de resistencia de un mismo clon (167). Pese a ello, las especies del Bcc destacan por su gran capacidad de adaptación, especialmente en un ambiente cambiante como las vías respiratorias de los pacientes con FQ. Los aislados de Bcc evolucionan y se comportan de manera diferente en respuesta al estrés inducido por el sistema inmune del huésped, la presión antimicrobiana, la disponibilidad de nutrientes, y las limitaciones de oxígeno (163).

### 5.7 Evaluación de los diferentes perfiles de sensibilidad observados entre las distintas especie de Bcc aisladas.

No se hallan en la literatura muchos trabajos que examinen la sensibilidad de las diferentes especies de Bcc a los antimicrobianos. Medina *et al.* reveló que *B. multivorans* y *B. cenocepacia* fueron las especies más resistentes a los antimicrobianos, en ambos casos el trimetoprim-sulfametoxazol fue el antimicrobiano con mayor sensibilidad (56,5% de 33 aislados y 47,3% de 31 aislados sensibles) (108). El estudio realizado por Leitao *et al.* determinó que los aislados de *B. cenocepacia* A, fueron los más resistente a la mayoría de antimicrobianos siendo trimetoprim-sulfametoxazol el más eficaz (91,3% de 23 aislados sensibles). Sin embargo, en este estudio los aislados de *B. cepacia* fueron los más resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol (el 56,5% de los aislados fueron resistentes (161)).

En nuestro trabajo, sucede un hecho similar. Donde la especie más resistente fue *B. multivorans*, aunque no en todos los antimicrobianos estudiados. Concretamente los aislados de la especie *B. multivorans* fueron los más resistentes a meropenem, piperacilina-tazobactam, ceftazidima y ciprofloxacina. El 84% de los 24 aislados de *B. multivorans* fueron sensibles a doxiciclina, siendo este antimicrobiano el más eficaz. Por el contrario, los aislados de *B. cepacia* fueron los más resistentes a doxiciclina. El 62,5% de los aislados de *B. cepacia* fueron sensibles a meropenem (Figura 22 y Tabla 21).

Parece ser que entre los dos trabajos hallados en la literatura junto con el nuestro hay indicios para pensar que los aislados de la especie *B. multivorans* son por lo general, unos de las más resistentes (108,161). Esta especie podría tener una mayor facilidad para la adquisición de resistencias a los diferentes antimicrobianos y la adaptación a los diferentes ambientes. Por tanto en ambientes como las vías respiratorias de los pacientes con FQ, la presión selectiva de los antimicrobianos podría suponer una ventaja para esta especie. Sin embargo, la poca literatura presente y las pocas cepas estudiadas de cada especie, son un impedimento para asegurar esta hipótesis.

### 5.8 Capacidad de formar biofilm de aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*.

Como se ha comentado en apartados anteriores la capacidad de formar biofilm es un elemento de gran importancia en la patogenicidad de las especies que forman parte del complejo *Burkholderia cepacia*. Para abordar este objetivo se decidió realizar la cuantificación de biofilm mediante la técnica de cristal violeta. En la literatura se han descrito multitud de protocolos y variantes para determinar la cuantificación de biofilm de los diferentes aislados bacterianos.

Mediante la técnica de cristal violeta, como se esperaba, de las tres cepas estudiadas *S. epidermidis* ATCC 35984 fue la cepa con mayor capacidad para formar biofilm ( $3,512 \pm 0,08$ ), mientras que la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 ( $0,056 \pm 0,029$ ) mostró la menor capacidad de formar biofilm; resultados similares fueron descritos por otros autores que emplearon estas dos cepas como controles de los respectivos estudios de cuantificación de biofilm (212–214) (Figura 23).

En este estudio la cuantificación de biofilm de la cepa *B. cepacia* ATCC 17759 mostró una absorbancia de  $0,153 \pm 0,039$  a 595 nm; en un trabajo realizado por Conway *et al.* en el cual se testó la misma cepa, ésta mostró una absorbancia de aproximadamente 0,1 a 590 nm. Esta diferencia probablemente sea debida a que en el estudio de Conway *et al.* utilizaron un medio de cultivo diferente (LB), además de la comentada absorbancia (193). Otro trabajo realizado por Caraher *et al.* determinó que la capacidad de formar biofilm de *B. cepacia* ATCC 17759 era inferior a 0,05 con una longitud de onda de 595 nm, no obstante este último estudio aunque empleó la misma técnica de cristal violeta para evaluar el biofilm el procedimiento utilizado era sensiblemente diferente (194). Por ello y junto con la alta reproducibilidad representada por la poca desviación obtenida se consideró que la técnica era válida y suficientemente reproducible como para proseguir con el estudio.

En la literatura no existe ningún patrón en Bcc que concrete que absorbancia es necesaria para determinar si una cepa es formadora o no de biofilm. Un estudio reciente el cual incluyó aislados pertenecientes a Bcc, consideró que obtener una absorbancia inferior a 0,05 con una longitud de onda a 650nm se interpreta como cepa no formadora de biofilm (215); aunque en este estudio se empleó una técnica basada en la formación de biofilm en púas en una placa de 96 pocillos. En el estudio ya comentado anteriormente de Caraher *et al.* consideraron que los aislados de Bcc formaban biofilm cuando la densidad óptica fuera superior a 0,05 con una longitud de onda de 590 nm (194). Con este patrón, solo dos cepas (BCC018 y BCC051) se considerarían como no formadoras de biofilm (4,5%) en este estudio. En otras especie como *S. epidermidis* se considera a los aislados como formadores de biofilm si a una densidad óptica de 495 nm se obtiene valores  $\geq 0,120$  (216). Con esta referencia serían 6 los aislados (13,6%) que valoraríamos como no formadoras de biofilm (BCC018, BCC027, BCC043, BCC045, BCC48 y BCC51).

Según los parámetros de nuestro estudio se consideraron aislados no formadores de biofilm aquellos que obtuvieron una absorbancia inferior a 0,1 a 595 nm. Cinco aislados (BCC018, BCC027, BCC043, BCC045 y BCC51) (11,36%) no tuvieron la capacidad para formar biofilm. Por el contrario se definió aislados con una gran capacidad de formar biofilm aquellos que obtuvieron una absorbancia superior a 1,5 nm a 595 nm. Tres aislados (BCC010, BCC001 y BCC0035) (6,8%) tuvieron una gran capacidad de formar biofilm. Los aislados restantes todos tuvieron capacidad para formar biofilm (81,8%) (Figura 25 y Tabla 22). Estos resultados muestran que la gran mayoría de aislados pertenecientes al Bcc tienen capacidad para formar biofilm, aspecto lógico más teniendo en cuenta que algunos autores sugieren que los aislados obtenidos a partir de muestras clínicas, como los de ese estudio, son los que muestran una mayor capacidad de formar biofilm (217).

En los resultados se determinó que los aislados de *B. multivorans* ( $1,069 \pm 0,592$ ) fueron los que tuvieron una mayor capacidad de formar biofilm seguido de *B. contaminans* ( $0,357 \pm 0,355$ ), *B. cepacia* ( $0,236 \pm 0,301$ ) y *B. stabilis* ( $0,19 \pm 0,08$ ). Mediante este estudio se ha evaluado por primera vez la capacidad de formar biofilm de aislados de la especie *B. contaminans*. Todas las especies del Bcc mostraron capacidad para formar biofilm incluida *B. contaminans* (Figuras 26 y 27).

La escasa literatura referente a esta temática reportan *B. multivorans* como una de las especies con mayor capacidad de producir biofilm mientras que *B. cepacia* y *B. stabilis* como las especies con un potencial menor para formar biofilm (193,194). No obstante otros autores revelaron que *B. cenocepacia* también tenía una gran capacidad para el biofilm (193,218).

Este estudio tanto *B. multivorans* como *B. contaminans*, son las especies con una mayor prevalencia entre los pacientes con FQ; a su vez son las especies que mayor grado de cuantificación de biofilm han mostrado. Es bien conocido que los biofilms de los microorganismos contribuyen a la patogénesis y a la cronicidad de las infecciones (219–221). Esta elevada capacidad de formar biofilm tal vez permita a estas cepas establecerse en periodos prolongados en las vías respiratorias de los pacientes con FQ, hecho que podría relacionarse con la elevada prevalencia de estas especies entre los pacientes con FQ de este estudio. Sin embargo es necesario realizar más estudios para esclarecer si existe una relación entre la capacidad de formar biofilm con la elevada prevalencia de estas especies en concreto.

Otro aspecto relevante de este estudio, es la gran variabilidad que mostraron los aislados de un mismo clon. Mayoritariamente los aislados de un mismo clon tuvieron una capacidad diferente de formar biofilm (Figuras 28, 29 y 30). En consecuencia parece ser que los aislados de un mismo clon tienen un comportamiento diferente. Esta variación entre la capacidad de formar biofilm de los aislados de un mismo clon también fue descrita por Cunha *et al.* (218). De hecho este suceso, es el mismo que se ha descrito en el apartado de evolución de la resistencia a antimicrobianos por parte de los clones. Donde de nuevo los aislados de un mismo clon tenían un comportamiento diferente.

Es probable que uno o varios factores, provoquen que un mismo clon tenga mayor o menor capacidad para formar biofilm. Un estudio realizado por Zlosnik *et al.* sobre el fenotipo mucoso de aislados pertenecientes a Bcc, reveló que los antibióticos ceftazidima y ciprofloxacina tenían una relación directa en el cambio de fenotipo, pasando de mucoides a no mucoides (134). Quizás exista algún elemento o factor que intervenga en la formación de biofilm que actualmente se desconozca. No obstante, es probable que tener una elevada tasa de mutación como se ha descrito entre los aislados del Bcc facilite que estos se adapten a multitud de ambientes, como las vías respiratorias de los pacientes con FQ (170).

También hay que tener presente que esta variabilidad entre aislados de un mismo clon también puede ser causada por las limitaciones de la propia técnica. En los estudios mencionados anteriormente donde utilizan métodos de cuantificación similares al nuestro también describieron elevadas variabilidades entre aislados de un mismo clon (194,218). Por ello, para obtener unos datos mucho más robustos sería necesario ampliar el estudio con el consiguiente aumento de aislados y cepas diferentes.

Pese a todo es de gran importancia proseguir con este tipo de estudios debido sobre todo a la gran implicación que tiene el biofilm en el aumento en la resistencia a los antimicrobianos y a las defensas del huésped.



# **Conclusiones**

## 6. Conclusiones

### 6.1 Conclusiones

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se detallan a continuación:

1. Entre enero 2010 y diciembre 2012 el 5,3% de pacientes con FQ estuvieron colonizados o infectados por especies del complejo *Burkholderia cepacia*. Las especies identificadas fueron *B. multivorans* (43,8%), *B. contaminans* (37,5%), *B. cepacia* (18,8%) y *B. stabilis* (6,3%).
2. Todos los pacientes estuvieron colonizados o infectados por la misma cepa durante el periodo del estudio, excepto en un caso en el que inicialmente se aisló *B. contaminans* y posteriormente *B. stabilis*.
3. La técnica MALDI-ToF MS es una herramienta rápida y eficaz para realizar la identificación a nivel de género de aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*, pero no resulta útil para la identificación a nivel de especie, siendo necesario el uso de técnicas genéticas para obtener una correcta identificación.
4. El estudio de clonalidad por electroforesis en gel por campo pulsante reveló que los aislados del complejo *Burkholderia cepacia* se distribuyen en 10 pulsotipos diferentes (I-X). Seis pulsotipos correspondieron a *B. multivorans* (I-III, VI, VII y X), dos pulsotipos a *B. cepacia* (V y IX), un pulsotipo a *B. contaminans* (VI) y un pulsotipo *B. stabilis* (VIII).
5. Entre los 16 pacientes estudiados se produjo la diseminación en 6 pacientes de un único clon (pulsotipo IV) perteneciente a la especie *B. contaminans*.
6. Entre todos los aislados se han descrito por primera vez cinco secuencias de tipos nuevos; cuatro pertenecientes a la especie *B. multivorans* (ST723, ST724, ST725 y ST814), y uno a la especie *B. cepacia* (ST716). El resto de ST descritos en este

estudio corresponden a las especies *B. multivorans* (ST17, ST450), *B. cepacia* (ST9), *B. contaminans* (ST482) y *B. stabilis* (ST51).

7. Todos los aislados pertenecientes a la especie *B. contaminans* fueron descritos como ST482, descrito también en países como Estados Unidos, República Checa, Australia y España.
8. De los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de pacientes colonizados o infectados por aislados del Bcc, de 63 aislados estudiados, el 68,2% fue sensible a meropenem, el 65,1% a piperacilina-tazobactam, el 60,3% a ceftazidima, el 54,6% a doxiciclina, el 47,6% a trimetoprim-sulfametoxazol y el 26,9% a ciprofloxacina.
9. *B. multivorans* y *B. cepacia* fueron las especies más resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. *B. contaminans* y *B. stabilis* fueron los más sensibles a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Doxiciclina fue el antimicrobiano más activo frente a los aislados de *B. multivorans* y meropenem frente a los aislados de *B. cepacia*.
10. Existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la capacidad de formar biofilm entre las diferentes especies del complejo *Burkholderia cepacia*. Los aislados de la especie *B. multivorans*, fueron los que mayor capacidad para formar biofilm mostraron ( $1,069 \pm 0,592$ ). Por primera vez se constató que los aislados de *B. contaminans* obtenidos de pacientes con FQ tienen capacidad para formar biofilm.
11. Se observaron diferencias significativas entre la capacidad de formar biofilm entre los aislados pertenecientes a un mismo pulstotipo.



# **Bibliografía**

## 7. Bibliografía

1. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007;13:231–40.
2. Riordan JR. CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:701–26.
3. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995;269:847–50.
4. Boucher RC. Cystic Fibrosis. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York: Mc Graw Hill; 2012. p. 2147–51.
5. Donaldson SH, Wolfgang MC, Guilligan PH, Boucher Jr RC. Cystic Fibrosis. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 947–56.
6. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*. 2012;45:1132–44.
7. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther*. 2015;145:19–34.
8. Zolin A, McKone EF, Van Rens J, et al. ECFSPR Annual Report 2010. In: *European Cystic Fibrosis Patient Registry*. Denmark; 2010. p. 1–102.
9. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:29–70.
10. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2001;183:444–52.
11. Hoiby N. Epidemiological investigations of the respiratory tract bacteriology in patients with cystic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol*. 1974;82:541–50.
12. LiPuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:299–323.
13. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Faiz AR, Lee J-H, Zhang Y, et al. Nontuberculous Mycobacteria: I: Multicenter Prevalence Study in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:828–34.
14. Roux A-L, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, et al. Multicenter Study of Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Cystic Fibrosis in France. *J Clin Microbiol*. 2009;47:4124–8.
15. Lumb R, Greville H, Martin J, Sangster N, Holmes M. *Nocardia asteroides* Isolated from Three Patients with Cystic Fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:230–3.

16. Isabel Barrio M, Carmen Martínez M, Prados C, Girón RM, Maiz L, Teresa Martínez M. Aislamiento de *Nocardia* en pacientes con fibrosis quística. Arch Bronconeumol. 2008;44:109–12.
17. Li Puma JJ, Currie BJ, Peacock SJ, Vandamme PAR. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, DC: ASM press; 2011. p. 692–713.
18. 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;59:948–51.
19. Ellaffi M, Vinsonneau C, Coste J, Hubert D, Burgel P-R, Dhainaut J-F, et al. One-year outcome after severe pulmonary exacerbation in adults with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:158–64.
20. Rosenstein BJ, Hall DE. Pneumonia and septicemia due to *Pseudomonas cepacia* in a patient with cystic fibrosis. Johns Hopkins Med J. 1980;147:188–9.
21. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. J Pediatr. 1984;104:206–10.
22. Ledson M, Gallagher M, Corkill J, Hart C, Walshaw M. Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*. Thorax. 1998;53:432.
23. Blackburn L, Brownlee K, Conway S, Denton M. “Cepacia syndrome” with *Burkholderia multivorans*, 9 years after initial colonization. J Cyst Fibros. 2004;3:133–4.
24. Nash EF, Thomas A, Whitmill R, Rashid R, Barker B, Rayner RJ, et al. “Cepacia syndrome” associated with *Burkholderia cepacia* (genomovar I) infection in an adolescent with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2010;46:512–4.
25. Sajjan U, Corey M, Humar A, Tullis E, Cutz E, Ackerley C, et al. Immunolocalisation of *Burkholderia cepacia* in the lungs of cystic fibrosis patients. J Med Microbiol. 2001;50:535–46.
26. Schwab U, Leigh M, Ribeiro C, Yankaskas J, Burns K, Gilligan P, et al. Patterns of Epithelial Cell Invasion by Different Species of the *Burkholderia cepacia* Complex in Well-Differentiated Human Airway Epithelia. Infect Immun. 2002;70:4547–55.
27. Hadjiliadis D. Special Considerations for Patients With Cystic Fibrosis Undergoing Lung Transplantation. CHEST J. 2007;131:1224.
28. Murray S, Charbeneau J, Marshall BC, LiPuma JJ. Impact of *Burkholderia* Infection on Lung Transplantation in Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178:363–71.
29. Bressler AM, Kaye KS, LiPuma JJ, Alexander BD, Moore CM, Reller LB, et al. Risk Factors for *Burkholderia cepacia* Complex Bacteremia Among Intensive Care Unit Patients Without Cystic Fibrosis: A Case-Control Study. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007;28:951–8.

30. Abe K, D'Angelo MT, Sunenshine R, Noble-Wang J, Cope J, Jensen B, et al. Outbreak of *Burkholderia cepacia* Bloodstream Infection at an Outpatient Hematology and Oncology Practice. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28:1311–3.
31. Maschmeyer G, Göbel UF. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* Complex. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2861–8.
32. Eser I. Two cases of *Burkholderia cepacia* endophthalmitis. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1211–1211.
33. Hutchinson GR, Parker S, Pryor JA, Duncan-Skingle F, Hoffman PN, Hodson ME, et al. Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1996;34:584–7.
34. Martin M, Christiansen B, Caspari G, Hogardt M, von Thomsen AJ, Ott E, et al. Hospital-wide outbreak of *Burkholderia contaminans* caused by prefabricated moist washcloths. *J Hosp Infect*. 2011;77:267–70.
35. Lee S, Han SW, Kim G, Song DY, Lee JC, Kwon KT. An outbreak of *Burkholderia cenocepacia* associated with contaminated chlorhexidine solutions prepared in the hospital. *Am J Infect Control*. 2013;41:e93–6.
36. Souza Dias MB, Cavassin LGT, Stempluk V, Xavier LS, Lobo RD, Sampaio JLM, et al. Multi-institutional outbreak of *Burkholderia cepacia* complex associated with contaminated mannitol solution prepared in compounding pharmacy. *Am J Infect Control*. 2013;41:1038–42.
37. Wiener-Well Y, Segonds C, Mazuz B, Kopuit P, Assous MV. Successful outbreak investigation of *Burkholderia cepacia* complex bacteremia in intensive care patients. *Am J Infect Control*. 2014;42:580–1.
38. Currie BJ. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: melioidosis and glanders. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2869–85.
39. Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*. 1950;40:115–7.
40. Palleroni NJ, Holmes B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*. 1981;31:479–81.
41. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol*. 1992;36:1251–75.
42. Gillis M, Van Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of

- Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45:274–89.
43. Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol.* 1996;45:395–407.
44. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:1188–200.
45. Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M, et al. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1481–90.
46. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3427–36.
47. Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, LiPuma JJ, et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;33:143–9.
48. Vermis K, Brachkova M, Vandamme P, Nelis H. Isolation of *Burkholderia cepacia* Complex Genomovars from Waters. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26:595–600.
49. Vanlaere E, LiPuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthiralingam E, et al. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:1580–90.
50. 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.
51. Peeters C, Zlosnik JEA, 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;36:483–9.
52. Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ, et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Res Microbiol.* 2003;154:91–6.
53. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, et al. Identification and Population Structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). *J Clin Microbiol.* 2000;38:1042–7.
54. Coenye T, Laevens S, Willems A, Ohlén M, Hannant W, Govan JR, et al. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1099–107.

55. Yabuuchi E, Kawamura Y, Ezaki T, Ikedo M, Dejsirilert S, Fujiwara N, et al. *Burkholderia uboniae* Sp. Nov., l-Arabinose-Assimilating but Different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. *Microbiol Immunol.* 2000;44:307–17.
56. Smet BD, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JEA, Spilker T, Hird TJ, et al. *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;Epub ahead of print. DOI 10.1099/ijs.0.000251.
57. Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol.* 2008;104:1539–51.
58. Holden MTG, Seth-Smith HMB, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeno-Tarraga AM, et al. The Genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an Epidemic Pathogen of Cystic Fibrosis Patients. *J Bacteriol.* 2009;191:261–77.
59. Vial L, Chapalain A, Groleau M-C, Déziel E. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environ Microbiol.* 2011;13:1–12.
60. Parke JL, Gurian-Sherman D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol.* 2001;39:225–58.
61. Zhang L, Xie G. Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;266:231–5.
62. Ramette A, LiPuma JJ, Tiedje JM. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:1193–201.
63. Dalmastri C, Baldwin A, Tabacchioni S, Bevivino A, Mahenthalingam E, Chiarini L, et al. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing: MLST of Italian maize rhizosphere BCC isolates. *Environ Microbiol.* 2007;9:1632–9.
64. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.* 2004;304:66–74.
65. Mahenthalingam E, Baldwin A, Drevinek P, Vanlaere E, Vandamme P, LiPuma JJ, et al. Multilocus Sequence Typing Breathes Life into a Microbial Metagenome. Salzberg S, editor. *PLoS ONE.* 2006;1:e17.
66. Mahenthalingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:144–56.
67. Steffan RJ, Sperry KL, Walsh MT, Vainberg S, Condee CW. Field-Scale Evaluation of in Situ Bioaugmentation for Remediation of Chlorinated Solvents in Groundwater. *Environ Sci Technol.* 1999;33:2771–81.

68. Trân Van V, Berge O, Ke SN, Balandreau J, Heulin T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil*. 2000;218:273–84.
69. Berg G, Eberl L, Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol*. 2005;7:1673–85.
70. LiPuma JJ, Spilker T, Coenye T, Gonzalez CF. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *The Lancet*. 2002;359:2002–3.
71. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan JR, Waine DJ, et al. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:458–61.
72. Nørskov-Lauritsen N, Johansen HK, Fenger MG, Nielsen XC, Pressler T, Olesen HV, et al. Unusual Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species in Danish Cystic Fibrosis Clinics May Stem from Restricted Transmission between Patients. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2981–3.
73. LiPuma JJ, Dasen SE, Stull TL, Nielson DW, Stern RC. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *The Lancet*. 1990;336:1094–6.
74. Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet*. 1993;342:15–9.
75. Hearst JE, Elliott KE. Identifying the killer in cystic fibrosis. *Nat Med*. 1995;1:626–7.
76. Sun L, Jiang RZ, Steinbach S, Holmes A, Campanelli C, Forstner J, et al. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat Med*. 1995;1:661–6.
77. Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;228:57–62.
78. Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Riley M, Jiang R, et al. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1999;179:1197–205.
79. Siddiqui AH, Mulligan ME, Mahenthiralingam E, Hebden J, Brewrink J, Qaiyumi S, et al. An Episodic Outbreak of Genetically Related *Burkholderia cepacia* Among Non-Cystic Fibrosis Patients at a University Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001;22:419–22.
80. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, et al. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1004–7.
81. Wright RM, Moore JE, Shaw A, Dunbar K, Dodd M, Webb K, et al. Improved cultural detection of *Burkholderia cepacia* from sputum in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol*. 2001;54:803–5.

82. Carson LA, Tablan OC, Cusick LB, Jarvis WR, Favero MS, Bland LA. Comparative evaluation of selective media for isolation of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis patients and environmental sources. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2096–100.
83. Hagedorn C, Gould WD, Bardinelli TR, Gustavson DR. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:2265–8.
84. Balandreau J, Viillard V, Cournoyer B, Coenye T, Laevens S, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* Genomovar III Is a Common Plant-Associated Bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Feb 1;67:982–5.
85. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Eskridge B, Jordan M, et al. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:886–91.
86. McMenamin JD, Zaccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US Cystic Fibrosis Treatment Centers: An Analysis of 1,051 Recent Sputum Isolates. *CHEST J.* 2000;117:1661–5.
87. 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.
88. Welch DF. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:422–38.
89. 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.
90. Coenye T, Schouls LM, Govan JR, Kersters K, Vandamme P. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1999;49:1657–66.
91. Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34:87–95.
92. Baldwin A, Mahenthalingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCJ, Govan JR, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme That Provides Both Species and Strain Differentiation for the *Burkholderia cepacia* Complex. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4665–73.
93. Baldwin A, Mahenthalingam E, Drevinek P, Pope C, Waine DJ, Henry DA, et al. Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2007;46:290–5.
94. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti J-L, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3361–7.

95. Vanlaere E, Sergeant K, Dawyndt P, Kallow W, Erhard M, Sutton H, et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J Microbiol Methods*. 2008;75:279–86.
96. Desai AP, Stanley T, Atuan M, McKey J, Lipuma JJ, Rogers B, et al. Use of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Pathol*. 2012;65:835–8.
97. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini M-I, Lamas A, Máiz L, Cantón R. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2012;11:59–62.
98. Fehlberg LCC, Andrade LHS, Assis DM, Pereira RHV, Gales AC, Marques EA. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77:126–8.
99. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell III PW, Liu L, Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:92–6.
100. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:181–7.
101. Cunha MV, Leitao JH, Mahenthiralingam 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. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4113–20.
102. McDowell A. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol*. 2004;53:663–8.
103. Golini G, Cazzola G, Fontana R. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:175–80.
104. Brisse S, Cordevant C, Vandamme P, Bidet P, Loukil C, Chabanon G, et al. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4824–7.
105. Reik R, Spilker T, LiPuma JJ. Distribution of *Burkholderia cepacia* complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2926–8.
106. Saiman L, Siegel J. Infection Control in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:57–71.
107. Carvalho AP d' A, Ventura G, Carvalho M, Pereira CB, Leaô RS, Folescu T, et al. *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. *Apmis*. 2007;115:311–8.

108. Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Villalón P, Garrido N, Rubio V, Saéz-Nieto JA. Identification, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:3385–96.
109. Barrado L, Martínez MT, Villa J, Orellana MÁ, Viedma E, Chaves F. Clonal diversity among *Burkholderia cepacia* complex isolates from cystic fibrosis patients in a reference unit. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2013;31:665–8.
110. 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*. 2012;51:339–44.
111. Agodi A, Barchitta M, Gianninò V, Collura A, Pensabene T, Garlaschi ML, et al. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: identification of a cluster of epidemic lineages. *J Hosp Infect*. 2002;50:188–95.
112. Frangolias DD, Mahenthalingam E, Rae S, Raboud JM, Davidson AGF, Wittmann R, et al. *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: variable disease course. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1572–7.
113. Loutet SA, Valvano MA. A Decade of *Burkholderia cenocepacia* Virulence Determinant Research. *Infect Immun*. 2010;78:4088–100.
114. Sajjan US, Sun L, Goldstein R, Forstner JF. Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: nucleotide sequence of the cblA major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. *J Bacteriol*. 1995;177:1030–8.
115. Mahenthalingam E, Simpson DA, Speert DP. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:808–16.
116. Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J, Mahenthalingam E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun*. 2004;72:1537–47.
117. Suppiger A, Schmid N, Aguilar C, Pessi G, Eberl L. Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence*. 2013;4:400–9.
118. Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol*. 1999;181:748–56.
119. Malott RJ, Sokol PA. Expression of the bviIR and cepIR Quorum-Sensing Systems of *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol*. 2007;189:3006–16.
120. Malott RJ, O'Grady EP, Toller J, Inhulsen S, Eberl L, Sokol PA. A *Burkholderia cenocepacia* Orphan LuxR Homolog Is Involved in Quorum-Sensing Regulation. *J Bacteriol*. 2009;191:2447–60.

121. Goldstein R, Sun L, Jiang R-Z, Sajjan U, Forstner JF, Campanelli C. Structurally variant classes of pilus appendage fibers coexpressed from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Bacteriol.* 1995;177:1039–52.
122. Sajjan US, Sylvester FA, Forstner JF. Cable-Piliated *Burkholderia cepacia* Binds to Cytokeratin 13 of Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2000;68:1787–95.
123. Sajjan U, Wu Y, Kent G, Forstner J. Preferential adherence of cable-piliated *Burkholderia cepacia* to respiratory epithelia of CF knockout mice and human cystic fibrosis lung explants. *J Med Microbiol.* 2000;49:875–85.
124. Urban TA, Goldberg JB, Forstner JF, Sajjan US. Cable Pili and the 22-Kilodalton Adhesin Are Required for *Burkholderia cenocepacia* Binding to and Transmigration across the Squamous Epithelium. *Infect Immun.* 2005;73:5426–37.
125. Goldberg JB, Ganesan S, Comstock AT, Zhao Y, Sajjan US. Cable Pili and the Associated 22 Kda Adhesin Contribute to *Burkholderia Cenocepacia* Persistence In Vivo. Kaushal D, editor. *PLoS ONE.* 2011;6:e22435.
126. Tomich M, Herfst CA, Golden JW, Mohr CD. Role of Flagella in Host Cell Invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun.* 2002;70:1799–806.
127. Urban TA, Griffith A, Torok AM, Smolkin ME, Burns JL, Goldberg JB. Contribution of *Burkholderia cenocepacia* Flagella to Infectivity and Inflammation. *Infect Immun.* 2004;72:5126–34.
128. Vinion-Dubiel AD, Goldberg JB. Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *J Endotoxin Res.* 2003;9:201–13.
129. Ganesan S, Sajjan US. Host Evasion by *Burkholderia cenocepacia*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;1:1–9.
130. Ferreira AS, Silva IN, Oliveira VH, Cunha R, Moreira LM. Insights into the role of extracellular polysaccharides in *Burkholderia* adaptation to different environments. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011;1:16.
131. Cérantola S, Marty N, Montrozier H. Structural studies of the acidic exopolysaccharide produced by a mucoid strain of *Burkholderia cepacia*, isolated from cystic fibrosis. *Carbohydr Res.* 1996;285:59–67.
132. Herasimenka Y, Cescutti P, Impallomeni G, Campana S, Taccetti G, Ravenni N, et al. Exopolysaccharides produced by clinical strains belonging to the *Burkholderia cepacia* complex. *J Cyst Fibros.* 2007;6:145–52.
133. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 1996;60:539–74.
134. Zlosnik JEA, Costa PS, Brant R, Mori PYB, Hird TJ, Fraenkel MC, et al. Mucoid and Nonmucoid *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria in Cystic Fibrosis Infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:67–72.

135. Zlosnik JEA, Hird TJ, Fraenkel MC, Moreira LM, Henry DA, Speert DP. Differential Mucoïd Exopolysaccharide Production by Members of the *Burkholderia cepacia* Complex. J Clin Microbiol. 2008;46:1470–3.
136. Zlosnik JEA, Speert DP. The Role of Mucoïdity in Virulence of Bacteria from the *Burkholderia cepacia* Complex: A Systematic Proteomic and Transcriptomic Analysis. J Infect Dis. 2010;202:770–81.
137. Bylund J, Burgess L-A, Cescutti P, Ernst RK, Speert DP. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. J Biol Chem. 2006;281:2526–32.
138. Lamothe J, Valvano MA. *Burkholderia cenocepacia*-induced delay of acidification and phagolysosomal fusion in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-defective macrophages. Microbiology. 2008;154:3825–34.
139. Lamothe J, Huynh KK, Grinstein S, Valvano MA. Intracellular survival of *Burkholderia cenocepacia* in macrophages is associated with a delay in the maturation of bacteria-containing vacuoles. Cell Microbiol. 2007;9:40–53.
140. Mullen T, Markey K, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26:869–77.
141. Thomas MS. Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia* complex. BioMetals. 2007;20:431–52.
142. Flannagan RS, Valvano MA. *Burkholderia cenocepacia* requires RpoE for growth under stress conditions and delay of phagolysosomal fusion in macrophages. Microbiology. 2008;154:643–53.
143. Saldias MS, Lamothe J, Wu R, Valvano MA. *Burkholderia cenocepacia* Requires the RpoN Sigma Factor for Biofilm Formation and Intracellular Trafficking within Macrophages. Infect Immun. 2008;76:1059–67.
144. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence: *B. cenocepacia* epidemiology and virulence. Clin Microbiol Infect. 2010;16:821–30.
145. Philippon A.  $\beta$ -Lactamines et bacilles a gram negatif non-fermentaires. In: Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. AntibioGramme. 2nd ed. Paris: Éditions Eska; 2006. p. 179–204.
146. Trépanier S, Prince A, Huletsky A. Characterization of the penA and penR genes of *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its LysR-type transcriptional regulator. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:2399.
147. Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M, Plesiat P, Nordmann P. Naturally occurring class A  $\beta$ -lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2008;53:876–82.

148. Mammeri H, Poirel L, Bemer P, Drugeon H, Nordmann P. Resistance to cefepime and cefpirome due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC beta-Lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:716–20.
149. Philippon LN, Naas T, Bouthors A-T, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2188–95.
150. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183:5639–44.
151. Burns JL, Wadsworth CD, Barry JJ, Goodall CP. Nucleotide sequence analysis of a gene from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:307–13.
152. Nair BM, Cheung K-J, Griffith A, Burns JL. Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III (*B. cenocepacia*). *J Clin Invest.* 2004;113:464–73.
153. Guglierame P, Pasca MR, De Rossi E, Buroni S, Arrigo P, Manina G, et al. Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol.* 2006;6:66.
154. Fehlner-Gardiner CC, Valvano MA. Cloning and characterization of the *Burkholderia vietnamiensis* norM gene encoding a multi-drug efflux protein. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;215:279–83.
155. Utsumi R, Yagi T, Katayama S, Katsuragi K, Tachibana K, Toyoda H, et al. Molecular cloning and characterization of the fusaric acid-resistance gene from *Pseudomonas cepacia*. *Agric Biol Chem.* 1991;55:1913–8.
156. Moore RA, Hancock RE. Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30:923–6.
157. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998;27:S93–9.
158. Loutet SA, Flannagan RS, Kooi C, Sokol PA, Valvano MA. A Complete Lipopolysaccharide Inner Core Oligosaccharide Is Required for Resistance of *Burkholderia cenocepacia* to Antimicrobial Peptides and Bacterial Survival In Vivo. *J Bacteriol.* 2006;188:2073–80.
159. Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli ML, Piana S, et al. *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria from Clinical and Environmental Sources in Italy: Genomovar Status and Distribution of Traits Related to Virulence and Transmissibility. *J Clin Microbiol.* 2002;40:846–51.
160. 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;50:265–9.

161. Leitão JH, Sousa SA, Cunha MV, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Barreto MC, et al. Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:1101–11.
162. 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. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2013;31:649–54.
163. Coutinho CP, Santos S dos, 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;1:1–11.
164. Wellinghausen N, Köthe J. Evidence of Coinfection with Distinct Strains of *Burkholderia multivorans* in a Cystic Fibrosis Patient. *Infection*. 2006;34:289–91.
165. Bernhardt SA, Spilker T, Coffey T, LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin Infect Dis*. 2003;37:780–5.
166. Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ. Simultaneous coinfection by multiple strains during *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;54:95–8.
167. St Denis M, Ramotar K, Vandemheen K, Tullis E, Ferris W, Chan F, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Chest*. 2007;131:1188–96.
168. Oliver A. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science*. 2000;288:1251–3.
169. Oliver A, Mena A. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance: Bacterial hypermutation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:798–808.
170. Martina P, Feliziani S, Juan C, Bettiol M, Gatti B, Yantorno O, et al. Hypermutation in *Burkholderia cepacia* complex is mediated by DNA mismatch repair inactivation and is highly prevalent in cystic fibrosis chronic respiratory infection. *Int J Med Microbiol*. 2014;304:1182–91.
171. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9:34–9.
172. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:167–93.
173. Carrel T, Nguyen T, Kipfer B, Althaus U. Definitive cure of recurrent prosthetic endocarditis using silver-coated St. Jude Medical heart valves: a preliminary case report. *J Heart Valve Dis*. 1998;7:531–3.

174. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2517–22.
175. Liu X, Ng C, Ferenci T. Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J Bacteriol.* 2000;182:4158–64.
176. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49–79.
177. Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 2009;17:73–87.
178. Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:255–61.
179. Klausen M, Gjermansen M, Kreft J-U, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;261:1–11.
180. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:623–33.
181. Fazli M, O'Connell A, Nilsson M, Niehaus K, Dow JM, Givskov M, et al. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol.* 2011;82:327–41.
182. Fazli M, Almblad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species: Regulation of biofilm formation. *Environ Microbiol.* 2014;16:1961–81.
183. Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, et al. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology.* 2001;147:2517–28.
184. Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA, Ceri H. Quorum-Sensing Mutations Affect Attachment and Stability of *Burkholderia cenocepacia* Biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:5208–18.
185. McCarthy Y, Yang L, Twomey KB, Sass A, Tolker-Nielsen T, Mahenthiralingam E, et al. A sensor kinase recognizing the cell-cell signal BDSF (cis-2-dodecenoic acid) regulates virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol.* 2010;77:1220–36.
186. Deng Y, Schmid N, Wang C, Wang J, Pessi G, Wu D, et al. Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:15479–84.
187. Alarcón T, Caballero E, Cantón R, Oliver A. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. In: Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2nd ed. Madrid: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2008. p. 1–43.

188. Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson CG, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2607–10.
189. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. Document M100-S17. Vol 26 No. 6. CLSI, Wayne, PA.
190. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22:996–1006.
191. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological Markers of *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic High-Risk Clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5527–35.
192. Fredheim EGA, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T, et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 2009 Jan 14;47:1172–80.
193. Conway B-AD, Venu V, Speert DP. Biofilm Formation and Acyl Homoserine Lactone Production in the *Burkholderia cepacia* Complex. *J Bacteriol.* 2002;184:5678–85.
194. Caraher E, Duff C, Mullen T, Mc Keon S, Murphy P, Callaghan M, et al. Invasion and biofilm formation of *Burkholderia dolosa* is comparable with *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*. *J Cyst Fibros.* 2007;6:49–56.
195. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol.* 2004;186:1518–30.
196. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species – the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;241:129–34.
197. 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 Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;21:150–6.
198. Cystic Fibrosis Canada. The Canadian cystic fibrosis registry 2013 Annual report. In Toronto, Canada; 2014. p. 1–34.
199. Bilton D, Elston C, Guun E, et al. UK Cystic Fibrosis Registry Annual data report 2013. In: UK Cystic Fibrosis Registry Annual data report 2013. London, UK; 2014. p. 1–53.
200. Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, et al. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5136–42.

201. Govan JR, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.* 2007;2:153–64.
202. Zlosnik JEA, Zhou G, Brant R, Henry DA, Hird TJ, Mahenthalingam E, et al. *Burkholderia* Species Infections in Patients with Cystic Fibrosis in British Columbia, Canada. 30 Years' Experience. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12:70–8.
203. Kidd TJ, Douglas JM, Bergh HA, Coulter C, Bell SC. *Burkholderia cepacia* complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. *Res Microbiol.* 2008;159:194–9.
204. 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.
205. Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ, Brown RF, Bryson EA, Chambers MJ, et al. Infection Prevention and Control Guideline for Cystic Fibrosis: 2013 Update. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35:S1–67.
206. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975;47:219–25.
207. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1946–54.
208. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cultures from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2034–9.
209. Lambiase A, Del Pezzo M, Cerbone D, Raia V, Rossano F, Catania MR. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2013;92:145–9.
210. Dolan SA, Dowell E, LiPuma JJ, Valdez S, Chan K, James JF. An outbreak of *Burkholderia cepacia* Complex associated with intrinsically contaminated nasal spray. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32:804–10.
211. Moehring RW, Lewis SS, Isaacs PJ, Schell WA, Thomann WR, Althaus MM, et al. Outbreak of bacteremia due to *Burkholderia contaminans* linked to intravenous fentanyl from an institutional compounding pharmacy. *JAMA Intern Med.* 2014;174:606.
212. Monk AB, Boundy S, Chu VH, Bettinger JC, Robles JR, Fowler VG, et al. Analysis of the Genotype and Virulence of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Patients with Infective Endocarditis. *Infect Immun.* 2008;76:5127–32.

213. Greco-Stewart VS, Ali H, Kumaran D, Kalab M, Rood IGH, de Korte D, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus capitis* strains isolated from contaminated platelet concentrates. *J Med Microbiol.* 2013;62:1051–9.
214. Reiter KC, Sant’Anna FH, d’Azevedo PA. Upregulation of *icaA*, *atIE* and *aap* genes by linezolid but not vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:248–53.
215. Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:213–6.
216. Juarez-Verdayes MA, Ramon-Perez ML, Flores-Paez LA, Camarillo-Marquez O, Zenteno JC, Jan-Roblero J, et al. *Staphylococcus epidermidis* with the *icaA-icaD-/IS256-* genotype and protein or protein/extracellular-DNA biofilm is frequent in ocular infections. *J Med Microbiol.* 2013;62:1579–87.
217. Ibrahim M, Tang Q, Shi Y, Almoneafy A, Fang Y, Xu L, et al. Diversity of potential pathogenicity and biofilm formation among *Burkholderia cepacia* complex water, clinical, and agricultural isolates in China. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28:2113–23.
218. Cunha MV, Sousa SA, Leitao JH, Moreira LM, Videira PA, Sa-Correia I. Studies on the Involvement of the Exopolysaccharide Produced by Cystic Fibrosis-Associated Isolates of the *Burkholderia cepacia* Complex in Biofilm Formation and in Persistence of Respiratory Infections. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3052–8.
219. Costerton JW, Stewart, PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 1999;284:1318–22.
220. Parsek MR, Singh PK. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:677–701.
221. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence.* 2013;4:273–83.

# **Índice de Ilustraciones** **y Tablas**

## **8.1 Índice de ilustraciones**

Figura 1: Representación de una célula normal y una célula de un paciente con FQ con la proteína CFTR defectuosa. Tomada de Boucher <i>et al.</i> (4) .....	pág. 4
Figura 2: Prevalencia de las infecciones más comunes en pacientes con FQ en función de su edad. Imagen tomada de Hauser <i>et al.</i> (9) .....	pág. 7
Figura 3: Supervivencia de pacientes con fibrosis quística según si están infectados por <i>B. cenocepacia</i> o <i>P. aeruginosa</i> . Imagen tomada de Jones <i>et al.</i> (18) .....	pág. 9
Figura 4: Proporción de aislados obtenidos por primera vez de muestras respiratorias procedentes de pacientes con FQ en EE.UU entre 1997 y 2004. Tomada de Reik <i>et al.</i> (105).....	pág. 22
Figura 5: Detalle de los genes presentes en la isla de patogenicidad que contiene BCESM descrita en las cepa <i>Burkholderia cenocepacia</i> ET-12. Tomada de Baldwin <i>et al.</i> (116).....	pág. 26
Figura 6: Modelo de desarrollo de la formación de biofilm. Imagen tomada de Monds <i>et al.</i> (177).....	pág. 41
Figura 7: Modelo teórico de la formación de biofilm basado en la adaptación individual de las células a su ambiente local. Imagen tomada de Monds <i>et al.</i> (177) .....	pág. 43
Figura 8: Esquema representativo de los elementos que influyen en la formación de biofilm. Imagen tomada de Fazli <i>et al.</i> (182) .....	pág. 46
Figura 9: Imagen de la placa y pocillos para la identificación mediante el MALDI-ToF MS..	pág 60
Figura 10: Imagen de los soportes para la formación del gel de agarosa.....	pág. 65
Figura 11: Imagen donde se colocan los bloques de agarosa en el soporte.....	pág. 66
Figura 12: Vertido de agarosa.....	pág. 67
Figura 13: Imagen del gel en la cubeta de electroforesis sumergido en TBE 0,5 X.....	pág. 68
Figura 14: Tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio.....	pág. 69
Figura 15: Resultado de la macrorestricción con las enzimas <i>XbaI</i> y <i>SpeI</i> .....	pág. 86
Figura 16: Dendograma obtenido a partir del perfil de restricción de cada una de los 43 aislados digeridas con la enzima <i>SpeI</i> .....	pág. 88
Figura 17: Representación del algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie <i>B. multivorans</i> .....	pág. 92

Figura 18: Representación del algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie *B. contaminans*.....pág. 93

Figura 19: Representación del algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie *B. cepacia*.....pág. 94

Figura 20: Representación del algoritmo BURST de todos los secuenciotipos descritos de la especie *B. stabilis*.....pág. 95

Figura 21: Resultados de la sensibilidad antimicrobiana de los 63 aislados obtenidos de 16 pacientes con FQ.....pág. 96

Figura 22: Resultados de la sensibilidad antimicrobiana de los 63 aislados obtenidos de 16 pacientes con FQ según la especie de Bcc.....pág. 104

Figura 23: Gráfico donde se representa la cuantificación del biofilm mediante la técnica de cristal violeta de las cepas control.....pág. 106

Figura 24: Imagen del estudio de la cuantificación de biofilm de las cepas control mediante la técnica de cristal violeta.....pág. 107

Figura 25: Gráfica representativa de la cuantificación del biofilm mediante la técnica de cristal violeta de aislados pertenecientes al Bcc obtenidos de pacientes con FQ.....pág. 109

Figura 26: Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm según la especie del Bcc....pág. 110

Figura 27: Cuantificación de biofilm de los distintos aislados agrupados por especie.....pág. 112

Figura 28: Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de los aislados del pulsotipo VI.....pág. 117

Figura 29: Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de los aislados del pulsotipo V.....pág. 118

Figura 30: Diagrama de cajas de la cuantificación de biofilm de los aislados del pulsotipo IV.....pág. 119

## **8.2 Índice de tablas**

Tabla 1: Especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> . Adaptada de LiPuma 2010 (12).....	pág. 14
Tabla 2: Principales características bioquímicas de Bcc. Adaptada de LiPuma <i>et al.</i> , Peeters <i>et al.</i> y De Smet <i>et al.</i> (17,51,56).....	pág. 16
Tabla 3: Principales mecanismos de resistencia del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> . Adaptada de Holden <i>et al.</i> 2009 (58).....	pág. 35
Tabla 4: Resistencia a los antimicrobianos de cepas del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> procedentes de pacientes con FQ de diferentes países.....	pág. 37
Tabla 5: Concentraciones de los reactivos para la realización de PCR.....	pág. 56
Tabla 6: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>recA</i> .....	pág. 57
Tabla 7: Condiciones utilizadas del termociclador para la amplificación del gen <i>recA</i> .....	pág. 57
Tabla 8: Condiciones empleadas para la realización del PFGE para las enzimas <i>XbaI</i> y <i>SpeI</i> .....	pág. 68
Tabla 9: Oligonucleótidos utilizados en el estudio MLST.....	pág. 71
Tabla 10: Condiciones del termociclador para la amplificación de los genes de MLST.....	pág. 71
Tabla 11: Antibióticos utilizados en el estudio.....	pág. 74
Tabla 12: Puntos de corte para la interpretación de los antibiogramas Bcc mediante la técnica de disco difusión. Tabla adaptada de CLSI. (189).....	pág. 74
Tabla 13: Representación de la distribución de las muestras y controles en las placas de microtiter de 96 pocillos para el estudio de biofilm.....	pág. 77
Tabla 14: Tabla de los resultados obtenidos de la identificación mediante la amplificación y secuenciación del gen <i>recA</i> de los 44 aislados obtenidos de 16 pacientes con FQ.....	pág. 82
Tabla 15: Tabla resumen de los resultados obtenidos por pacientes de la identificación mediante la amplificación y secuenciación del gen <i>recA</i> , junto con los datos de prevalencia.....	pág. 83
Tabla 16: Tabla resumen de la identificación de Bcc mediante VITEK MS, Daltonics Microflex LT y la identificación mediante el gen <i>recA</i> .....	pág. 85
Tabla 17: Resumen de los datos obtenidos a partir de la macrorestricción con la enzima <i>SpeI</i> de los 43 aislados estudiados.....	pág. 89
Tabla 18: Resumen de los perfiles alélicos obtenidos junto con los pulso tipos del estudio PFGE.....	pág. 90

Tabla 19: Distribución de los aislados de complejo *Burkholderia cepacia* obtenidos de 16 pacientes con FQ, fecha de la obtención de la muestra con y patrón de resistencia.....pág. 98

Tabla 20: Distribución de los 43 aislados ordenados cronológicamente del complejo *Burkholderia cepacia* según el pulsotipo obtenido en el estudio de clonalidad, fecha de la obtención de la muestra y patrón de resistencia.....pág. 102

Tabla 21: Tabla resumen de los resultados obtenidos del estudio de sensibilidad a antimicrobianos de los 63 aislados del Bcc agrupados por especie.....pág. 105

Tabla 22: Resultados obtenidos de la cuantificación de biofilm de los aislados estudiados mediante la técnica de cristal violeta.....pág. 116

Tabla 23: Tabla representativa donde se expone los datos de prevalencia de algunos países de las infecciones o colonizaciones a pacientes con FQ por parte de Bcc.....pág. 122

Tabla 24: Tabla comparativa de las especies de Bcc más prevalentes en diferentes países.....pág. 123

Tabla 25: Tabla comparativa de los trabajos realizados en España sobre las especies de Bcc con mayor prevalencia entre los pacientes con FQ.....pág. 124

# **Anexo**

## **9.1 Anexo I**

### **1. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados en este estudio, tanto sólidos como líquidos fueron realizados mediante agua ultra pura MQ obtenida mediante el dispositivo *Ultra-pure water system Milli-Q<sub>plus</sub> 185 (Millipore)*. Una vez realizados los medios se esterilizaron mediante calor húmedo a 121 °C durante 15 minutos en el autoclave S100 (*Siemens*). Todos los medios se conservaron a 4°C hasta su utilización.

#### **1.1 Agar Mc Conkey**

Es un medio selectivo y diferencial comercializado por bioMérieux S.A., (Marcy l'Etoile, France; ref 43141) el cual se conservó a 4°C.

<b>Agar Mc Conkey</b>	
<b>Digerido pancreático de gelatina</b>	<b>17g</b>
<b>Digerido pancreático de caseína</b>	<b>1,5g</b>
<b>Digerido péptido de tejido animal</b>	<b>1,5g</b>
<b>Lactosa</b>	<b>1,5g</b>
<b>Sales biliares</b>	<b>1,5g</b>
<b>Rojo neutro</b>	<b>0,03g</b>
<b>Cloruro sódico</b>	<b>5,0g</b>
<b>Cristal violeta</b>	<b>0,001g</b>
<b>Agar</b>	<b>13,5 g</b>

### 1.2 Agar columbia suplementado con 5 % sangre de cordero (Agar Columbia+ 5 % sangre de cordero)

Es un medio rico comercializado por bioMérieux S.A., (Marcy l'Etoile, France; ref 43041) el cual se conservó a 4°C.

<b>Agar Columbia+ 5% sangre de cordero</b>	
<b>Digerido pancreático de caseína</b>	<b>12g</b>
<b>Digerido péptido de tejido animal</b>	<b>5,0g</b>
<b>Extracto de lavadura</b>	<b>3,0g</b>
<b>Extracto de carne bovina</b>	<b>3,0g</b>
<b>Almidón de maíz</b>	<b>1,0g</b>
<b>Cloruro sódico</b>	<b>5,0g</b>
<b>Agar</b>	<b>13,5 g</b>
<b>Cloruro sódico</b>	<b>5,0g</b>
<b>Sangre de cordero</b>	<b>5 %</b>

### 1.3 Medio líquido para la congelación de cepas (TSBG, *Tryptic Soy Broth + Glicerol*)

Composición para 100 ml y a un ph de 7,3. Se esterilizó mediante autoclave.

<b>TSBG</b>	
<b>TSB (Becton, Dickinson and company, New Jersey, USA , ref 211825)</b>	<b>3 g</b>
<b>Digerido pancreático de caseína</b>	
<b>Peptona de soja</b>	
<b>Cloruro sódico</b>	
<b>Fosfato dipotásico</b>	
<b>Dextrosa</b>	
<b>Glicerol (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland ref G7757)</b>	<b>5 ml</b>
<b>Agua MQ</b>	<b>95 ml</b>

#### 1.4 Agar Muller Hinton (MH agar)

Es el medio comercial (MAIM S.L, Barcelona, Spain, ref 1740) recomendado para testar la sensibilidad a los antibióticos, este se conservó a 4°C.

Agar MH	
Infusión de carne	300 g
Peptona acida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	15 g
Agua MQ	1000 ml

#### 1.5 Caldo de Tripticasa Soja (TSB)

Es un medio rico comercial (Becton, Dickinson and company, New Jersey, USA, ref 211825) el cual crecen de manera adecuada los aislados pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*. Composición para 1l, se esterilizó mediante autoclave y se conservó a 4°C hasta su utilización.

TSB	
TSB (Difco)	30 g
Digerido pancreático de caseína	
Peptona de soja	
Cloruro sódico	
Fosfato dipotásico	
Dextrosa	
Agua MQ	1000 ml

## 2. Soluciones y tampones

### 2.1.1 TBE 0.5X (Tris Borato EDTA)

Previo al momento de su uso se realizó una dilución 1:20 con agua MQ del TBE 10X comercial (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref 93290)

TBE 10 X	
Tris	1,3 M
EDTA	25 mM
Acido bórico	450 mM
Agua MQ	

### 2.1.1 TBE 1X (Tris Borato EDTA)

Previo al momento de su uso se realizo una dilución 1:10 con agua MQ del TBE 10X comercial (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref 93290).

## 2.2 CSB (*Cell Suspension Buffer*)

Composición para 250ml y a un ph final de 8. Esta solución se esterilizó mediante autoclave y se conservó a temperatura ambiente.

CSB (100mM Tris; 100mM EDTA)	
Tris (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref 252859)	3,025 g
EDTA (Panreac, Barcelona, Spain, ref 131669.1211)	9,3 g
Agua MQ	200 ml

### 2.3 Buffer de lisis

Composición para 100ml y ph 7.5. La solución se conservó a temperatura ambiente

Buffer de lisis	
Tris-HCl 1 M (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref T3038)	0.6 ml
EDTA 0.5 M (Panreac, Barcelona, Spain, ref 131669.1211)	20 ml
NaCl 5 M (Panreac, Barcelona, Spain, ref 131659.1211)	20 ml
Brij 58 (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref P5884)	0.5 g
Ácido deoxicólico (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref D-2510)	0.5 g
N-lauroil sarcosina (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref L5125)	0.5 g
Agua MQ	40 ml

### 2.4 Buffer TE

Composición para 2l y ph 7.5. La solución se esterilizó mediante autoclave y se conservó a temperatura ambiente.

TE	
Tris (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref T3038)	2.42 g
EDTA (Panreac, Barcelona, Spain, ref 131669.1211)	3.72 g
Agua MQ	1.800 ml

### 2.5 Solución salina 8,5%

Solución compuesta por 0,85 g de NaCl (Panreac, Barcelona, Spain, ref 131659.1211) en 100 ml de agua MQ. La solución se esterilizó mediante autoclave y se conservó a temperatura ambiente.

### 2.6 PBS (*Phosphate Bufferd Saline*)

Solución comercial (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref P4417) que una vez preparada a pH 7,5 se almacenó a temperatura ambiente.

PBS	
Tableta comercial	1
Tampón fosfato (0,01 M)	
Cloruro potásico (0,0027 M)	
Cloruro sódico (0,137 M)	
Agua MQ	200 ml

### 2.7 Cristal violeta 0,1%

De una solución comercial de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref V5265) al 1 % se realizó una dilución 1:10 con agua MQ para la obtención final de cristal violeta al 0,1%.

### 2.8 Acido acético 30%

De una solución comercial de ácido acético  $\geq 99,8$  % (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland, ref ARK2183) se realizó una dilución 3:10 con agua MQ para la obtención final de ácido acético 30 %.