

López Cruz, Gerardo* Matos Alviso, Luis J.****
 López Díaz, Alejandra V.** Martínez Arce, Pedro A.*****
 Reyes Hernández, Katy L.*** Luevanos Velázquez, Antonio*****
 Reyes Gómez, Ulises****
 Santos Calderón, Luis A.****
 De Lara Huerta, Jesús****
 Quero Hernández, Armando****

Melioidosis en pediatría: potencial agente de bioterrorismo microbiológico

Melioidosis in pediatrics: potential agent of microbiological bioterrorism

Fecha de aceptación: julio 2018

Resumen

La melioidosis es una enfermedad tropical ocasionada por el bacilo Gram-negativo *Burkholderia pseudomallei*, transmitido a través del suelo, es una enfermedad endémica en el norte de Australia y en el sureste asiático, y actualmente se reconoce en lugares no endémicos, incluido México. El género *Burkholderia* comprende más de 40 especies.

El presente trabajo es una revisión de conceptos elementales para la sospecha clínica y el diagnóstico por laboratorio, para establecer un manejo oportuno dada su alta mortalidad. El cuadro clínico es muy similar a tuberculosis, sepsis fulminante o neumonía de evolución rápida. Por su alta letalidad, existe un gran riesgo de que éste se haya utilizado en bioterrorismo.

Palabras clave: bacilos Gram-negativos, bioterrorismo, *Burkholderia pseudomallei*, sepsis, neumonía fulminante, infección pulmonar crónica, niños.

Abstract

Melioidosis is a tropical disease caused by the Gram-negative bacillus *Burkholderia pseudomallei*, transmitted by soil, is an endemic disease in northern Australia and Southeast Asia, and is currently recognized in non-endemic places, including Mexico. The genus *Burkholderia* comprises more than 40 species.

This is a review of elementary concepts for clinical suspicion and laboratory diagnosis, to establish an opportune treatment, given its high mortality. The clinical picture is very similar to tuberculosis, fulminant sepsis or rapidly progressive pneumonia. Because of its high lethality, there is a great risk that it would be used in bioterrorism.

Keywords: Gram-negative bacilli, bioterrorism, *Burkholderia pseudomallei*, sepsis, fulminant pneumonia, chronic lung infection, child.

Introducción

La melioidosis es una enfermedad tropical ocasionada por el bacilo Gram-negativo *Burkholderia pseudomallei*,¹ transmitido a través del suelo, es una enfermedad endémica en el norte de Australia en el sureste asiático, y que actualmente se reconoce cada vez con mayor frecuencia en lugares no endémicos.²

La melioidosis debe ser un diagnóstico diferencial importante en las lesiones supurativas de la cabeza, así como en infecciones del cuello y de tejidos blandos en niños. La búsqueda microbiológica activa mejorará la precisión de diagnóstico presuntivo y ampliará el conocimiento sobre es-

te agente bacteriano emergente, especialmente en las zonas costeras.³

El género *Burkholderia* comprende más de 40 especies, que nutricionalmente son diversas, productoras de oxidasa y catalasa positivo, no fermentadoras de lactosa. El complejo *Burkholderia cepacia* comprende al menos 17 especies. Otras especies clínicamente importantes incluyen *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia gladiolos* y *Burkholderia mallei* (el agente responsable del muermo), *Burkholderia thailandensis* y *Burkholderia oklahomensis*, que son patógenos humanos raros.⁴

* Urólogo pediatra, CRIT, Clínica Diana de Especialidades, Oaxaca.

** Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

*** Residente de segundo año de Pediatría, Centro Médico la Raza, IMSS, México.

**** Servicio de Pediatría, Clínica Diana de Especialidades, Oaxaca.

***** Infectología Pediátrica, Hospital Universitario Torreón, Coahuila.

***** Infectología Pediátrica, Antiguo Hospital Civil sso, Guadalajara, Jalisco.

Correspondencia: Dr. Gerardo López Cruz
 Clínica Diana de Especialidades, Símbolos Patrios 747, Col. Reforma Agraria, C.P. 68130, Oaxaca.

Dirección electrónica: investigsurgery@yahoo.com
 Telefax: 01 95151 43690

Se sabe que las especies como *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* y *Burkholderia cepacia* causan melioidosis,^{5,6} muermo⁷ e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística,^{8,9} respectivamente. Aunque ahora estas infecciones son raras en los países occidentales, recientemente estos organismos han ganado mucho interés debido a su potencial uso como agentes de bioterrorismo.¹⁰

Melioidosis

La melioidosis es causada por una bacteria Gram-negativa, *B. pseudomallei*. Normalmente se ve en países del sudeste de Asia y en Australia, pero ahora es una infección emergente en India, África y Medio Oriente.¹¹ La melioidosis es una enfermedad grave que puede ser difícil de diagnosticar, debido a sus diversas manifestaciones clínicas y a la falta de habilidades en el diagnóstico para los casos sospechosos. Existe un gran interés por mejorar la detección y el diagnóstico de esta enfermedad, no sólo en regiones endémicas sino también fuera de estas áreas porque no se conoce de forma adecuada y plantea un potencial desafío bioterrorista para las autoridades de salud pública.¹²

La asociación de la melioidosis con la lluvia ha sido establecida desde hace mucho tiempo. También se ha propuesto que los niveles de nubosidad corresponden a los niveles de humedad del suelo que proporcionan las condiciones adecuadas para la supervivencia de las bacterias. Y asimismo proporcionaría protección contra las longitudes de onda ultravioleta bactericidas en la luz solar.¹³

Sintomatología

Las manifestaciones clínicas de la melioidosis varían y pueden incluir desde una infección localizada a multifocal con o sin septicemia. Aunque la presentación más común es la neumonía con síntomas similares a la tuberculosis pulmonar,¹⁴⁻¹⁶ también puede presentarse como encefalomielitis, artritis séptica, osteomielitis, abscesos en órganos viscerales y de la piel. Involucra sitios renales, esplénicos, prostáticos y hepáticos, lo que hace que esta enfermedad se considere un "gran imitador".¹⁷ La tasa de letalidad para la melioidosis es alta y depende del país donde se diagnostica.¹⁸

El diagnóstico clínico de melioidosis es difícil porque la enfermedad no tiene manifestaciones clínicas patognomónicas.¹⁹ El estándar de diagnóstico actual es el cultivo; sin embargo, *B. pseudomallei* puede identificarse erróneamente como un contaminante del cultivo o como otra especie (por ejemplo, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus* spp., o *Pseudomonas* spp.), especialmente por personal de laboratorio no familiarizado con este organismo.²⁰⁻²²

Debido a que las manifestaciones clínicas de la melioidosis varían ampliamente y pueden incluir sepsis con o sin una infección localizada, como neumonía o abscesos de órganos internos. La enfermedad crónica (síntomas durante más de dos meses) puede ocurrir y es posible que simule otras enfermedades como tuberculosis o cáncer. Por lo tanto, debe sospecharse la presencia de melioidosis en todos los pacientes con sepsis, neumonía o abscesos adquiridos en la comunidad en áreas donde se han notificado casos de melioidosis autóctona. En las regiones no endémicas para melioidosis, como Estados Unidos y Europa, se debe considerar el diagnóstico en cada paciente con sepsis

y antecedentes de haber viajado a regiones endémicas de melioidosis, especialmente para aquéllos con condiciones predispuestas como diabetes mellitus, enfermedad renal o inmunosupresión. Debido a que la duración de la infección latente puede extenderse por décadas,²³ se debe obtener un historial de viaje completo. La enfermedad también debe ser sospechada ante protocolos de estudio no concluyentes para neumonía y tuberculosis.

Burkholderia pseudomallei

Puede sobrevivir en agua destilada y de lluvia, con recuentos bacterianos que muestran un aumento de al menos dos veces en agua destilada estéril y alrededor de 30 veces en agua de lluvia después de un periodo de 28 días.²⁴ *B. pseudomallei* también puede sobrevivir sin ninguna fuente de carbono durante varios años,²⁵ así como en ambientes hostiles, como en soluciones de detergente,²⁶ en un ambiente ácido²⁷ y en suelo deshidratado con un contenido de agua inferior a 10%.²⁸ Son bacilos rectos, aerobios, Gram-negativos, nutricionalmente diversos, oxidasa y catalasas positivos, no fermentadores de lactosa. Este microorganismo tolera el pH ácido y puede sobrevivir en el agua en ausencia de nutrientes durante largos periodos.²⁹⁻³²

Usualmente las colonias de *B. pseudomallei* son de color crema con un brillo metálico y pueden volverse secas y tener una apariencia mate o arrugada después de la incubación durante más de 24 horas en agar sangre, aunque se observa una variación considerable. En agar MacConkey, las colonias de *B. pseudomallei* son pálidas (no fermentadoras de lactosa) y pueden presentar un brillo metálico y tornarse rosas y umbonadas o rugosas después de 48 horas. En agar triple S con hierro y azúcar, *B. pseudomallei* puede indicar que no hay cambio o una ligera oxidación. No obstante, la apariencia morfológica de las colonias bacterianas en medios de cultivo comunes también puede ser atípica. Es de gran utilidad la demostración de colonias típicas en agar Ashdown después de una incubación prolongada (48-96 horas) y la aparición de una película en caldo de Ashdown.³³

Cultivo

Aunque el cultivo es el estándar de diagnóstico y es 100% específico, la sensibilidad puede ser tan baja como 60%, dependiendo del método de recolección de muestras, los medios utilizados y la experiencia del microbiólogo.³⁴ Debido a que muchas muestras de pacientes con sospecha de melioidosis se obtienen de sitios no estériles, es crítico el uso de medios selectivos.

El agar de Ashdown se usa comúnmente en áreas donde la melioidosis es endémica, se debe considerar costo-efectividad,³⁵ pero en la mayoría de los países no está disponible comercialmente.

En la tinción de Gram, *B. pseudomallei* puede no parecerse a la descripción del libro de texto de la tinción bipolar (apariencia de "alfiler de seguridad").

La morfología microscópica de los organismos de pacientes que reciben fármacos antimicrobianos puede ser muy atípica, por su forma filamentosa, o puede parecerse en forma muy similar a la de las levaduras.³⁶

Con frecuencia *B. pseudomallei* se descarta como un contaminante del cultivo o se identifica erróneamente

como *Pseudomonas* spp. u otros organismos cuando se utilizan métodos de identificación estándar, incluidos API 20NE (bioMérieux, Craponne, Francia) y sistemas de identificación bacteriana automatizados.

Medios automatizados

El rendimiento de los sistemas comercialmente disponibles para la identificación de *Burkholderia pseudomallei* es el siguiente: El API 20 es un sistema estandarizado que permite la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram (-) no exigentes, que incluyen 20 pruebas bioquímicas miniaturizadas, así como una base de datos. El API 20NE* de Tailandia, de 400 *Burkholderia pseudomallei* identificó 390, lo que le otorga un 98% de éxito y seguridad para el diagnóstico por laboratorio.³⁷ El API 20NE Singapore, de 50 *Burkholderia pseudomallei* identificó 40, es decir, un porcentaje de 80.³⁸ En el caso del API 20NE Australia, de 103 *Burkholderia pseudomallei* identificó 101, equivalente a 98%.³⁹ En cuanto al API 20NE Australia, de 71 *Burkholderia pseudomallei* identificó 26, una cifra de sólo 37%.⁴⁰ El API 20NE Estados Unidos (importado), de 58 *Burkholderia pseudomallei* identificó 35, es decir, 60%.⁴¹ Con respecto al API 20NE Thailand/various, de 800 identificó 792, un porcentaje de 99, lo cual le da una confianza óptima.⁴²

El sistema automatizado Phoenix utiliza una serie de sustratos convencionales modificados, fluorogénicos y cromogénicos para cubrir un total de 145 taxones Gram-positivos y 161 Gram-negativos.⁴³ El Phoenix/Singapore, de 47 identificó 13 (28%).⁴⁴ En cuanto a Phoenix Malaysia/Thailand, de uno identificó cero casos, o sea, 0%.⁴⁵

El sistema automatizado Vitek 2, combinado con las tarjetas de identificación ID-GPC originales Gram-positivas y Gram-negativas ID-GNB, usando tecnología de lectura de fluorescencia, requiere hasta tres horas para identificar 52 taxones Gram-positivos y 98 Gram-negativos; con los formatos rediseñados (Gram-positivos) ID-GP y (Gram-negativo) ID-GN, basados en detección colorimétrica, el sistema cubre una base de datos ampliada de 115 taxones Gram-positivos y 135 Gram-negativos en un tiempo aproximado de 10 horas.⁴⁶

En el caso de Vitek 2* Australia, de 103 *Burkholderia pseudomallei*, identificó 19, es decir, 19%.⁴⁷ Vitek 2 Australia, de 103 identificó 83 (81%).⁴⁸ En cuanto a Vitek 2 Malaysia, que analizó sólo un *Burkholderia pseudomallei*, no fue capaz de identificarlo.⁴⁹ Vitek 2 Australia, de 149 identificó 146 (98%).⁵⁰ Vitek 2 Sabah, Malaysia, de 25 identificó 22, es decir, 88%.⁵¹ Así como Vitek 2 Sarawak, Malaysia, de 43 identificó 23 (53%).⁵²

Diagnóstico serológico

La hemaglutinación indirecta (IHA, indirect hemagglutination assay) es el principal análisis serológico utilizado en todo el mundo, aunque carece de estandarización. La sensibilidad diagnóstica de la IHA en el ingreso es sólo de 56%, y la prevalencia variable de la seropositividad de fondo en áreas donde la melioidosis es endémica reduce su especificidad.⁵³⁻⁵⁵ Como resultado, la IHA no tiene ningún papel en el diagnóstico de la melioidosis en regiones endémicas de la enfermedad, esto debe desalentar su uso.

Prueba de inmunofluorescencia (IFA)

La IFA es una prueba rápida, simple, confiable y utiliza un anticuerpo monoclonal contra el polisacárido de la cápsula (cps) para detectar *B. pseudomallei* directamente en muestras clínicas o en frascos de cultivo de sangre. Es particularmente útil para muestras en las que la densidad bacteriana es de al menos 103 UFC/ml (por ejemplo, en pus, esputo y orina). Aunque los resultados de cultivo pueden demorar de uno a siete días, la IFA toma sólo 15 minutos. Sin embargo, esta prueba requiere un microscopio uv y técnicos experimentados, y la sensibilidad diagnóstica de la IFA (rango 45-66%) es menor que la del cultivo.^{56,57} Aunque la IFA no está disponible comercialmente, tiene un largo y positivo historial de uso en algunos laboratorios especializados para proporcionar un diagnóstico rápido en regiones endémicas de melioidosis.

Pruebas moleculares

La identificación definitiva de *Burkholderia* es posible mediante PCR, con una gran variedad de métodos como TTS1⁵⁸, BurkDiff, entre otros.

El método BurkDiff se suma al creciente número de ensayos basados en moléculas, especialmente la PCR en tiempo real, que se ha diseñado para detectar *B. pseudomallei* y/o *B. mallei*. El uso de varios de estos ensayos en combinación para la identificación definitiva podría ser importante, ya que las Burkholderiaceae son organismos altamente recombinantes,⁵⁹⁻⁶¹ y a medida que se descubran más cepas, mayor será el desafío de la solidez y sensibilidad de estos ensayos.

Reportes recientes en niños mexicanos:

• Caso 1

Paciente masculino de 10 meses de edad, inmunocompetente atendido en el Instituto Nacional de Pediatría (INP). Inicia su padecimiento 10 días previos a su ingreso con rinorrea hialina, hiporexia y fiebre de alto grado, sin predominio de horario, se le ha tratado con aciclovir, aminopenicilina y cefalosporina de tercera generación por cuadro de vía aéreas superiores; además de metronidazol en una ocasión porque presentaba evacuaciones diarreicas con moco y sangre, así como coproparasitoscópico positivo a quistes de *Entamoeba histolytica*. Debido a que la fiebre persistía, se le llevó a consulta al INP. Durante su ingreso presentaba peso y talla bajos para su edad (z-1.58), reactiva, activo, sin datos de dificultad respiratoria, pero saturación hasta 84%, afebril, evacuaciones disminuidas en consistencia, sin moco ni sangre, tres al día; se le trató como neumonía adquirida en la comunidad bacteriana con penicilina G, biometría hemática con leucocitosis de 23 800/mm³, neutrófilos 86%, linfocitos 11% y bandas 27%. A las 24 horas de su ingreso presentaba tres picos febriles hasta 38.7 °C, y con nueva radiografía de tórax con consolidación medio-basal derecha, por lo que se escaló a cefalosporina de tercera generación. A las ocho horas el paciente presentaba datos de respuesta contrarreguladora, insuficiencia respiratoria e inestabilidad hemodinámica, por lo que se inició ventilación mecánica además de

apoyo aminérgico, pancitopenia abrupta y falla multiorgánica, se comenzó a administrarle cefepime y vancomicina.

El paciente tuvo una evolución tórpida, y falleció 12 horas después. En el hemocultivo central y cultivos postmórtem de pulmones, bazo, sangre y líquido cefalorraquídeo se reportó desarrollo de *Burkholderia multivorans*.⁶²

• Caso 2

Paciente masculino de seis años de edad, originario de La Carlota, municipio de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, de medio socioeconómico bajo. Su padecimiento comienza dos meses antes de su ingreso al Hospital General Aurelio Valdivieso, el 19 de agosto de 2017, con un inicio súbito al presentar fiebre de 39 y 40 °C, sin predominio de horario, acompañado de cefalea sobre todo en el parietal derecho. Niega sintomatología adicional de tipo respiratorio, gastrointestinal y urinario. Su familiar menciona que acudieron con dos médicos particulares en su localidad, se le diagnosticó con cuadro de sinusitis, tuberculosis y fiebre tifoidea. Recibió tratamiento con antibióticos (cefixime y ceftibuteno, sin especificar dosis) y antipiréticos, los protocolos de estudio infecciosos no especificados fueron con resultados negativos. Durante su ingreso el paciente estaba consciente, orientado y con fiebre de 38 °C. La frecuencia respiratoria era de 26 por minuto, la frecuencia cardíaca de 110 por minuto, oximetría de pulso 91%, peso 18 kilogramos (pérdida de peso de dos kilos los dos últimos dos meses), somnoliento, reactivo a estímulos, cooperador, coloración de tegumentos adecuada, buen estado de hidratación, cardiopulmonar normal, en el abdomen se palpaba hepatomegalia y esplenomegalia, las extremidades torácicas y pélvicas íntegras hipotróficas. Los reflejos osteotendinosos eran normales, la fuerza muscular conservada, llenado capilar distal adecuado, genitales fenotípicamente masculinos, Tanner II, columna lumbar con cicatriz de 5 cm en el sitio de absceso antiguo. Las pruebas de laboratorio del 20 de agosto de 2017 mostraron: leucocitos $14.30 \times 10^3/\mu\text{l}$, hemoglobina 7.6 g/dL, hematocrito 25, plaquetas $513 \times 10^3/\mu\text{l}$, neutrófilos 54.2%, tiempo de protrombina 16.1 segundos, calcio sérico 8.4 mg/dL. Radiografías: el tele de tórax mostró presencia de infiltrados intersticiales, parahiliares, con diagnóstico de neumonía atípica y probable tuberculosis miliar. Continuaba con fiebre y cefalea, temperatura de 38.8 °C, frecuencia respiratoria de 25 por minuto, frecuencia cardíaca 140 por minuto, tensión arterial 100/60, oximetría de pulso 95%, Glasgow 15, rigidez de nuca, Kernig +, Brudzinski +, reflejo rotuliano incrementado, Babinski positivo. La tomografía axial computarizada de cráneo fase simple mostró la presencia de atrofia cortical a nivel frontal, sin datos de edema cerebral ni masas tumorales. Laboratorio: leucocitos $8.200 \times 10^3/\mu\text{l}$, hemoglobina 6.6 g/dL, hematocrito 20.7, plaquetas 592 por $10^3/\mu\text{l}$, neutrófilos 4.96 por $10^3/\mu\text{l}$, linfocitos 2.36 por $10^3/\mu\text{l}$, glicemia capilar 100 mg/dL. Panel viral hepatitis negativo, perfil TORCH negativo. Punción lumbar con líquido de aspecto claro

"crystal de roca". Para el 24 de agosto continuaba con fiebre intermitente de 38 a 40 °C, sin predominio de horario. El paciente se encontraba emaciado, irritable, poco cooperador, palidez de la piel +++ de +++, excretas normales. Laboratorio: hemoglobina de 7.6 g/dL a 6.6 g/dL en cuatro días, trombocitosis de 531 por $10^3/\mu\text{l}$ a 592 por $10^3/\mu\text{l}$, monocitosis de 12.6%. Se consideró como diagnóstico tuberculosis meníngea como una posibilidad. El 25 de agosto se agregó al tratamiento rifampicina 225 mg, isoniacida 112.5 mg, pirazinamida 600 mg, clorhidrato de etambutol 450 mg, y se suspendió la claritromicina y la ceftriaxona. El cultivo de líquido cefalorraquídeo mostró *Burkholderia pseudomallei*. El 5 de septiembre de 2017 se suspendió el tratamiento antifímico y se administró meropenem y trimetropin con sulfametoxazol. El paciente falleció a los 18 días de su ingreso. Los diagnósticos finales fueron choque séptico y neuroinfección por *Burkholderia pseudomallei*.

Tratamiento

El meropenem es el agente más activo contra la mayoría de los aislados del complejo *B. cepacia*, otros fármacos que podrían ser eficaces incluyen imipenem, trimetoprim-sulfametoxazol, ceftazidima, doxicilina y cloranfenicol.

Los fármacos de elección para la melioidosis dependen del tipo de infección clínica, las pruebas de susceptibilidad y la presencia de comorbilidades (fibrosis quística, diabetes, enfermedad hepática o renal, cáncer y hemoglobinopatías).

El tratamiento de la infección invasiva severa deberá incluir meropenem, imipenem, o ceftazidima, como mínimo durante 10 a 14 días, y una vez completado este esquema continuar con trimetoprim-sulfametoxazol durante tres a seis meses para evitar la recurrencia.

La amoxicilina-clavulanato y la doxicilina se consideran agentes orales de segunda línea, y se asocian a un mayor número de recaídas.

Conclusiones

B. pseudomallei existe en nuestro país, es de difícil diagnóstico en áreas no endémicas, aunque el cambio climático está originando su presentación en lugares que aparentemente no explican su presencia.

Los sistemas automatizados de diagnóstico tienen una marcada variabilidad en su capacidad para identificar *B. pseudomallei*.

El diagnóstico de *B. pseudomallei* por el método colorimétrico (GN) automatizado Vitek 2, que existe en nuestro país, permite una identificación de hasta 75 a 80%. Ante la sospecha se debe buscar apoyo en laboratorios especializados.

Se deben establecer niveles 2 y 3 de bioseguridad en los hospitales donde se documente la presencia de *B. pseudomallei*. Actualmente el diagnóstico de *B. mallei* y *B.*

pseudomallei en el laboratorio clínico es muy problemático, dado el poco conocimiento de los médicos sobre las manifestaciones clínicas de melioidosis y muermo. Todavía no se cuenta con experiencia entre los microbiólogos fuera de las áreas endémicas, hay falta de medios adecuados y sistemas de identificación en el laboratorio centinela promedio y las

condiciones de bioseguridad necesarias para procesar estos organismos (nivel 2 para procesamiento de muestras clínicas y nivel 3 para procesamiento de aislados clínicos).⁶³ Es indispensable capacitar al personal de salud ante la virtual presencia de *Burkholderia* en nuestro país.

Referencias

1. Martínez-Hernández, L., González-Híjar, A., Valdez-Vásquez, R., García-López, S. y González-Chon, O., "Melioidosis: reporte de un caso y revisión de la literatura", *Neumol Cir Torax*, 2013, 72 (4): 291-298.
2. Sarovich, D.S., Chapple, S.N., Price, E.P., Matthew, M.M., Holden, T.G., Peacock, S.J. y Currie, B.J., "Whole-genome sequence to investigate a non-clonal melioidosis cluster on a remote Australian island", *Microbial Genomics*, 2017, 3: 1-7.
3. Mukhopadhyay, C., Eshwara, V.K., Kini, P. y Bhat, V., "Pediatric melioidosis in Southern India", *Indian Pediatr*, 2015, 52: 711-712.
4. Baker, C.J., *Red Book. Atlas of pediatric infectious diseases*. 3^a ed., American Academy of Pediatrics, 2015.
5. Hayden, H.S. et al., "Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis", *plos One*, 2012, 7: e36507, disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036507>.
6. Price, E.P. et al., "Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* in four cases of acute melioidosis", *PLOS Pathog*, 2010, 6: e1000725, disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000725>.
7. Lever, M.S. et al., "Experimental aerogenic *Burkholderia mallei* (glanders) infection in the BALB/c mouse", *J Med Microbiol*, 2003, 52: 1109-1115.
8. Zeeshan, M., Aziz, T. y Naqvi, F., "Recurrent urinary tract infection by *Burkholderia cepacia* in a live related renal transplant recipient", *J Pak Med Assoc*, 2012, 62: 496-498.
9. De Souza, A. et al., "Lung transplantation for patients with cystic fibrosis and *Burkholderia cepacia* complex infection: a single-center experience", *J Heart Lung Transplant*, 2010, 29: 1395-1404.
10. Gilad, J., Schwartz, D. y Amsalem, Y., "Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*", *ubs*, 2007, 3 (3): 144-152.
11. Singh, M. y Mahmood, M., "Melioidosis: the great micker", *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 2017, 7 (4): 245-247.
12. Hoffmaster, A.R., Aucoin, D., Baccam, P. et al., "Melioidosis diagnostic workshop, 2013", *Emerg Infect Dis*, 2015, 21 (2): e141045.
13. Merritt, A.J. y Inglis, T.J.J., "The role of climate in the epidemiology of melioidosis", *Curr Trop Med Rep*, 2017, 4 (4): 185-191.
14. Currie, B.J., *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei: melioidosis and glanders*, en Bennett, J.E., Dolin, R. y Blaser, M.J. (eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, PA, Elsevier Saunders, 2015, pp. 2541-2551.
15. Stewart, T., Engelthaler, D.M., Blaney, D.D. et al., "Epidemiology and investigation of melioidosis, Southern Arizona", *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1286-1288.
16. Centers for Disease Control and Prevention (cdc), "Imported melioidosis-South Florida, 2005", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2006, 55: 873.
17. Yee, K.C., Lee, M.K., Chua, C.T. et al., "Melioidosis, the great mimicker: a report of 10 cases from Malaysia", *J Trop Med Hyg*, 1988, 91: 249-254.
18. Bandeira, T.J.PG., Castelo-Branco, D.S.C.M., Rocha, M.F.G., Cordeiro, R.A., Ocadaque, C.J., Paiva, M.A.N., Brilhante, R.S.N. y Sidrim, J.J.C., "Clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Brazil: genotyping and detection of virulence gene", *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10 (10): 945-951.
19. Wiersinga, W.J., Currie, B.J. y Peacock, S.J., "Melioidosis", *N Engl J Med*, 2012, 367: 1035-1044.
20. Robertson, J., Levy, A., Sagripanti, J.L. e Inglis, T.J.J., "The survival of *Burkholderia pseudomallei* in liquid media", *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82: 88-94.
21. Peacock, S.J., Schweizer, H.P., Dance, D.A., Smith, T.L., Gee, J.E., Wuthiekanun, V. et al., "Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*", *Emerg Infect Dis*, 2008, 14: e2.
22. John, T.J., Jesudason, M.V., Lalitha, M.K., Ganesh, A., Mohandas, V., Cherian, T. et al., "Melioidosis in India: the tip of the iceberg?", *Indian J Med Res*, 1996, 103: 62-65.
23. Ngauy, V., Lemeshev, Y., Sadkowski, L. y Crawford, G., "Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II", *J Clin Microbiol*, 2005; 43: 970-972.
24. Kibbler, C.C., Roberts, C.M., Ridgway, G.L. y Spiro, S.G., "Melioidosis in a patient from Bangladesh", *Postgrad Med J*, 1991, 67: 764-766.
25. Pumpuang, A. et al., "Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011, 105: 598-600.
26. Gal, D. et al., "Contamination of hand wash detergent linked to occupationally acquired melioidosis", *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 71: 360-362.
27. Dejsirilert, S., Kondo, E., Chiewsilp, D. y Kanai, K., "Growth and survival of *Pseudomonas pseudomallei* in acidic environments", *Jpn J Med Sci Biol*, 1991, 44: 63-74.
28. Chen, Y.S., Chen, S.C., Kao, C.M. y Chen, Y.L., "Effects of soil pH, temperature and water content on the growth of *Burkholderia pseudomallei*", *Folia Microbiol*, 2003, 48: 253-256.
29. Ainsworth, R. (ed.), *Safe piped water: managing microbial water quality in piped distribution systems*, Londres-Ginebra, IWA Publishing-Organización Mundial de la Salud, Londres-Ginebra, 2004.
30. Currie, B.J., Fisher, D.A., Howard, D.M., Burrow, J.N., Selvanayagam, S., Snelling, P.L., Anstey, N.M. y Mayo, M.J., "The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea", *Acta Trop*, 2000, 74 (2-3): 121-127.
31. Currie, B.J. et al., "A cluster of melioidosis cases from an

endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates", *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65: 177-179.

32. Inglis, T.J. et al., "Outbreak strain of *Burkholderia pseudomallei* traced to water treatment plant", *Emerg Infect Dis*, 2000, 6: 56-59.

33. Dance, D.A., Wuthiekanun, V., Naigowit, P. y White, N.J., "Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE", *J Clin Pathol*, 1989, 42: 645-648.

34. Limmathurotsakul, D., Jamsen, K., Arayawichanont, A., Simpson, J.A., White, L.J., Lee, S.J. et al., "Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models", *plos One*, 2010, 5: e12485.

35. Roesnita, B., Tay, S.T., Puthucheary, S.D. y Sam, I.C., "Diagnostic use of *Burkholderia pseudomallei* selective media in a low prevalence setting", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2012, 106: 131-133.

36. Tandhavanant, S., Wongsuvan, G., Wuthiekanun, V., Teerawattanasook, N., Day, N.P., Limmathurotsakul, D. et al., "Monoclonal antibody-based immunofluorescence microscopy for the rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens", *Am J Trop Med Hyg*, 2013, 89: 165-168.

37. Wongsuvan, G., Limmathurotsakul, D., Wannapasni, S., Chierakul, W., Teerawattanasook, N. y Wuthiekanun, V., "Lack of correlation of *Burkholderia pseudomallei* quantities in blood, urine, sputum and pus", *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2009, 40: 781-784.

38. Dance, D.A., Wuthiekanun, V., Naigowit, P. y White, N.J., "Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE", *J Clin Pathol*, 1989, 42: 645-648.

39. Tandhavanant, S., Wongsuvan, G., Wuthiekanun, V., Teerawattanasook, N., Day, N.P., Limmathurotsakul, D. et al., "Monoclonal antibody-based immunofluorescence microscopy for the rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens", *Am J Trop Med Hyg*, 2013, 89: 165-168.

40. Inglis, T.J., Chiang, D., Lee, G.S. y Chor-Kiang, L., "Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE", *Pathology*, 1998, 30: 62-64.

41. Lowe, P., Engler, C. y Norton, R., "Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*", *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 4625-4627.

42. Inglis, T.J., Merritt, A., Chidlow, G., Aravena-Roman, M. y Harnett, G., "Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*", *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 2201-2206.

43. Dickinson, B., "BD Phoenix system user's manual", document L003342(M), Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, 2005.

44. BioMérieux, "Vitek 2 product information", document 510769-4EN1, BioMérieux, Inc., Durham, NC, 2006.

45. Glass, M.B. y Popovic, T., "Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*", *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 479-483.

46. Amornchai, P., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Makhunkijcharoen, Y., Phetsouvanh, R., Currie, B.J. et al., "Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test", *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 3774-3776.

47. Koh, T.H., Yong, Ng, L.S., Foon Ho, J.L., Sng, L.H., Wang, G.C. y Tzer Pin Lin, R.V., "Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*", *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1809.

48. Weissert, C., Dollenmaier, G., Rafeiner, P., Riehm, J. y Schultze, D., "Burkholderia pseudomallei misidentified by automated system", *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1799-1801.

49. Lowe, P., Haswell, H. y Lewis, K., "Use of various common isolation media to evaluate the new Vitek 2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei*", *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 854-856.

50. Zong, Z., Wang, X., Deng, Y. y Zhou, T., "Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the Vitek 2 system", *J Med Microbiol*, 2012, 61: 1483-1484.

51. Podin, Y., Kaestli, M., McMahon, N., Hennessy, J., Ngian, H.U., Wong, J.S. et al., "Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent", *J Clin Microbiol*, 2013, 51: 3076-3078.

52. Hodgson, K., Engler, C., Govan, B., Ketheesan, N. y Norton, R., "Comparison of routine bench and molecular diagnostic methods in identification of *Burkholderia pseudomallei*", *J Clin Microbiol*, 2009, 47: 1578-1580.

53. Podin, Y., Sarovich, D.S., Price, E.P., Kaestli, M., Mayo, M., Hii, K. et al., "Burkholderia pseudomallei isolates from Sarawak, Malaysian Borneo, are predominantly susceptible to aminoglycosides and macrolides", *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 162-166.

54. Anuntagool, N., Naigowit, P., Petkanchanapong, V., Aramsri, P., Panichakul, T. y Sirisinha, S., "Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicemia", *J Med Microbiol*, 2000, 49: 1075-1078.

55. Cheng, A.C., O'Brien, M., Freeman, K., Lum, G. y Currie, B.J., "Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia", *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 74: 330-334.

56. Cheng, A.C., Peacock, S.J., Limmathurotsakul, D., Wongsuvan, G., Chierakul, W., Amornchai, P. et al., "Prospective evaluation of a rapid immunochromogenic cassette test for the diagnosis of melioidosis in northeast Thailand", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100: 64-67.

57. Harris, P.N., Ketheesan, N., Owens, L. y Norton, R.E., "Clinical features that affect indirect-hemagglutination-assay responses to *Burkholderia pseudomallei*", *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16: 924-930.

58. Chanratita, N., Tandhavanant, S., Wongsuvan, G., Wuthiekanun, V., Teerawattanasook, N., Day, N.P. et al., "Rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures using a monoclonal antibody-based immunofluorescent assay", *Am J Trop Med Hyg*, 2013, 89: 971-972.

59. Wuthiekanun, V., Desakorn, V., Wongsuvan, G., Amornchai, P., Cheng, A.C., Maharjan, B. et al., "Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis", *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12: 555-556.

60. Ortega, G.M.V. et al., "PCR cuantitativa en tiempo real para la amplificación de ADN de *Burkholderia mallei*: comparación con el método molecular recomendado por la OIE", *Said Mill*, 2017, 73 (2): 85-90.

61. Tomaso, H., Scholz, H.C., Al Dahouk, S., Eickhoff, M., Treu, T.M. et al., "Development of a 59-nuclease real-time PCR assay targeting flp for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples", *Clin Chem*, 2006, 52: 307-310.

62. Ordóñez, R.I., Otero, M.F., Arias, G.E., Pérez, G.E. y Corcueras, D.C., "Choque séptico por *Burkholderia multivorans* en paciente previamente sano a su ingreso hospitalario. Presentación de un caso y revisión de la literatura", trabajo libre presentado en el XXXV Congreso de Infectología Pediátrica, Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, Veracruz 2016.

63. Gilad, J., Schwartz, D. y Amsalem, Y., "Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia Mallei* and *Burkholderia pseudomallei*", *Inter J Biomed Science*, 2007, 3 (3): 144-152.