

Trabajo original

Ludovica (2005)
VII, 4:110-121
© Ediciones de La Guadalupe
(2005)

Alejandro Miñán⁽¹⁾,
Alejandra Bosch⁽¹⁾,
Cecilia Vescina⁽²⁾,
José Degrossi⁽³⁾,
Blanca Gatti⁽³⁾,
Mirta Franco⁽³⁾,
Oswaldo Yantorno^(1*)

⁽¹⁾ *CINDEFI (CONICET),
 Facultad de Ciencias Exactas,
 UNLP, La Plata.*

⁽²⁾ *Hospital Sor María Ludovica,
 La Plata.*

⁽³⁾ *Cátedra de Microbiología,
 Fac. de Bqca. y Fcia.
 UBA. Argentina*

✉ yantorno@quimica.unlp.edu.ar

Ganador al premio Mejor Trabajo Científico de las Cuartas Jornadas de Actualización en Clínica Pediátrica 2005

Identificación rápida de bacterias aisladas de pacientes fibroquísticos mediante espectroscopía infrarroja y análisis multivariante

resumen

A partir del año 2004 se ha registrado en el Hospital de Niños de La Plata, un aumento en el número de aislamientos de *B. cepacia* en pacientes fibroquísticos (FQ), así como también en niños con otras patologías. La identificación rápida y precisa de estas bacterias resulta esencial para la iniciación del tratamiento adecuado. Los métodos bioquímicos empleados de rutina para la identificación microbiológica, no brindan por lo general resultados certeros, demandan al menos 5 días de análisis y sólo permiten discriminar hasta el nivel de especie. Sin embargo, las bacterias identificadas como "*B. cepacia*" comprenden un grupo de 9 especies o genomovares altamente relacionados, denominado colectivamente el Complejo *B. cepacia*.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una estrategia que permitiera la identificación y caracterización rápida de organismos aislados de muestras de esputo de pacientes FQ a nivel de subtipo de genomovar, basada en el empleo de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) combinada con técnicas de análisis multivariante.

Se obtuvieron espectros de 14 aislamientos hospitalarios y 16 cepas de referencia previamente confirmadas por técnicas de biología molecular (PCR y corte con enzimas de restricción) en un espectrómetro Perkin Elmer (Spectrum One). Para ello se utilizaron colonias obtenidas en medio sólido en condiciones estandarizadas, proveniente de un cultivo confluyente resuspendidas en H₂O, transferidas a una celda de ZnSe y llevadas a sequedad hasta obtener un film homogéneo y transparente. Los espectros se normalizaron y sus derivadas primeras fueron sometidas a diferentes análisis multivariantes para su diferenciación y construcción de librerías espectrales. Se desarrollaron y compararon dos sistemas de caracterización, diferenciación e identificación basados en: 1) análisis de clusters (AC) empleando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward (software OPUS V.4.0, Bruker Optics, USA) y 2) un sistema de redes neuronales artificiales (ANNs) que discrimina en tres diferentes niveles (género, genomovar y subtipo), entrenado aplicando diferentes algoritmos (NeuroDeveloper© software, Germany).

Se demostró que FT-IR combinada con AC y/o ANNs permite la identificación rápida (menos de 36 horas), precisa y a bajo costo de organismos de interés clínico.

Palabras clave: diagnóstico microbiológico, Burkholderia cepacia, espectroscopía infrarroja, análisis multivariante.

Introducción

Los pacientes fibroquísticos son susceptibles a infecciones pulmonares crónicas causadas por un amplio rango de bacterias ⁽¹⁾. Estas infecciones exacerbaban el progresivo deterioro pulmonar. Aunque *Pseudomonas aeruginosa* ha sido descrito como el organismo más comúnmente asociado a la morbilidad y mortalidad de estos pacientes, en las dos últimas décadas *Burkholderia cepacia* ha aparecido como responsable de brotes epidémicos entre personas fibroquísticas ^(2,3). En el ámbito local, particularmente en el Hospital de Niños de La Plata, durante el año 2004 se registraron 40 aislamientos de *B. cepacia*, en estos pacientes. *B. cepacia*, no es un simple organismo, sino que corresponde a un grupo de bacterias, las cuales incluyen nueve especies o genomovares estrechamente relacionados, colectivamente designados como el Complejo *B. cepacia* ^(4,5,6). La taxonomía e identificación de las especies que integran este complejo es dificultosa empleando las técnicas bioquímicas convencionales; y se ha documentado que bacterias pertenecientes a otros géneros como *Pandoraea* y *Ralstonia* pueden ser confundidas como especies de *Burkholderia* ^(6,7,8). Los métodos bioquímicos demandan al menos 5 días de análisis, son costosos y en el caso de *Burkholderia* no permiten discriminar hasta el nivel de especie. Análisis basados en polimorfismos de los genes 16S rDNA y *recA* fueron desarrollados en los últimos años a fines de identificación ^(4,9,10). Sin embargo, si bien estas técnicas representan un avance importante, su implementación es costosa, consume un tiempo considerable y no resulta sencilla, sobre todo en el ámbito hospitalario. Una estrategia radicalmente diferente, para la

rápida identificación de organismos clínicamente relevantes, es el empleo de técnicas espectroscópicas ^(11,12). El fundamento de las mismas es que un espectro infrarrojo (IR) constituye una especie de huella dactilar, que representa la composición química global de la muestra analizada y que, por lo tanto, permite su caracterización. La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) combinada con técnicas de análisis multivariante ha sido propuesta en los últimos años como un método fisicoquímico alternativo para la identificación y caracterización molecular microbiana ⁽¹²⁾. Esta metodología al analizar directamente espectros de células enteras, sin ningún tipo de tratamiento ni uso de reactivos especiales, tiene bajos costos operativos y lo que es más importante permite obtener resultados en tiempos reducidos. En otros organismos patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp.) FT-IR demostró su poder de resolución para diferenciarlos hasta el nivel de cepa ^(13,14,15).

El objetivo de este trabajo fue aplicar FT-IR combinada con técnicas multivariantes, como análisis de cluster y redes neuronales artificiales (RNA)⁽¹⁷⁾, para construir bibliotecas basadas en espectros de cepas de referencia del complejo *B. cepacia* y *Pseudomonas* que permitiesen la posterior identificación rápida, de organismos aislados de pacientes con fibrosis quística. La metodología desarrollada permitirá también realizar estudios de biodiversidad y epidemiológicos.

materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas y aislamientos bacterianos utilizados en este trabajo se indican en la Tabla I. Se estudiaron 14 aislamientos obtenidos al azar entre 40 muestras de esputo de pacientes fibroquísticos tratados en el Hospital de Niños de La Plata Sor María Ludovica durante el año 2004. Previo al análisis por espectroscopía los aislamientos se caracterizaron e identificaron por métodos bioquímicos y técnicas de biología molecular ^(5,6). Todos los

organismos fueron mantenidos a -70°C en glicerol al 30%. Para iniciar cada proceso se sembraron placas con agar Mueller-Hinton (MH) suplementado con 5% de sangre de carnero. Las placas se incubaron 24 hs a 36°C . Las colonias se repicaron e incubaron por 8 hs en las mismas condiciones. En estudios de optimización se tomaron muestras de fase lag, exponencial y estacionaria.

Espectroscopía Infrarroja

Adquisición y pre-tratamiento de los espectros: espectros infrarrojos de cada uno de los organismos en estudio, fueron obtenidos a partir de las colonias crecidas en medio sólido. Para la toma de muestra se utilizó la técnica descrita por Helm y colaboradores⁽¹¹⁾, la cual consiste en tomar dos anzadas de material microbiano proveniente de un cultivo confluyente (con anza de platino calibrada de 1mm de diámetro), resuspender el material en 120 μL de H_2O , transferir 100 μL de la suspensión a una celda de ZnSe y llevar a sequedad hasta obtener un film homogéneo y transparente. Las celdas fueron leídas en un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (Perkin Elmer, Spectrum One, USA). Los espectros de absorción fueron registrados entre 650 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 6 cm^{-1} y cada uno resultó del promedio de 64 escaneos. Para evitar interferencias debidas a bandas rotacionales del vapor de agua, las medidas se realizaron bajo corriente de aire seco. Los espectros fueron sometidos a un pre-tratamiento utilizando el software OPUS versión 4.0 (Bruker Opticks, Alemania), el cual consistió en la obtención de la derivada primera y segunda de cada espectro para posteriormente llevar a cabo un test de calidad espectral (TC)⁽¹³⁾. Sólo los espectros que superaron este test fueron incluidos en los análisis posteriores. Para disminuir corrimientos de la línea de base, aumentar la resolución de las bandas e igualar biomasa, los espectros originales fueron derivados y sometidos a una normalización vectorial empleando el software OPUS.

El espectro IR de cualquier material de origen biológico puede dividirse en 5 regiones o ventanas espectrales, de las cuales se obtiene diferente infor-

mación. La Figura 1 muestra un espectro microbiano típico el cual representa la composición bioquímica total de las células analizadas; se indican las ventanas espectrales y las absorciones de las principales macromoléculas y grupos funcionales. La región 3.100 a 2.800 cm^{-1} , designada W_1 , corresponde a las absorciones debidas a estiramientos y balanceos de uniones C-H de los grupos funcionales CH_3 y $>\text{CH}_2$, presentes en cadenas de ácidos grasos. En la región W_2 , entre 1.800 y 1.500 cm^{-1} , denominada región de Amidas, predominan las absorciones debidas al grupo $>\text{C}=\text{O}$ característico de la unión amida de proteínas y de ésteres. La región W_3 , entre 1.300 y 1.500 cm^{-1} , es la llamada región mixta, ya que incluye la absorción de grupos funcionales de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. La región espectral W_4 , entre 1.200 y 900 cm^{-1} , es asociada a bandas debidas a estiramientos C-C y C-O y a deformaciones C-O-C y C-O-H de polisacáridos. El intervalo entre 900 y 650 cm^{-1} , W_5 , conocido como huella dactilar, exhibe gran variedad de picos de muy baja intensidad, característico de la muestra en estudio^(11,12).

II) Estudios de reproducibilidad

Previo a la utilización de los espectros para la construcción de las bases de datos, se analizó la variabilidad que muestran los organismos en estudio con relación a su expresión fenotípica. Para ello se registraron no menos de 15 espectros de cada cepa, obtenidos de por lo menos 3 cultivos independientes realizados en el término de 6 meses. A fin de darle un valor numérico al nivel de reproducibilidad o variabilidad (NR), se aplicó sobre los 15 espectros replicados de cada especie la ecuación "Normalization to replevel" en el rango 1.700-900 cm^{-1} , con la cual se obtuvo una medida de la disimilitud entre espectros^(11,12). Finalmente, para visualizar el NR en forma de dendrograma se introdujo valor de disimilitud obtenido en el algoritmo de promedios ponderados ("Average Linkage"), software OPUS.

III) Análisis de cluster e identificación

Para la construcción de librerías espectrales que permitieran discriminar e identificar aislamientos

Tabla 1. Cepas de referencia y aislamientos hospitalarios utilizados en el estudio y sus respectivos orígenes.

Género	Especies (genomovar)	Cepa	Procedencia	
	cepacia (I)*	ATCC 25416	PCR/RFLP cebolla, EEUU	
	multivorans (II)*	ATCC 17616	PCR/RFLP suelo, EEUU	
	cenoepacia (IIIa)*	LMG 18863	PCR/RFLP paciente fibroquístico Canada	
	cenocepacia (IIIb)*		PCR/RFLP Cepa hospitalaria cedida por la Cátedra de Microbiología, Fac. Medicina (UBA)	
	stabilis (IV)*	LMG 18870	PCR/RFLP paciente fibroquístico, Canadá	
	dolosa (VI)*	LMG 21820	PCR/RFLP paciente fibroquístico Reino Unido	
	ambifaria (VII)*	LMG 19467	PCR/RFLP paciente fibroquístico Australia	
	anthina (VIII)*	LMG 20983	PCR/RFLP paciente fibroquístico Reino Unido	
	ubonensis (X)	ATCC		
Burkholderia		NF23	PCR/RFLP HNLP	
		NF57	PCR/RFLP	
		NF59	PCR/RFLP	
		NF64	PCR/RFLP	
		NF67	PCR/RFLP	
		NF69	PCR/RFLP	
		cenocepacia (III)*	NF72	PCR/RFLP
			NF74	PCR/RFLP
			NF77	PCR/RFLP
			NF87	PCR/RFLP
			NF96	PCR/RFLP
			NF98	PCR/RFLP
			NF99	PCR/RFLP
			NF101	PCR/RFLP
		NF102	PCR/RFLP	
		ATCC 13388		
		ATCC 19429	RKI, Berlin, Alemania	
		ATCC 25619		
Pseudomonas	aeruginosa	ATCC 31482		
		ATCC 10145		
		ATCC 15442		
		ATCC 27853		

* Especies pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*

ATCC: American Type Culture Collection; LMG: Belgian Co-ordinated Collections of microorganisms - Bacteria Collections, Ghent, Belgica.

Las cepas ATCC y LMG de *Burkholderia cepacia* forman parte del International *Burkholderia cepacia* Strain Panel y fueron cedidas por el sector bacteriología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires- Argentina).

HNLP: Hospital de Niños de La Plata "Sor María Ludovica".

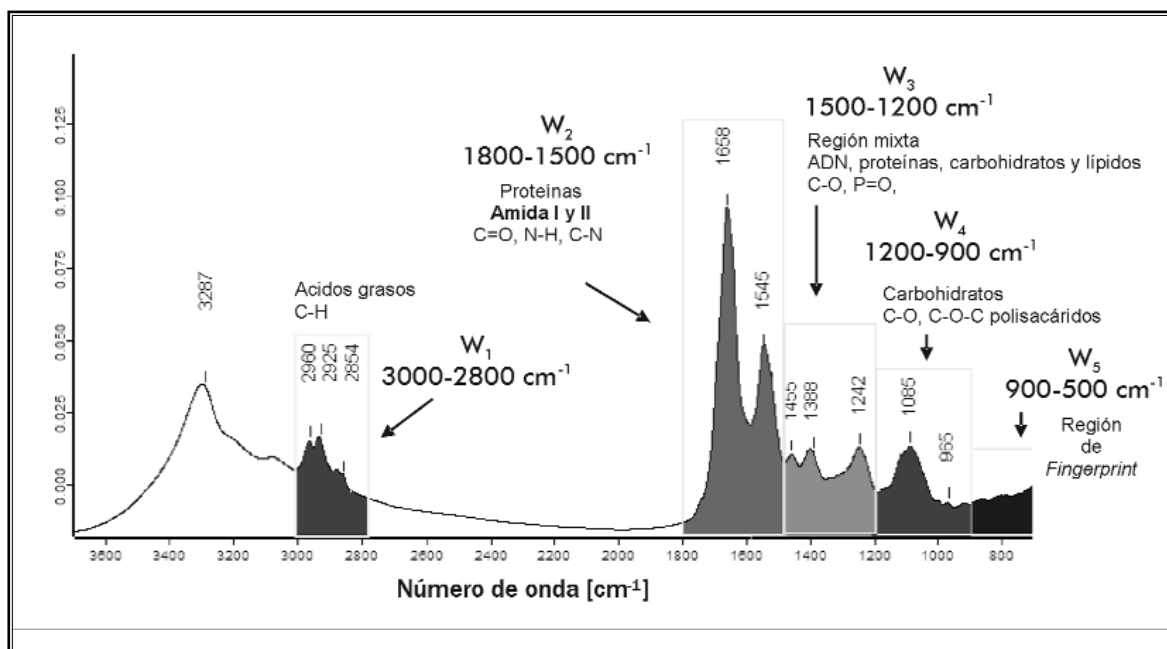
desconocidos y para estudios epidemiológicos a fin de poder diferenciar fenotípicamente aislamientos, se seleccionaron las ventanas espectrales que permitieron la diferenciación entre los diferentes genomovares del Complejo B. cepacia, para lo cual se fueron combinando las distintas ventanas espectrales indicadas en la Figura 1 hasta que la discriminación obtenida por FT-IR estuviera de acuerdo con la identificación molecular y bioquímica. Una vez establecidas las ventanas adecuadas, se calculó el coeficiente de disimilitud entre espectros utilizando el producto momento de Pearson ("scaling to 1st range") y para la construcción del dendrograma que muestra la clasificación final alcanzada, se utilizó el algoritmo de Ward. Las librerías basadas en el análisis de clusters, fueron construidas utilizando los software: Spectrum One (Perkin Elmer) y el paquete IDENT del software OPUS.

IV) Construcción de redes neuronales e identificación
La construcción de una librería basada en una red

neuronal artificial para identificar aislamientos bacterianos se realizó utilizando el software Neuro-Developer®, desarrollado por Synthon Analytics, Heidelberg, Alemania ^(16,17). La construcción de la librería requirió varias etapas: a) adquisición y pretratamiento de espectros; b) normalización de datos; c) ingreso de espectros para entrenamiento de la red; d) definición de la topografía de la red; e) optimización del número de niveles jerárquicos de la red, del número de capas escondidas de la red neuronal y de las funciones a utilizar y el cálculo del error mínimo; f) validación de la red neuronal artificial mediante tres técnicas: "winner takes all" (WTA), la regla 402040 y la extrapolación; g) identificación de aislados desconocidos.

Caracterización de organismos por PCR-RFLP
La identidad de los 9 genomovares de referencia del Complejo B. cepacia, así como de los aislados hospitalarios fue confirmada por aplicación de métodos de biología molecular utilizando la técnica de PCR y corte con enzimas de restricción (recA-RFLP) ⁽⁴⁾.

Figura 1. Espectro FT-IR de absorción de una muestra de Pseudomonas aeruginosa depositada sobre una celda de ZnSe, obtenido por 64 scaneos a 6 cm⁻¹ de resolución. Se muestran las distintas ventanas o regiones en que puede dividirse un espectro para facilitar su análisis y las absorciones correspondientes a los grupos funcionales presentes en las principales macromoléculas.



resultados y discusión

El fenotipo de un microorganismo varía en función de la composición del medio de cultivo, tiempo de crecimiento, pH, temperatura, sistema de cultivo, etc. Por lo tanto, al ser los espectros un reflejo del fenotipo, es de crítica importancia definir un procedimiento estandarizado de toma de muestra a fin de lograr reproducibilidad en los mismos. Los estudios de identificación de muestras biológicas por sus espectros son confiables si la muestra y condiciones de medida son estandarizadas.

Estandarización de condiciones de cultivo

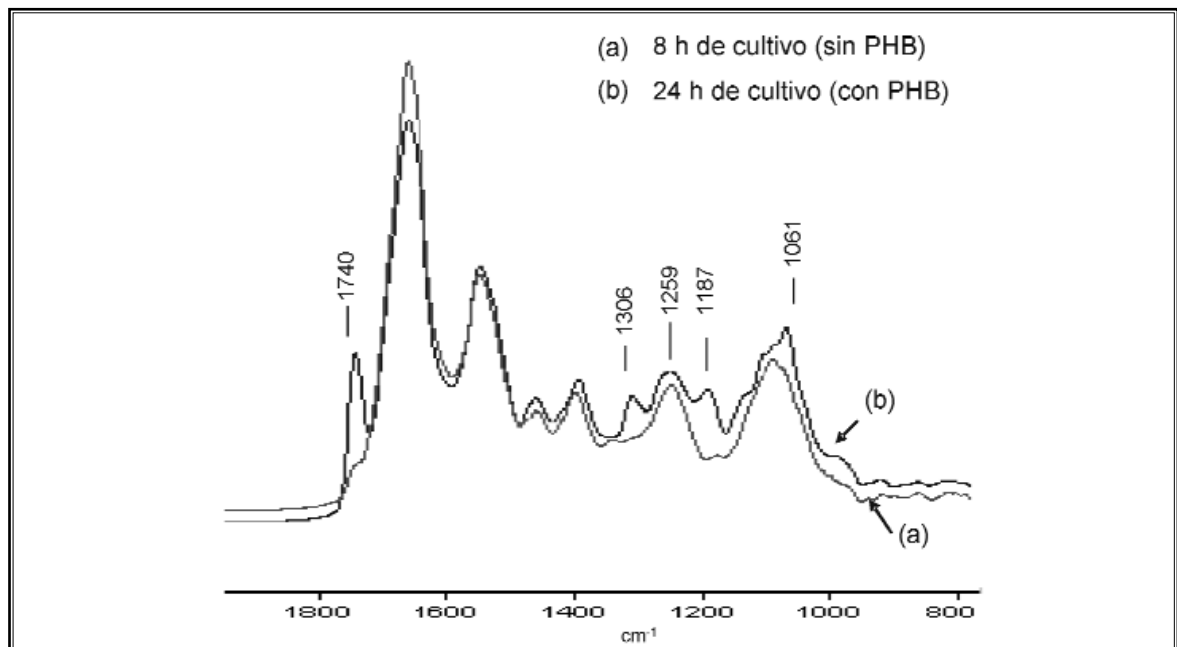
Diversas investigaciones demostraron que la presencia de polímeros de reserva derivados de hidroxi-alcanoatos (polibeta-hidroxibutirato, PHB), dificulta la caracterización e identificación por FT-IR debido a que los mismos exhiben importantes bandas de absorción a lo largo de todo el espectro IR (PHB posee 11 picos

característicos) ^(12,14,17). Por esta razón y teniendo en cuenta que estos organismos forman PHB durante su crecimiento, se debió determinar en qué fase del cultivo la presencia de PHB no representaba una interferencia. Como se observa en la Figura 2, colonias tomadas al cabo de 8 hs de crecimiento en medio sólido, no presentan un nivel detectable de PHB que pueda afectar la posterior diferenciación espectral. En vista de este resultado, se adoptó para todos los organismos este tiempo de crecimiento para la toma de muestra.

Reproducibilidad de las medidas

Estandarizadas las condiciones para la obtención de muestras se procedió a registrar no menos de 15 espectros de cada cepa a efectos de determinar, la reproducibilidad fenotípica de las mismas. En la Figura 3 se puede observar el nivel de reproducibilidad (indicado con líneas punteadas) obtenida para 3 diferentes genovares del Complejo B. cepacia.

Figura 2. Espectros FT-IR de un aislamiento hospitalario perteneciente al genomovar IIIa del Complejo B. cepacia que produce diferentes cantidades del material de reserva poli-hidroxi-butirato (PHB) en función del tiempo de crecimiento. a) espectros IR de células tomadas a las 8 hs de crecimiento en medio MH, donde no se detecta producción de PHB; y b) las mismas células tomadas a las 24 hs de crecimiento donde se detecta la presencia de PHB.



Los replicados provienen de 3 cultivos independientes. Este análisis demostró que en las condiciones de cultivo y medida seleccionadas el nivel de reproducibilidad mostrado por las cepas analizadas era satisfactorio ($NR < 16$), ya que la bibliografía internacional establece como admisibles valores menores a 25⁽¹³⁾.

Diferenciación de los genomovares pertenecientes al Complejo B. cepacia por FT-IR

La quemometría es una poderosa herramienta de análisis que resulta de la aplicación de técnicas computacionales a la espectroscopía vibracional^(16,17). A partir de la superposición de los espectros de cada una de las cepas de referencia de los distintos genomovares del complejo B. cepacia, (Tabla I), se seleccionaron 5 ventanas espectrales que permitieron la discriminación entre los mismos. El criterio de selección tiene en cuenta las regiones donde las diferencias entre espectros de una misma clase son mínimas y las diferencias entre clases resultan máximas. Las ventanas seleccionadas fueron utilizadas como datos de entrada, conjuntamente con el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward, para la construcción del dendrograma indicado en la Figura 4a. El mismo muestra que los distintos genomovares pueden ser claramente discriminados a través de sus espectros infrarrojos. Las cepas utilizadas habían sido analizadas por métodos moleculares (PCR-RFLP) para confirmar su identidad. Los resultados obtenidos empleando el gen recA (Figura 4b), fueron confrontados con bases de datos internacionales lo cual permitió corroborar el genotipo de cada cepa^(4,6,9).

Construcción de librerías basadas en el análisis de cluster

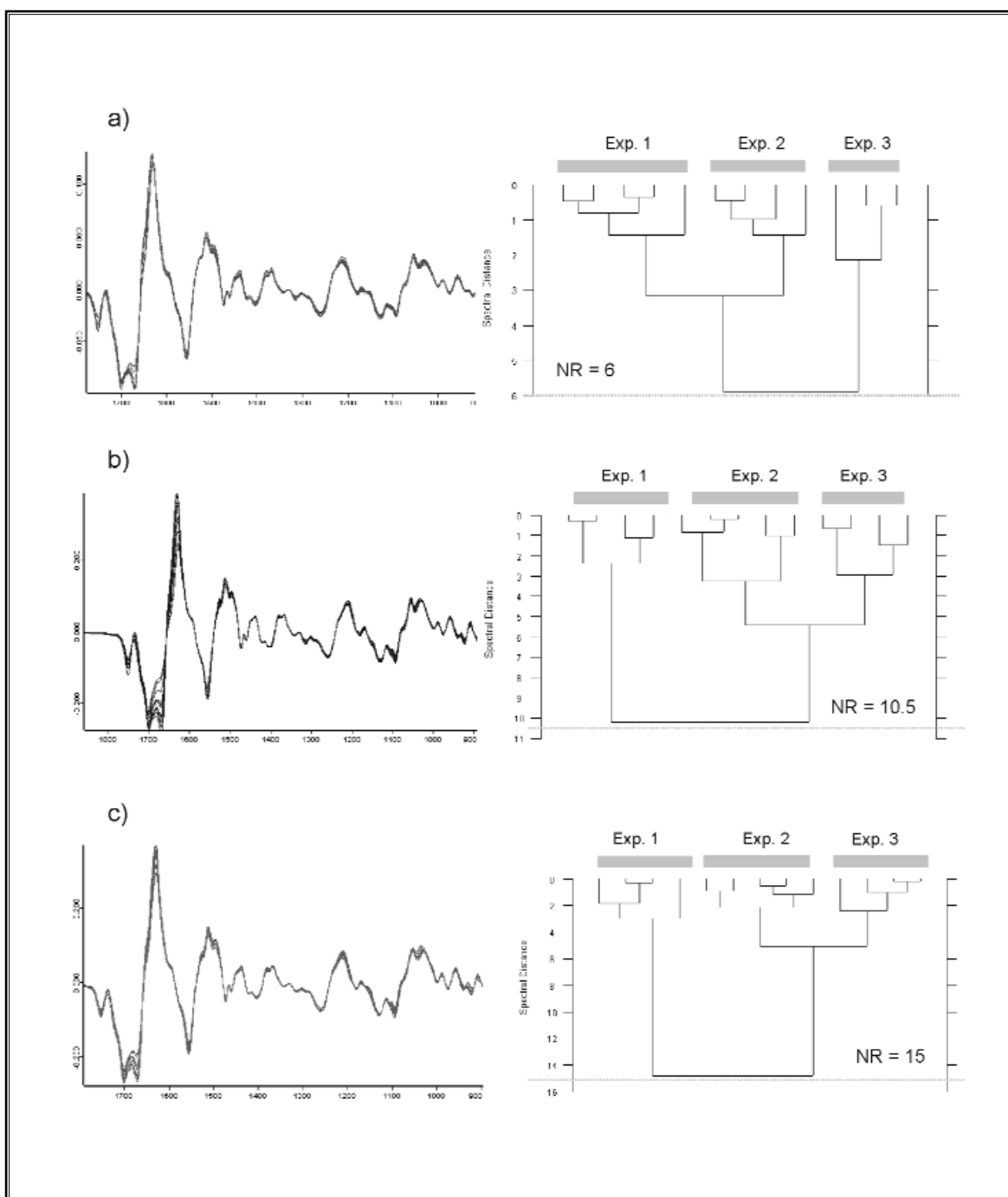
Habiendo establecido que la espectroscopía IR permite la diferenciación de genomovares de B. cepacia, se pasó a construir una librería o base de datos espectrales que permitiera la posterior identificación de aislados bacterianos desconocidos. Para la construcción de esta librería los espectros pertenecientes a los diferentes genomovares de referencia fueron divididos en dos grupos. Un primer grupo de 10 espectros de cada

genotipo, tomados al azar, fue cargado en el software OPUS y procesados usando el paquete IDENT para construcción de bibliotecas. Luego se cargaron en el software, las 5 ventanas espectrales seleccionadas previamente (indicadas en la Figura 4a) para la diferenciación. En las mismas se calculó el coeficiente de disimilitud de Pearson. La librería resultante, fue posteriormente validada con el otro grupo de espectros (5 de cada genotipo). A partir de los espectros que la librería no identificó correctamente se determinó el % de certeza o incertidumbre para la identificación. El porcentaje de certeza para la identificación de organismos pertenecientes a los genomovares II, IIIa, IIIb, IV, VII y X varió entre el 90 y el 95%; en tanto que para los genomovares I, VI y VIII estuvo comprendido entre el 80 y el 85%. Es importante resaltar que estos valores pueden ser mejorados ampliando el número de espectros con los cuales se construye y valida la librería.

Los espectros obtenidos de los aislamientos hospitalarios fueron posteriormente desafiados contra la librería desarrollada, resultando todos ellos identificados como genotipo IIIb del complejo B. cepacia excepto un aislamiento (número 87) que fue identificado como genotipo VI. El análisis posterior de todos los aislamientos por métodos moleculares demostró sin embargo, que todos ellos correspondían al genotipo IIIb. Se concluyó por lo tanto que esta librería basada en el análisis de cluster presentó un 7% de identificaciones incorrectas con los aislamientos hospitalarios ensayados.

Si bien la identificación de microorganismos al nivel de subtipo (IIIb en este caso) es necesaria para el tratamiento y seguimiento de los pacientes, en diversas ocasiones se requiere alcanzar un nivel de clasificación mayor y diferenciar los aislados microbianos a nivel de cepa, en especial en brotes o estudios epidemiológicos. Con este fin se estudió el conjunto de 14 aislados hospitalarios provenientes de un brote registrado en el Hospital de Niños de La Plata durante el año 2004 (Tabla I). Se analizaron los espectros promedio obtenidos de 15 replicados de cada aisla-

Figura 3. Dendrogramas mostrando los niveles de reproducibilidad para los genotipos I (a), VI (b) y VIII (c), en el rango 1.700 - 900 cm^{-1} . Los resultados provienen de 3 experiencias independientes con no menos de 5 repeticiones cada una registradas en el lapso de 6 meses. Para la construcción del dendrograma se utilizaron la función "Normal to replevel" para el cálculo de la distancia espectral y Average Linkage para mostrar la distribución de las distancias obtenidas (OPUS 4.0, Bruker, Optick, Alemania). El nivel de reproducibilidad (NR) alcanzado por cada cepa se indica con línea de puntadas.



miento, a través de un análisis de clusters utilizando el coeficiente de Pearson y el algoritmo de Ward en las ventanas definidas previamente. Los resultados (Figura 4c) indican que si bien todos ellos fueron identificados como IIIb, como se mencionó previamente, la espectroscopía IR fue capaz de diferenciarlos en 4 grupos o clusters. Es importante resaltar que los métodos bioquímicos aplicados a estos aislamientos permitieron identificarlos sólo hasta el nivel de género (Complejo B. cepacia) y la técnica de biología molecular los agrupó como pertenecientes al genomovar IIIb (nivel de subtipo). FT-IR demostró ser en este caso una metodología de mayor poder de discriminación.

Construcción de librerías espectrales basadas en redes neuronales artificiales

Una segunda estrategia de identificación implica el desarrollo de librerías empleando un sistema de clasificación jerárquica basado en redes neuronales artificiales (RNA). En este trabajo fue desarrollada una librería basada en tres niveles de clasificación (Figura 5a): el nivel superior (top-level) permite discriminar entre los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*; el segundo nivel (subnet 1) diferenciar los genomovares del Complejo B. cepacia y el tercer nivel (subnet 2) distinguir entre las dos subespecies del genomovar III (IIIa o IIIb). Utilizando el 75 % de los espectros registrados de cada genomovar de referencia se entrenaron y validaron las tres redes neuronales en forma independiente y luego fueron conectadas en forma de arquitecturas neurales en multicapas. El entrenamiento de cada una de ellas (top-net, subnet1 y subnet 2) consistió en la búsqueda de los números de onda que mejor diferencian las clases estudiadas (Figura 5b), así como también el ajuste de otras variables como el número de nodos internos. Posteriormente utilizando los espectros reservados para el testeo (25 % del total de espectros), se calcularon los % de certeza para la identificación de cada uno de los genomovares, obteniéndose valores comprendidos entre el 97 y 100 %,

dependiendo del genomovar. Bajo este sistema de identificación por redes neuronales artificiales todos los espectros correspondientes a los aislados de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos fueron correctamente clasificados como pertenecientes al genomovar IIIb (Figura 5c).

Los dos modelos de clasificación elaborados en el presente estudio prueban que la información contenida en el espectro IR es suficiente para diferenciar fenotípicamente los organismos pertenecientes al Complejo B. cepacia y diferenciar éstos de *Pseudomonas*. Se demostró que las diferentes cepas poseen estructuras específicas que FT-IR es capaz de reconocer.

Es importante resaltar en cuanto a la metodología en general el tiempo empleado en la obtención de resultados. Si se toma en cuenta el tiempo que insume el cultivo de la muestra de esputo (24 horas más 8 horas para el repique), el tiempo que insume preparar la muestra y secarla (15 minutos más 45 minutos) y el tiempo de lectura y carga de espectro en la librería (1 hora en total), se llega a la conclusión que la obtención de resultados por FT-IR insu- men menos de 36 horas.

conclusiones

En el presente trabajo se demostró que FT-IR combinada con análisis multivariante constituye una poderosa herramienta para la caracterización e identificación de organismos aislados de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos. Las librerías construidas permitirán el diagnóstico bacteriológico de organismos pertenecientes al complejo B. cepacia y *Pseudomonas* a las 36 horas posteriores a la toma de muestra. La metodología demostró altos niveles de certeza y bajo costo operativo. Un mayor nivel de seguridad podrá ser alcanzado con un aumento en el número de datos durante el entrenamiento de la red neuronal. La estrategia de diagnóstico microbiológico desarrollada es inédita tanto en el ámbito local como internacional y contribuirá a la resolución de un problema social importante a nivel hospitalario.

Figura 4. a) Dendrograma resultante de un análisis de cluster jerárquico de datos obtenidos de espectros FT-IR correspondientes a los diferentes genomovares del Complejo B. cepacia. El análisis fue realizado usando la 1ra derivada normalizada vectorialmente y con la combinación de ventanas espectrales indicadas. b) Análisis por RFLP del gen recA para algunos de los genomovares del complejo B. cepacia. c) Agrupamiento jerárquico obtenido de las medias de la derivada 1ra de 15 replicados de espectros obtenidos de 14 aislamientos microbianos recuperados de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos.

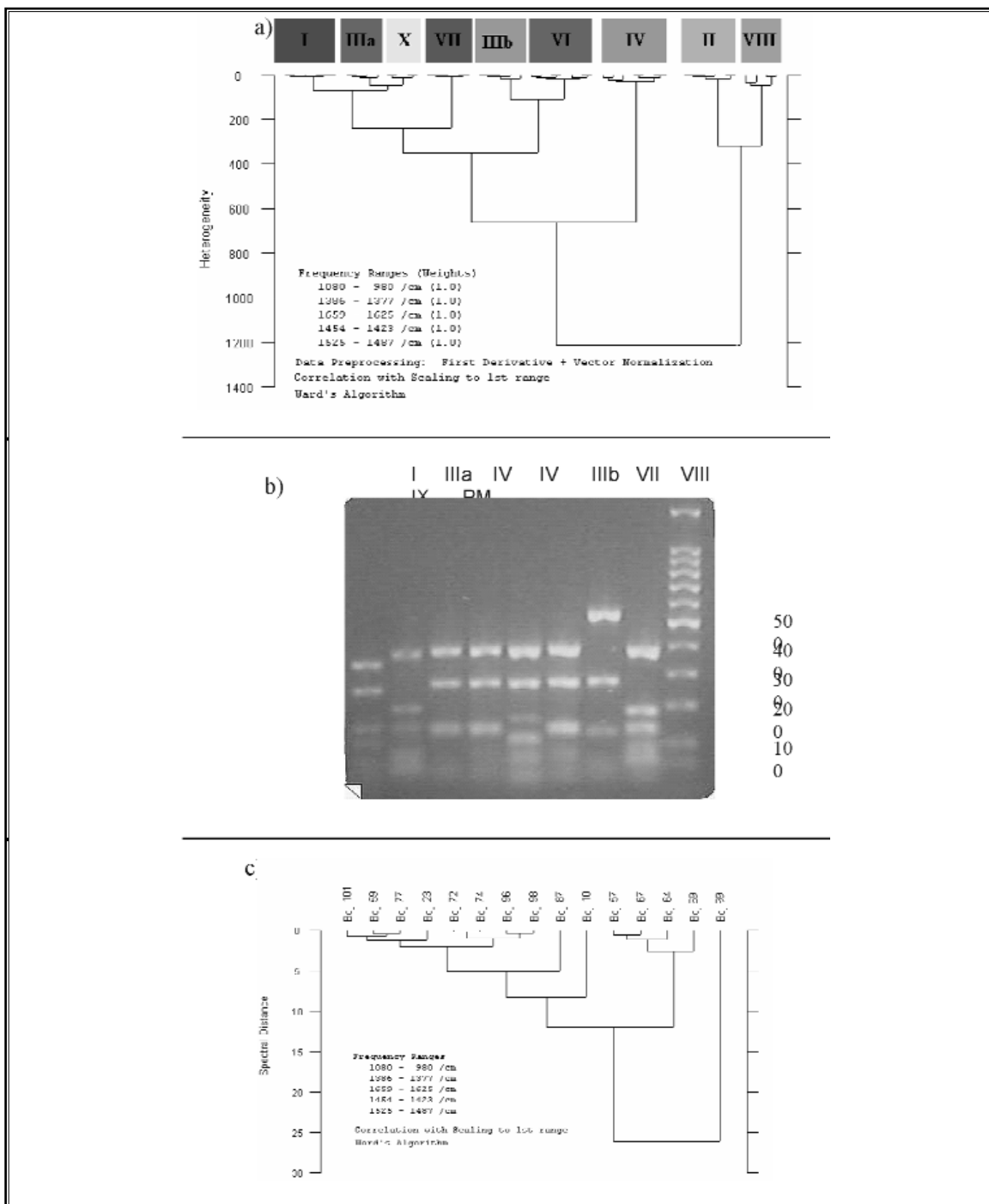
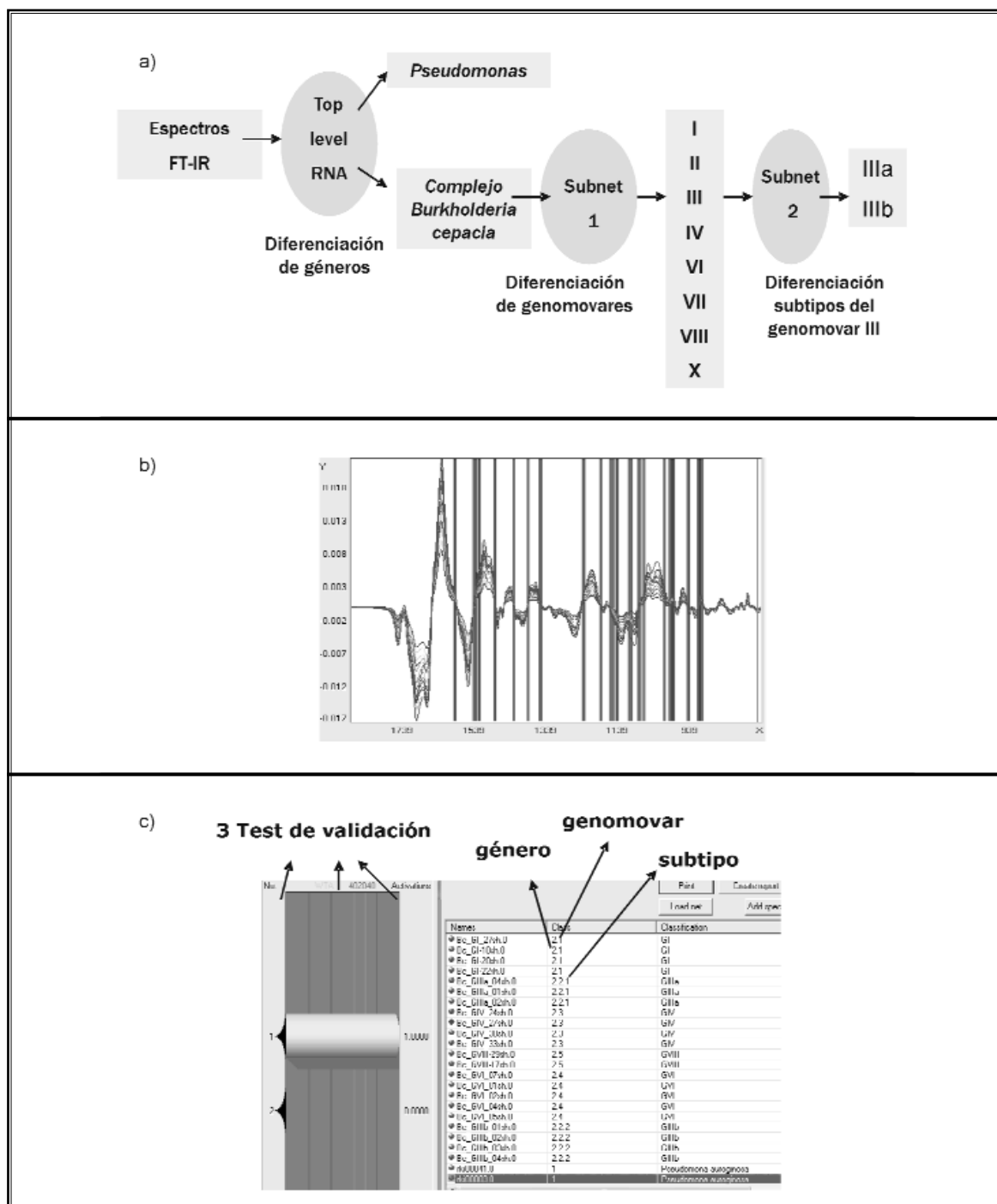


Figura 5. Librería sobre la base de redes neuronales artificiales. a) Representación esquemática de la red neuronal artificial en multicapas. Cada "subnet" fue optimizada independientemente para ejecutar una discriminación particular dentro de la base de datos general b) números de onda seleccionados (inputs) que mejor diferenciaron los genomas del Complejo B. cepacia correspondientes a la subnet 1. c) Validación de la librería espectral y representación de la forma en que el software presenta los resultados.



referencias

1. Miller MB and Gilligan PH 2005. *Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis*. J Clin Microbiol 41: 4009-401.
2. Fauroux B, Hart N, Belfar S, Boulé M, Tillous-Borde I, Bonnet D, Bingen E and Clément A 2004. *Burkholderia cepacia is associated with pulmonary hypertension and increased mortality among Cystic Fibrosis patients*. J. Clin Microbiol. 42: 5537-5541.
3. Henry D A, Campbell ME, LiPuma JJ and Speert DP. 1997. *Identification of Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium*. J. Clini Microbiol. 35: 614-619.
4. Drevinek P, Hrbáková H, Cinek O, Bartosova CJ, Nue O, Namac A and Pohumek P. 2002. *Direct PCR detection of Burkholderia cepacia complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA*. J Clin Microbiol 40: 3.485-3.488.
5. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P and LiPuma JJ 2000. *Utility of commercial systems for identification of Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis sputum culture*. J. Clin Microbiol. 38: 3.112-3.115.
6. VanPelt C, Verduin CM, Goessens H F, Vos MC, Tümmler B, Segonds, C., et al. 1999. A. *Identification of Burkholderia spp. in the Clinical Microbiology laboratory: Comparison of Conventional and Molecular Methods*. J Clin Microbiol 37: 2158-2164.
7. Burdge DR, Noble MA, Campbell ME, Krell V I and Speert D P 1995. *Xanthomonas mantophilia misidentified as Pseudomonas cepacia in cultures of sputum from patients with cystic fibrosis a diagnostic pitfall with major clinical implications*. Clin. Infec. Dis. 20: 445-448.
8. McMenamin JD, Zacccone TM, Vandamme P and Lipuna JJ 2000. *Misidentification of Burkholderia cepacia in US Cystic Fibrosis Treatment Centres*. Chest 117: 1.661-1.664.
9. Payne GW, Vandamme P, Morgan SH. et al 2005. *Development of a recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus*. Appl. Environ Microbiol 71: 3917-3927.
10. Seo S-T and Tsuchiya K. 2005. *Genotypic characterization of Burkholderia cenocepacia strains by rep-PCR and PCR-RFLP of the fliC gene*. FEMS Microbiol Lett 245: 19-24.
11. Helm D, Labischinski H, Schallehn G and Naumann D. 1991. *Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy*. J Gen Microbiol 137: 69-79.
12. Naumann D, Helm D and Labischinski H. 1991. *Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy*. Nature 351: 81-85.
13. Kirschner C, Maquelin K, Pina P, NgoThi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum GD et al. 2001. *Classification and identification for Enterococci: a comparative phenotypic, genotypic and vibrational spectroscopic study*. J. Clin. Microbiol. 39: 1763-1770.
14. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, NgoThi NA, van Vreeswijk T, Stämmler M, et al. 2003. *Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures*. J Clin Microbiol 41: 324-329.
15. Sandt C, Sockalingum G D, Aubert D, Lapan H, Lepouse C, Jaussaud M et al. 2003. *Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of Candida albicans strains isolated in intensive care units*. J. Clin. Microbiol. 41: 954-959.
16. Udelhoven, T, Novozhilov M and Schmitt J. 2003. *The NeuroDeveloper®: a tool for modular neural classification of spectroscopic data*. Chemometric Intelligent Lab Syst. 66: 219-226.
17. Udelhoven, T., Naumann, D., Schmitt, J. 2000. *Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria*. Appl. Spectrosc. 54: 1.471-1.479. ♦