



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis Doctoral

Epidemiología y evolución de aislados clínicos
pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia*
recuperados del tracto respiratorio de
pacientes fibroquísticos

Pablo Francisco Martina

Oswaldo Miguel Yantorno
Director

María Alejandra Bosch
Codirector

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECRETARÍA DE POSGRADO

Defensa de Tesis Doctoral para optar al grado académico de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

Área Ciencias Biológicas - Acreditada por CONEAU. Categoría A. Res. 521/01.

Tesis Doctoral

Epidemiología y evolución de aislados clínicos pertenecientes al
Complejo *Burkholderia cepacia* recuperados del tracto respiratorio de
pacientes fibroquísticos.

Lic. Pablo Francisco Martina

Tesista

Prof. Dr. Osvaldo M. Yantorno

Director

Dra. María Alejandra Bosch

Codirector

Comité Evaluador:

Prof. Dr. Pablo Pérez

Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas – UNLP.

Prof. Dr. Carlos Vay

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA.

Prof. Dra. Andrea Smania

Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas – UNC.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido publicados en revistas científicas con referato y han recibido un premio de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, y un premio en el Concurso Nacional de Innovaciones -INNOVAR 2011.

-Martina P., Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, Vay C, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O, Lagares A, Bosch A. 2013. **Genetic Diversity of *Burkholderia contaminans* Isolates from Cystic Fibrosis Patients in Argentina.** Journal of clinical microbiology **51**:339–44.

-Oderiz S, Palacio PDEL, Lewis MC, Bettiol MP, Martina P., Bosch A, Yantorno OM, Gatti BM. 2011. **Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación de organismos del complejo *Burkholderia cepacia* aislados de muestras clínicas.** Revista Argentina de Microbiología 43:168–175.

-Premio **FERNANDO RUSQUELLAS** otorgado por la **Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica** Título del trabajo: *Estudio microbiológico basado en métodos moleculares y espectroscópicos para la identificación del Complejo *Burkholderia cepacia* en muestras clínicas e industriales de Argentina. Implicancias epidemiológicas* Autores: José Degrossi, Alejandra Bosch, Matías Messina, Pablo Martina, Carlos Vay, Laura Galanternik, Blanca Gatti, Patricia Montanaro, Osvaldo Yantorno y Mirta Franco. 23 de Octubre de 2008, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. Julio 2008.

-Premio **INNOVAR 2011.** Concurso Nacional de Innovaciones. Premio otorgado en la Séptima Edición del Concurso INNOVAR de la Secretaría de Planeamiento y Políticas de Ciencia e Investigación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT). Proyecto 10344: **“KIT DE DIAGNOSTICO MOLECULAR RAPIDO PARA COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA.** Autores: Pablo Martina, Osvaldo Yantorno y Alejandra Bosch. El premio fue otorgado en Tecnópolis, Buenos Aires Argentina. Categoría Innovación Aplicada, en Octubre de 2011. Premio: \$5.000

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE “DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS”, SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI) Dr. J.J. ERTOLA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA; BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. OSVALDO MIGUEL YANTORNO Y LA CODIRECCION DE LA DRA. MARIA ALEJANDRA NIEVES BOSCH.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

La Plata, 21 de Marzo de 2013.

RECONOCIMIENTO

MI RECONOCIMIENTO AL CONCEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) Y AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA, POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.

DEDICATORIAS

*A mis padres,
Don Hugo Martina y Doña Teresa Canteros
por habernos educados con el ejemplo.*

A mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer especialmente al Dr. Osvaldo M. Yantorno por aceptarme en su laboratorio para realizar este trabajo de tesis bajo su dirección y por compartir durante todo este tiempo su valiosa experiencia y conocimientos. Por los consejos transmitido en distintos momentos decisivos de mi formación.

A mi codirector la Dra Alejandra Bosch que me han dado toda su confianza y apoyo a lo largo de este trabajo de investigación, por mostrarme de que las cosas pueden hacerse mejor. Por contribuir en mi crecimiento y formación académica.

A la Dra. Claudia Prieto por su increíble paciencia, predisposición y ayuda a lo largo de esta tesis. Al Dr. Antonio Lagares, por su tiempo y compromiso más allá de todo. La ayuda las temáticas relacionadas a genética.

A la Dra. Andrea Smania y al Dr. Antonio Oliver por haberme recibido en sus laboratorios, y a sus increíble grupos de trabajo que hicieron que me sienta en casa. Por el conocimiento transmitido y la ayuda brindada. Por compartir su gran experiencia en las temáticas relacionadas a esta fascinante profesión que es la investigación científica.

Extiendo mi agradecimiento a mis compañeros de trabajo y a los que han transitado por sus pasillos por brindarme, desde mi llegada al laboratorio su ayuda y entusiasmo.

A mis amigos del Laboratorio 2, por tanto momentos compartidos pero por sobre todo el calor humano que hacen de este segundo hogar el lugar más copado del CINDEFI... las tardes de folklore con Yani Lamberti, las reuniones informales post-laboratorio con Diego Serra y Alejandro Miñan, las charlas de últimas horas y los asados de fin de semana con Diego “Cacho” Nosedá y “Tito Benavides” Ramos, la amistad de Laura Arnal, los infaltables mates de Jime Alvarez Hayes, las charlas técnicas con Hugo Valdez y Nati Catelan, los amplios debates políticos y científicos con Juano Gorgojo. A la Dra. Eugenia Rodríguez por los consejos en distintas circunstancias. Especialmente a Julio Figari por compartir su valiosa experiencia y las miles de placas preparadas. A los estudiantes que han contribuido en el desarrollo experimental y enriquecimiento personal, gracias... Gonzalo “Chicho” Sequeira, Constanza Mannino, Eugenia Zappa, Cecilia Baeza, Fernando Mazur y Ailen Natale.

A la Dra Cecilia I. Catanensi y a la Lic. Laura Glesmann por la ayuda.

Al personal del Servicio de Bacteriología del Hospital de Niños, en especial a Blanca Gatti, Marisa Betiol, Sebastián Oderiz y Cecilia Vescina, por todo lo recibido.

A todas las personas han estado compartido conmigo en esta etapa de corazón, gracias !!

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGNIFICADOS

A ₅₉₀	Absorbancia a 590 nm
Abs IR	Absorbancia Infrarrojo
AHL	Acil-homoserín lactona
TSA	Medio de cultivo Trypticase Soja Agar
CV	Cristal violeta
DO ₆₅₀	Densidad óptica a 650 nm
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPS	Exopolisacárido extracelular
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
HPLC-MS	Cromatografía líquida alta performance-espectrometría de masas
HSL	Homoserín lactona
IR	Infrarrojo
LB	Medio Luria-Bertani
μ	Velocidad específica de crecimiento
MRS	Reparación de bases mal apareadas
MLST	Tipo de secuencias multilocus
NCBI	Centro Nacional de Información en Biotecnología
UPGMA	Método no ponderado de grupo par con media aritmética
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
QS	<i>Quorum sensing</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RFLP	Polimorfismo de restricción de longitud de fragmentos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SIM	Monitoreo ión selectivo
SS	Medio de cultivo Stainer-Scholte
UFC	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
V	Volts
ZnSe	Seleniuro de Zinc

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

Fibrosis quística, el estado del arte

CAPÍTULO II

Epidemiología del complejo *Burkholderia cepacia*

CAPÍTULO III

Diversidad genética y fenotípica en *Burkholderia contaminans*

CAPÍTULO IV

Análisis de factores de virulencia y capacidad de formación de *biofilm* en aislamientos de *B. contaminans* recuperados de infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ

CAPÍTULO V

Hipermutación en el complejo *Burkholderia cepacia*

CAPÍTULO VI

Conclusiones generales

The graphic features three overlapping circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of gray. These circles are arranged in a vertical sequence, with the largest at the top, a medium one in the middle, and the largest again at the bottom. Three thin, light gray lines originate from the top left and fan out towards the right, passing behind the circles. The overall composition is minimalist and modern.

Capítulo I

Fibrosis Quística,
el estado del arte

Capítulo I**FIBROSIS QUISTICA, EL ESTADO DEL ARTE**

INTRODUCCIÓN	13
1.1. Antecedentes	13
1.1.1. Estructura Y Función Del Gen CFTR	14
1.1.2. Mutaciones En El Gen <i>CFTR</i>	15
1.1.3. Distribución De Frecuencias De Mutaciones Del Gen <i>CFTR</i>	16
1.2. Epidemiología De La Fibrosis Quística	16
1.3. Manifestaciones Clínicas De La Enfermedad	18
1.4. Métodos de diagnóstico de la Fibrosis quística	21
1.4.1. Test del sudor	21
1.4.2. Diagnóstico neonatal	21
1.4.3. Diagnóstico genético	22
1.5. Estrategias terapéuticas en el tratamiento de pacientes fibroquísticos	22
2. Patógenos respiratorios	24
2.1. Inflamación e infecciones del tracto respiratorio en pacientes fibroquísticos	24
2.2 El complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	28
2.2.1 Taxonomía	28
2.2.2. Identificación de bacterias pertenecientes al complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	29
2.2.2.1. Métodos fenotípicos clásicos	29
2.2.2.2. Métodos genéticos	30
2.2.2.3. Estudios del genoma completo	33
2.2.2.4. Métodos basados en el análisis de células enteras	34
2.2.3. Factores de virulencia de organismos del complejo <i>B. cepacia</i>	35
2.2.4. Distribución de las especies del cBc en la naturaleza	38
2.2.5. Epidemiología de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	40
2.2.6. Organismos del Complejo <i>Burkholderia cepacia</i> en la infección crónica	42
2.3 Problemática local, contribución e impacto	44
OBJETIVOS GENERALES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva de mayor mortalidad en individuos caucásicos (52)(130). Las escasas referencias recuperadas del folclore medieval, indicaban la predicción de la muerte temprana de infantes a los mostraban un sabor salado en la piel cuando eran besados: *“Lastima de aquel niño el cual al ser besado en la frente tenga sabor salado. Él esta embrujado y pronto deberá morir”* (Anónimo). La enfermedad fue descrita por primera vez en 1595 por Peter Paaw en Holanda, el cual realizó una autopsia en una niña fallecida de 11 años de edad, la cual se suponía había sido “hechizada”. En sus anotaciones describió que la niña se encontraba muy delgada, con el páncreas abultado y de color blanco brillante (55). En 1677, Gearduis Blasius publica un libro titulado *“Observations Medicae Rariores”* donde se describe la autopsia de un niño con una atrofia del páncreas, el cual se encontraba cirrótico (de consistencia fibrosa dura). Así, en los pueblos de Europa, quedó instaurado en el imaginario de la época que todo niño con cuadro de desnutrición y que en su frente presentara un excesivo sabor salado se encontraba embrujado (55). No fue hasta principios del siglo pasado, cuando la patóloga norteamericana Dorothy Andersen en 1938 describe la enfermedad y utiliza por primera vez el término "Fibrosis Quística del Páncreas" adquiriendo así su nombre actual. El doctor Sydney Farber en 1945 introdujo el término de mucoviscidosis para contrarrestar la nomenclatura de Andersen que sólo se enfocaba en el páncreas, mientras él creía firmemente que esta enfermedad era generalizada y debida al estado del mucus. Finalmente en 1989, el grupo del Dr. Kerem y colaboradores publican que la FQ es una enfermedad causada por la mutación en un gen que codifica una proteína de 1.480 aminoácidos denominada regulador de conductancia transmembrana de la FQ (acrónimo en inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*; CFTR), la cual se expresa en muchas células epiteliales y sanguíneas (90)(138). Esta proteína, se comporta como un canal de cloro, controlado por AMPc, que regula directamente los movimientos de los iones cloruro e indirectamente los movimientos del sodio y agua. Su deficiencia da lugar a la producción de un moco anómalo y espeso en todos los órganos, especialmente en los pulmones, páncreas, intestino, hígado, glándulas sudoríparas y conductos deferentes en los varones, con interferencia en su funcionalismo. Aunque la mayoría de las personas sanas tienen dos copias funcionales del gen, sólo una es necesaria para impedir el desarrollo de fibrosis quística. La FQ se desarrolla cuando ninguno de estos genes funciona normalmente. En consecuencia, se la considera una enfermedad autosómica recesiva (21).

1.1.1. Estructura y función del gen CFTR

Estructuralmente, el gen que codifica al CFTR pertenece a la denominada superfamilia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*). Este gen se encuentra localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 7 en la posición 31.2, conteniendo 27 exones (124). La proteína CFTR es un polipéptido, el cual en su forma madura tiene un peso molecular de 170 KDa. La estructura terciaria de la proteína está constituida por cinco dominios, 2 dominios transmembrana y 3 citosólicos (Figura 1). Los primeros son denominados dominios MSD (*membrane spanning domains*), cada uno constituido por seis hélices alfa, que posibilitan el paso de la proteína a través de la membrana celular. En el citosol se encuentran, dos dominios de unión a nucleótidos NBDs (*nucleotide binding domains*), lo que permite a la proteína utilizar energía en la forma de ATP. Finalmente, la activación de CFTR se produce por reacción de fosforilación en el dominio R (regulador), mediante una proteína quinasa A (PQA). El carboxilo terminal de la proteína está unido al citoesqueleto por interacción con dominios proteicos (138)(153). La regulación de CFTR depende principalmente de dos factores, la concentración de ATP intracelular y de un mecanismo de fosforilación. Previo a la apertura del canal, el dominio R está fosforilado en numerosos sitios de fosforilación mediante la proteína PQA dependiente de AMPc. Este evento posibilita la interacción del ATP con los NBDs que conduce a un cambio conformacional en los MSDs, permitiendo la apertura y cierre del canal. De esta forma la unión e hidrólisis del ATP a los NBDs llevará a una regulación fina del flujo de iones cloruro a través del canal. La actividad del canal finaliza cuando una fosfatasa desfosforila el dominio R y retorna CFTR a su estado de reposo. Por lo tanto la apertura y cierre del canal CFTR dependerá del balance de la actividad quinasa (PQA) y fosfatasa intracelular (PPasa) (95).

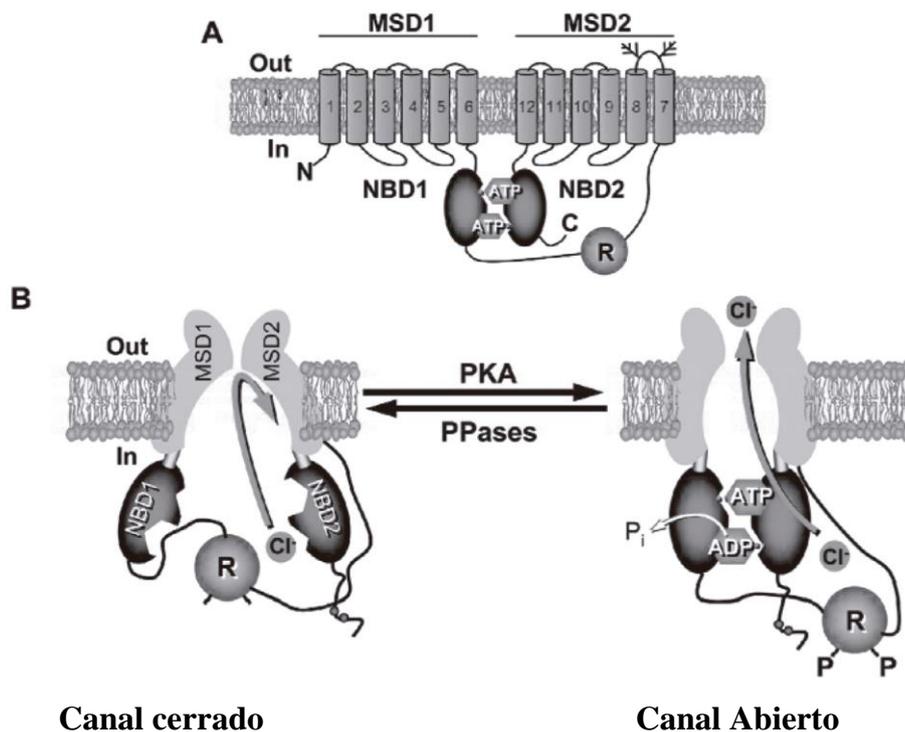


Figura 1. Modelo estructural simplificado del canal de cloro CFTR. El flujo del cloro a través del poro del canal está regulado por la fosforilación de una proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc y ciclos de ATP ligados a la hidrólisis en los NBDs. Abreviaciones: MSD, dominio transmembrana; PKA, proteína quinasa A; PPases, proteína fosfatasa; NBD, dominio de unión a nucleótido; P, fosforilación del dominio regulador R; P_i, fosfato inorgánico; R, dominio regulador (tomado de Li H y colaboradores, 2007 (96)).

1.1.2. Mutaciones en el gen *CFTR*

Hasta el presente se han identificado unas 1.600 mutaciones en el gen que codifica la proteína CFTR. La mayoría de estas mutaciones se encuentran confinadas a grupos familiares particulares, con unas pocas mutaciones comunes causantes de la enfermedad en la mayoría de los individuos. Aproximadamente en el 75% de todos los pacientes a nivel mundial, la mutación más común es la $\Delta F508$, que lleva a una delección de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína CFTR (97). Las mutaciones han sido divididas en cinco clases basadas en las alteraciones en el CFTR. Las clases I y II están relacionadas con la pérdida total de la función del gen. En cambio las mutaciones clase III, IV y V manifiestan defectos en la regulación, conducción de cloro por la proteína o que la misma se encuentre en muy baja concentración. Las mutaciones de clase I producen un defecto en la síntesis de CFTR debido a un codón de stop prematuro, resultando en la ausencia del producto final. En la clase II, que incluye la mutación $\Delta F508$, hay una producción anormal de la proteína CFTR que no logra sin embargo, salir del retículo endoplásmico y es degradada prematuramente. Las mutaciones tipo clase III, muestran la proteína CFTR en la membrana apical pero exhiben una disfunción en la

activación y regulación a nivel de membrana. En las mutaciones clase IV, CFTR se expresa en la membrana celular pero la conducción de cloro es reducida. La clase V presenta una disminución de la función a nivel de membrana producto de una reducción del *splicing* o “empalme” normal del CFTR. La amplia variedad de mutaciones en el CFTR explicarían parcialmente la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas entre pacientes FQ (136).

1.1.3. Distribución de frecuencias de mutaciones del gen *CFTR*

La distribución de los alelos del gen *CFTR* varía dentro de una población. La frecuencia de portadores con mutaciones $\Delta F508$ ha sido estimada en 1:200 en el norte de Suecia, 1:143, entre los lituanos y 1:38 en Dinamarca. Sin embargo, en países como Finlandia este constituye un alelo minoritario ha sido reportado que esta mutación se manifiesta en sólo 20 familias (*pedigree*) en Finlandia (175)(143)(68)(80). En Brasil también se han hecho estudios sobre distribución de mutaciones entre pacientes FQ siendo la mutación del alelo $\Delta F508$ la más frecuente (42). En Argentina, un estudio llevado a cabo por el Dr. Fernando Rentería y colegas del Hospital de Niños Sor María Ludovica de La Plata, informó una frecuencia en la mutación $\Delta F508$ del 57,7% entre los pacientes analizados, siendo la variante alélica G542X la segunda mutación más frecuente con un valor del 4,8% (137).

Tabla 1. Distribución mundial de las frecuencias de las principales mutaciones del gen *CFTR*.

Mutación	Frecuencia (*)
$\Delta F508$	66%-70%
G542X	2,4%
G551D	1,6%
N1303K	1,3%
W1282X	1,2%
Otras	27,5%

(*) Datos obtenidos de De Araujo y colaboradores (42).

1.2. Epidemiología de la Fibrosis Quística

Se ha reportado que en la población caucásica la incidencia es de esta enfermedad es de 1 en 2570 nacimientos (142). Sin embargo se debe tener en cuenta que la incidencia difiere según los distintos grupos raciales, probablemente como reflejo de una historia diferente. En los Estados Unidos, 1 de cada 4.000 niños nacen con fibrosis quística (145). En este país el estudio de la distribución de la enfermedad por raza permitió comprobar que la misma afecta a alrededor de 1/3.300 nacidos vivos para niños de raza blanca, a 1/15.300

nacidos vivos de niños de raza negra y a 1/32.000 de origen asiático (145) . En España la incidencia se estima en 1 de 4.500 nacimientos y en Irlanda 1 de cada 1.353, lo cual corresponde a la mayor incidencia mundial (21). En la Argentina, los últimos datos reportados por el Programa de Pesquisa Neonatal de Fibrosis Quística en el año 2008 indican una incidencia de 1 caso en 6.775 nacimientos, pero es muy probable que sólo el 50% de todos los casos hayan sido considerados (38)(139). Datos de la Asociación Argentina de Lucha contra la Enfermedad Fibroquística del Páncreas (FIPAN) (<http://www.fipan.org.ar/>) informan que 1 de cada 4000 recién nacidos padece esta enfermedad estimando que en nuestro país nacen entre 300 a 400 niños por año con fibrosis quística.

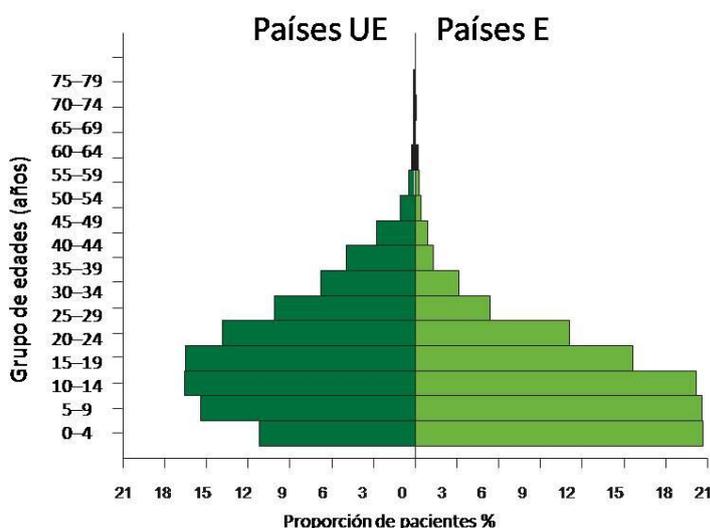


Figura 2: Pirámide de población de edad media de los pacientes con FQ en países de Unión Europea (UE) y los países pertenecientes solo a Europa (E).

En 1958 se detectó el primer caso de FQ en Argentina, y en 1968 comenzó la atención de estos pacientes en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires. Según datos del Registro Latinoamericano de Fibrosis Quística (REGLAFQ, año 1997) elaborados sobre más de 1800 pacientes, en Argentina hasta finales de los 80' la edad media al diagnóstico era de 31 meses y la edad media del fallecimiento era 5 años (139). La Sociedad Europea de Fibrosis Quística (ECF) y el proyecto del 6PM EuroCareCF elaboraron un informe en colaboración con el Registro Demográfico Europeo de Fibrosis Quística para demostrar las discrepancias en el diagnóstico, el tratamiento y la esperanza de vida - en última instancia - paciente entre los "nuevos" y "antiguos" Estados miembros de la Unión Europea, así como los terceros países de Europa. Datos demográficos comparativos de la población Fibroquística Europea de 29.000 pacientes con FQ de 35 países europeos, divididos de acuerdo a su condición de miembro de la UE en 2003 se muestran en la figura 2. En resumen

como era de esperar, los países de larga data de la UE tenían una mayor proporción de pacientes de edad avanzada. Los países no pertenecientes a la UE y los Estados miembros de la UE recientemente tuvieron una menor prevalencia de pacientes con fibrosis quística, debido probablemente a un incompleto diagnóstico, la reducción del acceso al tratamiento, la mortalidad prematura y la infancia (115). Se ha sugerido que este estudio puede servir como modelo, demostrando a los responsables políticos como los recursos asignados para el diagnóstico y la intervención temprana puede afectar el resultado de la enfermedad para los pacientes con una enfermedad rara.

La fibrosis quística es una enfermedad que acorta la vida media de los pacientes. Sin embargo con un adecuado tratamiento la expectativa de vida de los mismos se puede prolongar. La esperanza de vida para los individuos fibroquísticos en países desarrollados como Estados Unidos y Dinamarca puede llegar a superar los 60 años, ya que la misma está asociada directamente al tipo de tratamiento que reciben los pacientes. En la actualidad en Argentina los pacientes pueden superar los 35 años (datos obtenidos de FIPAN). La fibrosis quística afecta tanto a hombres como mujeres. Sin embargo las estadísticas han demostrado que los hombres tienden a tener una mayor perspectiva de vida que las mujeres (140)(27). En este sentido, si bien debido a las mejoras en la asistencia en los diferentes centros de salud esta diferencia de género no es tan evidente, un estudio recientemente realizado en Irlanda reporta una relación entre la hormona femenina estrógeno y una mala evolución del paciente FQ (2).

1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Históricamente se ha considerado que la FQ es un trastorno genético que da lugar a una enfermedad severa que se manifiesta en los primeros años de la vida del niño y cuya sintomatología más común se asocia a la mal absorción intestinal lo que conlleva a diarreas crónicas, malnutrición y a una neumopatía crónica. Sin embargo actualmente se la define como un trastorno complejo que produce un amplio abanico de expresiones clínicas que pueden aparecer a cualquier edad y también de forma atípica. Las manifestaciones clínicas más sobresalientes que sugieren el diagnóstico de la enfermedad (Tabla 1) pueden presentar una amplia variedad de expresiones a nivel gastrointestinal, respiratorio, endocrino y de crecimiento. **La afectación digestiva** es prácticamente total y se alteran las tres funciones principales: digestión, absorción y motilidad, siendo la mala absorción el síntoma capital (21). Entre las manifestaciones digestivas más frecuentes se encuentran el íleo meconial que

aparece en el 15% de los recién nacidos y la insuficiencia pancreática (IP) que aparece en el 85-90% de los pacientes y que se desarrolla desde el nacimiento o el primer año de vida, condicionando una mala absorción de grasas (50). Otras formas de presentación clínica relativamente frecuentes son la pérdida severa de iones por el sudor en épocas estivales, con alteraciones del equilibrio ácido-base, de instauración aguda (deshidratación hiponatémica, alcalosis metabólica, hipocalcemia e hipocloremia) o crónica (alcalosis hipoclorémica con cuadro de postración, anorexia y desmedro), y el síndrome de anemia, hipoproteinemia y edemas que aparecen sobre todo en el recién nacido (131). **La afectación hepatobiliar** relacionada con la fibrosis quística aparece en el 18-37% de los pacientes. La diabetes relacionada con fibrosis quística, cuya incidencia y prevalencia aumentan con la edad, está causada por una insulinopenia progresiva secundaria a la pérdida gradual de tejido pancreático. En relación a la **afección respiratoria**, los diferentes tipos de modificaciones de la proteína CFTR alteran el transporte de cloro a través de las membranas y modifican las secreciones bronquiales, haciéndolas más viscosas. Así, la enfermedad pulmonar resulta del bloqueo de las vías aéreas más pequeñas con un moco espeso característico. La inflamación y la infección producen daño a los pulmones y cambios estructurales que conducen a una variedad de síntomas. En las etapas iniciales, comúnmente se presenta tos incesante, producción de flema, y una disminución en la capacidad aeróbica. Estos síntomas y manifestaciones empeoran cuando ocurre la colonización bacteriana, que puede crecer en forma descontrolada y causar neumonía.

Además de infecciones por bacterias comunes, los pacientes FQ pueden desarrollar con gran facilidad otros tipos de infecciones respiratorias. Entre éstas se encuentra la aspergilosis (infecciones producidas por microorganismos del complejo *Mycobacterium avium*, grupo de actinobacterias emparentadas con *Mycobacterium tuberculosis*) que puede ocasionar daños mayores al pulmón, y que no responde a la terapéutica con antibióticos convencionales. Asociadas a las infecciones respiratorias, estos pacientes presentan también obstrucción en los senos paranasales debido a la acumulación de moco denso. La oclusión de los orificios nasales, hace que se acumulen las secreciones y éstas crean un ambiente propicio para la colonización de los patógenos antes mencionados. En estos casos, se pueden presentar dolor facial, fiebre, secreción nasal profusa y cefaleas. La inflamación por sinusitis crónica puede ocasionar en estos pacientes la formación de pólipos nasales que pueden agravar la obstrucción de las vías respiratorias superiores e intensificar las dificultades respiratorias (132).

Cuando la enfermedad se presenta de manera leve, no es detectada durante la infancia, y suele no ser fácilmente diagnosticada. En estos casos las manifestaciones clínicas

difieren considerablemente, presentando una alteración de la función pulmonar leve a moderada o incluso normal. Se reportó que en estos casos sólo un 15% de los pacientes sufren insuficiencia pulmonar (6)(16). Además, aunque la mayoría de estos pacientes presentan bronquiectasias difusas, la colonización bronquial crónica por *Pseudomonas aeruginosa* es menos frecuente, predominando otros gérmenes como el *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, complejo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomona maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans*. A veces se diagnostica la enfermedad por los rasgos fenotípicos clínicos asociados con dos mutaciones del gen CFTR o por presentar pancreatitis recurrente o en el curso de un estudio por infertilidad al detectarse una azoospermia con ausencia bilateral de conductos deferentes (48).

Tabla 2. Manifestaciones Clínicas de la Fibrosis Quística

Enfermedad Respiratoria Crónica

Tos crónica
 Colonización de las vías aérea por patógenos (Ej. *S. aureus*, *P. aeruginosa*)
 Obstrucción de las vías aéreas
 Anormalidades persistentes en el tórax
 Pansinusitis
 Pólipos nasales

Enfermedad Gastrointestinal

Ileo meconial, síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso rectal
 Insuficiencia pancreática, pancreatitis
 Cirrosis biliar
 Edema con hipoproteinemia, deficiencia en vitaminas liposolubles
 Síndrome de Pseudo-Bartter (pérdida de sal con alcalosis metabólica)

Afección endócrina y de crecimiento

Diabetes
 La mala absorción de vitamina D produce baja disponibilidad de Ca y P lo cual conduce a la osteoporosis.
 Dedos en palillos de tambor producidos por hipoxia en los huesos
 Infertilidad dada la azoospermia obstructiva

El sello distintivo de la enfermedad es sin duda el retardo en el crecimiento del niño. Los pacientes con FQ no logran, por lo general, ganar peso y altura. Las determinantes del retardo en el crecimiento son multifactoriales e incluyen, la infección pulmonar crónica, la mala absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal, y el aumento de la demanda metabólica asociado a la afección crónica. Por ello en la actualidad los pilares básicos de los

tratamientos de los pacientes fibroquísticos se basan en la antibiótico terapia, la fisioterapia y el control en la nutrición.

1.4. Métodos de diagnóstico de la Fibrosis quística

1.4.1. Test del sudor

El diagnóstico temprano de la FQ, junto con un plan de tratamiento integral puede mejorar tanto la longevidad como la calidad de vida del paciente. Por este motivo es esencial contar con metodologías que permitan el diagnóstico certero de la enfermedad. En este sentido el test del sudor continúa siendo una excelente herramienta diagnóstica pero siempre debe realizarse por un método validado. La prueba mide la concentración de cloruro en el sudor. Concentraciones >60 mmol/L confirman el diagnóstico. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados siempre por expertos, en el contexto de cada paciente. Así, niños menores de 3 meses de edad con FQ pueden presentar cifras entre 40 y 60 mmol/L de cloruros, pero para algunos adultos se han descrito estos mismos valores e incluso < 40 mmol/L. Por lo tanto para confirmar el diagnóstico por este método se recomiendan dos determinaciones positivas (116).

1.4.2. Diagnóstico neonatal

El diagnóstico neonatal de la enfermedad supone una excelente oportunidad para mejorar los cuidados y las consecuencias de la enfermedad, permitiendo intervenir para modificar su curso natural e implementar un tratamiento, previo a que se produzcan daños irreversibles en el individuo. En Argentina y otros países, se realiza un chequeo neonatal de FQ. Este análisis se efectúa en las primeras semanas de vida del recién nacido y se basa en la evaluación de tripsinógeno inmunoreactivo (TIR) en sangre (35)(133). Altas concentraciones de TIR sugieren injuria pancreática, consistente, aunque no específica con FQ. Este marcador se encuentra aumentado aún en neonatos con mutaciones del gen *CFTR* de clase IV y V asociados con insuficiencia pancreática. Los recién nacidos que exhiben una alta concentración de TIR en el examen inicial deben someterse a una nueva determinación pasadas 1 a 3 semanas del primer examen (TIR/TIR), o al análisis de la muestra inicial para determinar una mutación del gen de *CFTR* específica (TIR/DNA) (32)(161). La ventaja del análisis TIR/TIR es que evita los problemas asociados con la detección de mutaciones de clínica desconocida.

1.4.3. Diagnóstico genético

Para el diagnóstico genético se requiere la demostración de la existencia de dos mutaciones responsables de la alteración de la proteína CFTR. Se debe tener en cuenta que el estudio completo del gen sólo se realiza en unos pocos laboratorios especializados (21).

1.5. Estrategias terapéuticas en el tratamiento de pacientes fibroquísticos

El mayor conocimiento de los orígenes genéticos de la FQ ha llevado al desarrollo de acciones terapéuticas que apunten a la restauración de la función genética (134). En ese sentido, hace más de 15 años que diferentes grupos de investigación en el mundo se encuentran trabajando en la aplicación de terapia génica para combatir la fibrosis quística. Esta estrategia permitiría restaurar la función del gen *CFTR* lo cual llevaría a la resolución integral del problema (158). Algunos grupos de investigación en Reino Unido, intentaron terapias génicas del CFTR utilizando recubrimientos lipídicos no virales para introducir el gen dentro de las células que recubren la nariz y las vías respiratorias superiores (65). Si bien quedó demostrada su inocuidad, la capacidad de las células para corregir el defecto de la fibrosis quística transportando sal y agua hacia la superficie de las vías respiratorias, mejoró poco y fue ineficaz y breve. Por su parte en EE. UU. se ensayaron virus recombinantes como vectores para la transferencia del *CFTR* a las células pulmonares (56).

Ensayos *in vitro* y en algunos casos *in vivo* mostraron avances en el caso de las mutaciones de clase I, donde la proteína CFTR está ausente, gentamicina y análogos pueden anular las mutaciones de *stop* (parada) que interrumpen la síntesis de la cadena polipeptídica (26). Los defectos del tipo de clase II podrían ser resueltos mediante el uso de agregados tales como 4-fenilbutirato, que aumentan la maduración de la proteína CFTR (144) o el glicerol, que permiten el tráfico de la proteína mal plegada a la superficie apical de la célula (15). Varios agentes como inhibidores de la fosfodiesterasa y la genisteína flavonoide, que tienen propiedad antioxidante beneficiosa, podrían mejorar la función de las proteínas, mutantes clase III-V. Agentes destinados a corregir la secreción de iones cloruro o la hiperabsorción de sodio y agua para rehidratar la superficie de la vía aérea podrían ser de gran beneficio previniendo la formación de tapones mucosos, reduciendo así el tiempo de contacto entre las bacterias y los epitelio y la mejora de la defensa del hospedador (12). Otros métodos que han sido probados incluyen: los canales de iones existentes inhibiendo o estimulándolos mediante drogas (por ejemplo, amilorida, benzamil, trifosfato de adenosina y uridina) (10), el uso de agentes osmóticos (por ejemplo, manitol, solución salina

hipertónica) (160) y la inserción de canales de aniones sintéticos en la membrana celular (squalamime) (84).

El enfoque terapéutico utilizado en general, consiste en combatir las manifestaciones secundarias de la enfermedad (infecciones bacterianas, reducción de secreciones viscosas, mala nutrición, etc). La viscosidad de las secreciones mucosas en los pulmones depende principalmente de las concentraciones de mucoproteína, la presencia de enlaces disulfuro entre estas macromoléculas y el ADN. La N-acetilcisteína y DNasa actúan en contra de estos factores para disolver el moco espeso y se utilizan para ayudar a aliviar los problemas respiratorios (74). La aplicación de fisioterapia respiratoria ha demostrado ser beneficiosa para la función pulmonar y mejora el drenaje bronquial (59). Aunque el espectro de antibióticos con actividad contra las bacterias que se encuentran comúnmente en el pulmón del paciente FQ ha aumentado de manera remarcable, la infección crónica y persistente siguen siendo sumamente problemáticas. El tratamiento con antibióticos para eliminar un patógeno en particular tendrá un éxito limitado si otros miembros de la microflora del pulmón del paciente pueden colonizar estos nichos, o si la eliminación de un patógeno blanco crea nuevas oportunidades para otros patógenos para evadir y ampliar la infección (70). Por otra parte, el tratamiento con antibióticos también crea una presión selectiva para la resistencia. Por lo tanto, nuevos enfoques y estrategias necesitan ser explorados, como la prevención de la adherencia (por ejemplo, los bloqueadores de los receptores, antibióticos macrólidos, heparina y dextrano) y la vacunación contra algunos patógenos que se encuentran comúnmente entre los colonizadores (5).

Se reportó que el sistema de señales de quorum sensing en los organismos Gram-negativos regula importantes eventos temporales durante el proceso infeccioso, incluyendo la producción de factores de virulencia y la formación de *biofilm* (biopelículas). Por lo tanto intentar bloquear estos sistemas podría llevar a la identificación de nuevas estrategias terapéuticas destinadas a impedir el desarrollo del proceso infeccioso (20). Algunos autores han sugerido que una mejor comprensión de la ecología microbiana, facilitará el desarrollo de terapias más prometedoras. El descubrimiento que una flora intestinal saludable protege contra patógenos respiratorios puede resultar valioso en el futuro (70).

La inflamación que ocurre en las vías respiratorias de pacientes con FQ en respuesta a la disfunción de CFTR y las infecciones bacterianas se sabe que son los factores claves en la lesión pulmonar y bronquiectasias posterior, que es el sello distintivo de la enfermedad terminal (135). Por lo tanto, estrategias anti-inflamatorias son actualmente exploradas. Los biomarcadores inflamatorios se pueden utilizar para controlar la progresión de la

enfermedad o para evaluar la respuesta a un tratamiento y pueden jugar un papel fundamental en el desarrollo de nuevos fármacos (147).

Tal como se mencionó anteriormente, en el tratamiento de los pacientes FQ es imprescindible disponer de un amplio programa de procedimientos intensivos en el que participen médicos, personal de enfermería, expertos en nutrición, fisioterapeutas, especialistas en fisioterapia respiratoria y asistentes sociales. Los objetivos de un tratamiento integral consisten en mantener un estado adecuado de nutrición, la prevención o el tratamiento agresivo de las complicaciones pulmonares y de otro tipo y la provisión de un apoyo psicosocial suficiente. Con una asistencia adecuada, la mayoría de los pacientes pueden adaptarse bien a la vida social y escolar propia de su edad.

En el caso de los pacientes con fibrosis quística en fase terminal, el trasplante de pulmón es una alternativa comúnmente empleada (66). Pacientes FQ receptores de trasplante pulmonar tienen buenas perspectivas después del trasplante pulmonar y su calidad de vida se ha visto mejorada enormemente. Sin embargo, todavía son propensos a las complicaciones comunes de este tipo de intervención, como la disfunción primaria del injerto, rechazo agudo y crónico, gran variedad de infecciones y neoplasias malignas, y la insuficiencia renal (45).

2. Patógenos respiratorios

2.1. Inflamación e infecciones del tracto respiratorio en pacientes fibroquísticos

En los pacientes FQ, la enfermedad a nivel pulmonar se caracteriza por un círculo vicioso de inflamación e infección, lo cual resulta en la principal causa de morbilidad y mortalidad. Las personas FQ experimentan a diario diversos síntomas respiratorios cuya intensidad es variable. Entre estos síntomas se pueden citar el aumento de tos y producción de esputo, cambio en la apariencia del esputo, aumento de dificultad para respirar, disminución de la tolerancia al ejercicio, disminución en el bienestar general, a los que debe sumarse debilidad, fiebre y falta de apetito (59).

Los pulmones de los niños con FQ son normales en apariencia al nacer, pero rápidamente se inflaman e infectan. Estos individuos sufren un deterioro progresivo causado por la persistencia de la tríada inflamación, infección y obstrucción, que conduce a la insuficiencia respiratoria y muerte (52). Se ha sugerido que la inflamación es previa a la infección posiblemente relacionada a fallas en CFTR (92)(44). Los individuos FQ, aun encontrándose sanos, exhiben un incremento en la síntesis de diversos mediadores de inflamación, principalmente interleuquina 1 (IL-1), IL-8 y el factor de necrosis tumoral α (TNF-

α) (24). En paralelo, la disminución de los niveles de IL-10 con actividad antiinflamatoria, no logra limitar la inflamación y genera la acumulación de neutrófilos (91), los cuales liberan elastasas y proteasas que lesionan el tejido pulmonar e interfieren con los mecanismos fagocíticos (102). Por estos motivos la inflamación es considerada uno de los principales factores del daño pulmonar.

Las vías respiratorias de estos pacientes se ven afectadas por una gran variedad de virus (virus sincitial respiratorio, adenovirus e influenza), hongos (especies de *Aspergillus* y *Candida*) y bacterias. El espectro de patógenos microbianos difiere considerablemente de la de otros pacientes con enfermedad pulmonar crónica (51). Las vías respiratorias de los pacientes fibroquísticos pueden ser colonizadas por bacterias patógenas desde la primera infancia (70) (62). La fundación “Cystic Fibrosis Foudation” (CFF) recopila resultados de cultivos microbianos obtenidos de pacientes FQ atendidos en los centros públicos acreditados, y los publica anualmente en el registro CFF Patient Registry. Esta base de datos muestra claramente que los primeros patógenos bacterianos que colonizan el tracto respiratorio de estos pacientes son *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 3). Los pacientes adultos pueden albergar además *Stenotrophomonas maltophilia*, organismos del complejo *Burkholderia cepacia* (cBc), *Achromobacter xylosoxidans*, especies de *Klebsiella*, *Ralstonia*, *Bordetella*, *Pandora* y *Burkholderia gladioli* (41) (62).

La infección crónica de las vías aéreas tiene una secuencia más o menos definida progresando desde una bronquiectasia a hipoxia e hipercapnia, las cuales son características de la enfermedad pulmonar. Generalmente, los infantes con FQ son tempranamente colonizados por *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, o ambos (141). No obstante la colonización por *Pseudomonas aeruginosa* generalmente ocurre en niños a partir de los 3 años de edad (18). La infección bacteriana persistente conduce a la generación y secreción de citoquinas quimioattractantes, las cuales reclutan un gran número de células polimorfonucleares. *P. aeruginosa* amplifica el ciclo de inflamación e infección por liberación de toxinas y elastasas que exacerban la injuria de cualquier célula en el área (72).

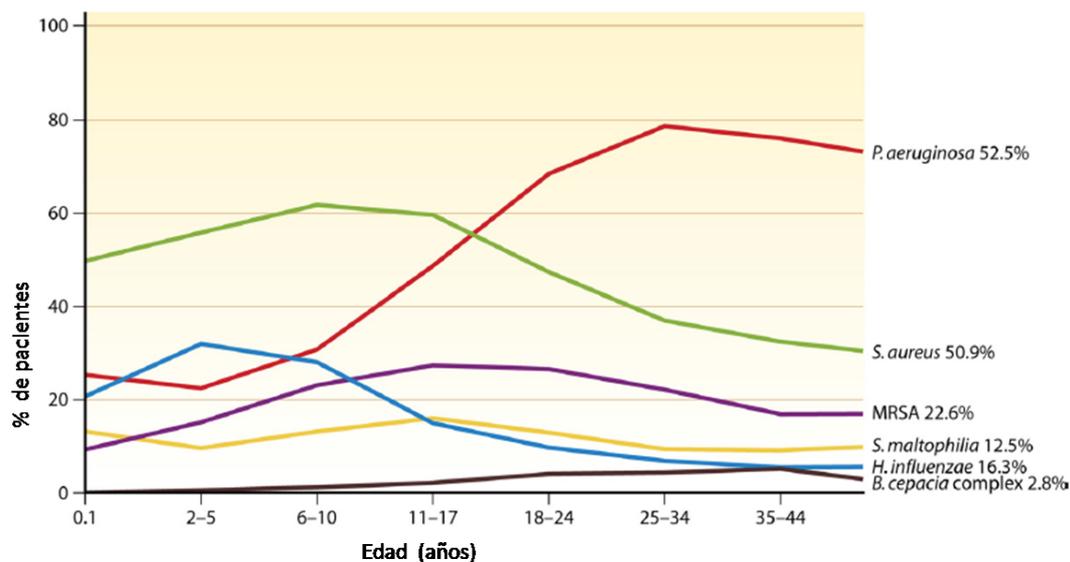


Figura 3. Prevalencia de los patógenos respiratorios comunes en pacientes FQ en función de su edad del paciente. Tomada de Hauser y colaboradores, 2011 (62). El autor adaptó los datos reportados en el Annual Data Report of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry (57). Los valores de % indicados a continuación de cada especie (columna derecha) corresponden a la prevalencia de cada una de ellas registrada en EE. UU en el año 2008).

Posteriormente, las exotoxinas y los productos de los neutrófilos dañados estimulan el reclutamiento de más polimorfonucleares, por tanto esto lleva a más inflamación, y un aumento en el daño tisular. La liberación de ADN de células polimorfonucleares senescentes conduce al incremento en la viscosidad del esputo (23). De este modo el pulmón entra en un ciclo vicioso de inflamación, injuria pulmonar e infección que llevará a la pérdida de la función pulmonar y por ende en estadios avanzados a la posibilidad de muerte del paciente. Las vías aéreas favorecen el crecimiento de microorganismos por varias razones: un microambiente adecuado dentro de nichos hipóxicos en placas de mucus adherente, este mucus favorece la adhesión de bacterias y disminuye la remoción bacteriana por mecanismos de la respuesta inmune innata (82)(114)(178).

Se ha reportado que inicialmente *P. aeruginosa* crece a nivel pulmonar como bacteria no mucoide, fenotipo que puede ser removido por el hospedador, o erradicado por un tratamiento antibiótico agresivo (78). Con el tiempo, las colonias de *P. aeruginosa* sintetizan una capa de alginato y forman biofilms (19), los cuales una vez establecidos son difíciles o imposibles de remover con el tratamiento antimicrobiano convencional. De acuerdo a los registros de pacientes de la fundación de fibrosis Quística (EE.UU), aproximadamente el 80% los pacientes mayores de 18 años se encuentran colonizados por este organismo (73). En este contexto, una práctica habitual es el monitoreo de la presencia de *P. aeruginosa*, con

aplicación de estrategias para erradicar la infección temprana mediante el uso de antibióticos inhalatorios con o sin quinolonas orales en investigación (135). La figura 4 muestra un esquema en el que se describe el ciclo por el cual la presencia de *P. aeruginosa* en las vías aéreas de pacientes FQ lleva a una progresiva injuria y daño pulmonar.

Como se mencionó, las vías aéreas del paciente FQ pueden ser infectadas por otros patógenos tales como organismos pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* (cBc), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA), *Ralstonia pickettii*, *Pandora spp.* *Acinetobacter spp.* y micobacterias atípicas. Muchas especies del complejo *B. cepacia* que tienen una resistencia a antibióticos innata, son transmisibles de persona-a-persona y son altamente virulentas. Asimismo, la infección por organismos del complejo *B. cepacia* puede causar la disminución de la función pulmonar, e incrementar la mortalidad de los pacientes (43). En ocasiones, la infección con organismos del complejo puede ser invasiva y desencadenar una bacteriemia fatal, comúnmente denominada “Síndrome cepacia” (83). *Burkholderia cenocepacia*, una de las especies del complejo es altamente transmisible y su infección está relacionada al rápido deterioro de la salud. Posiblemente esto es debido a la habilidad del microorganismo de ocasionar una respuesta inflamatoria más robusta de las células del hospedador comparado con otras especies del cBc (123). Otras especies del cBc también pueden causar deterioro agudo, por lo tanto resulta una necesidad contar con una estrategia que controle efectivamente la infección en los centros de atención de pacientes FQ (87). Otro patógeno relevante es MRSA con una frecuencia del 15-20 % entre pacientes FQ. Su presencia en vías aéreas está relacionada a una pobre función pulmonar (40). El aislamiento de *S. maltophilia* es cada vez más frecuente en pacientes FQ entre un 24 – 33% (73), aunque su presencia no ha sido relacionada con el rápido deterioro pulmonar (62). Otras bacterias que pueden ser encontradas en las vías aéreas de pacientes FQ son micobacterias atípicas cuyo rol en la verdadera infección no está claro (122). Asimismo un microorganismo causante de colonización sin infección invasiva es *Aspergillus fumigatus*. La intensa respuesta alérgica a este hongo se conoce como “Aspergilosis broncopulmonar”, la cual es observada en el 9-57% de los pacientes FQ según la región geográfica (157).

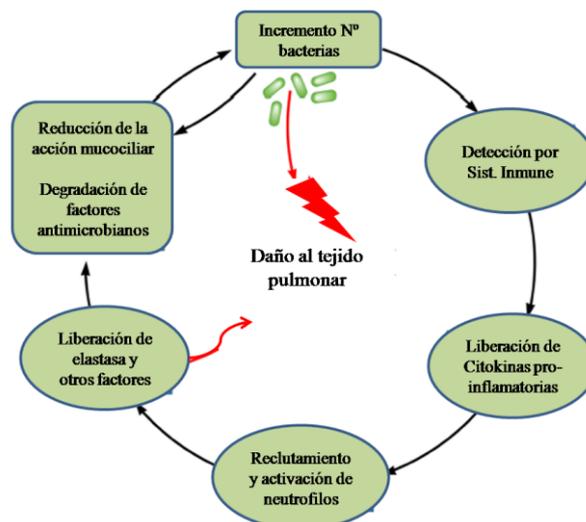


Figura 4. Esquema de la injuria y daño pulmonar producido por la infección con *P. aeruginosa*.

2.2 El complejo *Burkholderia cepacia*

2.2.1 Taxonomía

El complejo *B. cepacia* (cBc) incluye un grupo de bacilos aerobios Gram negativos no formadores de esporos, rectos o ligeramente curvos, de entre 1 a 5 μm de longitud (31). Dentro del complejo se incluyen al menos 17 especies que se distribuyen ampliamente en el entorno natural. Originalmente organismos pertenecientes al complejo fueron identificados como los agentes patógenos de la cebolla. En 1950, Walter H. Burkholder reconoce a estas bacterias como patógenos de plantas. Sin embargo, no fue hasta los años 1980, en que el cBc emergió como un grave problema para los pacientes FQ en diferentes partes del mundo (71). Las bacterias del cBc en general, participan en interacciones ecológicas beneficiosas con plantas, promoviendo el crecimiento de cultivos y evitando la colonización de ciertos hongos y otras bacterias. Estos organismos tienen gran diversidad genética y capacidad metabólica, que les permite degradar los contaminantes importantes como el tricloroetileno y ser utilizados como agentes de biorremediación (109)(104).

La taxonomía del cBc ha evolucionado dramáticamente en los últimos años (28). Las especies dentro del cBc han tenido múltiples nombres, incluyendo *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas multivorans* y *Pseudomonas kingii*. En 1992, siete especies fueron reasignadas desde el género *Pseudomonas* al nuevo género *Burkholderia* sobre la base de secuencias de 16S rRNA, homología de ADN-ADN, los valores de composición de lípidos celulares, ácidos grasos, y características fenotípicas. Un estudio minucioso realizado por Vandamme y sus colegas en 1997 discriminó las cepas del complejo *B. cepacia* en cinco genomovares (I-V) que representaban grupos de bacterias fenotípicamente similares pero que eran genéticamente

lo suficientemente distintas como para ser designadas como nuevas especies (165). Esto puso en marcha una nueva definición en el curso de la investigación sobre la taxonomía y epidemiología de estas especies. Hasta hace algunos años, el cBc estaba constituido por 9 especies formalmente descritas, pero el reconocimiento de *Burkholderia ubonensis* y la asignación de 5 nuevas especies al complejo en el año 2008 (169) incrementaron el número de especies a 15. Más aun, recientemente la descripción del un nuevo taxón K en 2009 (figura 5), que comprende a las nuevas especies *B. lata* y *B. contaminans* eleva hoy el número de especies del cBc a 17 (168), tal como se describe a continuación:

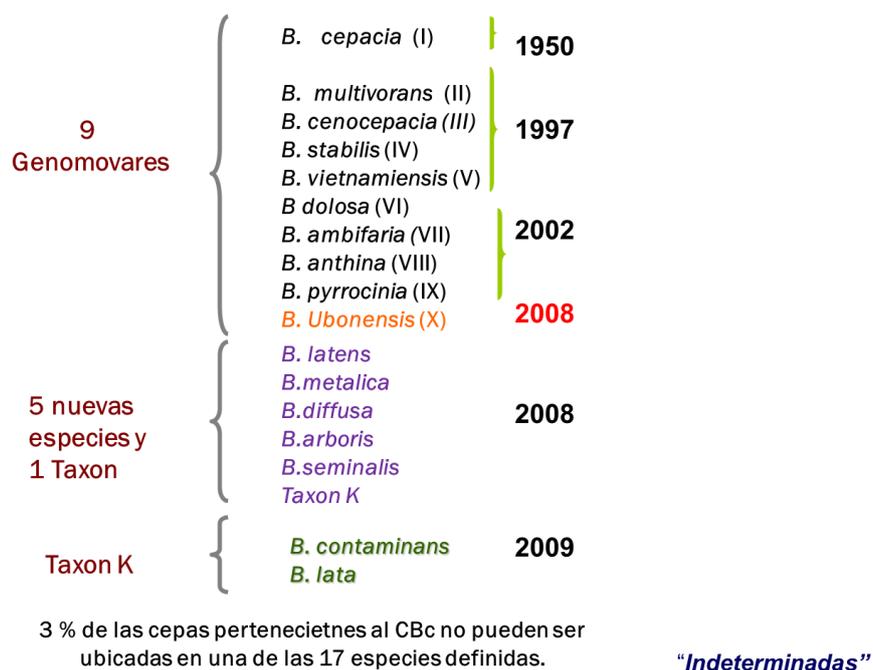


Figura 5. Evolución taxonómica del Complejo *Burkholderia cepacia*.

2.2.2. Identificación de bacterias pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*

2.2.2.1. Métodos fenotípicos clásicos

Las especies del cBc se encuentran entre las 120 especies de bacilos Gram-negativos no fermentadores (BGNNF) consideradas como patógenos oportunistas. La identificación de estos organismos en el laboratorio clínico se ha basado principalmente en características morfológicas y metabólicas que incluyen crecimiento a diferentes temperaturas, determinación de actividades enzimáticas, asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno, y perfil de susceptibilidad a antibióticos. En la actualidad se encuentran disponibles varios kits comerciales que evalúan simultáneamente diversas características metabólicas, las cuales pueden ser clasificadas de manera manual o de forma automatizada empleando sistemas

como el API 20 NE o el VITEX (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia)(75). La identificación final por medio de estos sistemas requiere de 6 a 48 h posteriores al aislamiento microbiano, dependiendo de la especie bacteriana, y de la utilización de determinado software de análisis. El requisito para aplicar estas metodologías es contar con un cultivo bacteriano puro. Los medios de cultivo empleados en la marcha de identificación o discriminación de estos aislados, en el caso de Gram-negativos son el medio EMB (Eosin methylene Blue), MacConkey y medio selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA). Si bien los sistemas de identificación comerciales mencionados han contribuido al manejo y tratamiento de pacientes FQ, las pruebas fenotípicas presentan varias limitaciones tales como: (i) dentro de una misma especie no todos los aislados exhiben una determinada característica, (ii) la reproducibilidad del método no es alta, además debemos considerar problemas debido a variaciones fenotípicas y al lento crecimiento causado por la presión que ejercen los antimicrobianos sobre estos organismos recuperados de pulmones de estos pacientes (120).

2.2.2.2. Métodos genéticos

Los métodos genéticos son los más precisos y fiables para confirmar la identificación fenotípica presuntiva de bacterias. La comparación filogenética de la secuencia completa del gen 16S ARNr de una bacteria contra un banco de datos permite distinguir la mayoría de las especies conocidas oficialmente (31). Además, las sondas de hibridación fluorescentes *in situ* basadas en el gen 16S rRNA han demostrado ser prometedores para la identificación microscópica directa de frotis de esputo de bacterias del cBc (14). Sin embargo, la secuenciación parcial del gen rRNA 16S o el estudio mediante RFLP (fragmentos de restricción polimorfismo de longitud-(RFLP) de este gen no son lo suficientemente discriminatorios para resolver todas las especies, debido a que el gen es idéntico en un > 98% en todos los miembros de cBc.

Polimorfismos de la secuencia del gen que codifica la proteína, *recA*, han demostrado ser discriminatorios a nivel de especie, habiéndose diseñado cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específicos a cada especie bacteriana dentro del cBc contribuir a la designación formal de varias especies (Tabla 1) (108). La amplificación de un producto de 1040-pb del gen *recA* usando los cebadores BCR1 y BCR2 permite asignar con una certeza de casi el 100% si un aislado es un miembro del cBc. Sin embargo *recA*-RFLP o la PCR del gen *recA* basada en cebadores especie específica, no son exactos para todas las especies actualmente descritas dentro del complejo (108)(126). Otros genes, como el gen *opcL* que codifica peptidoglicano asociado a las lipoproteínas de la membrana externa de las bacterias

del cBc (128), o el gen *fur* que codifica para proteínas involucradas en la captación de hierro (103), y/o el gen *fliC* que codifica para la subunidad que constituye el pili (177), entre otros también han sido empleadas para la identificación de las distintas especies. La aparición de nuevas especies ha constituido y constituye un gran desafío para los laboratorios encargados de identificar y discriminar estos organismos.

La identificación, si es posible, debe ser siempre confirmada por pruebas adicionales de la siguiente manera: el análisis filogenético de la secuencia del gen *recA* es discriminatorio (108) (126) y permite identificar un aislamiento dentro de un grupo del cBc. Sin embargo, este método basado en la secuencia de un solo gen ha sido superado posteriormente por la técnica del *Multi Locus Sequence Type* (MLST). Este esquema de identificación, reportado en el año 2005, surgió de un trabajo realizado por un Consorcio Europeo constituido por Adam Baldwin, de la Universidad de Warwick, Reino Unido, trabajando en estrecha colaboración con Eshward Mahenthiralingam (Universidad de Cardiff, Reino Unido) y otros colaboradores de diferentes hospitales del Reino Unido. Este grupo creó un sitio Web (<http://pubmlst.org/bcc/>) que contiene dos bases de datos enlazadas, una que almacena los perfiles alélicos y secuencias de genes y la otra la información relacionada con aislados clínicos. El sistema desarrollado es altamente validado y transferible. El esquema de MLST proporciona una herramienta que describe variantes alélicas en los genes conservados con el objetivo de identificar y tipificar a miembros de poblaciones de bacterias a nivel de especie y cepa. El esquema de MLST para cBc examina polimorfismos de nucleótidos en fragmentos de 7 genes de expresión constitutiva que se encuentran dispersos en los cromosomas primero y segundo, y utiliza los perfiles alélicos combinados resultantes para asignar un tipo de **secuencia clonal (ST)** para cada cepa única. MLST es el único sistema capaz de proporcionar la inequívoca identificación de las especies del cBc en un solo enfoque (4). Hasta la fecha no se han encontrado casos en los que MLST no haya proporcionado una identificación experimental útil para aislados del cBc. *B. cepacia* al igual que otros organismos puede recombinarse en un alto porcentaje, sin embargo los estudios de mutación y las tasas de recombinación en los genes utilizados en el MLST ocurren a tasas muy bajas que no afectan por lo tanto la eficacia de la técnica (173). Esta metodología es de aplicación común en países desarrollados. En Argentina si bien aún no se ha implementado esta metodología, en algunos servicios hospitalarios nacionales ya se dispone de secuenciadores de ADN (Hospital Gutierrez y Hospital Garrahan), lo cual indicaría que seguramente a corto plazo esta metodología estaría siendo implementada.

En relación a la identificación y discriminación de organismos del cBc a nivel de cepa se han desarrollado a lo largo de los últimos años diferentes métodos de tipificación

molecular y fenotípica. Adicionalmente al método de MLST mencionado anteriormente, otros métodos moleculares de diferenciación a nivel de cepas son: la tipificación multilocus restricción (MLRT) (29), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (1)(9), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (22)(105) y BOX-PCR *fingerprinting* (9)(30). La técnica de elección entre ellas dependerá de los organismos objeto de estudio y las cuestiones epidemiológicas a analizar. La utilidad de todas estas tecnologías es limitada cuando se tiene como objetivo analizar un amplio conjunto de aislamientos o responder preguntas relativas a la epidemiología a largo plazo (53). Los principales inconvenientes de estas técnicas es que sus resultados son difíciles de transferir entre laboratorios, requieren de equipamiento específico y, por estar basados en geles, no están exentas de variabilidad y ambigüedad (110). A pesar de que PFGE se ha aplicado históricamente a nivel mundial en la vigilancia epidemiológica de patógenos recuperados de pacientes FQ por centros nacionales de referencia, los datos generados por estos centros no son en general de fácil disponibilidad para su aplicación en investigaciones epidemiológicas globales. En comparación, si un laboratorio en cualquier lugar del mundo genera la secuencia del ADN de un aislamiento para solo uno de los genes del sistema MLST (por ejemplo la secuencia del gen *recA*), ésta podrá ser contrastada contra las secuencias que se encuentran depositadas en la base de datos pública (<http://pubmlst.org/bcc/>) y podrá obtenerse para el microorganismo en estudio el tipo de cepa (ST) y su identificación a nivel de especie (88). La mayor facilidad que existe en la actualidad a nivel mundial para generar secuencias de ADN y el fácil acceso a la base de secuencias pública, hacen que el MLST tenga un importante papel en la vigilancia epidemiológica (4)(88)(166).

En contraste con la tipificación por MLST, una herramienta específica diseñada para la epidemiología molecular y la asignación de cepas dentro de las especies mencionadas, en donde las similitudes y diferencias se miden usualmente como diferencias en los perfiles alélicos, la técnica de *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) emplea procedimientos filogenéticos basados en las secuencias de nucleótidos de alelos con el fin de revelar las similitudes entre las cepas que representan a diferentes especies y géneros. Muchos ejemplos de tales estudios se han publicado recientemente y, en general, los agrupamientos delineados se correlacionan bien con especies demarcadas mediante experimentos de hibridación ADN-ADN (168)(61). Este enfoque tiene una resolución superior al análisis tradicional de la secuencia del gen del rRNA 16S, especialmente para representar las relaciones dentro y entre especies estrechamente relacionadas. Los árboles filogenéticos se deducen no sólo para servir de eje filogenético, sino también para poner de manifiesto las

relaciones intra-especies a un nivel en donde el análisis comparativo de la secuencia en el rRNA 16S ya no es discriminatoria (166).

2.2.2.3. Estudios del genoma completo

Existe a nivel mundial un creciente interés para estudiar relaciones evolutivas entre especies bacterianas a través del análisis de la variación de secuencias a nivel de genoma completo, dentro y entre especies (166). La disminución de costos en la secuenciación de genes y el aumento de la velocidad con que se obtienen los resultados de la secuenciación de todo un genoma han llevado a que se proponga la secuenciación del genoma completo como una metodología estándar para la tipificación bacteriana (93).

A fin de establecer la distancia evolutiva entre diferentes organismos se han propuesto a lo largo de los últimos años diferentes enfoques que permiten establecer la similitud-disimilitud entre sus genomas completos:

1. El porcentaje de ADN conservado (pcDNA), método introducido por Goris y colegas (61) y el índice-MUM de Deloger y colegas (46) pueden considerarse como alternativa en imitaciones *in silico* de hibridación DNA-DNA. Las mediciones de similitud se basan en encontrar subsecuencias conservadas en los genomas bajo comparación. Estas metodologías trabajan directamente en genomas ensamblados y no requieren la anotación de secuencias que codifican a proteínas. Sin embargo, ambos métodos requieren secuencias del genoma completo o casi completo, ya que son altamente sensibles a los tramos de secuencias faltantes en los genomas bajo anotación. Si bien estos métodos no resuelven completamente relaciones evolutivas entre las especies de *Burkholderia* más alejadas, siguen siendo aplicables para inferir la filogenia de las especies de *Burkholderia* más estrechamente relacionadas, tales como los miembros del complejo *B. cepacia* (166).
2. El método de Identidad Promedio de Nucleótidos (*average nucleotide identity ANI*) y el método de Identidad de Núcleo de Gen (*core gene identity CGI*), son extensiones naturales de MLSA en caso secuencia completa del genoma. Considerando que el MLSA calcula los valores de similitud como el promedio de similitud entre un conjunto limitado de genes que codifican proteínas ortólogas compartidas entre todos los organismos estudiados, así ANI y CGI maximizar el contenido de la información mediante la adopción de todos los genes que codifican las proteínas ortólogas en los genomas en consideración (166).
3. *Pan-PCR*, es un método computacional para el diseño de primers para tipificación bacteriana, basados en datos de la secuencia de todo el genoma. Esta estrategia toma las secuencias del genoma de un conjunto de cepas de interés como dato de entrada y devuelve

los primers para un ensayo de PCR múltiple capaz de distinguir cepas de interés. Durante la evolución de muchas especies de bacterias se produce una variación en el contenido de genes lo cual proporciona la oportunidad para distinguir diferentes cepas mediante la búsqueda que detecta la presencia o ausencia de regiones variables. Una limitación de este enfoque es que se puede determinar sólo si un determinado aislamiento es un miembro del grupo al que pertenece una cepa particular y no puede discernir las relaciones entre múltiples cepas (180)

4. *Mapeo óptico*. Originalmente desarrollado por Schwartz y colaboradores (1993), este método ha sido parte integral del proceso de montaje en muchos proyectos de secuenciación. El Mapeo óptico es una técnica para la construcción ordenada en todo el genoma, de mapas de restricción de alta resolución desde moléculas individuales de ADN marcado. Mediante la cartografía de la ubicación de los sitios de enzimas de restricción a lo largo del ADN de un organismo desconocido, el espectro de fragmentos de ADN resultantes colectivamente sirven como una única "huella digital" o "código de barras" para esa secuencia, lo cual lo convierte en una poderosa técnica de tipificación (151).

2.2.2.4. Métodos basados en el análisis de células enteras

En busca de otras estrategias tendientes a resolver el problema de la identificación de organismos del cBc han surgido diferentes tecnologías basadas en el análisis de bacterias enteras (166). Una de ellas, la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), se basa en el análisis del fenotipo de los microorganismos a través de sus espectros FT-IR. Esta metodología permite la discriminación de los organismos del cBc a nivel de género, especie y cepa (11). Los espectros IR obtenidos de bacterias en condiciones estandarizadas son altamente específicos y reproducibles por lo que permiten distinguir microorganismos a diferentes niveles taxonómicos (fenotipo, especie, sub-especie, patogenicidad, virulencia, etc) (111)(119). Esta metodología representa una forma analítica, no destructiva y sencilla de analizar una población de células con una cantidad pequeña de biomasa (111)(119). Desde el año 2004, en los laboratorios del CINDEFI se han venido desarrollando investigaciones sobre el empleo de esta metodología en la identificación de bacilos Gram-negativos multi-resistentes a nivel de género, especie y en particular la discriminación de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* de mayor prevalencia en nuestro país (11).

Otra estrategia de identificación de organismos del cBc, desarrollada por el CINDEFI en cooperación con el Instituto Robert Koch de Berlín está basada en la aplicación de espectrometría de masa MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of fly)

de células enteras. Este método permite la discriminación de organismos del cBc a nivel de especie (169). De adquirirse un espectrómetro MALDI-TOF para el diagnóstico rápido de microorganismos en los hospitales nacionales, ésta técnica sería sin dudas la de elección para la discriminación e identificación de organismos del cBc a nivel de especie (144) (169).

2.2.3. Factores de virulencia de organismos del complejo *B. cepacia*

Se han descritos para las bacterias del cBc una amplia variedad de factores de virulencia, aunque no todos han demostrado tener un rol en la patogénesis de las enfermedades humanas o estar presentes en todas las especies (Figura 6). Los más representativos son:

1. Lipopolisacáridos (LPS). Los LPS, de las bacterias que componen el cBc están constituidos en general por un lípido A que constituye el núcleo, oligosacáridos y un antígeno O. A diferencia de lo observado en otros Gram-negativos, el núcleo oligosacárido del LPS de estas bacterias no contiene fosfato o 3-deoxy-D-manno-oct-2-ácido octulosónico (KDo). Asimismo, en la columna vertebral del lípido A se ha descrito la presencia de restos de 4-amino-4-deoxyarabinosa unidos a restos de fosfato que poseen implicancias en la resistencia a antibióticos del tipo de péptidos catiónicos y polimixina (34)(154). Como es típico en otros organismos Gram-negativos, el antígeno-O del LPS de las bacterias del cBc constituye un componente inmunogénico importante presente de la superficie de la célula bacteriana, y representa la base de una serotipificación bacteriana (172).

2. Expresión de señales de *quorum sensing* (QS). En el caso de organismos Gram-negativos, se ha descrito un sistema de señales de comunicación bacteriana denominado quórum sensing, el cual es mediado por la presencia de ciertas moléculas derivadas de la estructura de las acil-homoserin-lactonas (AHLs). Estas moléculas son liberadas por las bacterias al entorno celular. Por encima de cierta concentración umbral, estas moléculas contribuyen a modular la expresión génica en células vecinas. Estas sustancias, libremente difusibles, son sintetizadas por un sintasa conocida como CepI, y posteriormente son detectadas por un regulador transcripcional, CepR, que regula la expresión de diferentes genes blanco (tales sistemas se denominan tipo CepIR). La regulación por AHLs es dependiente de la densidad celular, y sólo se produce cuando las poblaciones de bacterias superan un umbral crítico, por lo que la detección de señales de QS proporciona un mecanismo por el cual las bacterias pueden rápidamente adaptarse a un determinado ambiente (94). Diferentes fenotipos asociados a virulencia están regulados por la comunicación célula-célula. Entre ellos se puede mencionar la secreción de toxinas, proteasas, lipasas, la producción de sideróforos, movilidad

swarming y formación de biofilm (170). *B. cenocepacia* fue la primera especie del cBc en la cual se identificaron genes asociados al sistema de QS. Se ha reportado la expresión de N-octanoyl homoserin lactona and N-hexanoyl homoserin lactona. Posteriormente, si bien han sido descritos sistemas homólogos para las principales especies del cBc, no se ha reportado aún su presencia en *B. contaminans*. Se reportó que un sistema CepIR de quórum sensing funcional contribuye a la severidad de la infecciones por *B. cepacia*. Dada la significativa implicancia que posee la expresión de señales de QS en la infección y colonización microbiana uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral fue detectar la expresión de dichas señales en esta especie, que constituye la de mayor prevalencia en nuestro país.

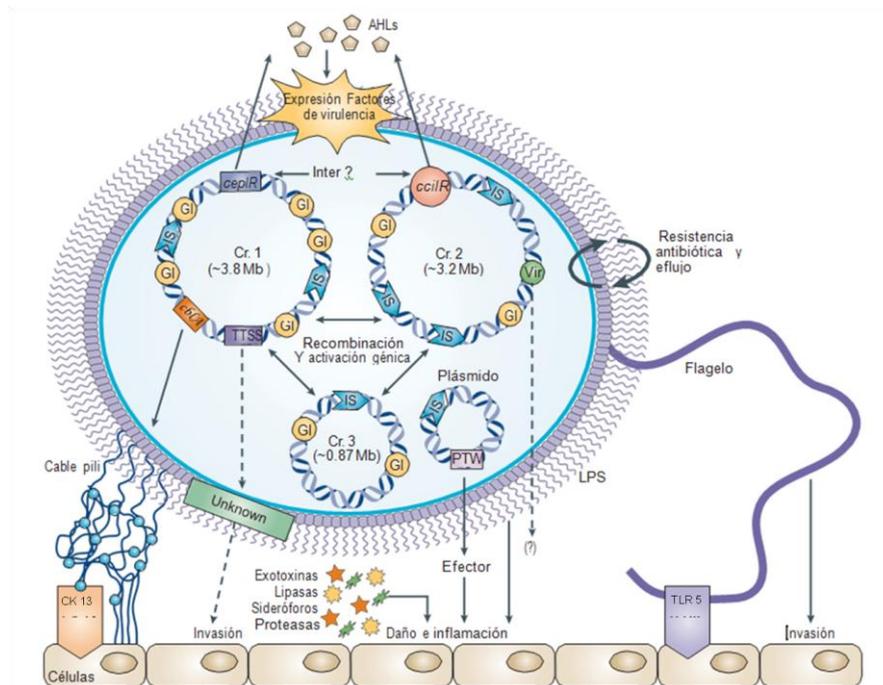


Figura 6. Estructura genómica y factores de virulencia expresados por *B. cenocepacia*. Tomado de Baldwin y colaboradores 2005 (4).

3. Cable pili y adhesinas de 22 kDa. Las infecciones en pacientes FQ pueden ser muy variables en su presentación clínica. Aproximadamente el 20% de pacientes infectados con organismos del cBc desarrollan el síndrome cepacia, caracterizado por neumonía y bacteriemia necrotizante. La adhesión de bacterias a las células epiteliales se considera que es uno de los primeros pasos en el proceso de infección. Varios estudios han demostrado que la presencia del cable pili (136) y la adhesina asociada de 22 kDa mejoran la capacidad de las cepas del complejo para unirse e invadir cultivos de células epiteliales a través del receptor la citoqueratina 13, que se expresa abundantemente en las vías respiratorias de los epitelios de estos pacientes (60) (148)(150). Para determinar la contribución específica del cable pili y la adhesina en la adherencia y la patogénesis, se han construido y estudiado diferentes

mutantes isogénicas. Específicamente, los genes que codifican la mayor subunidad de la pilina (*cblA*) y la adhesina de 22 kDa (*adha*) han sido bloqueados en ciertas mutantes. Los resultados de ensayos in vitro, utilizando células epiteliales diferenciadas en cultivos de células escamosas, indican que todos los mutantes muestran una disminución significativa en la adhesión/invasión. Esta diferencia fue más pronunciada en el Adha-mutante. Los resultados hasta ahora indican que, aunque el cable pili no es necesario para la expresión y función de la adhesina de 22 kDa, su presencia mejora la adhesión de la proteína de 22 kDa a la citoqueratina 13. Los aislamientos del cBc que no expresan pili, o poseen bajo nivel de expresión no producen la adhesina de 22-kDa en cantidad suficiente. Se ha reportado que en estos casos, los microorganismos no son capaces de unirse a las células del hospedador y poseen una baja capacidad invasiva (149).

4. Flagelos. Los miembros del cBc expresan dos tipos de flagelina que se distinguen por el tamaño de la subunidad que las conforma (55 kDa de tipo I y 45 kDa para el tipo II) (67). Se ha reportado para la cepa *B. cenocepacia* J2315 que la presencia de flagelos es esencial para invadir células de la línea A549 (162). La flagelina bacteriana presente en *B. cenocepacia* es reconocida por receptores celulares como *Toll-like* 5 (TLR5) (Figura 2). Su unión a estos receptores inicia una cascada de señalización, lo que resulta en la activación de NF- κ B y secreción de IL-8 (164).

5. Resistencia a antibióticos. Otra característica de las bacterias que integran el cBc y que algunos trabajos consideran un factor de virulencia es la resistencia innata de estos organismos a los antibióticos. Las bacterias del cBc son mayoritariamente resistentes a los aminoglucósidos y muestran múltiples mecanismos de resistencia a otras clases de antibióticos. Algunas cepas expresan β -lactamasas inducibles (17). Además, la disminución de la permeabilidad de la membrana externa y la estructura específica de LPS resulta clave en la resistencia a otras clases de antibióticos, incluyendo beta-lactámicos, así como péptidos catiónicos (171). La resistencia a antibióticos β -lactámicos es usualmente mediada por la presencia de beta-lactamasas inducibles de clase A, cuyos genes están localizados en el cromosoma bacteriano. Para el caso del complejo *B. cepacia* estas lactamasas tipo Pen son específicas de cada especie, lo que puede constituir una herramienta útil para la identificación a nivel de especie. Las enzimas tipo Pen hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y aztreonam (129). Las alteraciones en la permeabilidad de membrana externa pueden contribuir a la resistencia a los beta-lactámicos.

En general, los tratamientos con antibióticos se implementan a partir de los resultados obtenidos in vitro, los cuales son finalmente evaluados por la respuesta clínica. En las infecciones graves la monoterapia trae aparejada la emergencia de resistencia, por lo que

se ha sugerido la utilización de al menos dos agentes antimicrobianos. A pesar de la sensibilidad in vitro observada frente a algunos antimicrobianos, la erradicación de la colonización pulmonar en pacientes con fibrosis quística resulta dificultosa debido a varios factores, entre ellos la formación de biofilm (39), la disponibilidad de oxígeno, la alteración de la farmacocinética del antimicrobiano, la falta de droga libre en el pulmón bronquiectásico, la penetración insuficiente en la mucosa bronquial anormal y viscosa (49).

6. Biofilms. Los *biofilms* son comunidades de bacterias que crecen inmersas en una matriz que ellas mismas producen, protegidas de muchos factores ambientales. Aislamientos del cBc se han mostrado aptos para formar *biofilms* in vitro, y este proceso está asociado con la capacidad de producir acil-homoserina lactonas (AHLs) (33). Los biofilm proporcionan una barrera mecánica a la difusión de metabolitos y por ello bacterias crecidas en esta condición muestran una mayor resistencia a antibióticos que sus contrapartes células planctónicas (47). Especies del cBc han mostrado también capacidad para formar biofilm mixtos con *P. aeruginosa*, que a menudo es un co-colonizador del pulmón de pacientes FQ, ya que son sensibles para detectar señales de quórum sensing que son normalmente secretadas por *P. aeruginosa* (163)(79).

2.2.4. Distribución de las especies del cBc en la naturaleza

Las especies del complejo *Burkholderia cepacia*, al igual que otros patógenos oportunistas tales como *P. aeruginosa*, normalmente no infectan a personas sanas, sólo aquellas inmunocomprometidas o que presenten nichos adecuados para su desarrollo. Los pacientes con FQ son especialmente susceptibles a infecciones pulmonares con este tipo de bacterias que también colonizan pacientes hospitalizados con alguna enfermedad subyacente debilitante como HIV, cáncer, etc. (127). Asimismo han sido reportadas infecciones graves por organismos del cBc adquiridos en la comunidad, tales como endocarditis, abscesos cerebrales (76) y neumonía (174). Otro grupo de riesgo frente a las infecciones por organismos del cBc lo constituyen los pacientes que sufren granulomatosis crónica (EGC). Este trastorno en la inmunidad primaria de los leucocitos polimorfonucleares, trae como defecto subyacente una incapacidad de los fagocitos para generar superóxido, el cual es necesario para inhibir la actividad microbicida intracelular. La infección con estas bacterias representa la segunda causa de muerte en estos pacientes (85).

Las investigaciones sobre la caracterización de las especies del cBc recuperadas del medio ambiente han sido más limitadas que las llevadas a cabo en el área médica. Sin embargo se debe resaltar que plantas del grupo Gramineae parecen ser particularmente importantes como anfitriones rizosféricos para las bacterias del cBc. Los estudios

sistemáticos que examinan la distribución de las especies del cBc en el medio ambiente se han centrado en las poblaciones que interactúan con las plantas de cultivo como uno de los hábitats más importantes para estas bacterias. Así por ejemplo *B. vietnamiensis* se observa con elevada representación en la rizosfera del arroz; *B. ambifaria* está presente en las raíces del guisante y *B. cepacia* / *B. cenocepacia* están asociados con la rizosfera del trigo (28)(125). En un trabajo del 2005, sobre la rizosfera del maíz, se observó la presencia de *Burkholderia ambifaria* y *B. cepacia* (64% y 20% del número total de aislamientos, respectivamente) junto a *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. dolosa* y *B. pyrrocinia*, lo que sugiere a la rizosfera del maíz como una fuente ambiental rica en estas bacterias. Ha sido reportado en los últimos años la capacidad que poseen las diferentes especies del cBc de sobrevivir también en un importante número de productos farmacéuticos (107), cosméticos y desinfectantes (104) así como sobrevivir por largos períodos en soluciones conteniendo altas concentraciones de antimicrobianos , y aún en soluciones salinas.

A diferencia de *P. aeruginosa*, que puede ser transportada por alrededor del 10% de los seres humanos o *E. coli*, un colonizador normal del intestino, las bacterias del cBc no han sido recuperadas hasta la fecha de fuentes humanas que no sean sitios de infección. Si bien se han detectado bacterias del complejo *B. cepacia* en leche no pasteurizada (117), y en un brote de mastitis subclínica en el ganado ovino (8), los animales no se han descrito aún como reservorios de organismos del cBc. La presencia de estas bacterias en el medio ambiente podría explicar que en ausencia de transmisión paciente-paciente, los nichos naturales o los diversos establecimientos industriales y sus productos podrían ser las fuentes de infección para estos pacientes (109). Se han realizado numerosos estudios en este sentido y se ha podido establecer en algunos casos una gran similitud entre las cepas aisladas del ambiente y de pacientes FQ. Govan D. y colaboradores, demostraron mediante estudios genéticos realizados aplicando electroforesis de campo pulsado (PFGE), que aislados de *B. cepacia* de un paciente FQ tenían un perfil electroforético idéntico al de una cepa de esta especie (ATCC 25416) originalmente aislada de una planta de cebolla (63). Las evidencias más concluyentes al respecto fueron aportadas por los trabajos realizados por un consorcio de laboratorios de Europa, EE.UU. y Canadá quienes emplearon MLST para estudiar una población de casi 800 aislamientos del cBc provenientes del ambiente, pacientes y la industria (4)(104)(109). Estas investigaciones permitieron determinar que un importante número de aislamientos clínicos de *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* y *B. ambifaria* poseían secuencias de nucleótidos idénticas en los 7 loci del sistema MLST, a las encontradas en aislamientos recuperados del medio ambiente (provenientes de ríos, agua, cebollas, maíz) y en aislamientos recuperados de instalaciones industriales y sus productos (productos

farmacéuticos, equipamiento hospitalario, cosméticos, etc). Estos trabajos demostraron que al menos 6 tipos de secuencias ST obtenidas para las cepas de origen clínico coincidían con las encontradas para cepas de origen industrial. Asimismo 15 tipos de secuencias se encontraron en aislamientos provenientes de pacientes y de fuentes naturales (Figura 7).

Estos resultados muestran claramente la notable versatilidad que poseen los organismos del cBc para sobrevivir y crecer en ambientes muy diversos y probablemente infectar desde esos nichos a pacientes FQ. En este sentido, las políticas estrictas de control de infecciones implementadas en todo el mundo han logrado disminuir el contagio por transmisión paciente-paciente. Sin embargo, el ambiente y la industria continúan siendo nichos importantes para la adquisición de infecciones por parte de la población de pacientes FQ (99)(167). Por esta razón es necesario reconsiderar el uso de estos microorganismos como herramientas biotecnológicas, así como también implementar controles microbiológicos más estrictos tendientes a limitar la presencia de estos organismos en los productos tales como cosméticos, cremas, y productos domisanitarios.

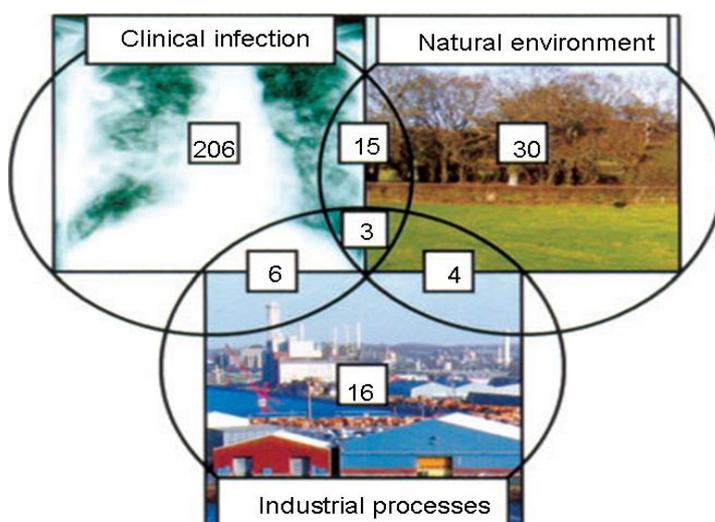


Figure 7. Esquema indicando el número de tipos de secuencias (ST) encontradas para aislamientos provenientes de muestras clínicas, ambientales y de productos de establecimientos industriales. Las regiones superpuestas entre los diferentes nichos indican el número de clones idénticos encontrados. Tomado de Mahenthiralingam, E. 2007 (85).

2.2.5. Epidemiología de las especies del complejo *Burkholderia cepacia*

Como se mencionó anteriormente, las infecciones en pacientes FQ pueden ocurrir, ya sea por trasmisión paciente-paciente o pueden adquirirse en el hospital o desde el medio ambiente. La evolución y el pronóstico de la enfermedad son sumamente variables dependiendo principalmente de la especie infectante, del estado clínico general del paciente, y de la predisposición individual del paciente al momento de la infección (66)(109). Muchos

pacientes FQ pueden permanecer infectados por estos organismos pero mostrarse relativamente saludables durante períodos prolongados, sin embargo, otros sufren un grave deterioro en su estado pulmonar, o mueren poco después de la colonización inicial (113). Los pacientes que muestran un deterioro clínico muy rápido y poco controlable, conocido como "síndrome cepacia", representan una minoría (aproximadamente el 10% de los individuos). Estos pacientes sufren por lo general neumonía necrotizante y septicemia que resulta en la muerte prematura del paciente (83)(159).

Todas las especies del complejo (a excepción de *B. ubonensis*) han sido aisladas de pacientes fibroquísticos, sin embargo la literatura muestra una distribución desbalanceada en ciertos países y en determinados períodos de algunas especies debido a la ocurrencia de brotes nosocomiales producidos por algunas especies en particular. Por ejemplo se han descrito diversos brotes epidémicos en pacientes FQ ocasionados por *B. multivorans* en el Reino Unido (176), en Francia (152) y Estados Unidos (156). Asimismo las especies *B. cepacia* y *B. dolosa*, también se han reportado como epidémicas en Estados Unidos (88). En Portugal la especie *B. cepacia* ha sido responsable de un importante brote producido por la contaminación de una solución salina de aplicación por vía nasal empleada en diferentes terapias hospitalarias (36)(37). La causa de la aparición de los diferentes brotes en los casos arriba mencionados ha sido, al igual que en Portugal, producido por la contaminación de algún material o soluciones desinfectantes, de nebulizadores, apósitos anestésicos, enjuague bucal o dispositivos médicos contaminados (64)(89)(113).

En Argentina, tal como se detallará en el Capítulo II la prevalencia de aislamientos de organismos del cBc recuperados de pacientes con FQ desde 1990 hasta el año 2004 era muy baja con valores entre 0,2 hasta 3,6% dependiendo del centro médico, y el período de tiempo considerado (Comunicación personal de jefes de Bacteriología de hospitales nacionales). Sin embargo a principios de 2004, ocurrió un brote de organismos del complejo en muchos centros de tratamiento de pacientes FQ de Argentina. La proporción de pacientes de los que se aislaban diferentes organismos del cBc oscilaba entre 19 y 36% (dependiendo del centro médico) (11)(86). En la actualidad, debido a la aplicación de estrictos procedimientos de control para prevenir las infecciones, la incidencia de *Burkholderia* spp. en estos pacientes se redujo a aproximadamente a un 10%.

Los últimos estudios de vigilancia sobre la distribución de las especies del cBc en pacientes con FQ a nivel mundial han dado a *B. multivorans* y *B. cenocepacia* como las especies más frecuentemente recuperadas de pacientes. La prevalencia sumada de las dos especies en diferentes países de Europa, EE.UU y Canadá indica que las mismas infectan aproximadamente el 80% de los pacientes FQ (73)(98). Se debe tener en cuenta que la

predominancia de una sobre la otra depende del lugar geográfico o el período de tiempo considerado. A diferencia de esta clara situación mundial, en nuestro país no se disponía de datos epidemiológicos sobre las especies prevalentes. Sin embargo, luego de los trabajos realizados en el marco de esta Tesis Doctoral (Capítulo II) conjuntamente con los realizados en los diferentes centros de referencia de FQ, hospitales nacionales y la Cátedra de Higiene y Sanidad de la UBA pudimos demostrar que en la Argentina existe una alta prevalencia de *B. contaminans*, seguida de *B. cenocepacia*. Hasta nuestro conocimiento, ninguna otra región geográfica fue reportada en la literatura con predominancia de *B. contaminans* colonizando pacientes FQ. Por esta razón esta especie ha sido poco caracterizada mundialmente. Esta falta de información en la bibliografía internacional sumado al hecho de la alta presencia de esta especie en pacientes de nuestro país generó un escenario que era necesario buscar resolver.

2.2.6. Organismos del Complejo *Burkholderia cepacia* en la infección crónica

Uno de los problemas más graves de los pacientes con fibrosis quística (FQ) son las infecciones pulmonares crónicas. La mayoría de los pacientes con fibrosis quística (FQ), finalmente sucumben frente a infecciones pulmonares crónicas con *Pseudomonas aeruginosa*, que, una vez establecidas, son prácticamente imposibles de erradicar (71). Es sabido que estos pacientes son inicialmente colonizados en forma recurrente y transitoria por diferentes cepas de *P. aeruginosa*, las cuales eventualmente pueden evolucionar a lo largo del tiempo a una infección crónica producida por una cepa dominante clínica llamada “cepa dominante adaptada” (146). Sin embargo, en un 20-30 % de los casos, se aíslan múltiples cepas de una misma infección crónica (58). Para el caso de las infecciones con organismos del cBc, si bien es sabido que las infecciones evolucionan en muchos casos a la cronicidad, se han reportado pacientes que cursan infecciones crónicas con múltiples cepas, así como pacientes infectados crónicamente por una única cepa (7)(22)(179).

Dadas las particularidades del pulmón de los pacientes FQ, los patógenos crecen en ellos en su mayoría en forma de *biofilms*, donde las bacterias se embeben en una matriz constituida principalmente por exopolisacáridos. Si bien la resistencia y persistencia de estos patógenos en el hospedador podría ser consecuencia de la presencia de dicha matriz que impide la penetración de antibióticos, existe otra estrategia de persistencia que adoptan especies como *P. aeruginosa* que es la de diversificación en fenotipos específicamente adaptados al ambiente hostil del pulmón FQ durante el establecimiento de la infección crónica, lo cual permite a estas bacterias persistir en su hospedador por muchos años (112)

(155) (118). Algunos de los cambios fenotípicos observados en *P. aeruginosa* a lo largo del proceso de diversificación fenotípica son: cambios en la resistencia antibiótica (3), pérdida del antígeno O (69), pérdida de movilidad celular (106), inactivación de funciones de *quorum sensing* (54)(77), auxotrofia (101), aparición de “colonias pequeñas” (81)(100), disminución de la producción de factores de virulencia asociados a la infección aguda (155) e incremento en la tasa de mutaciones (25).

Al respecto, las cepas con incremento espontáneo de la tasa de mutación o hipermutadoras poseen una frecuencia de mutación entre 10 a 1000 veces más elevada que las cepas salvajes. Uno de los mecanismos responsables de incrementar la tasa de mutación y/o recombinación en poblaciones bacterianas es el de la inactivación de genes involucrados en sistemas de reparación de ADN (hipermutabilidad estable). Dentro de éstos, el sistema de reparación de bases mal apareadas (*mismatch-repair system*, MRS) (*MutS*, *MutLo* *UvrD*) es el más frecuentemente afectado en poblaciones bacterianas naturalmente hipermutadoras. En particular en infecciones FQ pulmonares crónicas, se ha propuesto que la presencia de mutaciones en estos genes son responsable de la adaptación genética de dichas bacterias por su mayor probabilidad de acumular mutaciones beneficiosas (25)(121). Estos procesos han sido interpretados como que la adaptación al pulmón FQ, lleva a los microorganismos a adoptar un fenotipo de menor virulencia (13).

Las infecciones pulmonares crónicas producidas por miembros del Complejo *Burkholderia* en pacientes FQ presentan una gran relevancia clínica ya que su presencia significa prácticamente una sentencia de muerte para el paciente. Sin embargo, hasta el presente es muy poco lo que se ha investigado sobre la evolución o la existencia de fenotipos adaptativos de especies del Complejo *B.* cepacia particularmente *B. contaminans* en las infecciones crónicas de estos pacientes. Asimismo, no existe hasta el momento ninguna investigación sobre la prevalencia de cepas hipermutadoras en aislados de esta especie bacteriana recuperadas de pacientes FQ.

Dado estos antecedentes y teniendo en cuenta las características de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ así como los extensos estudios sobre hipermutabilidad o emergencia de cepas adaptativas en infecciones causadas por *P. aeruginosa*, nos propusimos en el marco de este trabajo de Tesis Doctoral avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que permiten a bacterias del cBc persistir en el pulmón FQ con el propósito final de encontrar estrategias efectivas para su erradicación.

2.3 Problemática local, contribución e impacto

A nivel mundial, el grave problema de los servicios de bacteriología hospitalarios para disponer de un diagnóstico microbiológico rápido y certero de organismos aislados de pacientes fibroquísticos, se resuelve derivando las muestras a laboratorios de referencia especializados, donde personal altamente entrenado aplica técnicas de biología molecular para la identificación microbiana. En nuestro país a comienzos del año 2004, cuando surge el brote de organismos del cBc en los pacientes que concurrían a diferentes hospitales nacionales, el problema del diagnóstico microbiológico no resultaba de fácil solución. Los servicios de Bacteriología nacionales aplicaban en general metodologías bioquímicas de rutina y la secuenciación del gen 16S-rRNA. Como se explicó anteriormente, mediante el empleo de herramientas bioquímicas clásicas es muy complejo y laborioso alcanzar la correcta discriminación de las especies de bacilos Gram-negativos y en particular las comprendidas en el cBc que colonizan el pulmón del paciente FQ. Por su parte la identificación por secuenciación del gen 16S-rRNA tampoco representaba una metodología capaz de discriminar las especies del cBc. Esta situación se vió más agravada porque al momento de producirse dicho brote no estaba aún descrita a nivel mundial la especie *B. contaminans*, la cual resultó ser la de mayor prevalencia en nuestro país. De modo que si bien algunos resultados de los análisis de identificación obtenidos en los laboratorios permitían asignar a los organismos causantes del brote como miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, otras pruebas resultaban contradictorias para ubicarlos dentro de alguna de las especies reportadas hasta ese momento para el cBc. Ante esta situación en Diciembre de 2007 nuestro laboratorio fue invitado junto con el laboratorio de Higiene y Sanidad de la UBA y los hospitales y centros de Referencia de mayor relevancia de nuestro país (Hospital de Niños de La Plata, Hospital Gutiérrez de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Hospital de Clínicas de la UBA, Hospital Garrahan, entre otros) a conformar un grupo de trabajo multidisciplinario en el marco de la Sociedad Argentina de Microbiología (AAM). La iniciativa resultó positiva y se creó el “Grupo de trabajo *Burkholderia cepacia*” (http://www.aam.org.ar/b_cepacia.shtml). El objetivo de este Grupo ha sido generar un ámbito científico propicio para la discusión de los temas relacionados con la optimización del aislamiento, la identificación fenotípica y molecular de organismos del cBc, así como las formas de tratamiento para contribuir a la erradicación de las infecciones producidas por estas bacterias. El Grupo de trabajo tuvo y tiene desde entonces la misión de difundir los avances logrados en el ambiente científico, hospitalario, la industria y la sociedad. En este contexto se llevó a cabo el presente trabajo de Tesis Doctoral, el cual ha apuntado desde sus

inicios a poner los mayores esfuerzos en contribuir a desarrollar métodos de identificación que permitieran la diferenciación e identificación de bacilos no fermentadores pertenecientes y no pertenecientes al cBc circulantes en nuestro país, con el fin de realizar estudios epidemiológicos locales, avanzar sobre el conocimiento general de la especie de mayor prevalencia en nuestro país (*B. contaminans*), e intentar entender la evolución de los microorganismos que participan en las infecciones crónicas.

El desarrollo de este trabajo de Tesis contempló desde su inicio realizar los estudios empleando aislamientos hospitalarios recuperados de pacientes FQ, no-FQ y provenientes del ambiente. Actualmente el CINDEFI cuenta con un banco de cepas de más de 400 aislamientos provenientes de centros de salud ubicados en diferentes regiones del país. Más de 5 instituciones han aportado cepas aisladas principalmente de muestras de esputo de pacientes FQ ya sea niños o adultos. Adicionalmente se dispone de aislamientos ambientales recuperados de productos domisanitarios e industrias farmacéuticas cedidos por la Cátedra de Higiene y Sanidad de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UBA y de la Universidad Tecnológica de Munich, Alemania (NUM). Todos los aislamientos fueron identificados como bacilos no fermentadores y alrededor de 200 fueron asignados al cBc en las respectivas instituciones hospitalarias empleando técnicas bioquímicas. Desde el año 2004 hasta el año 2008 gran parte de estos aislamientos identificados en los hospitales como miembros del cBc fueron analizados en los centros de investigación de la UNLP (CINDEFI) y UBA (Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA) con las herramientas que hasta ese momento se aplicaban a nivel internacional para discriminar los organismos del cBc, tales como *recA*-PCR-RFLP o PCR especie-específica. Sin embargo, a partir del año 2008 al asignarse 5 nuevas especies y el taxón K al complejo *Burkholderia cepacia* (168)(169), estas metodologías de identificación molecular ya no fueron capaces de discriminar las 17 especies asignadas al complejo. Por este motivo a partir de dicho año debieron optimizarse nuevas metodologías (secuenciamiento del gen *recA* y otros genes conservados) a efectos de confirmar la identidad no solo de los nuevos aislados recuperados, sino de reconfirmar todos los presentes en nuestra colección. En el transcurso de los últimos años los centros de investigación locales han transferido al sector hospitalario las herramientas adecuadas para alcanzar la correcta identificación de los organismos Gram-negativos multi-resistentes circulantes en nuestro país.

Una vez resuelto el problema de la identificación de los aislamientos obtenidos de pacientes FQ, las investigaciones enmarcadas en este trabajo de Tesis Doctoral se dirigieron a avanzar en el conocimiento de las características fenotípicas, genotípicas y epidemiológicas de aislados obtenidos de pacientes FQ con infecciones pulmonares adquiridas por primera

vez así como también las que evolucionaron hacia la cronicidad. Estos resultados podrían tener implicancias en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y estrategias de control de estas infecciones.

Objetivos generales

1. Desarrollar metodologías genéticas y fenotípicas para la identificación, discriminación y caracterización de microorganismos del complejo *Burkholderia cepacia* aislados de pacientes con fibrosis quística, que permitieran definir el cuadro epidemiológico local. Adaptar las metodologías para su transferencia y aplicación a nivel hospitalario (Capítulo 2)
2. Estudiar la diversidad genética y fenotípica dentro de los aislados de *B. contaminans*, la especie de mayor prevalencia local, mediante técnicas de ADN-*fingerprinting* y espectroscopía FT-IR. Se analizarán y confrontarán los resultados obtenidos a partir de poblaciones microbianas circulantes durante el brote del año 2004, en los organismos recuperados de infecciones iniciales y en los aislamientos recuperados de infecciones crónicas de pacientes FQ (Capítulos 3 y 4).
3. Analizar comparativamente propiedades fenotípicas tales como expresión de factores de virulencia, velocidad de crecimiento, capacidad de formación de biofilm, estructura de *biofilms* en aislados microbianos provenientes de infecciones crónicas, aislados recuperados de las primeras etapas de la adquisición de la infección de pacientes FQ y los aislamientos sucesivos obtenidos de un mismo paciente FQ colonizado por *Burkholderia* spp. crónicamente (Capítulo 5).
4. Establecer si la diversificación fenotípica constituye una estrategia empleada por los organismos del cBc para establecerse en el pulmón del hospedador y colonizarlo crónicamente. Para este fin se analizará dentro de la población de organismos del cBc disponible la existencia de cepas con alta frecuencia de mutación (hipermutadoras) empleando la técnica de resistencia a rifampicina. Se caracterizarán en los aislados identificados como hipermutadores, dos de los genes que podrían ocasionar la hipermutación (genes *mutS*, y *mutL*) ambos pertenecientes al sistema de reparación MRS (*mismatch repair system*). Se analizará si el fenotipo hipermutador está asociado a una mayor resistencia a antimicrobianos, a una diferente capacidad de formación de *biofilms* y a un diferente nivel en la expresión de algunos factores de virulencia (Capítulo 6).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Sciacca A, Stefani S.** 2001. Burkholderia cepacia Complex Infection in Italian Patients with Cystic Fibrosis : Prevalence , Epidemiology , and Genomovar Status. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2891–2896.
2. **AHLSTROM D.** 2010. CF worse for women “due to effect of oestrogen”. *The Irish Times.* Ireland.
3. **Anzaudo MM, Busquets NP, Ronchi S, Mayoral C.** 2005. Microorganismos patógenos aislados en muestras respiratorias de niños con fibrosis quística 129–134.
4. **Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCJ, Govan JR, Speert DP, LiPuma JJ, Vandamme P, Dowson CG.** 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the Burkholderia cepacia complex. *Journal of clinical microbiology* **43**:4665.
5. **Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM.** 1999. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* **103**:1113–1117.
6. **Bedrossian CW, Greenberg SD, Singer DB, Hansen JJ, Rosenberg HS.** 1976. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum Pathol* 195–204.
7. **Bernhardt S a, Spilker T, Coffey T, LiPuma JJ.** 2003. Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **37**:780–5.
8. **Berriatua E, Ziluaga I, Uribarren P, Juste R, Laevens S, Vandamme P, Govan JRW.** 2001. Outbreak of Subclinical Mastitis in a Flock of Dairy Sheep Associated with Burkholderia cepacia Complex Infection. *Journal of clinical microbiology* **39**:990–994.
9. **Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ.** 2003. Evidence of transmission of Burkholderia cepacia , Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters* **228**:57–62.
10. **Blouquit-Laye S, Chinnet T.** 2007. Ion and liquid transport across the bronchiolar epithelium. *Respir Physiol Neurobiol* **159**:278–282.
11. **Bosch A, Miñán A, Vescina C, Degrossi J, Gatti B, Montanaro P, Messina M, Franco M, Vay C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O.** 2008. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology* **46**:2535–46.
12. **Boucher RC.** 2007. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* **58**:157–170.
13. **Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di S, Doring G, Tümmler B.** 2009. Pseudomonas aeruginosa microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med* **180**:138–145.
14. **Brown AR, Govan JR.** 2007. Assessment of fluorescent Rapid, in situ hybridization and PCR-based methods for Organisms, identification of Burkholderia cepacia complex directly from sputum samples. *J Clin Microbiol* **45**:1920– 1926.
15. **Brown CR, Hong-Brown LQ, Welch WJ.** 1997. Strategies for correcting the delta F508 CFTR protein-folding defect. *J Bioenerg Biomembr* **29**:491–502.
16. **Brownlee KG.** 2006. Small airways disease in cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis* **35**:21–37.
17. **Burns JL, Hedin L a, Lien DM.** 1989. Chloramphenicol resistance in Pseudomonas cepacia because of decreased permeability. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **33**:136–41.
18. **Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW.** 2001. Longitudinal Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Young Children with Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* **183**:444–452.
19. **Campodonico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB.** 2008. Airway epithelial control of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med* **14**:120–33.

20. **Caraher EM, Gumulapurapu, K., Taggart CC, Murphy P, Mcclean S, Callaghan M, Susceptibility.** 2007. The effect of recombinant human lactoferrin on growth and the antibiotic As, of the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cepacia* complex when cultured planktonically or biofilms. *J Antimicrob Chemother* **60**:546–554.
21. **Castro HE, Aguirre AS, Ortega DG, María J, Ortega N.** 2009. Fibrosis quística. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP 77–84.
22. **Chen JS, Witzmann K a, Spilker T, Fink RJ, LiPuma JJ.** 2001. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics* **139**:643–9.
23. **Chernick WS, Barbero GJ.** 1959. Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics* **24**:739–45.
24. **Chmiel J, Berger M, Konstan M.** 2002. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **23**:5–27.
25. **Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Høiby N.** 2005. Occurrence of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Is Associated with the Oxidative Stress Caused by Chronic Lung Inflammation. *Society* **49**:2276–2282.
26. **Clancy JP, Rowe SM, Bebok Z, Aitken ML, Gibson R, Zeitlin P, Berclaz P, R. M, R. KM, Oster RA, Mayer-Hamblett N, Ramsey B.** 2007. No detectable Aminoglycosides, improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**:57–66.
27. **Coakley RD, Sun H, Clunes LA, Rasmussen JE, Stackhouse JR, Okada SF, Fricks I, Young SL, Tarran R.** 2008. homeostasis of airway surface liquid volume in human cystic fibrosis airway epithelia i:4025–4035.
28. **Coenye T, Mahenthalingam E, Henry D, Lipuma JJ, Laevens S, Gillis M, Speert DP, Vandamme P.** 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member Biocontrol, of the *Burkholderia cepacia* complex including Microbiol, and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol* **51**:1481–1490.
29. **Coenye T, LiPuma JJ.** 2002. Multilocus restriction typing: a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *The Journal of infectious diseases* **185**:1454–62.
30. **Coenye T, Spilker T, Martin A, Lipuma JJ.** 2002. Comparative Assessment of Genotyping Methods for Epidemiologic Study of *Burkholderia cepacia* Genomovar III. *Journal of clinical microbiology* **40**:3300–3307.
31. **Coenye T, Vandamme P.** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* **5**:719–729.
32. **Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW, Hoffman G, Parad RB, Wilfond BS, Rosenfeld M, Sontag MK, Massie J, Farrell PM, O’Sullivan BP.** 2007. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* **119**:e495–518.
33. **Conway BA, Venu V, Speert DP.** 2002. Biofilm formation and *Burkholderia*, acyl homoserine lactone production in the *cepacia* complex. *J. Bacteriol.* **184**:5678–5685.
34. **Cox AD, Wilkinson SG.** 1991. Ionizing groups in To, lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* **5**:641–646.
35. **Crossley JR, Smith PA, Edgar BW, Gluckman PD, Elliott RB.** 1981. Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots. *Clin Chim Acta* **113**:111–21.
36. **Cunha V, Leita JH, Mahenthalingam E, Vandamme P, Lito L, Barreto C, Jose M, Sa I.** 2003. Molecular Analysis of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from a Portuguese Cystic Fibrosis Center : a 7-Year Study. *Society* **41**:4113–4120.
37. **Cunha M V, Pinto-de-Oliveira A, Meirinhos-Soares L, Salgado MJ, Melo-Cristino J, Correia S, Barreto C, Sá-Correia I.** 2007. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *Journal of clinical microbiology* **45**:1628–33.
38. **Czubaj F.** 2007. En el país, Sólo se diagnostica el 50% de los casos de fibrosis quística. LA NACION. Buenos Aires, BA.
39. **Dales L, Ferris W, Vandemheen K, Aaron SD.** 2009. Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **28**:1275–9.

40. **Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP.** 2008. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **178**:814–21.
41. **Davies JC, Rubin BK.** 2007. Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **28**:312–321.
42. **De Araújo FG, Novaes FC, Dos Santos NPC, Martins VC, De Souza SM, Dos Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC.** 2005. Prevalence of Δ F508 , G551D , G542X , and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**:11–15.
43. **De Boeck K, Malfroot A, Schil L Van, Lebecque P, Knoop C, Govan JR, Doherty C, Laevens S, Vandamme P.** 2004. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex colonisation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* **19**:851–6.
44. **De Rose V.** 2002. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* **19**:333–40.
45. **Dellon EP, Leigh MW, Yankaskas JR, Noah TL.** 2007. Effects of lung transplantation on inpatient end of life care in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **6**:396–402.
46. **Deloger M, Karoui M, Petit MA.** 2009. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *J. Bacteriol.* **191**:91–99.
47. **Desai M, Buhler T, Weller PH, Brown MR.** 1998. Increasing *Burkholderia*, resistance of planktonic and biofilm cultures of Exponential, *cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during growth. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:153–160.
48. **Dodge JA.** 1995. Male fertility in cystic fibrosis. *Lancet* **346**:587–8.
49. **Donaldson S, Boucher R.** 2003. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* **9**:486–91.
50. **Durie PR, Forstner GG.** 1989. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *J R Soc Med* **82**:2–10.
51. **Döring G, Hoiby N.** 2004. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* **3**:67–91.
52. **D'Alessandro V, Rentería F, Fernández A, Martínez MI, Segal E.** 2009. Comparación del estado clínico-funcional en niños con fibrosis quística detectados por pesquisa neonatal o por síntomas clínicos. *Archivos argentinos de pediatría* **430–435**.
53. **Enright MC, Spratt BG.** 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**:482–487.
54. **Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM.** 2010. Mucoïdy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS one* **5**:1–12.
55. **Ferrer J.** 2003. Perspectivas históricas. En: Sociedad Científica de lucha contra la Quística Manual de .
56. **Flotte T, Ng P, Dylla D, McCray P, Wang G, Kolls J, Hu J.** 2007. Viral Vector-Mediated and Cell-Based Therapies for Treatment of CF. *Molecular Therapy* **15**:229–241.
57. **Foundation CF.** 2009. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2008 Annual data report. Bethesda, MD.
58. **Foweraker J, Laughton C, Brown D, Bilton D.** 2005. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* **55**:921–927.
59. **Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW.** 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **168**:918–51.
60. **Goldstein R.** 1995. Structurally variant classes of pilus *Burkholderia*, appendage fibers coexpressed from (*Pseudomonas*) *cepacia*. *J. Bacteriol.* **177**:1039–1052.
61. **Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje J.** 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:81–91.
62. **Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubinfeld GD, Ramsey BW.** 2004. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax* **955–959**.
63. **Govan JRW, Balendreau J, Vandamme P.** 2000. *Burkholderia cepacia* – friend and foe. *Asm News* **66**:124–125.

64. **Gravel D, Sample ML, Ramotar K, Toye B, Oxley C, Garber G.** 2002. Outbreak of *Burkholderia cepacia* in the adult intensive care unit traced to contaminated indigo-carmin dye. *Infect Control Hosp Epidemiol* **23**:103–106.
65. **Griesenbach U, Geddes D, Alton E.** 2006. Gene Therapy Progress and Prospects: Cystic Fibrosis. *Gene Therapy*, **13**.
66. **Hadjiliadis D.** 2007. Special considerations for patients with cystic fibrosis undergoing lung transplantation. *Chest* **131**:1224–1231.
67. **Hales BA, Morgan JA, Hart CA, Winstanley C.** 1998. *Burkholderia*, Variation in flagellin genes and proteins of *cepacia*. *J. Bacteriol.* **180**:1110–1118.
68. **Hamosh A, Fitzsimmons SC, Macek M, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR.** 1998. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *THE JOURNAL OF PEDIATRICS* **132**:255–259.
69. **Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB.** 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infection and immunity* **42**:170–7.
70. **Harrison F.** 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **153**:917–923.
71. **Hart C, Winstanley C.** 2002. Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children. *Br Med Bull* **61**:81–96.
72. **Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, Krauss-Etschmann S, Koller B, Reinhardt D, Roscher AA, Roos D, Griese M.** 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* **13**:1423–30.
73. **Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley S a.** 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* **24**:29–70.
74. **Henke MO, Ratjen F.** 2007. Mucolytics in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **8**:24–29.
75. **Henry D, Mahenthalingam E, Vandamme P, Coenye T.** 2001. Phenotypic Methods for Determining Genomovar Status of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Society* **39**:1073–1078.
76. **Hobson R, Gould I, Govan J.** 1995. *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* as a cause of brain abscesses secondary to chronic suppurative otitis media. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* **14**:908–911.
77. **Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW, Miller SI.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **8**:66–70.
78. **Hoiby N, Frederiksen B, Pressler T.** 2005. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros* **4**:49–54.
79. **Huber B.** 2002. Genetic analysis of functions involved in the *Cepacia*, late stages of biofilm development in *Burkholderia H111*. *Mol. Microbiol.* **46**:411–426.
80. **Hytönen M, Patjas M, Vento S.** 2001. Cystic fibrosis gene mutations deltaF508 and 394delTT in patients with chronic sinusitis in Finland. *Acta Otolaryngol* **121**:945–7.
81. **Häussler S.** 2004. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology* **6**:546–51.
82. **Imundo, L., Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q.** 1995. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **3019–23**.
83. **Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H.** 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* **104**:206–10.
84. **Jiang C, Lee ER, Lane MB, Xiao YF, Harris DJ, Cheng SH.** 2001. Partial correction of defective Cl⁻ secretion in cystic fibrosis epithelial cells by an analog of squalamine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:L1164–1172.
85. **Johnston RBJ.** 2001. Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Hematol.* **8**:17–22.
86. **Jordá-Vargas L, Degrossi J, Castañeda NC, D'Aquino M, Valvano M a, Procopio A, Galanternik L, Centrón D.** 2008. Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. *Journal of clinical microbiology* **46**:1151–2.

87. **Kalish LA, Waltz DA, Dovey M, Potter-Bynoe G, McAdam AJ, Lipuma JJ, Gerard C, Goldmann D.** 2006. Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **173**:421–5.
88. **Kalish L a, Waltz D a, Dovey M, Potter-Bynoe G, McAdam AJ, Lipuma JJ, Gerard C, Goldmann D.** 2006. Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **173**:421–5.
89. **Kamiya A.** 1996. BRIEF Microbial contamination and disinfectants. *American Journal of Infection Control* **24**:389–395.
90. **Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui. LC.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**:1073–80.
91. **Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW.** 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **151**:1075–82.
92. **Konstan, M. W. and MB.** 1997. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* **24**:137–42.
93. **Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, Holden MTG, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ.** 2012. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS pathogens* **8**:e1002824.
94. **Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN.** 2004. Regulatory Bacteria, circuits and communication in Gram-negative. *Nature Rev. Microbiol.* **2**:581–592.
95. **Lewis HA, Buchanan SG, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, W. A. Hendrickson, J. F. Hunt, M. C. Kearins, D. Lorimer, P. C. Maloney KWP, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X, Emtage. S.** 2004. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* **23**:282–93.
96. **Li H, Cai Z, Chen J, Ju M, Xu Z, Sheppard D.** 2007. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel: a versatile engine for transepithelial ion transport. *Sheng Li Xue Bao* **59**:416–30.
97. **Liedtke CM.** 1992. Electrolyte of normal and cystic fibrosis lung. *The FASEB Journal* **6**:3076–3084.
98. **Lipuma JJ.** 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* **23**:299–323.
99. **LiPuma J, Spilker T, Coenye T, Gonzalez C.** 2002. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet.* **359**:2002–3.
100. **Luján AM, Moyano AJ, Segura I, Argaraña CE, Smania AM.** 2007. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain. *Microbiology (Reading, England)* **153**:225–37.
101. **Luzar M a, Thomassen MJ, Montie TC.** 1985. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infection and immunity* **50**:577–82.
102. **Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**:194–222.
103. **Lynch KH, Dennis JJ.** 2008. Development of a species-specific *fur* gene-based method for identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of clinical microbiology* **46**:447–55.
104. **Mahenthalingam E, Baldwin a, Dowson CG.** 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of applied microbiology* **104**:1539–51.
105. **Mahenthalingam E, Campbell ME, Henry D a, Speert DP.** 1996. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Journal of clinical microbiology* **34**:2914–20.
106. **Mahenthalingam E, Campbell ME, Speert DP.** 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infection and immunity* **62**:596–605.
107. **Mahenthalingam E, Baldwin A, Drevinek P, Vanlaere E, Vandamme P, LiPuma JJ, Dowson CG.** 2006. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS one* **1**:e17.

108. **Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-gay Y.** 2000. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of Burkholderia cepacia Complex , Burkholderia vietnamiensis , Burkholderia cepacia Genomovars I and III. *Society* **38**:3165–3173.
109. **Mahenthiralingam E, Urban T a, Goldberg JB.** 2005. The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. *Nature reviews. Microbiology* **3**:144–56.
110. **Maiden MC.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**:561–588.
111. **Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ.** 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of microbiological methods* **51**:255–71.
112. **Martin C, Ichou M a, Massicot P, Goudeau a, Quentin R.** 1995. Genetic diversity of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region. *Journal of clinical microbiology* **33**:1461–6.
113. **Martin M, Christiansen B, Caspari G, Hogardt M, Von Thomsen a J, Ott E, Mattner F.** 2011. Hospital-wide outbreak of Burkholderia contaminans caused by prefabricated moist washcloths. *The Journal of hospital infection* **77**:267–70.
114. **Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, Taylor RM, Superfine R, Rubinstein M, Iglewski BH, Boucher RC.** 2006. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:18131–6.
115. **McCormick J, Mehta G, Olesen H V, Viviani L, Macek M, Mehta A.** 2010. Comparative demographics of the European cystic fibrosis population: a cross-sectional database analysis. *Lancet* **375**:1007–13.
116. **Mishra A, Greaves R, Smith K, Carlin JB, Wootton A, Stirling R, Massie J.** 2008. Diagnosis of Cystic Fibrosis by Sweat Testing: Age-Specific Reference Intervals. *The Journal of pediatrics* **153**:758–763.
117. **Moore JE, McIlhatton B, Shaw A, Murphy PG, Elborn JS.** 2001. Occurrence of Burkholderia cepacia in foods and waters: clinical implications for patients with cystic fibrosis. *J Food Prot* **7**:1076–1078.
118. **Mowat E.** 2011. Pseudomonas aeruginosa Population Diversity and Turnover in Cystic Fibrosis Chronic Infections American. *J ournal of Respiratory and Critical Care Medicine.*
119. **Naumann Dieter, Helm D, Labischinski H.** 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**:81–82.
120. **Oderiz S, Palacio PDEL, Lewis MC, Bettiol MP, Martina P, Bosch A, Yantorno OM, Gatti BM.** 2011. Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación de organismos del complejo Burkholderia cepacia aislados de muestras clínicas. *Revista Argentina de Microbiología* **43**:168–175.
121. **Oliver A, Baquero F, Blázquez J.** 2002. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in Pseudomonas aeruginosa: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molecular microbiology* **43**:1641–50.
122. **Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr. ARF, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR.** 2003. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**:828–34.
123. **Ones AM, Dodd ME, Govan JR, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK.** 2004. Burkholderia cenocepacia and Burkholderia multivorans: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* **59**:948–51.
124. **Ott CJ, Blackledge NP, Leir S, Harris A.** 2010. Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene. *NIH Public Access* **37**:843–848.
125. **Parke JL, Gurian-Sherman D.** 2001. Diversity of the Risk, Burkholderia cepacia complex and implications for Phytopathol, assessment of biological control strains. *Annu Rev* **39**:225–258.
126. **Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthiralingam E, Icrobiol APPLNEM.** 2005. Development of a recA Gene-Based Identification Approach for the Entire Burkholderia Genus. *Applied and environmental microbiology* **71**:3917–3927.
127. **Pegues DA, Carson LA, Anderson RL, Norgard MJ, Argent TA, Jarvis WR, Woernle CH.** 1993. Oncology, Outbreak of Pseudomonas cepacia bacteremia in patients. *Clin Infect Dis* **16**:407–411.
128. **Plesa M, Kholti A, Vermis K, Vandamme P, Panagea S, Winstanley C, Cornelis P.** 2004. Conservation of the Outermembrane, opCL gene encoding the peptidoglycan-associated Burkholderia, lipoprotein among representatives of the cepacia complex. *J Med Microbiol* **53**:389–398.

129. **Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M, Plésiat P, Nordmann P.** 2009. Naturally occurring Class A ss-lactamases from the Burkholderia cepacia complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:876–82.
130. **Quinton PM.** 1999. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol. Rev.* **79**:S3–S22.
131. **Quinton PM.** 2007. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)* 212–25.
132. **Ramsey B RM.** 1992. Impact of sinusitis in cystic fibrosis. *Allergy Clin Immunol.* **90**:547–52.
133. **Ranieri E, Lewis BD, Gerace RL, Ryall RG, Morris CP, Nelson P V., Carey WF, Robertson EF.** 1994. Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience. *BMJ* **308**:1469–72.
134. **Ratjen F.** 2007. New pulmonary therapies for cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* **13**:541–546.
135. **Ratjen F, Rietschel E, Kasel D, Schwiertz R, Starke K, Beier H, Koningsbruggen S van, Grasemann H.** 2006. Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:306–311.
136. **Ratjen F, Döring G.** 2003. Cystic fibrosis. *Seminar* **361**:681–689.
137. **Renteria F, Orellano L, Palumbo M, Segal E.** 2008. ASOCIACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA, p. 14. *In* *Pediátrica*, SC de N (ed.), VII Congreso Latinoamericano de Neumología Pediátrica y XI Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística.
138. **Riordan, J. R., Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**:1066–73.
139. **Rodríguez VA.** 2010. Fibrosis quística en Argentina. *Neumologia Pediatrica* **5**:37–38.
140. **Rosenfeld M, Davis R, FitzSimmons S, Pepe M, Ramsey B.** 1997. Gender gap in cystic fibrosis mortality. *American journal of epidemiology* **145**:794–803.
141. **Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL.** 2003. Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* **9**:492–7.
142. **Rosenstein BJ, Zeitlin PL.** 1998. Cystic fibrosis. *Seminar* **351**.
143. **Rosenstein BJ, Cutting GR.** 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *THE JOURNAL OF PEDIATRICS* **132**:589–595.
144. **Rubenstein RC, Zeitlin PL.** 2000. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C259–267.
145. **Russell P.** 2011. *Biology : the dynamic science.* Belmont, CA.
146. **Römling U, Wingender J, Müller H, Tümmler B.** 1994. A major Pseudomonas aeruginosa clone common to patients and aquatic habitats. *Applied and environmental microbiology* **60**:1734–8.
147. **Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW.** 2007. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* **4**:406–417.
148. **Sajjan SU, Liu L, Lu A, Spilker T, Forstner J, LiPuma JJ.** 2002. Lack of cable pili expression by cblA-containing Burkholderia cepacia complex. *Microbiology (Reading, England)* **148**:3477–84.
149. **Sajjan SU, Forstner JF.** 1992. Identification of the mucinbinding From, adhesion of Pseudomonas cepacia isolated patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **60**:1434–1440.
150. **Sajjan U, Wu Y, Kent G, Forstner J.** 2000. Preferential To, adherence of cable-piliated Burkholderia cepacia Cystic, respiratory epithelia of CF knockout mice and human fibrosis lung explants. *J. Med. Microbiol.* **49**:875–885.
151. **Schwartz DC, Li X, Hernandez L, Ramnarain S, Huff E, Wang Y.** 1993. Ordered Restriction Maps of Saccharomyces Cerevisiae Chromosomes Constructed by Optical Mapping. *Science* **262**:110–114.
152. **Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G.** 1999. Differentiation of Burkholderia species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* **37**:2201–2208.
153. **Sheppard DN, Welsh MJ.** 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**:S23–45.
154. **Shimomura H.** 2003. Unusual interaction of a With, lipopolysaccharide isolated from Burkholderia cepacia polymyxin B. *Infect. Immun.* **71**:5225–5230.

155. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio D a, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson M V.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:8487–92.
156. **Speert D, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthalingam E.** 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis.* **8**:181–7.
157. **Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G.** 2003. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* **37**:S225–64.
158. **Sueblinvong V, Suratt BT, Weiss DJ.** 2007. Novel therapies for the treatment of cystic fibrosis: new developments in gene and stem cell therapy. *Clin Chest Med* **28**:361–379.
159. **Tablan OC.** 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization in Clinical, patients with cystic fibrosis: risk factors and outcome. *J. Pediatr.* **107**:382–387.
160. **Thelin WR, Boucher RC.** 2007. The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* **7**:290–295.
161. **Therrell BL, Lloyd-Puryear MA, Mann MY.** 2005. Understanding newborn screening system issues with emphasis on cystic fibrosis screening. *J Pediatr* **147**:S6–10.
162. **Tomich M, Herfst CA, Golden JW, Mohr CD.** 2002. Role *Cepacia.*, of flagella in host cell invasion by *Burkholderia*. *Infect. Immun.* **70**:1799–1806.
163. **Tomlin KL, Coll OP, Ceri H.** 2001. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia Cepacia*. *J. Microbiol.* **47**:949–954.
164. **Urban TA.** 2004. Contribution of *Burkholderia cenocepacia*, flagella to infectivity and inflammation. *Infect. Immun.* **72**:5126–5134.
165. **Vandamme P.** 1997. Occurrence of multiple genomovars of Proposal, *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and *Bacteriol.*, of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst.* **47**:1188–1200.
166. **Vandamme P, Dawyndt P.** 2011. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Systematic and applied microbiology* **34**:87–95.
167. **Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthalingam E, LiPuma JJ, Govan JRW.** 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Research in microbiology* **154**:91–6.
168. **Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthalingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P.** 2009. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**:102–11.
169. **Vanlaere E, Lipuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthalingam E, Speert D, Dowson C, Vandamme P.** 2008. *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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.
170. **Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G, Aguilar C.** 2004. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Microbiol.* **155**:238–244.
171. **Vinion-Dubiel AD, Goldberg JB.** 2003. Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of endotoxin research* **9**:201–13.
172. **Vinion-dubiel AD, Spilker T, Dean CR, Monteil H, Lipuma JJ, Goldberg JB.** 2004. Isolate Source within Species of the *Burkholderia cepacia* Complex Correlation of wbil Genotype , Serotype , and Isolate Source within Species of the *Burkholderia cepacia* Complex.
173. **Waine DJ, Henry D a, Baldwin A, Speert DP, Honeybourne D, Mahenthalingam E, Dowson CG.** 2007. Reliability of multilocus sequence typing of the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **6**:215–9.
174. **Waterer w. G, Jones CB, Wunderink RG.** 1999. Bacteremic community-acquired pneumonia in an immunocompetent adult due to *Burkholderia cepacia*. *Chest.* **116**:1842–1843.
175. **Wennberg C, Kucinskis V.** 1994. Low frequency of the delta F508 mutation in Finno-Ugrian and Baltic populations. *Hum Hered.* **44**:169–71.

176. **Whiteford M, Wilkinson J, McColl J, Conlon F, Michie J, Evans T.** 1995. Outcome of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* **50**:1194–1198.
177. **Winstanley C.** 2003. Improved flagellin genotyping in the Burkholderia cepacia complex. *FEMS Microbiology Letters* **229**:9–14.
178. **Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G.** 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of Clinical Investigation* **109**:317–325.
179. **Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ.** 2006. Simultaneous coinfection by multiple strains during Burkholderia cepacia complex infection in cystic fibrosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **54**:95–8.
180. **Yang JY, Brooks S, Meyer J a, Blakesley RR, Zelazny AM, Segre J a, Snitkin ES.** 2012. Pan-PCR, a computational method for designing bacterial-typing assays based on whole genome sequence data. *Journal of clinical microbiology*.



Capítulo II

Epidemiología del

complejo *Burkholderia cepacia*

INTRODUCCIÓN	58
OBJETIVOS	60
Objetivos específicos	60
MATERIALES Y MÉTODOS	61
2. Colección de microorganismos	61
2.2. Aislamiento y caracterización fenotípica de microorganismos pertenecientes al Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	62
2.2.1. Aislamiento	62
2.2.2. Pruebas de identificación fenotípica	63
2.2.2.1. Oxidación de Azúcares (Medio TSI)	63
2.2.2.2. Prueba de oxidación-fermentación (OF)	64
2.2.2.3. Prueba de la enzima citocromo oxidasa	65
2.2.2.4. Hemólisis	65
2.2.2.5. Catalasa	65
2.2.2.6. DNAsa	66
2.2.3 Identificación con el sistema VITEK 2 compact	66
2.2.4 Identificación con el sistema API 20NE	67
2.3. Técnicas Genéticas	67
2.3.1. Extracción de ADN genómico	67
2.3.2. Amplificación por PCR de los genes <i>recA</i> , <i>gyrB</i> y <i>lepA</i>	68
2.3.3. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	69
2.3.4. Análisis virtual del patrón de los productos de digestión producidos por la Enzima <i>HaeIII</i> del gen <i>gyrB</i> - (RFLP <i>in silico</i>)	70
2.3.5. Amplificación y secuenciación del gen <i>recA</i>	71
2.3.6. Identificación de microorganismos aplicando secuenciación de genes y alineamiento por BLAST	72
2.3.7. Análisis de relación filogenética	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
3.1. Caracterización e identificación fenotípica	76
3.2 . Caracterización e identificación genotípica	78
3.2.1. Aplicación de técnicas de RFLP para discriminación de especies del Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	78
3.2.1.1. PCR-RFLP del gen <i>recA</i> empleando <i>Hae III</i> como enzima de restricción	78
3.2.1.2. PCR-RFLP del gen <i>gyrB</i> empleando <i>HaeIII</i> como enzima de restricción	81
3. 2.2. Secuenciación de genes <i>recA</i> , <i>gyrB</i> y <i>lepA</i>	83
3.2.2.1. Determinación de la distribución de especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> .	83
3.2.3. Análisis filogenético del gen <i>recA</i>	85
3.2.4. Distribución temporal de las especies del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> en pacientes FQ	88
CONCLUSIONES	90
ANEXO	91
MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS.	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se ha reportado que cuatro especies o grupos de microorganismos son los principales colonizadores del pulmón de dichos pacientes: *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y miembros del Complejo *Burkholderia cepacia*. La presencia de miembros del Complejo *Burkholderia* en pacientes FQ tiene una gran relevancia clínica, ya que se asocia a deterioros pulmonares severos que pueden conducir a la muerte del paciente (41). Actualmente se definen el complejo *Burkholderia cepacia* como un grupo filogenético distinto dentro del género *Burkholderia* constituido por 17 especies estrechamente relacionadas (Tabla 1). Estos organismos son altamente resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados en la clínica (9), pueden transmitirse fácilmente entre pacientes (17), poseen la capacidad de invadir macrófagos y células epiteliales (39) y en algunos casos producen una neumonía necrotizante asociada a septicemia conocida como “síndrome cepacia” (25). Los miembros del Complejo *B. cepacia* han sido descritos como patógenos oportunistas en humanos, produciendo en diversas oportunidades devastadoras infecciones pulmonares no sólo en pacientes FQ sino también en individuos inmunocomprometidos (19).

Las infecciones pulmonares crónicas constituyen la principal causa de muerte de pacientes con fibrosis quística. En este sentido, las recomendaciones consensuadas de los centros de referencia mundial, están dirigidas a mejorar las metodologías de aislamiento, identificación y posterior determinación de susceptibilidad a antibióticos de los organismos aislados de muestras de esputo de estos pacientes (6). Estos centros de referencia aconsejan a los laboratorios donde se realizan los diagnósticos microbiológicos a que éstos implementen técnicas apropiadas para la discriminación de los organismos de cBc a nivel de especie. La identificación de las especies microbianas involucradas en este tipo de infecciones es de enorme importancia no sólo para el conocimiento de la epidemiología sino para la adopción de medidas dirigidas al control de infecciones. Sin embargo, en el caso particular de fibrosis quística, son ampliamente reconocidas las dificultades que existen para alcanzar una identificación certera en los laboratorios de análisis de rutina (6) (12)(18)(46). Generalmente los organismos que colonizan los pulmones de estos pacientes crecen en biofilms formando consorcios mixtos donde se ve favorecida la transmisión de material genético entre las bacterias. Este hecho hace que sea aún más compleja la identificación de aislamientos recuperados de muestras de esputo de pacientes FQ (30). A este contexto que muestra la dificultad de alcanzar una correcta identificación de organismos del cBc a nivel de complejo y especies, los laboratorios de microbiología de nuestro país han enfrentado dos inconvenientes

adicionales: i) la alta incidencia de organismos del cBc que ocurrió desde principios de 2004 debido al brote detectado en los principales hospitales y centros de Referencia FQ y ii) el hecho que la gran mayoría de los organismos circulantes en nuestro país poseen características fenotípicas y genotípicas que hasta año 2008-2009 no estuvieron descriptas en la bibliografía internacional.

Tabla 1. Especies descriptas para el Complejo *Burkholderia cepacia*.

Espece	Año de identificación y asignación
<i>B. cepacia</i>	1950, 1997
<i>B. multivorans</i>	1997
<i>B. cenocepacia</i>	1997, 2003
<i>B. stabilis</i>	1997, 2000
<i>B. vietnamiensis</i>	1995, 1997
<i>B. dolosa</i>	2001, 2004
<i>B. ambifaria</i>	2001
<i>B. anthina</i>	2002
<i>B. pyrrocinia</i>	2002
<i>B. ubonensis</i>	2000, 2008
<i>B. latens</i>	2008
<i>B. difusa</i>	2008
<i>B. arboris</i>	2008
<i>B. seminalis</i>	2008
<i>B. metálica</i>	2008
<i>B. contaminans</i>	2009
<i>B. lata</i>	2009

Debido a esta gran incertidumbres que producían estos acontecimientos en los profesionales del ámbito hospitalario, en los años 2004-2005, y a la gran necesidad de resolver los problemas de identificación, se acercó al CINDEFI, la jefa del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Niños de La Plata “Sor María Ludovica”, Bca. Blanca Gatti a fin de iniciar trabajos conjuntos tendientes a resolver la necesidad concreta de disponer de herramientas que permitiera alcanzar el diagnóstico microbiológico de estos organismos. Fue este entonces, el inicio de 8 años de un trabajo conjunto en el marco de diferentes proyectos de Extensión Universitaria de la Facultad de Ciencias Exactas y la Universidad Nacional de La Plata entre el CINDEFI y el Hospital Sor María Ludovica. En un principio el trabajo cooperativo llevó al desarrollo y/o optimización de diferentes técnicas fenotípicas como espectroscopia FT-IR y espectrometría de masas MALDI-TOF combinadas ambas con métodos multivariantes (4)(31). Posteriormente en el marco de este trabajo de Tesis se desarrollaron técnicas genotípicas y

fenotípicas aplicadas a la identificación de los microorganismos del complejo cBc. Los resultados logrados bajo este contexto en los últimos años podrán ser aplicados para responder importantes preguntas a cerca de la epidemiología local y regional, la diversidad de los organismos presentes en brotes de infección, en el estudio de los genotipos y fenotipos predominantes en las cepas circulantes locales y en estudios de evolución de las cepas en pacientes con infección crónica.

Objetivos

Definir el cuadro epidemiológico local en relación a la distribución de especies del Complejo *Burkholderia cepacia* en los aislados clínicos que producen infecciones pulmonares en pacientes fibroquísticos, no fibroquísticos y ambientales.

Objetivos específicos

1. Desarrollar metodologías genéticas y fenotípicas para la identificación y caracterización de microorganismos del complejo *Burkholderia cepacia* que permitan su discriminación a nivel de complejo y especie.
2. Estudiar la prevalencia temporal y geográfica de las especies del cBc en la población de aislamientos recuperados de pacientes FQ atendidos en diferentes regiones del país durante el periodo 2004-2012.
3. Analizar la diversidad genética de las especies del cBc empleando técnicas de PCR-RFLP y secuenciación de los genes *recA*, *gyrB*, y *lepA* y estudios de relaciones filogenéticas en los aislados del cBc recuperados de pacientes FQ, no FQ y ambientales.
4. Poner a disposición del sector hospitalario las metodologías desarrolladas, de manera que los laboratorios de microbiología de los hospitales puedan discriminar e identificar con precisión las especies del Complejo *Burkholderia cepacia*, en particular las de mayor prevalencia en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Colección de microorganismos

Para los estudios realizados en esta sección del trabajo de Tesis se emplearon más de 350 aislamientos clínicos y ambientales del Complejo *Burkholderia cepacia* (Tabla 2, al final del capítulo). Estos constituyen parte de la colección de microorganismos del Laboratorio N° 2 del CINDEFI recuperados de muestras de esputo de pacientes FQ, muestras de diferentes orígenes de pacientes no FQ y muestras ambientales:

- 284 aislamientos de pacientes FQ,
- 46 aislamientos provenientes de pacientes no FQ,
- 19 aislamientos ambientales,
- 18 cepas de referencias del género *Burkholderia*,
- 10 cepas de referencia de bacilos no fermentadores multi-resistentes de diferentes géneros utilizadas para completar las pruebas fenotípicas de discriminación entre.

Los aislamientos clínicos fueron recuperados de pacientes atendidos en diferentes hospitales públicos del país y centros de referencia de Fibroquísticos: Hospital de Niños de La Plata - Sor María Ludovica (HNLP), Hospital Gutiérrez de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, (HGz) Hospital de Clínicas de la UBA (HCBA), Hospital Santísima Trinidad de Córdoba (HST), Hospital Dr. Pedro Moguillanski, Cipoletti, Río Negro, (HNRN) y Hospital Garrahan (HG). Se define que un paciente tiene infección crónica si se aíslan organismos del cBc 3 veces consecutivas en el lapso de 6 meses (34). Si bien en este capítulo no se estudia en detalle aislamientos de infecciones crónicas, se diferenciarán los aislamientos de pacientes que presentan infección por una vez y los que tienen infección crónica.

Los aislamientos ambientales fueron obtenidos de contaminantes en productos industriales, domisanitarios, agua de uso farmacéutico y muestras de suelo. Parte de esta colección fue cedida por el Dr. José Degrossi, Cátedra de Higiene y Sanidad, Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA y otra parte por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica de Munich (NUM - Alemania).

La colección de cepas de referencia fue obtenida del cepario ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Berlín, Alemania; LMG: Laboratorium Microbiologie Gent Culture Collection, Gent, Belgica. En particular las cepas de referencia del Complejo *Burkholderia cepacia* fueron cedidas por Bca. Laura Galanternik del Hospital Gutiérrez, CABA.

Todos los aislamientos y cepas de referencia fueron conservados como liofilizados o a -70°C en glicerol y -20°C en leche descremada.

2.2. Aislamiento y caracterización fenotípica de microorganismos pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia*

El CINDEFI recibe los aislamientos clínicos provenientes de los hospitales donde se les ha realizado ya una identificación como miembros del Complejo *Burkholderia cepacia*. En los respectivos centros de salud se lleva a cabo el aislamiento en medios selectivos siguiendo las prácticas clínicas microbiológicas recomendadas para el aislamiento e identificación de muestras de especímenes respiratorios (8)(18). Sobre los aislados obtenidos se realizan métodos convencionales de identificación bioquímica ya sea por el sistema API 20NE o Vitek 2 (bioMérieux). En la mayoría de los casos, también se realizan ensayos bioquímicos adicionales que permiten su discriminación de otros Gram negativos multiresistentes (*B. cepacia*-like bacteria) (8)(18)(48) y las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos (técnica de difusión con discos en medio Mueller-Hinton) siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (33).

2.2.1. Aislamiento

Es conocido en los laboratorios que manejan organismos del cBc la gran dificultad que implica su almacenamiento. En algunos casos no es posible recuperar aislamientos que han sido almacenados aún a -80 C. En esos casos es necesario realizar siembras en los diferentes medios empleados en la rutina de aislamiento de organismos del cBc indicados en la Tabla 3 y cultivarlos bajo las condiciones especificadas en cada caso e incubados a 35-37 °C en aerobiosis de 2 a 7 días, dependiendo el medio de cultivo.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación empleados para el aislamiento de organismos de cBc.

Medio de Cultivo	EMB	AS	BCSA*
Tiempo de incubación	2 días	hasta 5 días	5 -7 días
Microorganismos seleccionados	Selectivo para Gram-negativos <i>Ps. aeruginosa</i> <i>St. maltophilia</i> <i>Achromobacter spp.</i> Complejo <i>B. cepacia</i> Otros BNF	<i>Ps. aeruginosa</i> <i>St. aureus</i> <i>St. pneumoniae</i> Otros bacilos no fermentadores	Complejo <i>B. cepacia</i> * Otros BNF resistentes a colistín Hongos

*En el Medio BCSA, las colonias de organismos del cBc dan color rosado, crema-amarillento algunos organismos viran el color del medio de cultivo al rosado.

2.2.2. Pruebas de identificación fenotípica

2.2.2.1. Oxidación de Azúcares (Medio TSI)

El medio de cultivo hierro-triple azúcar (TSI) permite determinar la capacidad de un microorganismo de degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico con o sin producción de gas y de ácido sulfhídrico (SH_2). El medio contiene tres azúcares: lactosa (1%), sacarosa (1%) y glucosa (0.1%) en una relación de 10:10:1 g/ litro, respectivamente (14)(21).

La degradación de azúcares con formación de productos ácidos es una prueba tradicional que se manifiesta por un cambio de color del indicador (rojo de fenol) que vira del naranja al amarillo o al rojo en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido a SH_2 que reacciona con la sal férrica produciendo S_3Fe_2 color negro. Para analizar vías de degradación de azúcares se emplean distintos monosacáridos contenidos en medios de cultivo preparados en tubos con medio en pico de flauta. Los monosacáridos son degradados por la vía glicolítica hasta ácido pirúvico y posteriormente son metabolizados siguiendo el ciclo de Krebs para dar CO_2 , H_2O y energía. La regeneración del NAD^+ se realiza mediante la cadena respiratoria con O_2 como último aceptor de electrones. En la zona recta del medio de cultivo, que posee baja concentración de O_2 , los monosacáridos también son metabolizados por la vía de la glicólisis hasta ácido pirúvico pero luego son convertidos en diversos productos finales estables como ácido láctico y/u otros ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes, CO_2 , H_2 y energía.

Siembra e incubación. A partir de un cultivo puro, se siembra en medio TSI, picando el fondo con un ansa recta y extendiendo sobre la superficie del medio. Los tubos se incuban a $35\text{-}37^\circ\text{C}$ durante 24 horas, en aerobiosis. En la Figura 1 se observa la interpretación de resultados.

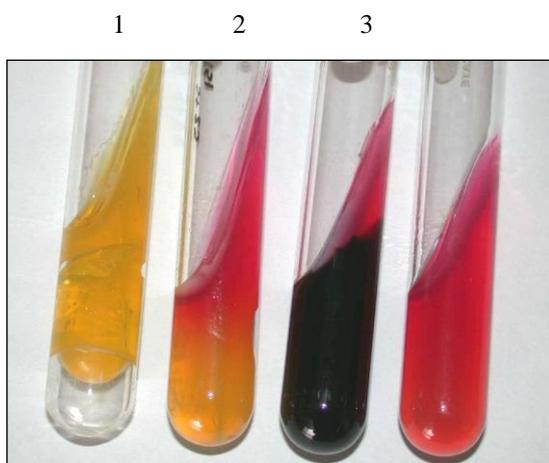


Figura 1. Tubos con medio TSI. 1- Pico ácido/fondo ácido (amarillo/amarillo): fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica producción de gas. 2- Pico alcalino/fondo ácido (rojo/amarillo): solamente fermenta la glucosa. 3-Pico alcalino/fondo alcalino (rojo/rojo): no fermentador de azúcares. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico. Para una correcta interpretación de esta prueba es muy importante realizar la lectura luego de 18 a 24 hs. Lecturas prematuras o demoradas podrán conducir a interpretaciones erróneas.

2.2.2.2. Prueba de oxidación-fermentación (OF)

Permite determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un microorganismo sobre un determinado hidrato de carbono. La fermentación es un proceso metabólico que no requiere O₂. Se caracteriza por la fosforilación inicial del hidrato de carbono (glucosa-6-fosfato) y requiere de un compuesto orgánico como aceptor final de electrones. Los procesos oxidativos son estrictamente aeróbicos. El proceso de oxidación directa del hidrato de carbono, que se da en el grupo fluorescente del género *Pseudomonas*, no requiere de la fosforilación inicial del azúcar. La glucosa se oxida a ácido glucónico o 2-cetoglucónico y posteriormente se fosforila y degrada a ácido pirúvico (21) (16).

Luego de esterilizar y enfriar a temperatura ambiente al medio base se le añade una solución del azúcar en agua destilada estéril para obtener una concentración final del 1%. El medio utilizado es un agar semi-blando, que permite evidenciar movilidad y reducir la difusión y dilución de los ácidos permitiendo su detección aún en pequeñas cantidades ya que posee una muy limitada capacidad buffer.

A partir de un cultivo puro de 24 hs se inoculan con ansa recta dos tubos del medio OF. Un tubo se inocula directamente ("*Tubo con O₂*"), y el otro es purgado previamente para eliminar el O₂ mediante el calentamiento a Baño de María durante 15 minutos, luego se enfría bajo canilla sin agitar y se siembra por punción. Inmediatamente se cubre con 1 cm de parafina o vaselina líquida estéril ("*Tubo sin O₂*"). Ambos tubos se incuban a 35°C durante 48 hs. Algunos microorganismos requieren hasta 2 semanas de incubación. La Interpretación de los resultados se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Pruebas de oxidación-fermentación

Tipo de metabolismo	"Tubo con O ₂ , abierto"	"Tubo sin O ₂ , cerrado"
Oxidativo	Acidez (amarillo)*	Neutro (verde)
Fermentativo	Acidez (amarillo)	Acidez (amarillo)
Fermentativo	Neutro (verde)	Acidez (amarillo)
Inerte**	Neutro (verde)	Neutro (verde)

* Si se produce poca cantidad de ácido, suele aparecer de color amarillo solo la superficie del agar. ** El microorganismo no metaboliza el carbohidrato o no es capaz de crecer en este medio

2.2.2.3. Prueba de la enzima citocromo oxidasa

Esta prueba permite determinar la presencia de la enzima citocromo c oxidasa presente, entre otros, en los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas*, y nos permite diferenciarlos del grupo oxidasa negativa de la familia *Enterobacteriaceae*.

Esta enzima actúa, en presencia de oxígeno, activando la oxidación del citocromo "reducido" de la cadena transportadora de electrones. Un sustrato artificial (reactivo) puede sustituir al dador natural (citocromo reducido) dentro de la cadena transportadora. Existen varios reactivos que pueden actuar como dadores artificiales de electrones, como ejemplo: indofenol, p-fenilendiamina. Estos reactivos al ser oxidados dan un producto coloreado de manera inmediata, indicando la presencia de la enzima (22).

Para la realización de la prueba, se prepara una suspensión concentrada del microorganismo en 0,2 ml de agua destilada (aproximadamente Nº 2 de la escala de Mac Farland). Colocar el disco (Britania, Argentina) en contacto con la suspensión, la aparición de color rosado en un lapso no mayor a 1 minuto indica la presencia de la enzima citocromo oxidasa positivo.

2.2.2.4. Hemólisis

Esta prueba está relacionada con la presencia de factores de virulencia llamados citolisinas que son capaces de formar poros en la membrana citoplasmática de diferentes células eucarióticas. Un sistema indicador adecuado lo constituyen los glóbulos rojos ya que la lisis de éstos (hemólisis) es fácilmente demostrable. Para la realización de la prueba, se incorpora sangre de oveja o carnero al 5% a un medio nutritivo sólido estéril, fundido y templado (55°C aproximadamente). Las placas se secan a 37°C y sobre la superficie se siembra el microorganismo en estudio y se incuba a 30°C por 24 horas. Al cabo del período de incubación se observa la presencia de un halo de hemólisis alrededor de la colonia. Los resultados se expresan como positivo o negativo (21).

2.2.2.5. Catalasa

Esta enzima es una hemo-proteína que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Uno de sus sustratos es el H₂O₂ que se forma durante la degradación de los azúcares. Este compuesto es tóxico si se acumula en la célula. Su descomposición puede producirse a través de dos enzimas, catalasa y peroxidasa (21).

La prueba se realiza a partir de un cultivo del microorganismo en caldo nutritivo, agregando unas gotas de agua oxigenada (concentración 10 Vol.) y observando la formación de burbujas. Es importante partir de cultivos libres de sangre ya que los glóbulos rojos contienen la enzima.

2.2.2.6. DNAsa

Esta prueba permite demostrar la presencia de la enzima DNAsa producida por los microorganismos, mediante la hidrólisis del DNA contenido en el medio de cultivo.

A partir de un cultivo de 24 hs se siembra la muestra de suspensión microbiana a testear con ansa en anillo en forma puntual (spot) sobre una placa de Petri conteniendo el medio tripticasa agar suplementado 2 gr DNA. Se pueden sembrar varios cultivos en una placa. Incubar durante 24 hs a 37°C. (32)(21)

Revelado e interpretación: Se revela cubriendo la placa con una solución de HCl 1N. El HCl provocará la lisis celular y la posterior precipitación del DNA intacto. Ensayo positivo: se observa una zona clara alrededor del spot -lisis del DNA- que contrasta con la turbidez del medio (el cultivo produce DNAsa). Ensayo negativo: ausencia de dicha zona clara (21).

2.2.3 Identificación con el sistema VITEK 2 compact

Se siguieron estrictamente los procedimientos recomendados por el fabricante. Se ajustó la suspensión bacteriana al estándar 0,6 de McFarland (rango 0,50-0,63) en 2,5 ml de solución de NaCl al 0,45 % con un densitómetro (bioMérieux). El tiempo entre la preparación de la suspensión y el llenado de la tarjeta fue inferior a 30 min. Para el control de calidad, se ensayaron semanalmente y en cada procesamiento de un lote nuevo de reactivos cinco cepas de referencia, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Los análisis se realizaron usando la tarjeta de VITEK 2 ID-GN. Para valorar la calidad de la identificación se tuvo en cuenta el porcentaje de probabilidad (ID %) que arrojó el sistema VITEK 2 compact. Dicho parámetro representa el nivel de comparación entre las reacciones observadas y las reacciones habituales de cada organismo. Mediante el empleo de este parámetro, los resultados de la identificación pudieron expresarse acompañados de un indicador de su calidad. Se calificó como ID excelente (E), ID muy buena (VG), ID buena (G) e ID aceptable (A) cuando los valores de concordancia fueron de 96-99 %, 93-95 %, 89-92 % y 85-88 %, respectivamente, y como ID de baja discriminación (LD) cuando el sistema suministró más

de un resultado de identificación (con lo cual el software sugiere la realización de pruebas adicionales). El sistema también prevé la categoría ID no definido o inconcluso (U).

2.2.4 Identificación con el sistema API 20NE

Se utilizó el sistema comercial API 20NE siguiendo las instrucciones del fabricante. La incubación se realizó durante 24 a 48 horas en aire a 37 °C. Luego de la lectura de las reacciones producidas, espontáneas o reveladas mediante la adición de reactivos, se llevó a cabo el registro manual de los datos para su posterior incorporación al software APIWEB (bioMérieux). Los resultados obtenidos fueron informados de acuerdo a los criterios establecidos por el fabricante, considerando un resultado como válido cuando el porcentaje de identificación fue de al menos 90 %. Los resultados de identificación se clasificaron en las siguientes categorías de calidad: excelente (E), muy buena (MB), muy buena ID de género (MBG), buena (B), buena ID de género (BG), aceptable (A), baja discriminación (BD), dudosa (D) e inaceptable (I).

2.3. Técnicas Genéticas

2.3.1. Extracción de ADN genómico

El ADN se preparó según el protocolo modificado de Sambrook (40). A partir de un cultivo de 24hs en Agar Trypticase Soja (ATS, Oxoid) incubado a 37 °C se tomaron colonias individuales y se resuspendieron en 100µl de sarcosil al 0,1%. Luego de centrifugar se resuspendió el sedimento en NaCl, se vortexeó y volvió a centrifugar. La lisis enzimática se logró resuspendiendo el pellet en 250µl de sacarosa al 20% en TE (Tris-Base 0,1%, EDTA 0,1%) y 250µl de lizozima (5mg/ml) (Sigma, USA) en TE. Luego de incubar a 37°C por 60 minutos se agregó sarcosil 5% y se mezcló por inversión; nuevamente se incubó a 37°C por una hora. Luego se agregaron 70µl de sílica 5%, se incubó por 10 a 15 minutos, se resuspendió y se centrifugó 1 minuto a 5000 r.p.m. El sedimento se lavó tres veces con solución de lavado (TE, Etanol 25% y NaCl 1M) y se dejó secar a temperatura ambiente por treinta minutos. Se resuspendió el sedimento en agua destilada estéril (70µl) y se incubó a 65°C por quince minutos. Finalmente se vortexeó y centrifugó en caliente para desprender el vidrio y se pasó el sobrenadante -conteniendo el DNA- a un tubo nuevo. La concentración de DNA se obtuvo midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm a través del espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) (Figura 2). Las extracciones fueron almacenadas a -20 °C o utilizadas inmediatamente.

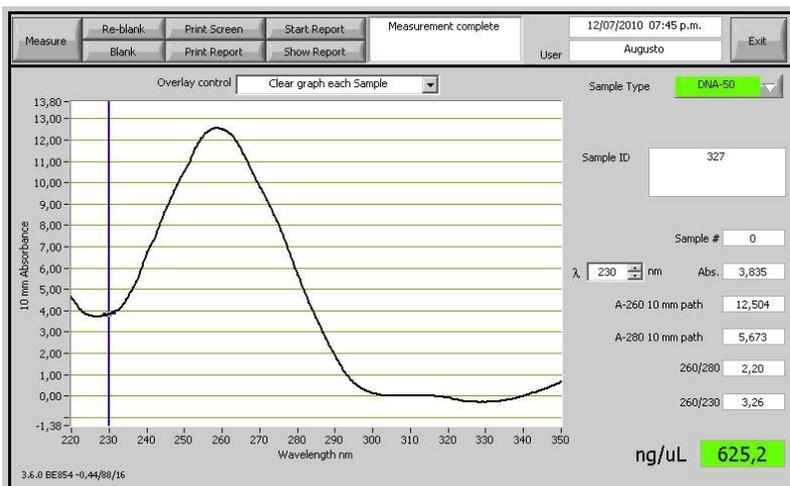


Figura 2. Interfase del software NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). A modo de ilustración, se observa la concentración y pureza de ADN que se obtiene mediante la técnica empleada.

2.3.2. Amplificación por PCR de los genes *recA*, *gyrB* y *lepA*

Se aisló el ADN genómico total, como se describió anteriormente, y luego se llevó a cabo la amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el par de cebadores que hibridan con el extremo 5' y el 3' del locus del gen correspondiente (Tabla 5) (26).

Tabla 5: Cebadores específicos utilizados en identificación de aislados del cBc.

Gen	Secuencia	Tamaño	Referencia
Amplificación			
<i>recA</i>	Fw-1 (<i>recA</i> -1)	5' - GATAGCAAGAAGGGCTCC -3'	1.041 pb (3)
	Rv-2(<i>recA</i> -2)	5' - CTCTTCTTCGTCATCGCCTC -3'	
<i>gyrB</i>	Fw-1	5' - CGACAACTCGATCGACGA - 3'	1.900 pb (3)(44)
	Rv-2	5' - CGGATCCATSGTSGTTTCC - 3'	
<i>lepA</i>	Fw-1	5' - GGCATCAAGGAACTGACG - 3'	700 pb (3)
	Rv-2	5' - CGTGAAGGTCGACATGCT - 3'	
Secuenciación			
<i>recA</i>	Fw-1 (<i>recA</i> -3)	5' - TGACCGCCGAGAAGAGCAA -3'	(3)
	Rv-2 (<i>recA</i> -4)	5' - GACCGAGTCGATGACGAT - 3'	
<i>gyrB</i>	Fw-1	5' - CGACAACTCGATCGACGA - 3'	(3)
	Rv-2	5' - GACAGCAGCTTGTCGTAG -3'	
<i>lepA</i>	Fw-1	5' - GGCATCAAGGAACTGACG - 3'	(3)
	Rv-2	5' - CGTGAAGGTCGACATGCT - 3'	

A un volumen final de 25µl conteniendo 5µl de DNA molde (5-20ng/µl); se le adicionan 2,0µl del primer forward (10 pmol/µl); 2,0µl del primer reverse (10 pmol/µl); 5,0µl de Buffer PCR 5X (Quiagen); 2,5µl de dNTPs (Quiagen, 10mM por cada uno de los nucleótidos); 0,15µl de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen Brasil 5U/µl) y 8,25µl de agua destilada. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por un minuto; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos; *annealing* de los *primers* a 58°C por 1 minuto; extensión a 72°C por 2 minutos; una extensión final de 5 minutos a 72°C se aplicó a todos los ciclos térmicos. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *My Cycler Thermal Cycler* (BIO-RAD, USA). Los productos de PCR se resolvieron empleando geles de agarosa al 1% suplementados con bromuro de etidio (5mg/ml). La visualización de una banda única en cada caso permite la asignación del aislado al CBc.

2.3.3. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica de RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*). “polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción” (37) se basa en emplear secuencias específicas de nucleótidos en el DNA que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos. Sobre los fragmentos o genes amplificados obtenidos usando la técnica de PCR se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción *BsuRI* (Fermentas), también denominada *HaeIII* (Promega). Los perfiles de fragmentos de restricción obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa y comparados con aquellos que se obtuvieron empleando cepas de referencia en nuestro laboratorio o con perfiles reportados previamente en bibliografía (11)(7)(26). El procedimiento y las características de la reacción de PCR-RFLP empleando se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Características y condiciones de reacción para el empleo de la enzima de restricción *BsuRI*- *Hae III*.

Secuencia de reconocimiento	Mezcla de reacción	Condiciones de reacción
	H ₂ O dest. Est. 4 µl	-Incubación 2h a 37 °C.
	Buffer C* 4 µl	-Electroforesis en gel de
5'- G G - C C - 3'	BSA 10X 1 µl	agarosa al 2% suplementado
3' - C C G G - 5'	Producto PCR 20 µl	con bromuro de etidio
	Hae III 1,5 µl	(5mg/ml).

2.3.4. Análisis virtual del patrón de los productos de digestión producidos por la Enzima *HaeIII* del gen *gyrB* - (RFLP *in silico*)

Se evaluó del potencial de la técnica de PCR-RFLP-*HaeIII* sobre el gen *gyrB* como una herramienta complementaria para confirmar la identificación a nivel de especie en ciertos aislados pertenecientes al cBc cuya identificación resulta incierta empleando otras técnicas moleculares. El procedimiento consiste en examinar de manera virtual los productos de la aplicación RFLP-*gyrB-HaeIII* mediante el programa informático NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Este programa trabaja con una secuencia del gen a analizar, que puede provenir de un archivo local o un archivo reportado del NCBI Genbank. Dicho programa calcula todos los marcos de lectura abiertos (ORFs) y muestra las enzimas de restricción que podrían ser utilizadas para escindir cada ORFs hallado y generar corridas electroforéticas en geles con distinta concentración y composición. Finalmente, en los geles se observará la longitud de los fragmentos generados por los cortes de la enzima y una imagen hipotética del patrón de bandas observado en determinada condición de trabajo.

En nuestro esquema, el amplicón del gen *gyrB* es obtenido a partir de una región delimitada por el cebador forward (Fwd) del *gyrB* del esquema MLST (<http://pubmlst.org/bcc/>) y el reverse (Rvs) pc9r previamente descrito por Tabacchioni y colegas (44). Las Figuras 3 muestra los sitios de cortes para la secuencias del gen *gyrB* para *B. cenocepacia* y *B. lata*, mientras que en la Figura 4 se puede observar el tamaño de los fragmentos cortados y su resolución en un gel de agarosa al 2%.

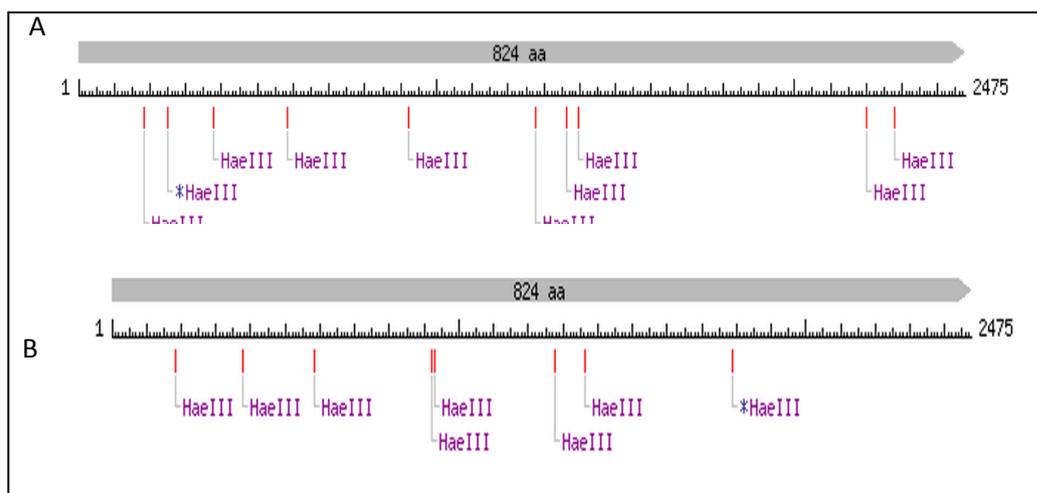


Figura 3. Se indican los sitios de cortes con la enzima de restricción *HaeIII* sobre la secuencia nucleotídica del gen *gyrB* depositada en el GenBank obtenido de A) cepa *B. cenocepacia* J2315 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Imagen tomada de B) la cepa *B. lata* 383 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Imagen tomada de <http://tools.neb.com/NEBcutter2/showdig.php?>

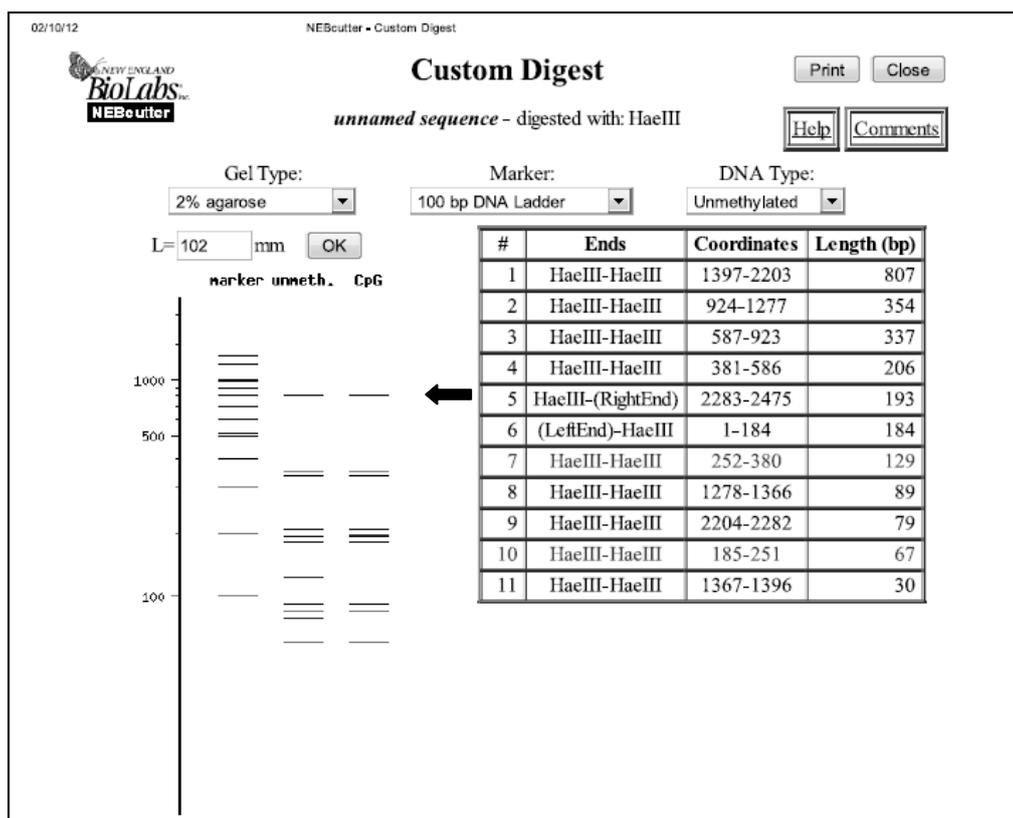


Figura 4. Perfil PCR- RFLP para el gen *gyrB* de la cepa *B. cenocepacia* J2315 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/showdig.php?>). La flecha indica la banda 800 pb.

2.3.5. Amplificación y secuenciación del gen *recA*

La amplificación positiva del gen *recA* con los cebadores *recA*-1 y *recA*-2 (Tabla 5) fue empleada para identificar un aislamiento como miembro del Complejo *B. cepacia*. Estos cebadores específicos descritos inicialmente por el grupo del Dr. Mahenthalingam y colaboradores (36) generan un producto de PCR de 1.041pb. La secuencia de estos 1041 pb se utilizó para llevar a cabo la identificación de organismos del cBc a nivel de especie contrastando por BLAST con las secuencias depositadas en el GeneBank. La secuencia del fragmento de 393 pb al inicio del gen (Figura 4), obtenida con los cebadores *recA*-3 y *recA*-4 (Tabla 2) fue empleada para la identificación de los organismos del cBc a nivel de especie y cepa (tipo de secuencia ST) mediante su comparación con las secuencias depositadas en la base del MLST (3). Los fragmentos de 1041 pb fueron purificados utilizando el kit de purificación *QUIAquick PCR purification kit* (Quiagen Inc. CA, USA) y secuenciados sobre ambas hebras usando los cebadores *recA*-3 y *recA*-4 (Tabla 2) por medio de la reacción de secuenciación cíclica con el Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) llevada a cabo en Macrogen Inc. Seúl, Korea. En la Figura 5 se

indican las regiones del gen *recA* empleadas para los diferentes propósitos (amplificación, secuenciación, identificación a nivel del complejo, de especie y de cepa).

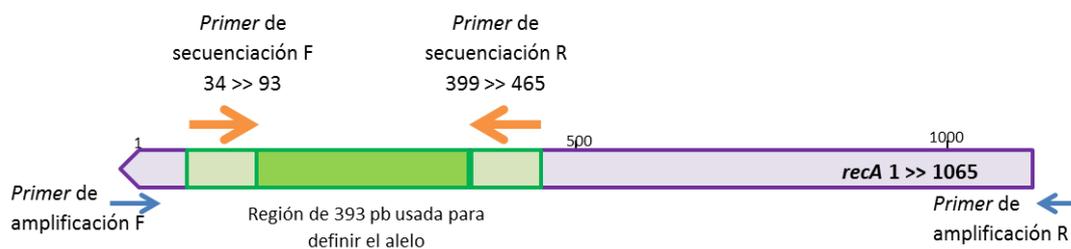


Figura 5: Esquema de aplicación del gen *recA* para la identificación de organismos del cBc. Se indica con flechas celestes los cebadores de amplificación descritos (RecA 1 y RecA 2) para la identificación a nivel de complejo *Burkholderia cepacia* y a nivel de especie del complejo por contraste de secuencias por BLAST con el GeneBank. Con flechas naranja se indican los cebadores de secuenciación (RecA 3 y RecA 4) para la identificación a nivel de ST por contraste con las secuencias del MLST.

2.3.6. Identificación de microorganismos aplicando secuenciación de genes y alineamiento por BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren depositadas una base de datos. Un algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. Es importante mencionar que BLAST usa un algoritmo heurístico por lo que no nos puede garantizar que ha encontrado la solución correcta. Sin embargo, el programa BLAST es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro estadístico para juzgar los resultados que se obtienen (Figura 6).

Normalmente el programa BLAST es usado para encontrar probables genes homólogos. Por lo general, ante una cepa desconocida, se amplifica y secuencia el gen *recA*, se comparara la secuencia contra otras secuencias que han sido previamente caracterizadas. La Figura 5 muestra el resultado de un alineamiento de una secuencia de bases del gen *recA* obtenida de un aislado identificado como cBc (42).

2.3.7. Análisis de relación filogenética

MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) es un paquete informático que ha sido desarrollado para la estimación de distancias evolutivas y la reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de alineamiento de secuencias. El paquete incluye varios métodos para la estimación de distancias evolutivas de datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, tres diferentes métodos de inferencia filogenética (UPGMA, NJ - Neighbor-Joining- y máxima parsimonia) y dos pruebas estadísticas de diferencias topológicas. Además, MEGA calcula cantidades estadísticas tales como las frecuencias de nucleótidos y aminoácidos, sesgos de transición / transversión, frecuencias de codones (tablas de uso de codones), y el número de sitios variables en segmentos específicos en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (<http://www.megasoftware.net>) (45) (Figura 7).

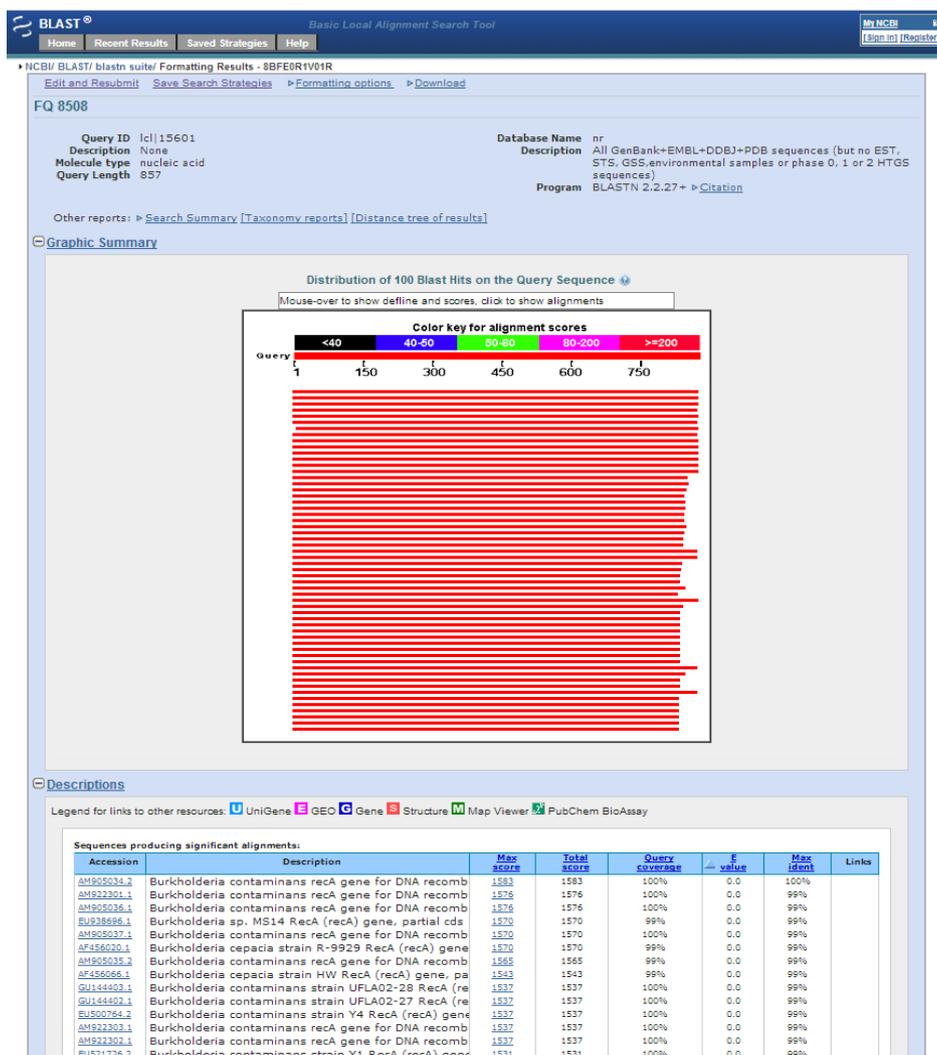


Figura 6. Interfase del sitio Web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Se observa el resultado de identificación alcanzado por el alineamiento de secuencias de

bases del gen *recA* de la base de datos contra una secuencia obtenida a partir de la amplificación del gen *recA* de un aislamiento de una muestra de esputo de paciente FQ.

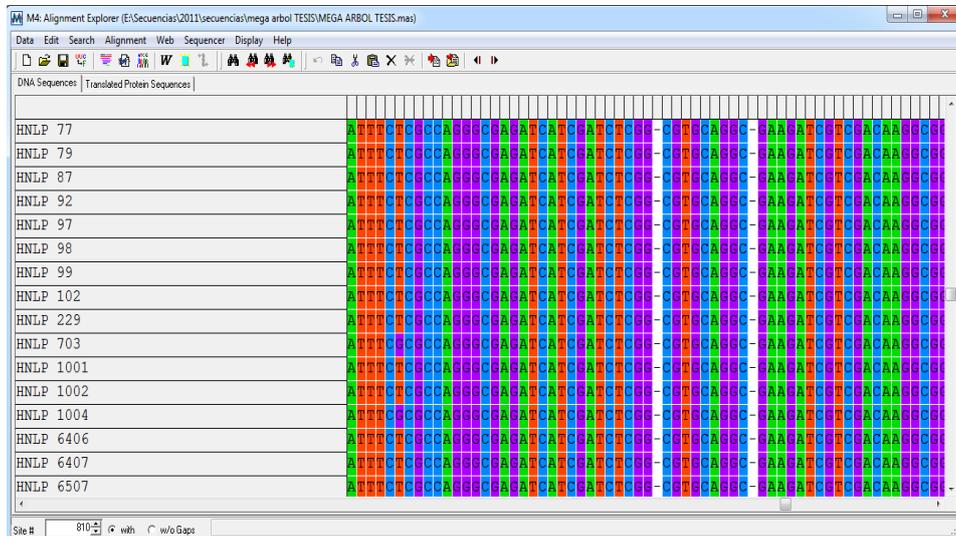


Figura 7. Interface del programa MEGA. Se observa el resultado para el alineamiento de secuencia de bases del gen *recA* de diferentes aislamientos hospitalarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Argentina, los primeros reportes de aislamientos de organismos del cBc recuperados de pacientes con FQ comenzaron alrededor de 1990. En ese momento, en forma esporádica y con una prevalencia muy baja (<0,1%), se detectaban microorganismos Gram-negativos a los que sólo podía asignarse al género *Burkholderia* spp. El número de de estos organismos aislados comenzó a aumentar durante la última década con valores de 0,2 hasta 3,6% dependiendo del centro médico. A principios de 2004, cuando surge el brote de organismos del cBc en un gran número de centros de atención hospitalaria, la proporción de pacientes de los que se aislaban diferentes organismos del cBc oscilaba entre 19 y 36% (dependiendo del centro médico) (4)(20)(30). En la actualidad, debido a la aplicación de estrictos procedimientos de control para prevenir las infecciones, la incidencia de *Burkholderia* spp. en estos pacientes se redujo a aproximadamente a un 10%.

La Figura 8 resume las características de la población de pacientes FQ y no-FQ analizada en esta sección. Todos los aislados (284 recuperado de esputo de pacientes FQ, 46 recuperados de sangre o heridas y 18 ambientales) fueron recuperados en el período 2004-2012, la población FQ analizada de total de 92 pacientes, consistió en un 86% de pacientes pediátricos (hasta 18 años) y un 14% fueron adultos. En la población FQ pediátrica en el 47% de los casos desarrolla infecciones crónicas, mientras que en el 53% restante las infecciones fueron resueltas de manera satisfactoria (o los pacientes dejaron de concurrir a estos centros de atención. En relación al sexo de los pacientes, fue sólo ligeramente superior las infecciones respiratorias en niñas que en niños. La edad en el momento del primer aislamiento cBc ocurrió entre unos pocos meses de vida y los 14 años de edad, con una edad media estimada de 7 años.

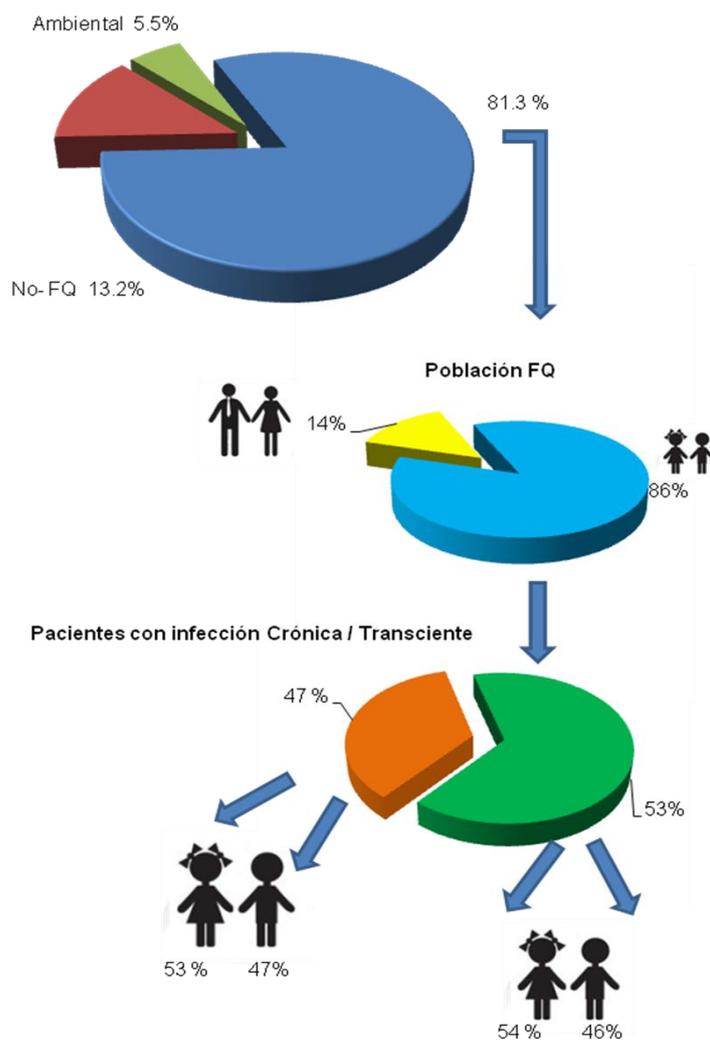


Figura 8. Distribución de los aislamientos del complejo *B. cepacia* entre la población de pacientes FQ y no-FQ (sobre un total de 349 aislamientos).

3.1. Caracterización e identificación fenotípica

Como se mencionó anteriormente las técnicas bioquímicas empleadas de rutina para la caracterización e identificación de microorganismos aislados de pacientes fibroquísticos arrojan resultados que pueden tener diferente grado de incertidumbre. Los pacientes fibroquísticos son particularmente susceptibles a contraer infecciones pulmonares con microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, otras especies bacterianas Gram-negativas no-fermentadoras, tales como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Pandoraea spp.* (29). A pesar que la frecuencia de infección con estas especies es relativamente baja y su significado clínico aún no está aclarado, todas ellas presentan un importante desafío para el diagnóstico de laboratorio ya que son difíciles de identificar y a menudo se las confunde con organismos del cBc (*B. cepacia-like bacteria*)(29).

A fin de avanzar en el conocimiento de las características fenotípicas de la población circulante de organismos del cBc en nuestro país se realizó un estudio sobre propiedades

fenotípicas de una subpoblación de 50 aislamientos tomados aleatoriamente de muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística. Los aislados habían sido previamente identificados como bacterias pertenecientes al cBc en los hospitales

En este *screening* analizamos la proporción de esta subpoblación que mostraba las características fenotípicas que caracterizan a los organismos del complejo según la bibliografía internacional: producción de pigmentación en colonias crecidas en agar Mueller-Hinton, movilidad, algunas características metabólicas como la expresión de oxidasa, lisina descarboxilasa (LDC), esculina, DNAsa, oxidación de azúcares, ONPG y la sensibilidad a la gentamicina y colistina. Los resultados obtenidos de todas estas pruebas se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Pruebas bioquímicas para aislados clínicos identificados como pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*.

Prueba bioquímica (n=35)	Nº de aislamientos positivos	% de positividad
Movilidad	46	91
Oxidasa	50	100
DNAsa	5	10
Bilis esculina	25	50
Hemólisis	29	57
LDC	49	97
ONPG	49	97
Oxidación de :		
Manitol	47	94
Xilosa	49	97
Lactosa	47	94
Glucosa	50	100
Pigmento amarillo-verde	20	40
Pigmento rosa	2	4
Pigmento rojo	2	4
Resistencia a colistina ⁽¹⁾	49	97
Resistencia a gentamicina ⁽¹⁾	46	91

⁽¹⁾Método de difusión en agar con discos según normas CLSI para *P. aeruginosa*

La caracterización fenotípica de las especies del CBC es dificultosa, aun con un panel extendido de pruebas bioquímicas manuales. En síntesis, ante un BGNNF

oxidasa positivo de reacción lenta, DNasa negativo y que oxida la glucosa, el manitol y descarboxila la lisina, debemos pensar en la asignación de dicho aislado a un organismo miembro del CBC.

Entre los métodos de identificación en la actualidad, existen disponibles varios kits comerciales que censan simultáneamente diversas características metabólicas, los cuales pueden ser clasificados en manuales como API 20 NE (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) y en semi o completamente automatizados como VITEK (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia). Junto al personal del servicio de Bacteriología nosotros pusimos de manifiesto la confiabilidad y sensibilidad de los sistemas comerciales API 20NE y VITEK 2 compact automatizado.

La identificación por el sistema automatizado VITEK 2 compact presentó una S de 71,1 % (IC = 56,6; 85,5 %) y una E de 100 %. En cuanto a la identificación empleando el sistema API 20NE arrojó para las 73 muestras analizadas valores promedio de S del 69,7 %, (IC = 54; 85,4 %) y de E del 90,2 % (IC = 81,2; 99,3 %).

Los resultados obtenidos con el sistema VITEK 2 compact demuestran que dicho método constituye una herramienta confiable en la identificación de organismos pertenecientes al CBC, ya que no mostró resultados falso-positivos (tablas no se presentan) (35). Sin embargo, ante la sospecha de un BGNNF con características de CBC, se debe tener en cuenta la posibilidad de falso-negativos que pueden requerir pruebas adicionales para su identificación. Nuestros resultados, basados en el análisis de 33 aislados clínicos CBC positivos y 40 aislados clínicos CBC negativos, demostraron que el sistema de identificación API 20NE no resulta ser un sistema confiable para el reconocimiento de organismos del CBC, por lo que sus resultados deberían ser tomados con precaución.

3.2 . Caracterización e identificación genotípica

3.2.1. Aplicación de técnicas de RFLP para discriminación de especies del Complejo

Burkholderia cepacia

3.2.1.1. PCR-RFLP del gen *recA* empleando *Hae III* como enzima de restricción

El gen *recA* del complejo *Burkholderia cepacia*, codificante para la proteína RecA es esencial en la maquinaria para la reparación y recombinación del ADN. Trabajos previos habían demostrado su utilidad en la discriminación de aislamientos del cBc de otros géneros de bacterias relacionadas y en la discriminación de los 9 genomovares del cBc descritos hasta el 2008 (Tabla 1)(26)(36). Luego de la amplificación del gen con los cebadores indicados en la

Tabla 5, se llevó a cabo la digestión con la enzima de restricción *HaeIII* para obtener los patrones de corte. Este análisis se realizó sobre 162 aislados del cBc disponibles en nuestra colección, entre los cuales se consideraron aislados recuperados de pacientes FQ, no-FQ y ambientales.

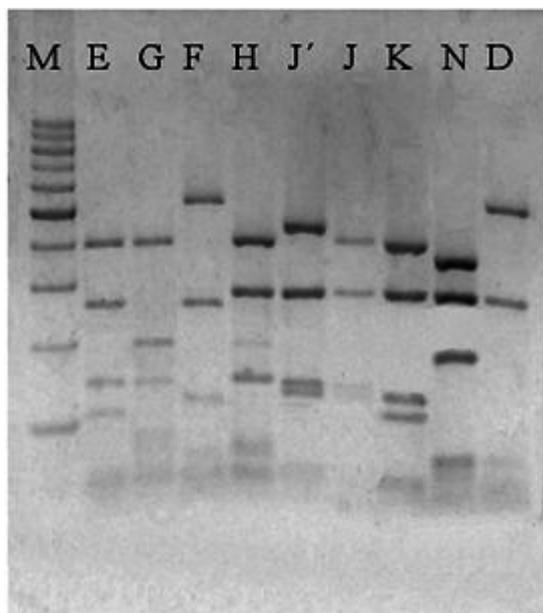


Figura 9: Patrones de restricción obtenidos por PCR-RFLP-*recA* con la enzima de restricción *HaeIII*. Perfiles observados en cepas de referencia *B. cepacia* (E, G), *B. multivorans* (F), *B. cenocepacia* (H y J'), *B. stabilis* (J), *B. contaminans* (K), *B. ambifaria* (N) y *B. dolosa* (D). Patrón de Peso molecular (M).

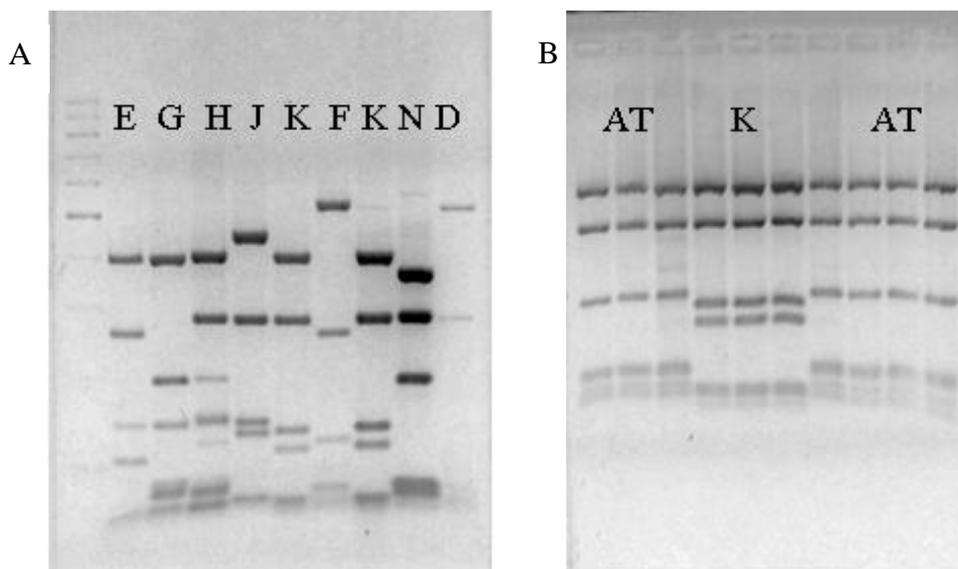


Figura 10. Patrones de restricción obtenidos por PCR-RFLP-*recA* con la enzima de restricción *HaeIII*. A) Perfiles observados en aislados analizados. *B. cepacia* (E, G), *B. multivorans* (F), *B. cenocepacia* (H) y *B. stabilis* (J). B) *B. contaminans* y *B. lata* (K, AT).

Como resultado del este análisis, se encontraron 11 patrones de restricción diferentes, que al ser contrastados contra los perfiles obtenidos para cepas de referencia (Figura 9) y/o perfiles descritos en bibliografía (10)(26)(47), permitieron identificar las siguientes especies: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria*, *B. seminalis*, *B. lata* y *B. contaminans* (Figura 10). Los patrones de corte encontrados para la enzima de restricción *HaeIII* están, en su mayoría dentro de los reportados previamente para las especies del cBc. Es interesante notar el patrón J, que no había sido reportado previamente para la especie *B. contaminans* se presentó en esta población con una proporción de 1,5% (Tabla 8).

Tabla 8. Patrones RFLP-*recA-HaeIII* observados en los aislados analizados.

Especies	Patrón	% de cada RFLP
<i>B. cepacia</i>	D	5
	E	95
<i>B. multivorans</i>	F	100
<i>B. cenocepacia</i>	G	6
	H	85
	J	9
<i>B. stabilis</i>	J	100
<i>B. vietnamiensis</i>	A	90
	B	10
<i>B. ambifaria</i>	N	100
<i>B. dolosa</i>	n.a.	-
<i>B. anthinia</i>	n.d.	-
<i>B. seminales</i>	H	100
<i>B. contaminans</i>	K	89.5
	AT	9
	J	1.5
<i>B. lata</i>	K	100
Otro cBc	n.i.	-

n.a., no asignado; n.d., no determinado; n.i., no identificado, %, porcentaje en cada especie. La asignación de especie fue obtenida por secuenciación del gen *recA*.

A partir de los datos indicados en la Tabla 8 se puede observar que esta metodología resulta muy práctica, rápida y sencilla para discriminar un gran número de especies del cBc. Sin embargo para algunas especies presenta perfiles superpuestos. Estos son los casos de *B. cenocepacia* y *B. stabilis* que comparten el perfil J, o *B. contaminans* y *B. lata* que comparten el

perfil K. Asimismo el perfil K es muy similar al J, lo cual podría llevar a confusión a un observador no experto si no se corren simultáneamente en el mismo gel.

3.2.1.2. PCR-RFLP del gen *gyrB* empleando *HaeIII* como enzima de restricción

Anteriormente, se mencionó que para evaluar la utilidad potencial del gen *gyrB* como herramienta adicional para alcanzar la discriminación de las especies que no podían ser diferenciadas o de diferenciación confusa a través de PCR-RFLP-*recA-HaeIII*, se examinaron los perfiles virtuales obtenidos por PCR-RFLP-*gyrB-HaeIII* mediante el programa informático NEBcutter V2.0. Los resultados indicaron, que a través de este corte virtual del gen *gyrB* los organismos pertenecientes a la especie *B. cenocepacia* y *B. stabilis* que comparten el patrón J por PCR-RFLP-*recA*, podrían discriminarse a través de un fragmento de 800 pb que presenta *B. cenocepacia* y no *B. stabilis* (ver explicación en la sección de Metodología). Para comprobar si este fragmento podía emplearse como criterio de discriminación entre estas especies, se analizaron virtualmente 15 secuencias del gen *gyrB* correspondientes a aislados identificados previamente como *B. cenocepacia* y *B. stabilis* por Tabaccioni y colaboradores (44), cuyas claves de acceso se encuentran depositadas en GenBank.

Por ser *B. contaminans* y *B. lata* especies recientemente caracterizadas (47), y no se han depositado aún secuencias completas del gen *gyrB* en las diferentes bases de datos, sobre las que se pudieran predecir los patrones virtuales de RFLP-*gyrB-HaeIII*. A excepción de la cepa *B. lata* 383, la cual posee el genoma secuenciado (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Para el caso de las especies *B. contaminans* y *B. lata* se dispone de secuencias del gen *gyrB* depositadas en la base de datos del MLST (<http://pubmlst.org/bcc/>), pero estas constituyen secuencias parciales (sólo una longitud aproximada de 400 pb) que constituyen las que permiten su asignación a diferentes ST (Sequence Type) o alelos al gen. De modo que estas secuencias resultaron poco útiles para el corte virtual de secuencias ya que se realiza una subestimación de la diversidad de patrones que pudieran obtenerse al procesar secuencias completas de aproximadamente 1,9 Kpb. Por esta razón se seleccionaron al azar 40 aislados de *B. contaminans* y 2 de *B. lata*, identificadas previamente en nuestro laboratorio por secuenciación completa del gen *recA*, sobre los cuales se evaluó la diversidad de perfiles RFLP-*gyrB-HaeIII*. Se obtuvieron 7 distintos patrones para la especie *B. contaminans*, que se observan en la Figura 11, a los cuales les asignamos nombres con letras del alfabeto “a” a “g”. Siendo los patrones “a” y “b” igualmente abundante los más representados (70%), “c” caracterizado en 6 aislados (15%), “d” y “e” con 2 y 3 aislados cada uno (12,5%) y “f” con un único aislado (2,5%). En cuanto a *B. lata* presentó el patrón “g”, fácilmente distinguible de los demás patrones observados para *B. contaminans* o las otras especies de cBc aquí analizadas.

Sin embargo, este resultado no debe tomarse como criterio de discriminación debido al escaso número de aislamientos de *B. lata* analizados.

Es de destacar que el único aislamiento que mostró el patrón *f* identificado como *B. contaminans*, que presenta por PCR-RFLP-*gyrB*-*HaeIII* una banda de aproximadamente 800 pb, podría llegar a confundirse con los observado para *B. cenocepacia*. Esto último resultó un caso interesante, ya que este patrón que denominamos "*f*" observado en el aislamiento CBC 179, resultó idéntico al patrón obtenido para el aislamiento CBC 165 de la especie *B. cenocepacia*. Más aún, resulta interesante considerar el hecho que ambos aislamientos provienen de distintos pacientes pero fueron atendidos en el mismo período de tiempo en el mismo centro clínico. Las especies del cBc poseen varias características genómicas, que hacen que su variabilidad genética dependa principalmente de la recombinación mediante el intercambio genético (27), y esto ha sido reportado tanto dentro de una misma especie como entre especies (2).

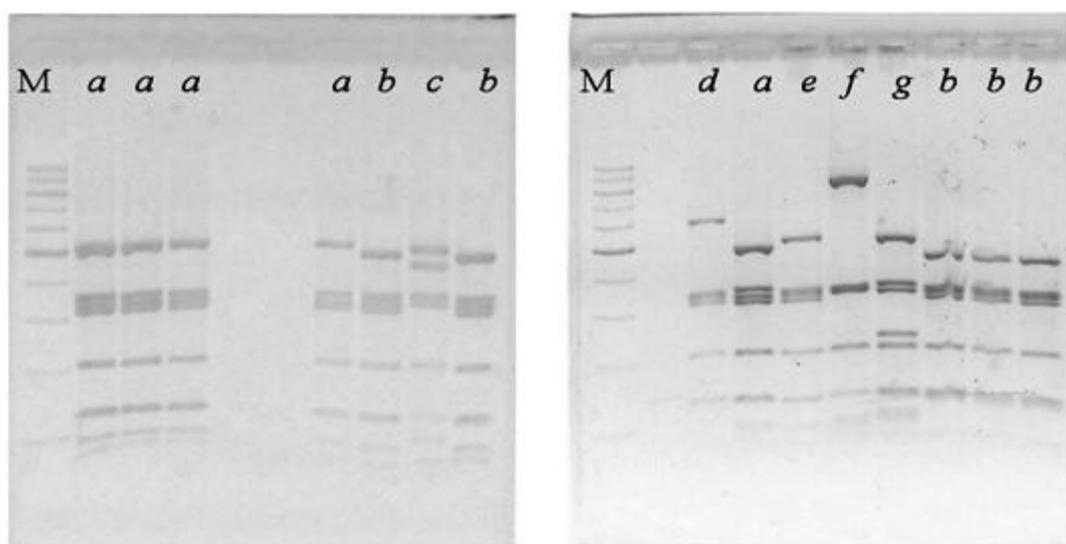


Figura 11. Patrones de restricción obtenidos por PCR-RFLP-*gyrB* con la enzima de restricción *HaeIII*. Perfiles observados en aislados de *B. contaminans*. (M) corresponde al patrón de peso molecular.

Cabe mencionar que si bien se reportó en bibliografía el empleo del análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen de 1800pb como herramienta para discriminar las especies del cBc (44), y que el gen *gyrB* ha sido seleccionado para el desarrollo del esquema del MLST (3), no se ha empleado, hasta nuestro conocimiento la técnica de PCR- RFLP- *gyrB* *Hae III* como alternativa sencilla de discriminación de especies del cBc.

3. 2.2. Secuenciación de genes *recA*, *gyrB* y *lepA*

3.2.2.1. Determinación de la distribución de especies del complejo *Burkholderia cepacia*.

Teniendo en cuenta que a partir del año 2008 se consideró como una alternativa certera para la identificación de los organismos del cBc a nivel de especie disponer de por lo menos la secuencia del gen *recA* del esquema del MLST (24), empleamos este criterio para confirmar la identificación los aislados a nivel de especie. Para ciertos aislados, el resultado de identificación obtenido con la secuenciación del gen *recA* era incierto, de modo que se adicionó para esos casos la secuenciación del gen *gyrB*, y del gen *lepA* si aún no resolvía.

En base al esquema de identificación arriba mencionado, analizamos la distribución de especies del complejo *B. cepacia*, entre los aislados indicados en la Tabla 2. La Figura 12 muestra la distribución obtenida para los aislados recuperados de muestras de esputo de pacientes FQ. De manera similar, la Figura 13 indica la distribución porcentual de especies recuperadas de nuestras clínicas no-FQ y ambientales. Nótese en la Figura 11B que la categoría “Otro cBc” agrupa aislados que pertenecen al complejo *B. cepacia* pero que no han podido discriminarse a nivel de especie al comparar las secuencias de los genes indicados contra las bases de secuencia disponibles, ellos representan seguramente otras especies aún no descritas para el complejo (23).

Burkholderia gladiolii fue recuperada en 0.68% en muestras de pacientes FQ, pero no fue incluidas en estos esquemas de distribución porque esta especie no pertenece al cBc. Es importante señalar que a nivel internacional *B. gladiolii* tiene una representación de un 10 %.

Nuestros resultados conjuntamente a los obtenidos en la Cátedra de Higiene y Sanidad de la UBA con otros aislados hospitalarios y ambientales, fueron los primeros datos con los que contó el sector de Salud en relación a la distribución de especies del cBc de nuestro país. Pudimos demostrar que de las 16 especies descritas hasta el momento para el complejo como las capaces de colonizar al paciente FQ (todas excepto *Burkholderia ubonensis*), en nuestro país circulaban entre los pacientes FQ, no-FQ y el ambiente 10 especies, con una alta representación de *B. contaminans* (Figura 12). Se han recuperado de muestras de esputo de pacientes FQ y aislados clínicos no-FQ las especies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria*, *B. arboris*, *B. seminalis* y *B. contaminans*. Si bien *B. lata* aun no ha sido recuperada de pacientes FQ, está presente en la distribución de especies recuperadas de muestras ambientales e industriales. Por otro lado, es interesante resaltar que *B. contaminans* es la especie más prevalente tanto en muestras de pacientes como en aislados ambientales. La distribución de especies encontradas para pacientes FQ en otros países como

en EE.UU. es completamente diferente: *B. cenocepacia* y *B. multivorans* representan aproximadamente el 70% de las especies que colonizan los pacientes FQ (23).

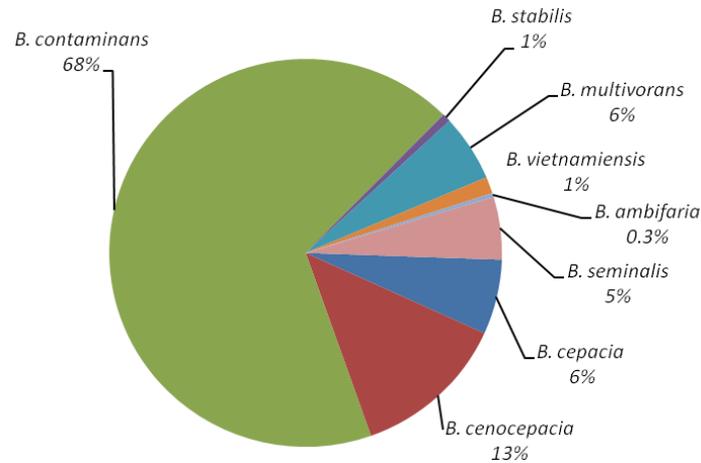


Figura 12. Distribución de especies del complejo *B. cepacia* recuperadas de pacientes FQ (identificadas por secuenciación de los genes *recA*, *gyrB* y *lepA*).

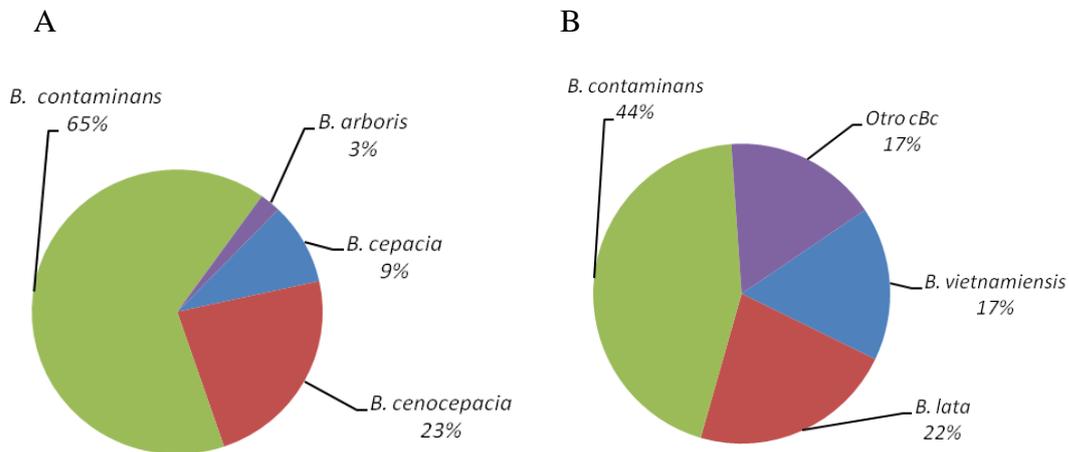


Figura 13. Distribución de especies del complejo *B. cepacia* recuperadas de (A) pacientes No-FQ y (B) muestras ambientales.

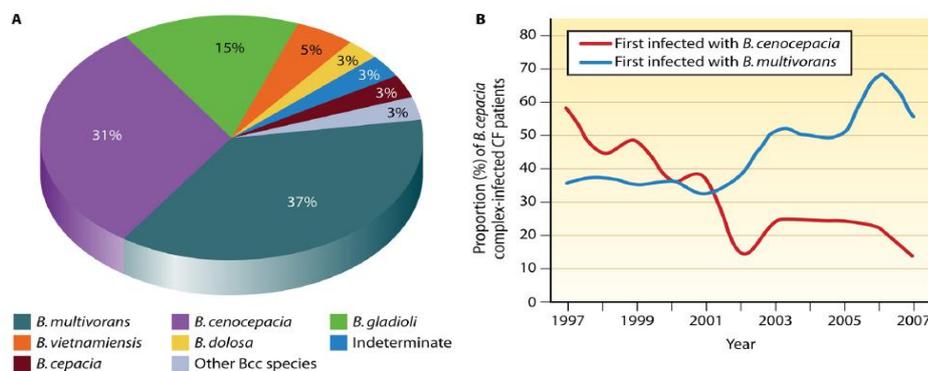


Figura 14. Distribución de especies del cBc en pacientes FQ de EE.UU. Los datos fueron obtenidos de más de 2000 pacientes FQ recuperados entre 1997 y 2007 (A). Incidencia de infecciones por *B. cenocepacia* y *B. multivorans* en pacientes FQ de EE.UU. a lo largo del tiempo. Tomado de (23).

En Canadá y en algunos países europeos (República Checa, Portugal, Francia, Italia y Reino Unido), *B. cenocepacia* representaba la especie mayoritaria en aislamientos de pacientes FQ (1)(17)(23)(43). Sin embargo, durante los últimos años la incidencia de *B. multivorans* y *B. cenocepacia* en infección de pacientes FQ parece haberse invertido (Figura 12)(17)(38).

B. contaminans si bien constituye una especie recientemente descrita, su presencia sin embargo ha sido reportada a nivel mundial en aislamientos de muestras de pacientes FQ, no-FQ, en el ambiente y productos industriales en otros países como Estados Unidos, Italia, Canadá, Portugal, Reino Unido, Brasil, Nueva Zelanda, Dinamarca, Turquía, China y Alemania (3)(4)(15)(24)(34)(28). Sin embargo no ha habido hasta el momento reportes en la literatura indicando regiones geográficas con una incidencia tan elevada de *B. contaminans* en relación a las otras especies como la observada en nuestro país.

Conocer en el contexto nacional la distribución de especies es de gran importancia ya que i) permite estudiar la dinámica de la distribución de las especies prevalentes a lo largo del tiempo y en las diferentes regiones; ii) constituye un resultado de relevancia para evaluar los tratamientos a realizar ya que es conocido que existe diferencias en el patrón de susceptibilidad entre las especies del cBc (5) y que determinados antimicrobianos son más efectivos para inhibir las diferentes especies y que otros antibióticos pueden inducir un cambio en la morfología bacteriana que aumenta su virulencia (49) iii) permite predecir la posible gravedad de la infección (descartar o no la infección por complejo *B. cepacia*) iv) conocer si el paciente puede ser derivado a trasplante pulmonar (los pacientes infectados con *B. cenocepacia* no son transplantados).

3.2.3. Análisis filogenético del gen *recA*

Para evaluar la diversidad genética entre las especies dentro del Complejo *B. cepacia*, 139 aislados recuperados en nuestro país de pacientes FQ, No-FQ y aislados ambientales, se analizaron a través de la construcción de un árbol filogenético obtenido como se indicó en la sección de métodos, sobre la base de la secuencia de fragmentos de 900pb del gen *recA* empleando los cebadores indicados en la tabla 5 y figura 5.

Como se puede observar en la Figura 15, la mayoría de las secuencias se agruparon junto a secuencias de cepas de referencia de las especies del cBc, generando un árbol con 12 *clúster* definidos y aislamientos únicos. Este ordenamiento discriminó a las especies detectadas en aislados circulantes en nuestro país. Es interesante observar que este agrupamiento reveló la presencia de un grupo de aislamientos, denominado GAMA, cuya secuencia del *recA* presentan baja similitud con relación al resto de los aislamientos y no se agrupa con la secuencia de ninguna de las cepas de referencia depositadas en el GeneBank.

Estas secuencias si bien corresponden a aislamientos con reacción positiva para cBc, poseen secuencias claramente diferentes a las encontradas en otras regiones del mundo, lo cual podrían constituir aislamientos correspondientes a alguna especie del cBc aun no reconocida como tal que circula en nuestro país, en particular en el Hospital Santísima Trinidad de Córdoba (Figura 15).

El análisis filogenético en base a la secuencia nucleotídica del gen *recA* demostró ser una metodología útil para discriminar a nivel de especie los aislados pertenecientes al cBc. Aunque, carece de poder resolutivo para discriminar a nivel de cepas (Figura 15) ya que la gran mayoría de los aislados de *B. contaminans* provenientes de pacientes FQ están agrupados en un gran *clúster* homogéneo, por lo que se requeriría de herramientas más poderosas para detectar si existe mayor diversidad genética entre esos aislados. Sin embargo esta metodología es útil ya que permite detectar la relación filogenética como se puede observar en el grupo GAMA constituido por los aislados (HST 189, HST 190 y HST 194) que pertenecen al cBc, pero claramente no se agrupan con ninguna de las 17 especies, sugiriendo que se trata de bacterias que hasta el momento no han sido asignadas a nivel de especie.

3.2.4. Distribución temporal de las especies del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes FQ

Teniendo los aislamientos identificados a nivel de especie, analizamos la distribución temporal de los mismos. Se pudo establecer que durante los primeros años de este estudio (2004-2007), la diversidad de las especies recuperadas en los primeros aislamientos de pacientes FQ era muy baja (Figura 13). Predominaba claramente *B. contaminans* – principalmente en el período 2004-2005 del brote hospitalario y sólo se aislaron *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* y *B. cenocepacia* en unos pocos pacientes. A partir de 2007, se redujo significativamente la incidencia de las infecciones por cBc pero, si bien continuó predominando *B. contaminans*, la diversidad de especies aisladas fue mayor. Por otro lado, es interesante resaltar que *B. contaminans* es la bacteria más prevalente tanto en muestras de pacientes como en aislados ambientales y geográficamente tiene una representación similar en cada hospital.

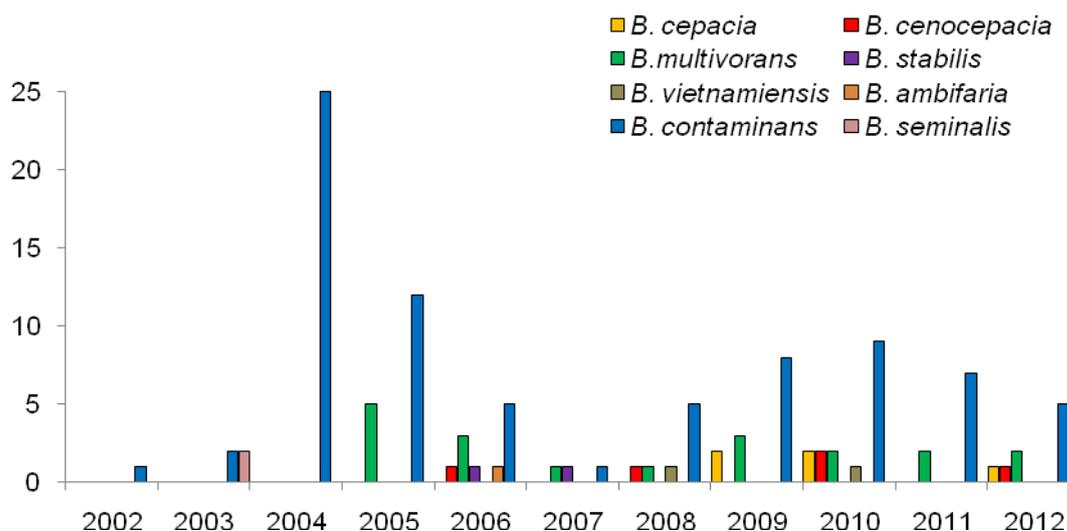


Figura 16. Distribución de especies cBc según año de aislamiento. Se considero el primer aislado recuperado de cada paciente. El reemplazo de cepa fue considerado como nuevo aislamiento.

Esta significativa disminución de infecciones se debió a la implementación de medidas de higiene y prevención en los diferentes servicios hospitalarios junto a la aplicación de normas dispuestas en un consenso para el manejo de pacientes con fibrosis quística. La transmisión paciente-paciente ha disminuido significativamente en los últimos años, sin embargo, la incidencia de infección con aislados identificados como *B. contaminans* es aún elevada. Esto estaría implicando que estos organismos son adquiridos a partir del contacto con el medio ambiente o ciertos productos de uso doméstico como cremas, cosméticos, productos

de limpieza del hogar, enjuagues de ropa y otros productos domisanitarios (3)(24). En este sentido, el grupo de trabajo de la cátedra de Higiene y Sanidad de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UBA ha realizado paralelamente a estos estudios investigaciones sobre la presencia de bacterias del cBc en productos industriales, domisanitarios, cosméticos, etc (13).

En base a estos resultados, se abren entonces una serie de interrogantes respecto a los aislados de *B. contaminans* encontrados en nuestro país: ¿Existe alguna relación clonal entre los aislados clínicos recuperados en el brote ocurrido en el año 2004? ¿Cuál es la diversidad genotípica y fenotípica de estos aislados clínicos? ¿Existe algún clon predominante de *B. contaminans* con mayor capacidad de transmisión? Existe una prevalencia de esta especie en alguna región del país en particular o en algún período de tiempo en particular?

Esta serie de interrogantes llevó a nuestro laboratorio a estudiar la diversidad molecular y fenotípica de los aislados de *B. contaminans*, no reportada hasta el presente en la bibliografía internacional. Para ello debieron desarrollarse y optimizarse diferentes herramientas basadas en *fingerprinting* molecular, y fenotípicas (FT-IR). Estas metodologías podrán también ser aplicadas en un futuro para descartar o confirmar brotes hospitalarios, evitando la diseminación de clones, y resultar de valor en la identificación de la fuente de contaminación, el reservorio y/o los vehículos de transmisión de las infecciones.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este capítulo, podemos concluir lo siguiente:

1. La caracterización fenotípica de los organismos pertenecientes al cBc es compleja, dado que es un grupo heterogéneo y de difícil crecimiento.
2. El sistema VITEK 2 compact demuestran que dicho método constituye una herramienta confiable en la identificación de organismos pertenecientes al CBC.
3. El desarrollar métodos moleculares, para identificación a nivel de cBc o incluso a nivel de especie, como el utilizado en este trabajo, que puedan ser llevados a cabo fácilmente en los laboratorios clínicos.
4. Nuestro país la distribución de especies del cBc presenta una epidemiología única en aislados recuperados de pacientes FQ y no FQ.
5. *B. contaminans* fue la especie predominante durante el brote hospitalario ocurrido en el año 2004-2005.
6. *B. contaminans* es la especie más prevalente recuperada en muestras clínicas y contaminantes industriales.

ANEXO

Tabla A. Colección general de aislados de Complejo *Burkholderia cepacia*.

N°	Aislado	Origen	RFLP	Especie	Fecha	Hospital	Procedencia
001	CBC 001	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	01/04/2009	HNLP	La Plata
002	CBC 002	FQ		<i>B. contaminans</i>	01/04/2009	HNLP	La Plata
003	CBC 003	FQ		<i>B. contaminans</i>	08/05/2009	HNLP	La Plata
004	CBC 004	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	03/10/2009	HNLP	La Plata
005	CBC 005	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	14/02/2011	HNLP	La Plata
006	CBC 006	FQ		<i>B. vietnamiensis</i>	09/03/2012	HNLP	La Plata
007	CBC 007	FQ	J'	<i>B. cenocepacia</i>	19/08/2009	HNLP	La Plata
008	CBC 008	FQ		<i>B. cenocepacia</i>	29/08/2008	HNLP	La Plata
009	CBC 009	FQ	no identif	<i>B. cenocepacia</i>	02/11/2009	HNLP	La Plata
010	CBC 010	FQ	J'	<i>B. cenocepacia</i>	01/12/2009	HNLP	La Plata
011	CBC 011	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	10/07/2010	HNLP	La Plata
012	CBC 012	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	22/07/2010	HNLP	La Plata
013	CBC 013	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	23/08/2010	HNLP	La Plata
014	CBC 014	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	24/08/2010	HNLP	La Plata
015	CBC 015	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	21/10/2010	HNLP	La Plata
016	CBC 016	No-FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	21/10/2010	HNLP	La Plata
017	CBC 017	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	12/10/2010	HNLP	La Plata
018	CBC 018	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	12/10/2010	HNLP	La Plata
019	CBC 019	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	17/02/2011	HNLP	La Plata
020	CBC 020	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	24/02/2011	HNLP	La Plata
021	CBC 021	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	16/03/2011	HNLP	La Plata
022	CBC 022	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	17/05/2011	HNLP	La Plata
023	CBC 023	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	17/05/2011	HNLP	La Plata
024	CBC 024	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	20/06/2011	HNLP	La Plata
025	CBC 025	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	15/07/2011	HNLP	La Plata
026	CBC 026	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	02/08/2011	HNLP	La Plata
027	CBC 027	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	02/08/2011	HNLP	La Plata
028	CBC 028	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	11/11/2011	HNLP	La Plata
029	CBC 029	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	17/12/2011	HNLP	La Plata
030	CBC 030	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	09/03/2012	HNLP	La Plata
031	CBC 031	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	09/03/2012	HNLP	La Plata
032	CBC 032	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	16/04/2012	HNLP	La Plata
033	CBC 033	FQ	H	<i>B. cenocepacia</i>	20/04/2012	HNLP	B. Blanca
034	CBC 034	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	24/05/2012	HNLP	La Plata
035	CBC 035	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	07/07/2012	HNLP	La Plata
036	CBC 036	FQ	-	<i>B. cenocepacia</i>	06/10/2005	HNLP	La Plata
037	CBC 037	FQ	-	<i>B. cenocepacia</i>		HNLP	La Plata
038	CBC 038	FQ	-	<i>B. cenocepacia</i>		HNLP	La Plata
039	CBC 039	FQ	-	<i>B. cenocepacia</i>	10/07/2006	HNLP	La Plata
040	CBC 040	FQ	-	<i>B. cenocepacia</i>		HNLP	La Plata
041	CBC 041	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	01/10/2009	HNLP	La Plata
042	CBC 042	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	02/06/2010	HNLP	La Plata
043	CBC 043	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	27/08/2010	HNLP	La Plata
044	CBC 044	No-FQ	E	<i>B. cepacia</i>	16/05/2012	HNLP	T. del Fuego
045	CBC 045	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
046	CBC 046	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
047	CBC 047	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
048	CBC 048	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
049	CBC 049	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata

050	CBC 050	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
051	CBC 051	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
052	CBC 052	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
053	CBC 053	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
054	CBC 054	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
055	CBC 055	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
056	CBC 056	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
057	CBC 057	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
058	CBC 058	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
059	CBC 059	FQ		<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
060	CBC 060	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
061	CBC 061	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
062	CBC 062	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
063	CBC 063	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
064	CBC 064	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	2005	HNLP	La Plata
065	CBC 065	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
066	CBC 066	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
067	CBC 067	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
068	CBC 068	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
069	CBC 069	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
070	CBC 070	No-FQ	-	<i>B. contaminans</i>	27/06/2006	HNLP	La Plata
071	CBC 071	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	06/10/2005	HNLP	La Plata
072	CBC 072	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	05/10/2005	HNLP	La Plata
073	CBC 073	FQ		<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
074	CBC 074	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
075	CBC 075	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
076	CBC 076	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
077	CBC 077	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	28/03/2006	HNLP	La Plata
078	CBC 078	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
079	CBC 079	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	05/12/2006	HNLP	La Plata
080	CBC 080	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	06/12/2006	HNLP	La Plata
081	CBC 081	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	07/12/2006	HNLP	La Plata
082	CBC 082	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	08/12/2006	HNLP	La Plata
083	CBC 083	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
084	CBC 084	FQ	AT	<i>B. contaminans</i>	20/06/2008	HNLP	No es de LP
085	CBC 085	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	04/08/2008	HNLP	La Plata
086	CBC 086	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
087	CBC 087	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
088	CBC 088	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HNLP	La Plata
089	CBC 089	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	11/09/2008	HNLP	La Plata
090	CBC 090	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	11/09/2008	HNLP	La Plata
091	CBC 091	FQ		<i>B. contaminans</i>	23/10/2008	HNLP	La Plata
092	CBC 092	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	27/10/2008	HNLP	La Plata
093	CBC 093	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	06/05/2009	HNLP	La Plata
094	CBC 094	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	07/05/2009	HNLP	La Plata
095	CBC 095	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	23/06/2009	HNLP	La Plata
096	CBC 096	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	05/09/2009	HNLP	La Plata
097	CBC 097	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	05/09/2009	HNLP	La Plata
098	CBC 098	FQ		<i>B. contaminans</i>	01/10/2009	HNLP	La Plata
099	CBC 099	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	01/10/2009	HNLP	La Plata
100	CBC 100	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	09/10/2009	HNLP	La Plata
101	CBC 101	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	04/05/2010	HNLP	La Plata
102	CBC 102	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	07/05/2010	HNLP	La Plata
103	CBC 103	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	14/05/2010	HNLP	La Plata

104	CBC 104	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	14/05/2010	HNLP	La Plata
105	CBC 105	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>	28/05/2010	HNLP	La Plata
106	CBC 106	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	27/05/2010	HNLP	La Plata
107	CBC 107	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	31/05/2010	HNLP	La Plata
108	CBC 108	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	19/08/2010	HNLP	La Plata
109	CBC 109	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	19/08/2010	HNLP	La Plata
110	CBC 110	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	01/09/2010	HNLP	La Plata
111	CBC 111	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	21/10/2010	HNLP	La Plata
112	CBC 112	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>	21/10/2010	HNLP	La Plata
113	CBC 113	No-FQ	AT	<i>B. contaminans</i>	21/10/2010	HNLP	La Plata
114	CBC 114	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	13/10/2010	HNLP	La Plata
115	CBC 115	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	25/10/2010	HNLP	La Plata
116	CBC 116	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	25/10/2010	HNLP	La Plata
117	CBC 117	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	25/11/2010	HNLP	La Plata
118	CBC 118	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	07/12/2010	HNLP	La Plata
119	CBC 119	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>	14/02/2011	HNLP	La Plata
120	CBC 120	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	14/03/2011	HNLP	La Plata
121	CBC 121	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	24/02/2011	HNLP	La Plata
122	CBC 122	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	22/03/2011	HNLP	La Plata
123	CBC 123	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	29/03/2011	HNLP	La Plata
124	CBC 124	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	06/04/2011	HNLP	La Plata
125	CBC 125	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	14/04/2011	HNLP	La Plata
126	CBC 126	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	16/05/2011	HNLP	La Plata
127	CBC 127	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	17/06/2011	HNLP	La Plata
128	CBC 128	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	11/07/2011	HNLP	La Plata
129	CBC 129	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	12/07/2011	HNLP	La Plata
130	CBC 130	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	02/08/2011	HNLP	La Plata
131	CBC 131	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	28/07/2011	HNLP	La Plata
132	CBC 132	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	28/07/2011	HNLP	La Plata
133	CBC 133	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	08/09/2011	HNLP	La Plata
134	CBC 134	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	08/09/2011	HNLP	La Plata
135	CBC 135	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	12/09/2011	HNLP	La Plata
136	CBC 136	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	08/11/2011	HNLP	La Plata
137	CBC 137	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	05/12/2011	HNLP	La Plata
138	CBC 138	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	08/03/2012	HNLP	La Plata
139	CBC 139	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	08/03/2012	HNLP	La Plata
140	CBC 140	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	02/08/2012	HNLP	La Plata
141	CBC 141	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	02/08/2012	HNLP	La Plata
142	CBC 142	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>	15/08/2012	HNLP	La Plata
143	CBC 143	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	17/08/2012	HNLP	B. Blanca
144	CBC 144	FQ		<i>B. contaminans</i>	19/09/2012	HNLP	La Plata
145	CBC 145	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	14/07/2010	HNLP	La Plata
146	CBC 146	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	15/07/2008	HNLP	La Plata
147	CBC 147	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	04/09/2009	HNLP	La Plata
148	CBC 148	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	06/05/2010	HNLP	La Plata
149	CBC 149	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	19/05/2010	HNLP	La Plata
150	CBC 150	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	08/06/2010	HNLP	La Plata
151	CBC 151	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	11/05/2011	HNLP	La Plata
152	CBC 152	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	27/07/2011	HNLP	La Plata
153	CBC 153	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	25/08/2011	HNLP	La Plata
154	CBC 154	FQ	F	<i>B. Multivorans</i>	29/02/2012	HNLP	La Plata
155	CBC 155	FQ	F	<i>B. Multivorans</i>	29/02/2012	HNLP	La Plata
156	CBC 156	FQ	F	<i>B. Multivorans</i>	25/04/2012	HNLP	La Plata
157	CBC 157	FQ	F	<i>B. Multivorans</i>	27/07/2012	HNLP	La Plata

158	CBC 158	FQ		<i>B. vietnamiensis</i>	08/10/2008	HNLP	La Plata
159	CBC 159	FQ	A	<i>B. vietnamiensis</i>	02/10/2009	HNLP	La Plata
160	CBC 160	FQ	A	<i>B. vietnamiensis</i>	21/10/2010	HNLP	La Plata
161	CBC 161	FQ	A	<i>B. vietnamiensis</i>	02/08/2011	HNLP	La Plata
162	CBC 162	FQ		<i>B. ambifaria</i>		HNLP	La Plata
163	CBC 163	FQ		<i>B. cepacia</i>		HGz	B. Aires
164	CBC 164	FQ		<i>B. cenocepacia</i>	21/12/2007	HGz	B. Aires
165	CBC 165	No-FQ	J simil	<i>B. cenocepacia</i>		HGz	B. Aires
166	CBC 166	No-FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HGz	B. Aires
167	CBC 167	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
168	CBC 168	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
169	CBC 169	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
170	CBC 170	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
171	CBC 171	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
172	CBC 172	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
173	CBC 173	FQ		<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
174	CBC 174	FQ		<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
175	CBC 175	FQ		<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
176	CBC 176	FQ		<i>B. contaminans</i>	23/12/2007	HGz	B. Aires
177	CBC 177	FQ		<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
178	CBC 178	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	25/12/2007	HGz	B. Aires
179	CBC 179	FQ		<i>B. contaminans</i>		HGz	B. Aires
180	CBC 180	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	26/12/2007	HGz	B. Aires
181	CBC 181	FQ	J	<i>B. stabilis</i>		HGz	B. Aires
182	CBC 182	FQ		<i>B. stabilis</i>		HGz	B. Aires
183	CBC 183	FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HGz	B. Aires
184	CBC 184	FQ		<i>B. Cepacia</i>		HGz	B. Aires
185	CBC 185	FQ		<i>B. gladiolii</i>	31/03/2009	HGz	B. Aires
186	CBC 186	No-FQ		<i>B. arboris</i>		HCBA	B. Aires
187	CBC 187	No-FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HCBA	B. Aires
188	CBC 188	No-FQ	H	<i>B. cenocepacia</i>		HCBA	B. Aires
189	CBC 189	No-FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HCBA	B. Aires
190	CBC 190	No-FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HCBA	B. Aires
191	CBC 191	No-FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HCBA	B. Aires
192	CBC 192	No-FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
193	CBC 193	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
194	CBC 194	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
195	CBC 195	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
196	CBC 196	No-FQ		<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
197	CBC 197	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
198	CBC 198	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
199	CBC 199	No-FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
200	CBC 200	No-FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
201	CBC 201	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
202	CBC 202	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
203	CBC 203	No-FQ	AT	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
204	CBC 204	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
205	CBC 205	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
206	CBC 206	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
207	CBC 207	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
208	CBC 208	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
209	CBC 209	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
210	CBC 210	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
211	CBC 211	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires

212	CBC 212	No-FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
213	CBC 213	No-FQ		<i>B. stabilis</i>		HCBA	B. Aires
214	CBC 214	No-FQ		<i>B. stabilis</i>		HCBA	B. Aires
215	CBC 215	No-FQ		<i>B. gladioli</i>		HCBA	B. Aires
216	CBC 216	No-FQ		<i>B. cenocepacia</i>		HCBA	B. Aires
217	CBC 217	No-FQ	G	<i>B. cepacia</i>		HCBA	B. Aires
218	CBC 218	No-FQ	-	<i>B. cepacia</i>		HCBA	B. Aires
219	CBC 219	No-FQ		<i>B. contaminans</i>		HCBA	B. Aires
220	CBC 220	FQ		<i>B. contaminans</i>	18/12/2002	HST	Córdoba
221	CBC 221	FQ		<i>B. contaminans</i>	07/10/2003	HST	Córdoba
222	CBC 222	FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>		HST	Córdoba
223	CBC 223	No-FQ	G	<i>B. cenocepacia</i>	27/10/2006	HST	Córdoba
224	CBC 224	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	01/11/2010	HST	Córdoba
225	CBC 225	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	01/11/2010	HST	Córdoba
226	CBC 226	No-FQ	E	<i>B. cepacia</i>	05/11/2010	HST	Córdoba
227	CBC 227	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	23/03/2009	HST	Córdoba
228	CBC 228	FQ		<i>B. cepacia</i>	09/06/2009	HST	Córdoba
229	CBC 229	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	24/06/2009	HST	Córdoba
230	CBC 230	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	09/08/2009	HST	Córdoba
231	CBC 231	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	29/09/2009	HST	Córdoba
232	CBC 232	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	05/07/2010	HST	Córdoba
233	CBC 233	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	24/08/2010	HST	Córdoba
234	CBC 234	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	21/12/2010	HST	Córdoba
235	CBC 235	FQ	E	<i>B. cepacia</i>	18/07/2011	HST	Córdoba
236	CBC 236	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	07/10/2003	HST	Córdoba
237	CBC 237	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	07/10/2003	HST	Córdoba
238	CBC 238	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	13/01/2004	HST	Córdoba
239	CBC 239	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	02/03/2004	HST	Córdoba
240	CBC 240	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	09/06/2004	HST	Córdoba
241	CBC 241	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	20/07/2004	HST	Córdoba
242	CBC 242	FQ	-	<i>B. contaminans</i>	09/09/2004	HST	Córdoba
243	CBC 243	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	28/09/2004	HST	Córdoba
244	CBC 244	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	26/10/2004	HST	Córdoba
245	CBC 245	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	23/11/2004	HST	Córdoba
246	CBC 246	FQ		<i>B. contaminans</i>	13/05/2004	HST	Córdoba
247	CBC 247	FQ		<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
248	CBC 248	FQ		<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
249	CBC 249	FQ		<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
250	CBC 250	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
251	CBC 251	FQ		<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
252	CBC 252	FQ	-	<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
253	CBC 253	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
254	CBC 254	FQ	+	<i>B. contaminans</i>	09/11/2004	HST	Córdoba
255	CBC 255	FQ	+	<i>B. contaminans</i>	07/01/2005	HST	Córdoba
256	CBC 256	FQ	+	<i>B. contaminans</i>	30/11/2004	HST	Córdoba
257	CBC 257	FQ		<i>B. contaminans</i>	18/03/2004	HST	Córdoba
258	CBC 258	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	07/10/2004	HST	Córdoba
259	CBC 259	FQ		<i>B. contaminans</i>	09/11/2004	HST	Córdoba
260	CBC 260	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	06/08/2004	HST	Córdoba
261	CBC 261	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	21/01/2005	HST	Córdoba
262	CBC 262	FQ		<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
263	CBC 263	FQ		<i>B. contaminans</i>	29/06/2005	HST	Córdoba
264	CBC 264	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
265	CBC 265	FQ		<i>B. contaminans</i>	18/08/2005	HST	Córdoba

266	CBC 266	FQ		<i>B. contaminans</i>	19/08/2005	HST	Córdoba
267	CBC 267	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
268	CBC 268	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HST	Córdoba
269	CBC 269	FQ		<i>B. contaminans</i>	22/05/2006	HST	Córdoba
270	CBC 270	FQ		<i>B. contaminans</i>	14//06/2006	HST	Córdoba
271	CBC 271	FQ		<i>B. contaminans</i>	17/07/2006	HST	Córdoba
272	CBC 272	FQ		<i>B. contaminans</i>	14/09/2006	HST	Córdoba
273	CBC 273	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	01/11/2010	HST	Córdoba
274	CBC 274	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	04/11/2010	HST	Córdoba
275	CBC 275	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	04/11/2010	HST	Córdoba
276	CBC 276	FQ		<i>B. Contaminans</i>	11/08/2009	HST	Córdoba
277	CBC 277	FQ		<i>B. Contaminans</i>	29/09/2009	HST	Córdoba
278	CBC 278	FQ	+	<i>B. Contaminans</i>	02/08/2011	HST	Córdoba
279	CBC 279	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	23/10/2009	HST	Córdoba
280	CBC 280	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	21/01/2010	HST	Córdoba
281	CBC 281	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	30/07/2010	HST	Córdoba
282	CBC 282	FQ		<i>B. contaminans</i>	24/08/2010	HST	Córdoba
283	CBC 283	FQ		<i>B. contaminans</i>	02/12/2010	HST	Córdoba
284	CBC 284	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	22/03/2011	HST	Córdoba
285	CBC 285	FQ		<i>B. contaminans</i>	03/06/2011	HST	Córdoba
286	CBC 286	FQ		<i>B. contaminans</i>	04/04/2011	HST	Córdoba
287	CBC 287	FQ		<i>B. contaminans</i>	10/08/2011	HST	Córdoba
288	CBC 288	FQ		<i>B. contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
289	CBC 289	FQ		<i>B. Contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
290	CBC 290	FQ		<i>B. Contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
291	CBC 291	FQ		<i>B. Contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
292	CBC 292	FQ		<i>B. Contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
293	CBC 293	FQ		<i>B. Contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
294	CBC 294	FQ		<i>B. Contaminans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
295	CBC 295	FQ		<i>B. gladiolii</i>	09/03/2010	HST	Córdoba
296	CBC 296	AMB		<i>B. lata</i>	15/10/2009	HST	Córdoba
297	CBC 297	FQ	-	<i>B. multivorans</i>	27/03/2006	HST	Córdoba
298	CBC 298	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
299	CBC 299	FQ	F	<i>B. multivorans</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
300	CBC 300	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	18/03/2003	HST	Córdoba
301	CBC 301	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	22/04/2003	HST	Córdoba
302	CBC 302	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	13/05/2003	HST	Córdoba
303	CBC 303	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	22/08/2003	HST	Córdoba
304	CBC 304	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	08/09/2003	HST	Córdoba
305	CBC 305	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	11/04/2003	HST	Córdoba
306	CBC 306	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	22/07/2003	HST	Córdoba
307	CBC 307	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	18/05/2003	HST	Córdoba
308	CBC 308	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	18/12/2007	HST	Córdoba
309	CBC 309	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	29/02/2008	HST	Córdoba
310	CBC 310	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	07/07/2008	HST	Córdoba
311	CBC 311	FQ	H	<i>B. seminalis</i>	09/12/2008	HST	Córdoba
312	CBC 312	FQ		<i>B. seminalis</i>	26/06/2009	HST	Córdoba
313	CBC 313	FQ		<i>B. seminalis</i>	25/08/2009	HST	Córdoba
314	CBC 314	FQ		<i>B. seminalis</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
315	CBC 315	AMB	A	<i>B. vietnamiensis</i>	04/09/2009	HST	Catamarca
316	CBC 316	FQ	-	<i>B. cenocepacia</i>		HST	Córdoba
317	CBC 317	AMB		<i>CBC nueva</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
318	CBC 318	AMB		<i>CBC nueva</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
319	CBC 319	AMB		<i>CBC nueva</i>	07/09/2012	HST	Córdoba

320	CBC 320	AMB		<i>CBC nueva</i>	07/09/2012	HST	Córdoba
321	CBC 321	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	03/05/2010	R. Rossi	La Plata
322	CBC 322	FQ	PCR (+)	<i>B. contaminans</i>	01/10/2010	R. Rossi	La Plata
323	CBC 323	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	26/01/2011	R. Rossi	La Plata
324	CBC 324	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	26/01/2011	R. Rossi	La Plata
325	CBC 325	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	30/05/2011	R. Rossi	La Plata
326	CBC 326	FQ	PCR (+)	<i>B. Cepacia</i>	30/05/2011	R. Rossi	La Plata
327	CBC 327	FQ	PCR (+)	<i>B. contaminans</i>	06/05/2011	R. Rossi	La Plata
328	CBC 328	FQ		<i>B. Cepacia</i>	06/12/2011	R. Rossi	La Plata
329	CBC 329	FQ	PCR (+)	<i>B. contaminans</i>	02/06/2012	R. Rossi	La Plata
330	CBC 330	FQ	PCR (+)	<i>B. contaminans</i>	13/07/2012	R. Rossi	La Plata
331	CBC 331	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	13/08/2008	HNRN	Rio Negro
332	CBC 332	FQ	K	<i>B. contaminans</i>	01/09/2008	HNRN	Rio Negro
333	CBC 333	AMB	K	<i>B. lata</i>		Desinf. piso	Ambiental
334	CBC 334	AMB	AT	<i>B.Contaminans</i>		Agua Ind. Fca	Ambiental
335	CBC 335	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Agua Ind. Fca	Ambiental
336	CBC 336	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Agua Ind. Fca	Ambiental
337	CBC 337	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Agua Ind. Fca	Ambiental
338	CBC 338	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Sala Hospital	Ambiental
339	CBC 339	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Desinf. piso	Ambiental
340	CBC 340	AMB	A	<i>B. vietnamiensis</i>		Acond.ropa	Ambiental
341	CBC 341	AMB	A	<i>B. vietnamiensis</i>		Acond. ropa	Ambiental
342	CBC 342	AMB	K	<i>B. lata</i>		Agua Ind. Fca	Ambiental
343	CBC 343	AMB	K	<i>B. lata</i>		Agua Ind. Fca	Ambiental
344	CBC 344	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Gel ecog.	Ambiental
345	CBC 345	AMB	AT	<i>B. contaminans</i>		Gel ecog.	Ambiental
346	CBC 346	FQ	J	<i>B. contaminans</i>		HG	B. Aires
347	CBC 347	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HG	B. Aires
348	CBC 348	FQ	K	<i>B. contaminans</i>		HG	B. Aires
349	CBC 349	FQ	E	<i>B. cepacia</i>		HG	B. Aires
350	ATCC 25416		D	<i>B. cepacia</i>		Referencia	
351	DSMZ 50181			<i>B. cepacia</i>		Referencia	
352	DSMZ 9241,		E	<i>B. cepacia</i>		Referencia	
353	ATCC 17616		F	<i>B. multivorans</i>		Referencia	
354	LMG13010		F	<i>B. multivorans</i>		Referencia	
355	LMG 16656		G	<i>B. cenocepacia</i>		Referencia	
356	LMG 18863			<i>B. cenocepacia</i>		Referencia	
357	LMG 16654		J	<i>B. cenocepacia</i>		Referencia	
358	LMG 18870		I	<i>B. cenocepacia</i>		Referencia	
359	LMG 14294			<i>B. cenocepacia</i>		Referencia	
360	LMG 10929		B	<i>B. vietnamiensis</i>		Referencia	
361	LMG 18943		Q	<i>B. dolosa</i>		Referencia	
362	LMG 21820			<i>B. dolosa</i>		Referencia	
363	LMG 19182,		N	<i>B. ambifaria</i>		Referencia	
364	LMG 19467			<i>B. ambifaria</i>		Referencia	
365	LMG 20983			<i>B. ambifaria</i>		Referencia	
366	LMG 20980		T	<i>B. anthina</i>		Referencia	
367	ATCC 15958		M	<i>B. pyrrocinia</i>		Referencia	
368	LMG 14191			<i>B. pyrrocinia</i>		Referencia	
369	ATCC 10248			<i>B. gladioli</i>		Referencia	
370	ATCC 27853			<i>P. aeruginosa</i>		Referencia	
371	Sm 33			<i>S. maltophilia</i>		Referencia	
372	Sm 36			<i>S. maltophilia</i>		Referencia	
373	Axx 23			<i>A. xylosoxidans</i>		Referencia	

374	Axx 79	<i>A. xylooxidans</i>	Referencia
375	LMG 16407	<i>P. apista</i>	Referencia
376	LMG 18087	<i>P. pnomenusa</i>	Referencia
377	LMG 18106	<i>P. pulmonicola</i>	Referencia
378	ATCC 27511	<i>Ralstonia pickettii</i>	Referencia
379	LMG 20952	<i>I. limosus</i>	Referencia

MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS.

Medio EMB agar (con eosina y azul de metileno)

Medio utilizado para la diferenciación de distintas enterobacterias, basándose en la capacidad de fermentación de lactosa y sacarosa, y en la producción de brillo metálico que sirve para la orientación aunque no para la confirmación del organismo hallado.

Fórmula (en gramos por litro)

Peptona	10.00
Lactosa	5.00
Sacarosa	5.00
Fosfato dipotásico	2.00
Agar	13.50
Eosina	0.40
Azul de metileno	0.065

Medio Triptone soya agar (TSA)

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

Al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis. Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

Fórmula (en gramos por litro)

Digestión pancreática de caseína	15.00
Digestión enzimática de soja y lentejas	5.00
Cloruro de sodio	5.00
Agar	15.00

Medio Luria Bertani agar (LB)

El Caldo de Lisogenia (CL) es un medio nutricionalmente rico para propósitos generales, se utiliza principalmente para el crecimiento de bacterias. El acrónimo se ha interpretado erróneamente como caldo Luria, caldo Lennox, o medio Luria-Bertani, de acuerdo con su creador Giuseppe Bertani, el CL abreviatura estaba destinado en realidad a pie de caldo lisogenia.

Fórmula (en gramos por litro)

Triptona	10.00
Extracto de lavadura	5.00
Cloruro de sodio	10.00
Agar	15.00
pH final:	7.5

Medio Burkholderia cepacia Selectivo Agar (BCSA)

Medio de cultivo basal que con el agregado del suplemento antimicrobiano, permite el aislamiento selectivo de Burkholderia cepacia a partir de diversos materiales. Es ampliamente utilizado cuando se procesan muestras respiratorias en pacientes con fibrosis quística.

Fórmula (en gramos por litro)

Tripteína	10.0
Extracto de levadura	1.5
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.008
Cristal violeta	0.0008
Agar.....	15.0

pH final: 7.0 ± 0.2
 Polimixina B 120000 ui
 Gentamicina 0.002 g
 Vancomicina 0.0005 g

Medio TSI agar

Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe³⁺, los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Fórmula (en gramos por litro)

Pluripeptona 20.0
 Extracto de carne 3.0
 Glucosa 1.0
 Lactosa 10.0
 Sacarosa 10.0
 Cloruro de sodio 5.0
 Tiosulfato de sodio 0.2
 Sulfato de hierro y amonio 0.2
 Rojo de fenol 0.008
 Agar 13.0
 pH final: 7.3 ± 0.2

Medio DNAsa Agar

Medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleasas. Es especialmente útil para la diferenciación entre especies de estafilococos, así como para la diferenciación de *Serratia* spp. de especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*.

Fundamento

En el medio de cultivo, la tripteína es la fuente de nitrógeno, aminoácidos, y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

El ácido desoxirribonucleico se encuentra altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Este medio de cultivo, permite diferenciar bacterias que poseen la enzima desoxirribonucleasa de aquellas que no la poseen.

La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N.

El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo.

contenido y composición

Fórmula (en gramos por litro)

Tripteína 20.0
 Acido Desoxirribonucleico 2.0
 Cloruro de sodio 5.0
 AGAR 15.0
 pH final: 7.3 ± 0.2

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Sciacca A, Stefani S.** 2001. Burkholderia cepacia Complex Infection in Italian Patients with Cystic Fibrosis : Prevalence , Epidemiology , and Genomovar Status. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2891–2896.
2. **Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Pope C, Waine DJ, Henry D a, Speert DP, Carter P, Vandamme P, LiPuma JJ, Dowson CG.** 2008. Elucidating global epidemiology of Burkholderia multivorans in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology* **46**:290–5.
3. **Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCJ, Govan JR, Speert DP, LiPuma JJ, Vandamme P, Dowson CG.** 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the Burkholderia cepacia complex. *Journal of clinical microbiology* **43**:4665.
4. **Bosch A, Miñán A, Vescina C, Degrossi J, Gatti B, Montanaro P, Messina M, Franco M, Vay C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O.** 2008. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology* **46**:2535–46.
5. **Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M.** 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **26**:213–6.
6. **Coenye T, Spilker T, Martin A, Lipuma JJ.** 2002. Comparative Assessment of Genotyping Methods for Epidemiologic Study of Burkholderia cepacia Genomovar III. *Journal of clinical microbiology* **40**:3300–3307.
7. **Coenye T, Vandamme P.** 2003. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* **5**:719–729.
8. **Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ.** 2001. Taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:3427–3436.
9. **Coutinho CP, Dos Santos SC, Madeira A, Mira NP, Moreira AS, Sá-Correia I.** 2011. Long-Term Colonization of the Cystic Fibrosis Lung by Burkholderia cepacia Complex Bacteria: Epidemiology, Clonal Variation, and Genome-Wide Expression Alterations. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **1**:12.
10. **Dalmastri C, Baldwin A, Tabacchioni S, Bevivino A, Mahenthiralingam E, Chiarini L, Dowson C.** 2007. Investigating Burkholderia cepacia complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environmental microbiology* **9**:1632–9.
11. **Dalmastri C, Pirone L, Tabacchioni S, Bevivino A, Chiarini L.** 2005. Efficacy of species-specific recA PCR tests in the identification of Burkholderia cepacia complex environmental isolates. *FEMS microbiology letters* **246**:39–45.
12. **De Bruijn FJ.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* **58**:2180–7.
13. **Degrossi J.** 2012. El complejo Burkholderia cepacia como contaminante de productos industriales y su potencial impacto sanitario.
14. **Ewing.** 1985. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae* 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., New York N.Y.
15. **Fang Y, Lou M, Li B, Xie G-L, Wang F, Zhang L-X, Luo Y-C.** 2009. Characterization of Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis patients in China and their chitosan susceptibility. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**:443–450.
16. **Forbes B.** 2004. *Diagnostico Microbiologico* 11 ed. Panamericana Medica., Argentina.
17. **Govan J, Brown A, Jones A.** 2007. Evolving epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.* **2**:153–64.
18. **Henry D a, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP.** 1997. Identification of Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *Journal of clinical microbiology* **35**:614–9.
19. **Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H.** 1984. Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* **104**:206–10.

20. **Jordá-Vargas L, Degrossi J, Castañeda NC, D'Aquino M, Valvano M a, Procopio A, Galanternik L, Centrón D.** 2008. Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. *Journal of clinical microbiology* **46**:1151–2.
21. **Kiska D, Gilligan PH.** 2003. *Manual of clinical microbiology* 8th ed. Washington, DC.
22. **Koneman E.** 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 5th ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.
23. **Lipuma JJ.** 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* **23**:299–323.
24. **Mahenthalingam E, Baldwin a, Dowson CG.** 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of applied microbiology* **104**:1539–51.
25. **Mahenthalingam E, Baldwin A, Vandamme P.** 2002. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol* **51**:533–8.
26. **Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-gay Y.** 2000. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex , *Burkholderia vietnamiensis* , *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. *Society* **38**:3165–3173.
27. **Mahenthalingam E, Urban T a, Goldberg JB.** 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature reviews. Microbiology* **3**:144–56.
28. **Martin M, Christiansen B, Caspari G, Hogardt M, Von Thomsen a J, Ott E, Mattner F.** 2011. Hospital-wide outbreak of *Burkholderia* contaminans caused by prefabricated moist washcloths. *The Journal of hospital infection* **77**:267–70.
29. **McMenamin J, Zaccone T, Vandamme P, Lipuna J.** 2000. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US Cystic Fibrosis Treatment Centres. *Chest* **117**:1661–1664.
30. **Miller MB, Gilligan PH, Hill C, Carolina N.** 2003. MINIREVIEW Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis **41**:4009–4015.
31. **Miñán A, Bosch A, Lasch P, Stämmler M, Serra DO, Degrossi J, Gatti B, Vay C, D'aquino M, Yantorno O, Naumann D.** 2009. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cellMALDI-ToFmass spectrometry. *Analyst* **134**:1138–1148.
32. **Murray PR, Baron, Pfaller, Tenover, Tenover, Tenover, Yolken.** 1999. *Manual of clinical microbiology* 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
33. **NCCLS.** 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A. Wayne, PA.
34. **Nørskov-lauritsen N, Johansen HK, Mette G, Nielsen XC, Pressler T, Hanne V, Højby N, Fenger MG, Olesen H V.** 2010. Unusual Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species in Danish Cystic Fibrosis Clinics May Stem from Restricted Transmission between Patients Unusual Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species in Danish Cystic Fibrosis Clinics May Stem f. *Society* **1–4**.
35. **Oderiz S, Palacio PDEL, Lewis MC, Bettiol MP, Martina P, Bosch A, Yantorno OM, Gatti BM.** 2011. Evaluación de los sistemas comerciales automatizados VITEK 2 y API 20NE para la identificación de organismos del complejo *Burkholderia cepacia* aislados de muestras clínicas. *Revista Argentina de Microbiología* **43**:168–175.
36. **Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthalingam E, Icrobiol APPLNM.** 2005. Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. *Applied and environmental microbiology* **71**:3917–3927.
37. **Purves W, Sadava D, Orians G, Heller H.** 2003. *Vida, La Ciencia de la Biología* 6th ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, BA.
38. **Reik R, Spilker T, Lipuma JJ.** 2005. Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species among Isolates Recovered from Persons with or without Cystic Fibrosis **43**:2926–2928.
39. **Sajjan U, Wu Y, Kent G, Forstner J.** 2000. Preferential To, adherence of cable-piliated *Burkholderia cepacia* Cystic, respiratory epithelia of CF knockout mice and human fibrosis lung explants. *J. Med. Microbiol.* **49**:875–885.
40. **Sambrook, J., E. F. Fritsch and TM.** 1989. . *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spr. Cold Spring Harbor, NY.

41. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio D a, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson M V.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:8487–92.
42. **Smith T, Waterman M.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**:195–7.
43. **Speert D, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E.** 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis.* **8**:181–7.
44. **Tabacchioni S, Ferri L, Manno G, Mentasti M, Cocchi P, Campana S, Ravenni N, Taccetti G, Dalmastri C, Chiarini L, Bevivino A, Fani R.** 2008. Use of the *gyrB* gene to discriminate among species of the *Burkholderia cepacia* complex. *FEMS microbiology letters* **281**:175–82.
45. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* **24**:1596–9.
46. **Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D.** 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of clinical microbiology* **38**:1599–608.
47. **Vanlaere E, Lipuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthiralingam E, Speert D, Dowson C, Vandamme P.** 2008. *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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.
48. **Zhou J, Garber E, Desai M, Saiman L.** 2006. Compliance of clinical microbiology laboratories in the United States with current recommendations for processing respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1547–1549.
49. **Zlosnik JE a, Costa PS, Brant R, Mori PYB, Hird TJ, Fraenkel MC, Wilcox PG, Davidson a GF, Speert DP.** 2011. Mucoïd and nonmucoïd *Burkholderia cepacia* complex bacteria in cystic fibrosis infections. *American journal of respiratory and critical care medicine* **183**:67–72.



Capítulo III

Diversidad genética y fenotípica
en *Burkholderia contaminans*

INTRODUCCIÓN	106
OBJETIVOS	113
Objetivo general	113
Objetivos particulares	113
MATERIALES Y MÉTODOS	114
3.1. Microorganismos	114
3.2. Identificación bacteriana mediante la técnica de Multilocus Sequence Type (MLST)	114
3.2 Técnicas de tipificación por PCR-ADN- <i>fingerprinting</i>	116
3.2.1. BOX-PCR (Conserved sequence BOX element of <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	116
3.2.2. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)	117
3.2.3 REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic)	117
3.2.4 Análisis de los productos de PCR obtenidos por rep-PCR	118
3.2.5 Análisis de geles obtenidos por rep-PCR	118
3.3. Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)	119
3.4.1. Detección de marcadores genéticos de transmisibilidad cable pili (gen <i>cblA</i>) <i>Burkholderia cepacia epidemic strain marker</i> (BCESM)	121
3.4.2 Análisis de secuencia del marcador de transmisibilidad BCESM	122
RESULTADOS	123
3.5. Diversidad genética de aislados clínicos de <i>B. contaminans</i> obtenida de la secuencia del gen <i>recA</i>	123
3.6. Diversidad genética entre aislados de <i>B. contaminans</i> <i>recA</i> -ST 71 a través de rep-PCR ADN- <i>fingerprinting</i>	125
3.6.1. REP-PCR	125
3.6.2. ERIC-PCR	126
3.6.3. BOX-PCR	126
3.7. Determinación de la presencia de Marcadores de transmisibilidad	128
3.8. Diversidad fenotípica en aislados clínicos de <i>B. contaminans</i> (<i>recA</i> ST-71) mediante espectroscopía FT-IR	130
3.9. Infecciones crónicas	133
3.10. Evolución genética y fenotípica en aislados sucesivos de <i>B. contaminans</i> en la infección crónica	133
DISCUSIÓN	135
3.11. Epidemiología de la infección crónica	138
CONCLUSIONES	141
Anexo	142
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

INTRODUCCIÓN

La primera asignación de *Burkholderia contaminans*, en el año 2009 como nueva especie del cBc fue *Burkholderia vanimaris* (56). La muestra sobre la cual se describió el metagenoma se aisló del mar de Sargazo. Su nombre *contaminans* que proviene del latín contaminante, contaminación describe mejor a la especie que el nombre *vanimaris* ya que esta especie, al igual que otros aislados del cBc habitan muy poco en agua de mar, lo cual sugiere que el mar no es un hábitat natural para las especies de este complejo. La cepa tipo es la *B. contaminans* LMG 23361, la cual está depositada en el LMG -Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection, Faculty of Sciences University Gent, Bélgica (33).

Las bacterias asignadas a *B. contaminans* son bacilos Gram-negativos, aeróbicos, no esporulados. Las colonias muestran un característico brillo metálico. Todas las cepas pueden crecer en agar MacConkey y en medio *B. cepacia* agar selectivo (BCSA). Se observó crecimiento en dicho medio a 30, 37 y a 42 ° C. La mayoría de las cepas son pigmentadas, de color amarillo verdoso y hemolíticas, una característica que no se observa comúnmente entre las especies del cBc (57). La Figura 1 muestra el cultivo en medio EMB de un aislado local de esta especie.

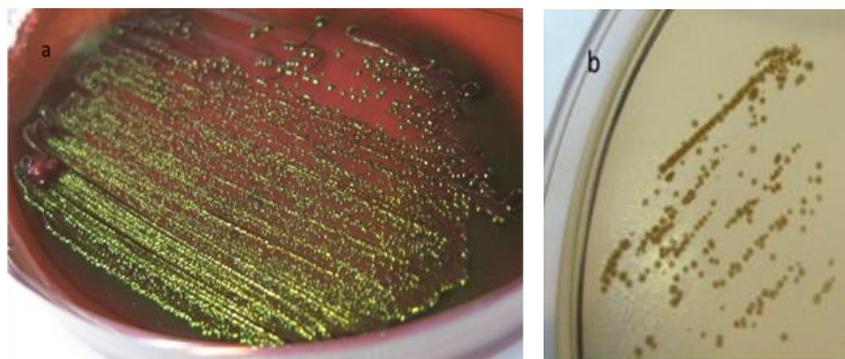


Figura 1. *Burkholderia contaminans* aislada a partir de muestras de esputo de un paciente FQ. A) Medio EMB-agar y B) medio TS-agar.

Su presencia ha sido reportada a nivel mundial en aislamientos de muestras de pacientes FQ, no-FQ, en el ambiente y en productos industriales en países como Estados Unidos, Italia, Canadá, Portugal, Reino Unido, Brasil, Nueva Zelanda, Dinamarca, Turquía, China y Alemania (2)(6)(18)(31)(42)(44). Sin embargo no ha habido hasta el momento reportes en la literatura indicando regiones geográficas con una incidencia tan elevada de *B. contaminans* en relación a las otras especies como la observada en nuestro país. Asimismo, al ser una especie recientemente descrita es muy poco lo publicado sobre las características fenotípicas de los organismos pertenecientes a esta especie (9)(57).

La alta prevalencia de *B. contaminans* en aislamientos clínicos de pacientes FQ y no FQ, y las dudas existente a nivel hospitalario sobre la posibilidad de estar ante una expansión clonal intrahospitalaria indicaban que era necesario continuar las investigaciones tendientes a dilucidar la diversidad genotípica y fenotípica de los aislados clínicos circulantes. En este sentido también era muy importante establecer las características genéticas de los organismos circulantes en relación a su capacidad de transmisibilidad. Asimismo, existen pocos datos reportados en relación a la capacidad de los organismos del cBc de causar infecciones pulmonares crónicas y hasta nuestro conocimiento no existen reportes sobre las características genotípicas y fenotípicas de aislamientos de *B. contaminans* recuperados a lo largo de una infección crónica.

Nos propusimos entonces, avanzar en el conocimiento genotípico y fenotípico de la población de organismos de la especie *B. contaminans* que colonizan al paciente FQ a fin de alcanzar un mayor conocimiento sobre la realidad epidemiológica local, y contar con herramientas que permitan ayudar a disponer medidas que acoten la transmisión o diseminación de infecciones por estas bacterias y permitan estudiar la “evolución” de las infecciones crónicas.

A fin de realizar estudios sobre la diversidad molecular y fenotípica de los aislados de *B. contaminans*, debieron desarrollarse y optimizarse diferentes herramientas basadas en *fingerprinting* molecular, estudios sobre la presencia de genes asociados a la transmisibilidad e investigaciones sobre la expresión fenotípica (a través de la espectroscopía infrarroja). De poder implementarse estas metodologías podrán ser aplicadas en un futuro para descartar o confirmar brotes hospitalarios, evitar la diseminación de clones, identificar fuentes de contaminación o los reservorios y/o vehículos de transmisión de las infecciones.

Entre las metodologías genéticas empleadas para el estudio de diversidad de aislados del *Burkholderia*, el sistema MLST constituye el “gold standard”. Ésta permite la identificación de bacterias del complejo *B. cepacia* a nivel de género, especie, y cepa por lo que ha sido empleada para realizar estudios de epidemiología global del complejo (31)(60). Si bien el análisis de secuencia de ADN requerido para el MLST es cada vez más accesible incluso en nuestro país, resulta aún muy costoso para ser realizado como técnica de rutina. Han sido reportada otras estrategias de genotipificación de organismos del cBc como el plimorfismo de genes individuales como *recA* (31) (43), *fur* (30), *fliC* (62), o *gyrB* (54). Otros métodos empleados satisfactoriamente con alto poder discriminatorio aplicados a estudios de diversidad de aislamientos del cBc fueron la electroforesis en campo pulsante (PFGE) y la ribotipificación (7). Asimismo, las técnicas basadas en la amplificación de elementos repetitivos rep-PCR (*repetitive element sequence-based PCR*) (59) (en particular empleando los cebadores

dirigidos contra los elementos repetitivos, tales como ERIC, REP o secuencias BOX, se han aplicado también con éxito para discriminar organismos de las especies *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. dolosa* y *B. pseudomallei* en aislamientos clínicos (4) (12).

Estas secuencias o elementos repetitivos están presentes en los genomas de múltiples microorganismos (particularmente Gram-negativos) y generan patrones de bandas diferentes denominados “*fingerprint*”. Estos elementos de ADN repetitivo no tienen una función conocida y se encuentran tanto en regiones intergénicas como extragénicas del genoma microbiano (55). Se ha probado que esta técnica es una valiosa herramienta para la identificación, seguimiento y valoración de la diversidad entre microorganismos importantes a nivel médico y/o ambiental (59)(45)(23). El *fingerprint* del ADN por medio de rep-PCR (*repetitive element based*) es una técnica rápida y sencilla que cuenta con el poder de resolución necesario para la identificación de microorganismos a nivel de cepa o subespecie (59).

Una tecnología que es cada vez más empleada para la identificación y discriminación fenotípica de microorganismos a nivel de género, especie, cepa y en estudios epidemiológicos se basa en el análisis de espectros infrarrojos (IR) de muestras biológicas utilizando FT-IR combinada con métodos estadísticos multivariantes. Los espectros IR obtenidos de bacterias en condiciones estandarizadas son altamente específicos y reproducibles, por lo que permiten distinguir microorganismos a diferentes niveles taxonómicos (fenotipo, especie, sub-especie, patogenicidad, virulencia, etc.)(25)(6)(40)(51). Esta metodología representa una forma sencilla, no destructiva de analizar el fenotipo que expresa una población de células en una determinada condición de crecimiento a partir de una cantidad pequeña de biomasa (37).

Haciendo una breve mención del funcionamiento de la técnica y los equipos utilizados para llevarla a cabo, puede decirse que la absorción de radiación infrarroja por parte de una muestra da lugar a un espectro de bandas vibracionales, características de los grupos químicos funcionales presentes en dicho material. Estas bandas son el resultado de estiramientos y balanceos entre los átomos de un enlace químico (Figura 2). Los modos normales de una molécula o grupo particular dependen: de la estructura molecular, las fuerzas interatómicas (fuerza de los enlaces) y las masas de los átomos involucrados, pero sólo serán activos en el IR si su modo vibracional involucra un cambio en el momento dipolar (enlace químico entre átomos de diferente electronegatividad). El espectro resultante representa la absorción y transmisión molecular de la muestra, creando un *fingerprint* molecular de la muestra; es decir, cada estructura molecular absorbe un espectro infrarrojo único para ella. Esto hace que un espectro infrarrojo sea útil para varios tipos de análisis. A partir del empleo de FT-IR pueden obtenerse: identidades de muestras desconocidas, determinación de pureza, calidad o consistencia de una muestra, cantidad de componentes de una muestra, etc.

A continuación se describen algunas características de la espectroscopía FT-IR. El análisis mediante espectroscopía infrarroja, es una técnica que se basa en estudio de la absorción de luz IR (4000 a 650 cm^{-1}) por parte de los distintos enlaces químicos presentes en las moléculas. Dicha absorción produce la excitación de estados vibracionales y rotacionales de los enlaces químicos que poseen una frecuencia de vibración en el rango IR del espectro electromagnético. La mayoría de los espectros IR representan las vibraciones propias de los estiramientos de las uniones químicas, que ocurren a alta energía dentro de la región IR, y las absorciones asociadas al balanceo de los enlaces, que se producen a baja energía. Para la absorción de luz IR, las moléculas deben poseer un dipolo oscilante, el cual debe cambiar cuando ocurre la transición para permitir la absorción. Asimismo, las frecuencias de vibración dependerán de la constante de fuerza de los enlaces entre los átomos y las masas de los mismos. Las vibraciones entre átomos pueden ser debidas a cambios en la longitud del enlace (estiramiento) o cambios en el ángulo de enlace (balanceo), siempre conservando el centro de masas (41) (Figura2).

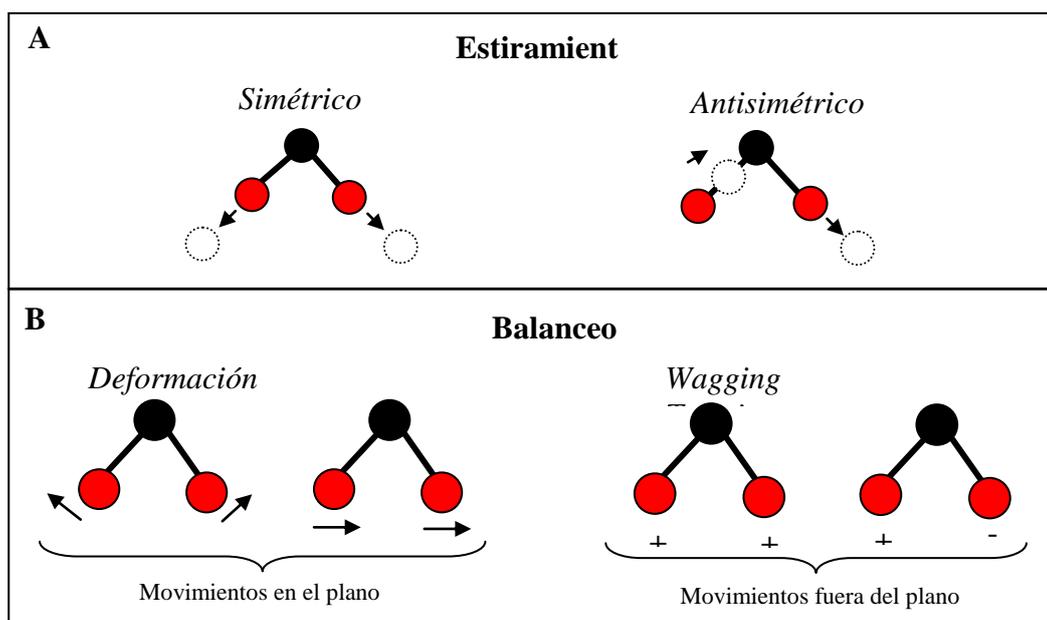


Figura 2. Tipos de vibraciones entre átomos. A) Vibraciones por Estiramientos: Son generadas por cambios en la longitud del enlace entre dos átomos. B) Vibraciones por Balanceos: Son causadas por cambios en el ángulo de enlace, ya sea en el plano o por fuera de este.

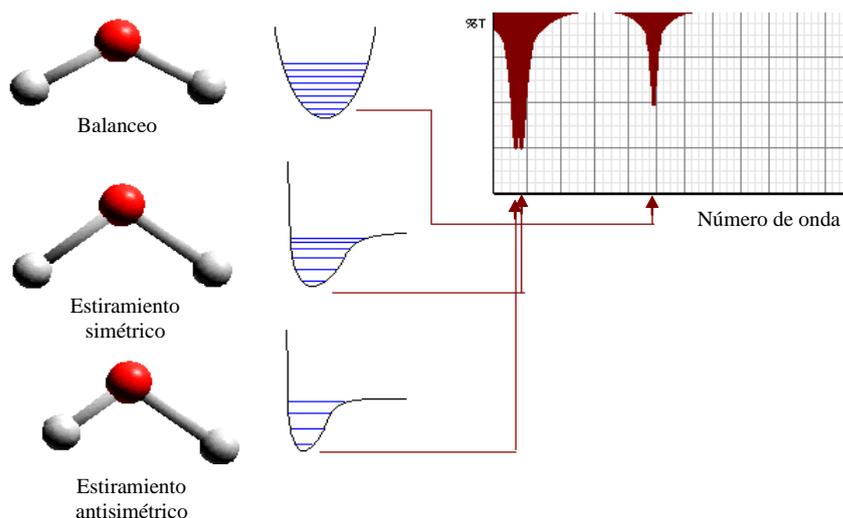


Figura 3. Bandas de absorción vibracional para la molécula de agua. Para una molécula sencilla como el agua, las 3 bandas de absorción provienen de las vibraciones generadas por balanceo y por el estiramiento simétrico y antisimétrico.

La luz IR es relativamente de baja energía, de modo que al producirse una absorción IR por las moléculas, los niveles cuánticos vibracionales o rotacionales se excitarán a un nivel cuántico vibracional o rotacional mayor pero no a un nivel cuántico electrónico mayor (41). Para una molécula sencilla como el agua, las bandas espectrales pueden ser interpretadas como provenientes de vibraciones de balanceo, estiramiento simétrico y antisimétrico. En consecuencia deberán observarse 3 bandas de absorción en el espectro IR correspondiente (Figura 3). Cada uno de los modos normales de vibración está asociado a una variación de energía potencial y consecuentemente a un conjunto de niveles energéticos.

Las bandas de absorción observadas en el espectro IR medio de una suspensión bacteriana corresponden a los modos vibracionales de los enlaces químicos presentes en las macromoléculas que componen esos microorganismos (Figura 4). Las bandas observadas en la región $3500 - 900 \text{ cm}^{-1}$ pueden ser asignados a estiramientos y balanceos de enlaces químicos específicos. A números de onda menores (menor energía) entre $900 \text{ y } 700 \text{ cm}^{-1}$, las bandas resultantes no pueden ser asignadas a modos vibracionales localizados, sino más bien al acoplamiento de diferentes bandas vibracionales o de movimientos de los “esqueletos” de las macromoléculas. Esta región espectral es específica de cada sistema biológico por lo que se denomina zona del *fingerprinting* (36).

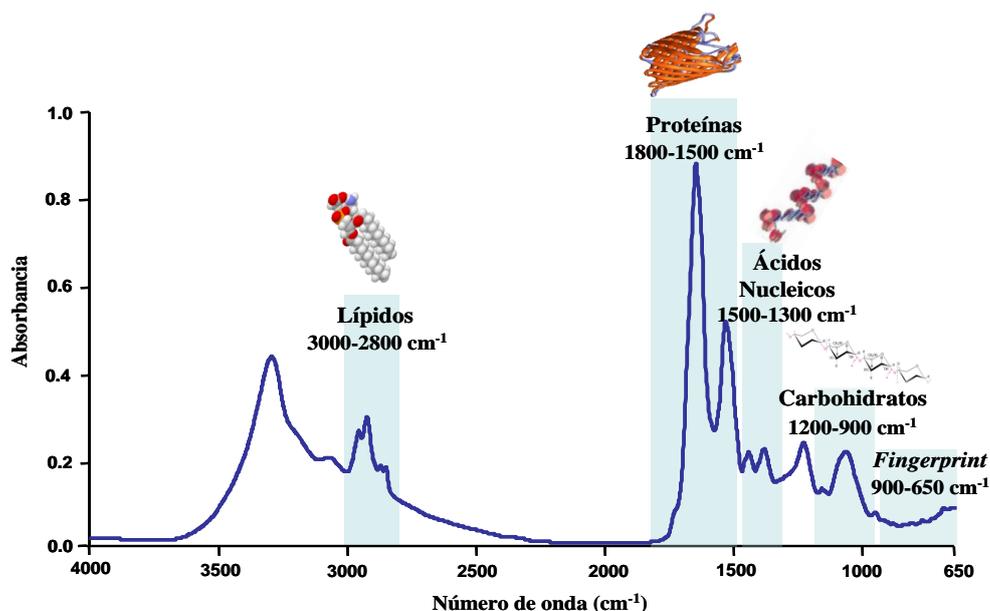


Figura 4. Asignación de bandas espectrales a las principales macromoléculas constituyentes las bacterias. El rango espectral de 3000 a 2800 cm^{-1} corresponde a los lípidos, 1800-1500 cm^{-1} a las proteínas, 1500-1300 cm^{-1} a los ácidos nucleicos, 1200-900 cm^{-1} a los carbohidratos y 900-650 cm^{-1} a la región conocida como *fingerprints*.

Existen dos aspectos que son importantes de resaltar en relación al espectro FT-IR de una suspensión bacteriana:

- Representa la composición bioquímica de un fenotipo particular, ya que contiene información sobre las biomoléculas de la pared celular, membranas plasmáticas, citoplasma, polímeros intracelulares.
- Un espectro dado, resulta altamente específico y reproducible bajo las mismas condiciones de operación.

La asignación de picos o frecuencias de absorción a una determinada estructura o grupo funcional, es una tarea compleja debido a que el importante ancho de las bandas hace dicha asignación muy difícil y ambigua. Sin embargo, es posible aplicar sobre los espectros técnicos de aumento de resolución como son la derivada primera o segunda o la deconvolución, que permiten distinguir los picos que componen las bandas anchas de los espectros de materiales biológicos complejos. El desarrollo de sistemas de computación de análisis de reconocimiento de patrones ha permitido comparar y analizar los patrones obtenidos por las derivadas espectrales, dando la posibilidad de crear bases de datos espectrales que pueden ser compartidas e intercambiadas entre los diferentes laboratorios.

De este modo la espectroscopia IR combinada con los sistemas de reconocimiento de patrones ha permitido abrir caminos trascendentales en las aplicaciones de estas técnicas en el área de alimentación, salud, y biomedicina (17)(26)(61) Particularmente en el área

microbiológica clínica, se ha demostrado la capacidad de esta técnica para realizar estudios epidemiológicos con gran eficiencia, para la detección de cadenas de infección y monitorear cambios fenotípicos (51).

En esta sección se presentan los resultados obtenidos del análisis de una colección de cepas clínicas (Tabla 1 al final del capítulo) de *B. contaminans* que fueron caracterizadas genéticamente mediante la comparación de secuencias del gen *recA*, técnicas de *fingerprinting* basadas en PCR, marcadores de transmisibilidad y fenotípicamente mediante el empleo de espectroscopía FT-IR.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la diversidad genética y fenotípica de una población de aislados clínicos de *Burkholderia contaminans* recuperados de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos y pacientes no fibroquísticos de nuestro país durante el periodo 2004-2012 y determinar la presencia de genes asociados a transmisibilidad. Se caracterizarán genotípica y fenotípicamente los aislados recuperados del brote 2004-2005, los aislados circulantes que producen actualmente nuevas infecciones y los aislamientos recuperados a lo largo de infecciones crónicas.

Objetivos particulares

1. Determinar la diversidad de la población de *B. contaminans* a partir del análisis de la secuencia del gen *recA* mediante confrontación con secuencias depositadas en el GenBank y en la base del MLST.
2. Estudiar la diversidad genómica mediante la utilización de técnicas rep-PCR (*repetitive element sequence-based PCR*). Evaluando la capacidad de discriminación de diferentes cebadores: REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR.
3. Estudiar la presencia del marcador de transmisibilidad *Burkholderia cepacia epidemic strain marker* (BCSEM) y cable *pili-cblA* (*cblA*) entre los aislados provenientes de muestras de esputo de pacientes FQ.
4. Analizar la diversidad fenotípica de aislados de *B. contaminans* mediante espectroscopia FT-IR.
5. Analizar la distribución de genotipos y fenotipos presentes en la población de pacientes fibroquísticos, a fin de establecer las características de los aislamientos recuperados durante el brote hospitalario ocurrido en 2004-2005, y el de las poblaciones circulantes.
6. Aplicar las metodologías optimizadas para analizar la diversidad genética y fenotípica de aislados de *B. contaminans* recuperados de infecciones crónicas de pacientes FQ.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

Se emplearon 125 aislados clínicos (110 FQ, 15 no-FQ). En el presente capítulo se realizó en el marco de un proyecto de Extensión Universitaria entre el Hospital de Niños de La Plata y el Hospital Santísima Trinidad de Córdoba, por lo que sólo se consideraron los pacientes FQ de estos dos establecimientos hospitalarios. También fueron incluidas en el estudio cepas provenientes de pacientes no-FQ recuperadas de pacientes asistidos en el Hospital de Clínicas, UBA, CABA.

Los estudios sobre la presencia de los genes de transmisibilidad (gen *cbIA*) y BCESM se realizaron sobre un total de 60 aislamientos de *B. contaminans* recuperados de pacientes FQ, no FQ.

Para el caso del estudio de las infecciones crónicas se analizaron 66 aislamientos recuperados de 21 pacientes (atendidos en los centros de referencia de FQ mencionados arriba), sobre los cuales se recuperaron organismos del complejo *B. cepacia* a lo largo de la infección crónica (TABLA 1 al final del capítulo II y capítulo III).

3.2. Identificación bacteriana mediante la técnica de Multilocus Sequence Type (MLST)

La estrategia MLST emplea el polimorfismo de siete genes de expresión constitutiva (housekeeping) que se encuentran en el primer y segundo cromosoma (15), tal como se describió en el capítulo I del presente trabajo de Tesis. Los genes empleados en el sistema MLST son: 1) cadena-B de ATP sintasa, *atpD*; 2) subunidad mayor de glutamato sintasa, *gltB*; 3) DNA girasa-B, *gyrB*; 4) recombinasa A, *recA*; 5) proteína ligante de GTP, *lepA*; 6) acetoacetyl-CoA reductasa, *phaC* y 7) triptófano sintasa, *trpB*. De cada gen se amplifican y secuencian fragmentos internos de aproximadamente 400-500 pb (2). A cada una de las secuencias alélicas diferentes de cada gen se le asigna un número único arbitrario (alelo tipo ST para cada gen, por ejemplo ST del gen *recA*). La combinación de estos 7 genes proporciona un perfil alélico, el cual representa un único ST (*Sequence Type*). En este sentido, cepas que exhiben al menos 6 de los 7 perfiles alélicos idénticos, tienen los mismos ST y son definidas como clones porque son genéticamente indistinguibles (2).

La Figura 5 muestra, a modo de ejemplo, el empleo de la base MLST para la obtención del alelo que le corresponde a una secuencia problema (*query*) introducida al la base de datos para el gen *recA*. El programa devuelve el número de alelo que corresponde a dicha secuencia problema. Al ingresar dicho alelo a la base de datos la misma le asigna la especie que corresponde dicha secuencia.

A

PubMLST Query: Sequences | Batch sequences | Compare alleles | Profile/ST | Batch profiles | List | Browse | Query
 Download: Alleles | MLST profiles
 Links: Contents | Home | Options | PubMLST.org | Isolate Database

Batch sequence query - Burkholderia cepacia complex locus/sequence definitions

Please paste in your sequences to query against the database. Query sequences will be checked first for an exact match against the chosen (or all) loci - they do not need to be trimmed. The nearest partial matches will be identified if an exact match is not found. You can query using either DNA or peptide sequences.

Please select locus/scheme: All loci | Order results by: locus

Enter query sequences (FASTA format)

```

ATGGGCGACGGCGAGGCGACCGAGAACATCCAGGTCGTGTCCACGGGCTCGCTCGGTCTC
GATATCGCGCTCGGGCTCGGGCGCCTGCCGCGCGCGGGTGGTCAAAATCTACGGTCCG
GAATCGTCCGGTAAAAACCGCTCACGCTGCAGGTCATTGCCAACTGCAGAGCTGGGC
GGCACC CGGCGTTCATCGACGCCGAGCAGCGCTCGACGTTCAATATGCAGCGAAGCTC
GGCGTGAACGTCGCCGAGCTGCTGATCTCGCAGCGGACACCGCGGAGCAGGCACTTGA
ATCACCGACCGCGCTGGTGGCTCGGGCTCGATC
  
```

Reset Submit

Secuencia Problema

B

1 exact match found. Resultado

Translate query

Allele	Length	Start position	End position
recA: 71	393	1	393

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored. Autofill profile by searching remote database

atpD	gltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB
			71			

Options: Search: Exact or nearest match | Display/sort options: Order by: species | descending | Display: 25 records per page

Reset Submit

Exact match found (1 locus).
 16 records returned. Click the hyperlinks for detailed information.

C

id	isolate	aliases	species	genomovar	country	source	year	MLST										
								atpD	gltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB	ST	clonal complex		
100	IST410		B. contaminans		Portugal	CF		89	82	80	71	60	73	74	96			
101	CEP0964	R-9929	B. contaminans		Australia	CF		89	83	81	71	39	54	75	97	97		
419	R-9896	90-530; CEP0097	B. contaminans		US	CF		89	106	113	71	39	54	109	123	97		
420	R-18428	PC21	B. contaminans		Brazil	NON		89	164	310	71	168	73	161	344	301		
587	CEP0964		B. contaminans		Australia	CF		89	106	113	71	39	98	109	197	97		
1127	IST401		B. contaminans		Portugal	CF	1995	89	82	80	71	60	73	74	96			
1128	IST493		B. contaminans		Portugal	CF	2001	89	82	80	71	60	73	74	96			
1129	IST408		B. contaminans		Portugal	CF	1995	89	82	80	71	60	73	74	96			
1130	IST410		B. contaminans		Portugal	CF	1995	89	82	80	71	60	73	74	96			
1131	IST487		B. contaminans		Portugal	CF	2001	89	82	80	71	60	73	74	96			
1132	IST488		B. contaminans		Portugal	CF	2001	89	82	80	71	60	73	74	96			
1133	IST492		B. contaminans		Portugal	CF	2001	89	82	80	71	60	73	74	96			
1134	IST406		B. contaminans		Portugal	CF	1995	89	82	80	71	60	73	74	96			
1135	IST480		B. contaminans		Portugal	CF	2001	89	82	80	71	60	73	74	96			
1165	BCS9		B. contaminans		Spain	CF	2010	89	216	114	71	226	98	96	404	100		

Alelo

Figura 5. Se observa la interfaz del sitio web <http://pubmlst.org/bcc/> que permite asignar la identificación a nivel de especie o subespecie por comparación mediante la identidad de la secuencia del gen seleccionado. En este ejemplo, A) se ingresa la secuencia, B) la secuencia del gen *recA* corresponde al alelo 71, C) es identificado como *B. contaminans*.

3.2 Técnicas de tipificación por PCR-ADN-*fingerprinting*

Los elementos repetitivos que se utilizan en la técnica rep-PCR (repetitive element sequence-based PCR) se encuentran repartidos en todo el genoma bacteriano y pueden estar presentes en ambas orientaciones. Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas: los elementos Extragénicos Palindrómicos Repetitivos (REP) (*repetitive extragenic palindromic*) de 35-40 pb, las secuencias Repetitivas Intergénicas Consenso de las Enterobacterias (ERIC) (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) de 124 a 127 pb y el elemento BOX de 154 pb (58)(15). A partir de la amplificación selectiva de estas secuencias se puede hacer un análisis tipo "*fingerprint*" o huella genómica con alta reproducibilidad que permite distinguir individuos, clones o genotipos (15). Se reportó la existencia de elementos repetitivos en los genomas de *Burkholderias* (20). El procedimiento global para llevar a cabo la caracterización molecular por *fingerprinting* se indica en el esquema de la Figura 6.

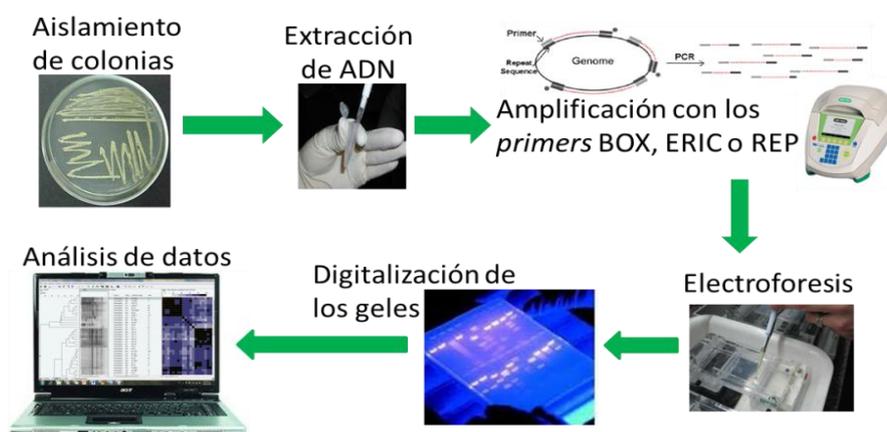


Figura 6: Esquema general de trabajo para la caracterización molecular mediante la técnica de *fingerprinting*

3.2.1. BOX-PCR (Conserved sequence BOX element of *Streptococcus pneumoniae*)

El ADN total se preparó como se ha descrito anteriormente (capítulo II) luego se diluyó hasta obtener una concentración de 5ng/μl. En este caso el primer utilizado fue el BOX-A1R (Tabla 2). Este primer se empleó con la finalidad de obtener diferentes perfiles de *fingerprint* de ADN de los distintos aislados estudiados. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25μl con 0,2μl de *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brasil), 2μl de Buffer Rxn 10X, 1,5μl de MgCl₂, 2μl de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) (200mM), 13,3μl de agua destilada y 25ng de ADN molde. Las muestras fueron amplificadas en una cicladora My Cycler Thermal Cycler (BIO-

RAD, USA) de la siguiente manera: un ciclo de 94 °C por 2 minutos para desnaturalizar el molde; 38 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 50 °C por 1 minuto y 65 °C por 6 minutos y finalmente un ciclo de 65 °C por 10 minutos (14) (15) (46).

3.2.2. ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)

Sobre el molde de ADN ajustado a una concentración de 5ng/μl se realizó la reacción de PCR empleando los cebadores ERIC1 y ERIC2. (Tabla 2). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25μl conteniendo 0,15μl de *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brasil); 2μl de Buffer Rxn 10X; 1,5μl de MgCl₂; 2μl de dNTPs 200mM; 2μl de ERIC1 y 2μl de ERIC2; agua destilada y 25ng de DNA molde (de Brujin, 1992). Luego de un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, cada uno consistiendo de tres pasos: 20 segundos a 94 °C; 1 minuto a 50 °C y 8 minutos a 65 °C. Finalmente se realizó un ciclo de extensión de 15 minutos a 65 °C. (15) (46).

3.2.3 REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic)

Sobre la preparación del ADN (entre 25-50ng/μl de molde) se agregó la mezcla de reacción de volumen final 25μl. Se utilizaron en este caso 50pmol/μl de cada uno de los primers (REP1 y REP2) (Tabla 2), 1,25mM de desoxinucleótidos trifosfato, Buffer Rxn 5X; 2 U de *Taq* polimerasa y agua destilada. El ciclado aplicado fue el siguiente: un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C por 6 minutos; 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 40 °C por 1 minuto y 65 °C por 8 minutos y finalmente un ciclo de extensión a 65 °C por 16 minutos (15)(46).

Tabla 2: Cebadores utilizados en PCR-*Fingerprinting*.

Nombre		Secuencia	Reference
BOX-A1R	Fw-1	5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -	(15)
		3'	
ERIC1R-I	Fw-1	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC -	(15)
		3'	
REP1R-I	Fw-1	3'- CGGICTACIGCIGCIII - 5	(15)
REP2-I	Rv-2	5'- ICGICTTATCIGGCCTAC - 3'	(15)

3.2.4 Análisis de los productos de PCR obtenidos por rep-PCR

En el caso de los productos de amplificación del gen *recA* y sus productos de digestión con enzimas de restricción, se emplearon para su separación geles de agarosa al 2% en TBE 0,5X corridos a 80mV por 150 minutos.

Los productos de PCR *fingerprinting* (ERIC-, BOX-, REP-PCR) fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5% en 0,5X TBE. El tiempo de corrida fue de 10 minutos a 45 mV y luego 90 minutos a 90mV con la finalidad de conseguir una separación adecuada de las bandas. La tinción con Bromuro de Etidio (10mg/ml) se llevó a cabo agregando 5µl del mismo cada 100ml de agarosa fundida. La tinción se visualizó por medio de luz UV (306nm) y se tomaron fotografías con el Sistema Digital Kodak. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Se incluyó un marcadores de peso molecular cada 18 calles para facilitar la normalización posterior de los geles (15).

3.2.5 Análisis de geles obtenidos por rep-PCR

Las imágenes obtenidas de los geles se digitalizaron y convirtieron a formato TIFF con la finalidad de llevar a cabo el análisis de los perfiles de *fingerprint* obtenidos. Con este fin se utilizó el software GEL Compare II (versión 2.1Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Cada imagen fue convertida con una resolución de calle de 250 y normalizada (resolución, 900; *smoothing* 5 puntos; sustracción de *background rolling disk intensity*, 12) usando el marcador de peso molecular *Lambda ladder* (Bio-Rad) como referencia. Se determinó que los perfiles con dos o más bandas de diferencia entre sí se consideraban no relacionados. La variación en la intensidad de las bandas no se consideró como una diferencia genética. Las bandas más débiles no se incluyeron en el análisis. El análisis de similitud de los resultados para cada ensayo fue calculado utilizando el coeficiente de "Dice" y el análisis de clústers generados por matrices de similitud se realizó usando el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Meted with Arithmetic Mean*) (14). El criterio para definir clones relacionados fue considerar perfiles con el 85% o más de bandas similares. Este valor se considero deliberadamente alto de similitud con la que definir tipos de cepas en este estudio. El valor de corte adecuado para ser aplicado en un estudio epidemiológico es difícil determinar a priori, ya que es una función de la diversidad genética dentro de las especies investigadas, el poder de discriminación del método de tipificación utilizado y la cuestión epidemiológico está abordando (12). En un estudio anterior, un corte parecido BOX-PCR de 70% se considera más apropiado para evaluar la estructura de la población mundial de *B. cenocepacia* (12)En el presente estudio, en el que pocos centros FQ participaron y se hicieron comparaciones de cepas recuperadas durante

períodos de tiempo relativamente cortos, un punto de corte superior era necesaria para proporcionar una definición más rigurosa de clonalidad.

3.3. Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)

La caracterización fenotípica por FT-IR y la discriminación de fenotipos entre los aislados clínicos y ambientales se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada en el CINDEFI para bacilos Gram-negativos, aislados de muestras de esputo de pacientes FQ (6). Para las mediciones por FT-IR, tanto los aislados clínicos, recibidos en nuestro laboratorio desde distintos hospitales, en medio agar EMB como los que se mantenían en stock y fueron subcultivados, se repicaron en medio TSA y se incubaron por 5h a 37 °C. Una ansada de bacterias de estos subcultivos fue directamente resuspendidas en 120µl de agua destilada. La suspensión se mezcló mediante vortex a alta velocidad (2000rpm) por 15 minutos empleando un minishaker MS2 (IKA Works, Inc., Wilmington, NC). Esta suspensión fue luego centrifugada a 8000g por 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el sedimento de células se resuspendió en 100µl de agua destilada. Alícuotas de 80µl de cada suspensión fueron transferidas a celdas de ZnSe y luego secadas por 45 minutos con el fin de obtener una película bacteriana transparente sobre cada celda (Figura 7).

Los espectros de absorción FT-IR fueron registrados entre 4000 y 650cm⁻¹ empleando un espectrómetro Spectrum One FT-IR Spectrometer (Perkin- Elmer Instruments) con una resolución espectral de 6 cm⁻¹ y 64 escaneos. Para el procesamiento de datos se utilizó el software OPUS (versión 4.2; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania). Las primeras derivadas se calcularon utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay con nueve puntos de “suavizado” para obtener mayor discriminación en el espectro y minimizar los inconvenientes asociados a cambios en la línea de base del espectro. Para evitar el problema asociado a variaciones en biomasa entre las diferentes muestras depositadas sobre las celdas, los espectros se normalizaron vectorialmente en todo el rango espectral (22)(41). Al menos 3 espectros de cada cepa fueron incluidos en los análisis para minimizar las variaciones inherentes al muestreo. Los niveles de reproducibilidad entre replicados para cada cepa fueron calculados como fue reportado previamente (6) tomando el promedio más o menos 2 desviaciones estándar de la llamada distancia espectral (D), que es una medida de disimilitud espectral. D es igual a $(1 - r) \times 1.000$, donde r es el coeficiente de correlación de Pearson (26)(41)(22). Para el cálculo de D y las desviaciones estándar para los diferentes rangos espectrales, se utilizó el software OPUS. Las cinco ventanas típicas que se utilizan habitualmente para llevar a cabo correlaciones espectrales para las macromoléculas biológicas más importantes de los

microorganismos son: W1, 3100-2800 cm⁻¹ dominado por C-H estiramiento vibraciones de los grupos funcionales presentes normalmente en los componentes de ácidos grasos (> CH₂ y CH₃-); W2, 1800-1500 cm⁻¹ que incluye la banda de éster y amida de la I y II bandas de proteínas y péptidos (> C = O en ésteres y C = O, NH, CN en Amide bandas); W3, 1500-1200 cm⁻¹ conocidos como la "región de mezcla", que se asigna a las proteínas y los ácidos grasos bandas de absorción (CO, P = O estiramiento bandas); W4: 1200-900 cm⁻¹ reconocidas como el polisacárido región (CO, COC); W5, 900-700 cm⁻¹ que contiene bandas que no pueden ser fácilmente asignados a grupos funcionales específicos y normalmente se conoce como la "región de huella dactilar verdadero" (41)(22). La calidad de los espectros se testeó tomando en cuenta la intensidad, el nivel de vapor de agua, valores de la relación señal-ruido y señal-vapor de agua. Adicionalmente se calculó un valor α , el cual corresponde a la relación de intensidades a dos número de onda: 1738cm⁻¹ (marcador asociado a la presencia del grupo éster carbonilo del polímero polihidroxibutirato -PHB-) y 1540cm⁻¹ (marcador asociado al grupo Amida II, de proteínas, biomasa). Valores de α superiores a 0,025 fueron descartados debido a que este polímero presenta un gran número de bandas de absorción en el IR, por lo cual por encima de dicho valor comprobamos que el alto nivel de expresión del mismo dificulta la discriminación entre espectros. Por lo tanto este valor de corte fue incluido en el Test de calidad (Figura 7).

El fenotipo de una población depende de un gran número de variables, tales como: composición del medio de cultivo, tiempo de cultivo, pH, temperatura, etc. Por lo tanto al ser los espectros infrarrojos un reflejo del fenotipo, en la adquisición de los mismos es de crítica importancia, definir un procedimiento estandarizado de toma de muestra a fin de lograr reproducibilidad en los espectros a adquirir. Los estudios de caracterización e identificación de muestras biológicas sólo son absolutamente confiables si la preparación y condiciones de medida están perfectamente estandarizadas (26)(35) La optimización y el desarrollo de las metodologías a emplear para la caracterización e identificación de microorganismos se realizaron en base al esquema general de trabajo mostrado como Figura 7.

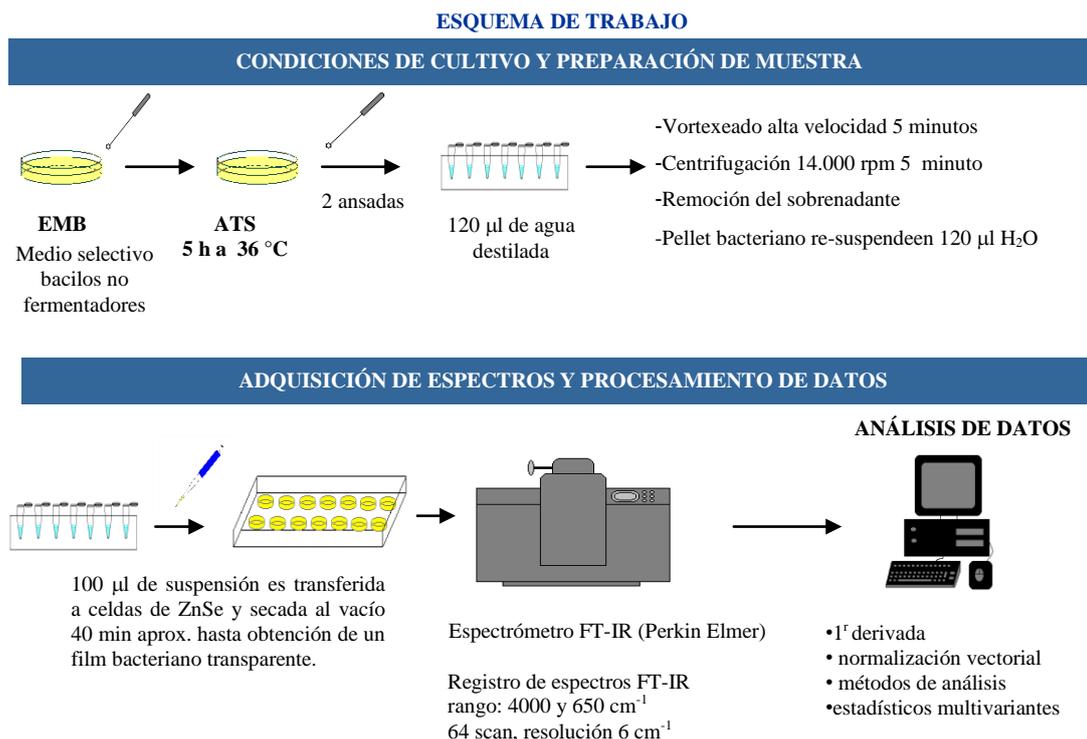


Figura 7. Esquema del procedimiento utilizado para la adquisición y procesamiento de espectros de los aislados de *B. contaminans*.

3.4.1. Detección de marcadores genéticos de transmisibilidad cable pili (gen *cbIA*)

Burkholderia cepacia epidemic strain marker (BCESM)

Para determinar la presencia y frecuencia de los marcadores cable pili-*cbIA*, y *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker (BCESM) en la colección de cepas de *B. contaminans*, el ADN bacteriano se preparó como se menciona en el capítulo II (50). A un volumen final de 25µl conteniendo 5µl de DNA molde (5-20ng/µl) se le adicionan 2,0µl del primer forward (10 pmol/µl); 2,0µl del primer reverse (10 pmol/µl) (Tabla 2); 5,0µl de Buffer PCR 5X (Quiagen); 2,5µl de dNTPs (Quiagen, 10mM por cada uno de los nucleótidos); 0,15µl de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen Brasil 5U/µl) y 8,25µl de agua destilada. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por un minuto; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos; annealing de los cebadores a 63°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 90 segundos; una extensión final de 5 minutos a 72°C se aplicó a todos los ciclos térmicos. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador My Cycler Thermal Cycler (BIO-RAD, USA). Los productos de PCR se resolvieron empleando geles de agarosa al 1% suplementados con Bromuro de Etidio (5mg/ml)(49)(32).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la detección de marcadores de transmisibilidad.

Marcador	Secuencia	Referencia
<i>cbIA</i>	Fw-1 5'-CCAAAGGACTAACCCA-3'	(49)(48)
	Rv-2 5'-AGCCGATGTCCATCACA-3'	
BCESM	Fw-1 5'-CCACGGACGTGACTAACA-3'	(32)(11)
	Rv-2 5'-CGTCCATCCGAACACGAT-3'	

3.4.2 Análisis de secuencia del marcador de transmisibilidad BCESM

Productos de PCR del marcador BCESM (1.400 pb) obtenidos utilizando los cebadores descritos anteriormente se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QUIAquick (Quiagen Inc., CA, EE.UU.). La secuenciación se llevó a cabo en MacroGen Inc. (Seúl, Corea). En la reacción de secuencia se empleó un ciclo BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La secuencia de nucleótidos del producto resultante de cada aislado se determinó como se describió anteriormente y se analizaron usando el software VECTOR NTI Advance 10 y MEGA 4.0.

RESULTADOS

3.5. Diversidad genética de aislados clínicos de *B. contaminans* obtenida de la secuencia del gen *recA*

La primer estrategia aplicada en búsqueda de la diversidad genotípica de los aislamientos de *B. contaminans* fue el análisis del polimorfismo del gen *recA*. Se construyó entonces, un árbol filogenético empleando las secuencias de ADN de 900 pb del gen *recA* de 94 aislados clínicos de *B. contaminans* (Figura 8). En dicho árbol los aislados mostraron una clara agrupación en dos *clúster* principales, A y B. Dentro del grupo A las distancias de separación entre las secuencias de los aislamientos fueron muy estrechas indicando un bajo grado de diversidad entre los aislamientos. El grupo B, en cambio mostró una mayor diversidad pudiéndose observar por lo menos 7 *clúster* en él. Se confrontaron luego, las secuencias de los fragmentos de 393 pb con la base de secuencias del MLST (<http://pubmlst.org/bcc/>), en la búsqueda de una mayor diversidad dentro de cada uno de estos grupos. Se obtuvo para cada secuencia su correspondiente alelo *recA* (ST, Sequence Type del gen *recA*) (indicados en el margen derecho de la figura 7). Al contrastar las secuencias contra la base de datos del MLST, se comprobó que cada *cluster* se correspondía con un alelo o ST, siendo el *recA* ST71 el predominante. Este alelo resultó ser el único presente entre los aislados agrupados en el grupo mayoritario A (73 aislados clínicos). En los restantes *clústeres* del dendrograma filogenético se identificaban 5 distintos tipos de *recA*-ST, y contienen en conjunto un menor número de aislados clínicos. Los *clústeres* correspondientes al alelo 166 y 243 contienen sólo un aislado cada uno, el GH1 y el HNLP 7740, respectivamente. Los otros alelos encontrados fueron el 89, 64 y 152 contenían 6, 4 y 1 aislados respectivamente.

Es interesante notar que ninguna de las secuencias del gen *recA* de las cepas de referencia que fueron incluidas en nuestro estudio se agrupó en el *clúster* o grupo A que contiene la gran mayoría de las secuencias de los aislados clínicos de pacientes fibroquísticos. Solo la cepa de referencia R18428 proveniente de Brasil (incluida en el grupo B) mostró un alelo *recA*-ST 71 y agrupó junto con el aislado no-FQ HC23. El resto de las cepas de referencia de *B. contaminans* (cuyas secuencias del gen *recA* están depositadas en la base del MLST) se agruparon en tres *clústeres* diferentes: la cepa LMG 232553 (Italia, FQ) agrupó dentro del *clúster* del alelo *recA*-ST 89 junto con aislados de pacientes no-FQ, las cepas LMG 16227 (Suecia, FQ) y R 9929 (Brasil, FQ) se agruparon juntas en el *clúster* del alelo *recA*-ST 64 junto con dos cepas clínicas locales provenientes de pacientes FQ y dos provenientes de pacientes no-FQ y por último, la cepa UFLA02-28 (EE.UU., cepa ambiental) agrupó con el aislado FQ 7740 (alelo *recA*-ST 243).

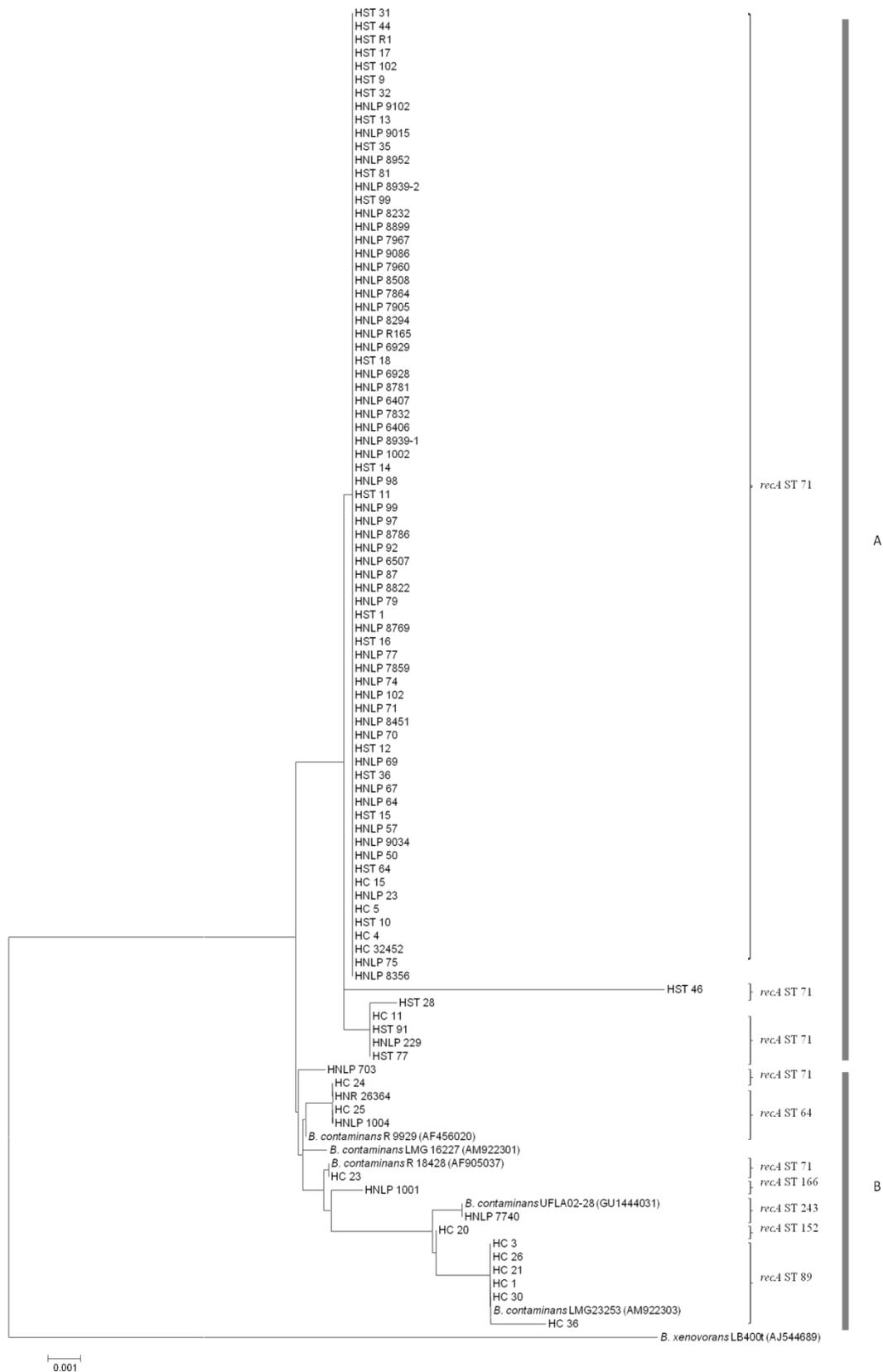


Figura 8: Árbol filogenético de 94 aislados y cepas de referencia de *B. contaminans* basado en la secuencia del gen *recA* (900 pb). Se indica el número de acceso para las cepas de referencia. HC, HST, HNLP corresponden a aislados de pacientes tratados en el Hospital de Clínicas de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Córdoba y La Plata, respectivamente. Grupo A incluye únicamente el alelo *recA* ST 71. Grupo B incluye todos los alelos restantes identificados mediante MLST-*recA*.

El 79% de los aislados clínicos mostraron el alelo *recA* ST71 (de los cuales 10 aislados correspondieron al brote del año 2004 del Hospital de Niños de La Plata) (Tabla 1), y el restante 21 % de los aislados (recuperados de pacientes no fibroquísticos) mostraron polimorfismo entre 5 alelos diferentes.

De estos resultados se desprende que esta metodología, si bien es útil para discriminar aislados pertenecientes al cBc a nivel de especie y agruparlos en diferentes alelos, no resultaba de gran poder discriminatorio para la gran mayoría de los aislados de *B. contaminans* provenientes de pacientes FQ, por lo que se requeriría de herramientas más poderosas para poder detectar diversidad genética entre dichos aislados, si efectivamente la hubiera.

Se decidió entonces estudiar si mediante otras estrategias moleculares y fenotípicas se podía llegar a establecer algún tipo de diversidad dentro del grupo de 79 aislados recuperados de pacientes FQ (Figura 8, Grupo A) los cuales se mostraban homogéneos a nivel del la secuencia de 339 pb del gen *recA*. Se seleccionaron al azar dentro de la población del grupo A, 55 aislados de pacientes FQ a fin de estudiar el poder de discriminación aplicando otra metodología como *PCR-fingerprinting* empleando tres conjuntos de cebadores diferentes (Tabla 2).

3.6. Diversidad genética entre aislados de *B. contaminans* *recA*-ST 71 a través de rep-PCR

ADN-fingerprinting

A diferencia de los métodos de polimorfismo de genes que analiza sólo un gen, o fragmentos en un conjunto reducido de genes, la tecnología del rep-PCR estudia el perfil obtenido a partir de secuencias distribuidas en todo el genoma y llegan a representar hasta el 5% del ADN bacteriano (55).

3.6.1. REP-PCR

Los patrones de bandas obtenidas aplicando cebadores REP (Tabla 2) revelaron una diversidad muy limitada entre los aislados clínicos estudiados. Se observaron sólo 4 patrones diferentes con distintas bandas, que van desde los 300 pb a 2000 pb, designados como subtipos R (R1-R4). El grupo más importante, R3, mostró un patrón de 13 bandas que se representaron en 51 cepas (92%), patrón R2 se caracteriza por 10 bandas visible y contenía 2 cepas (3,69%), patrones R1 y R4 mostraron 11 y 7 bandas visibles y representaron cada una de las cepas (1,49%) (Datos no mostrados).

3.6.2. ERIC-PCR

El análisis de los patrones de bandas obtenidos aplicando cebadores ERIC (Tabla 2) mostró 5 perfiles diferentes. Los perfiles estaban constituidos por bandas que van en tamaño desde 250 pb a 3500 pb (Figura 9). Estos distintos patrones fueron, designados como subtipos E1 a E5. El grupo más grande (subtipo E5) se caracteriza por un patrón de 7 bandas que contenía 46 (89%) de los 55 aislamientos, un pequeño grupo (subtipo E4) con perfil de 7 bandas visibles, agrupando 3 cepas (5,76%) y 3 grupos de distintos subtipos (E1, E2 y E3) con una sola cepa de cada uno (1,98%) que muestra 12, 11 y 8 visible bandas, respectivamente.

En cuanto a la distribución geográfica de los aislados según su perfil genético, no se pudo encontrar una agrupación significativa. Se debe tener en cuenta en este sentido que la mayoría de los mismos proviene de los Hospitales de Córdoba y de Niños de La Plata. Por otro lado, en el Hospital de Niños de La Plata fueron recuperados 20 aislados entre 2004-2005, época durante la que se desarrolló el brote ya mencionado. Es interesante resaltar que a excepción de 2 aislados (genotipo E3) recuperados en este periodo, los restantes mostraron el mismo perfil de ERIC-PCR (E5).

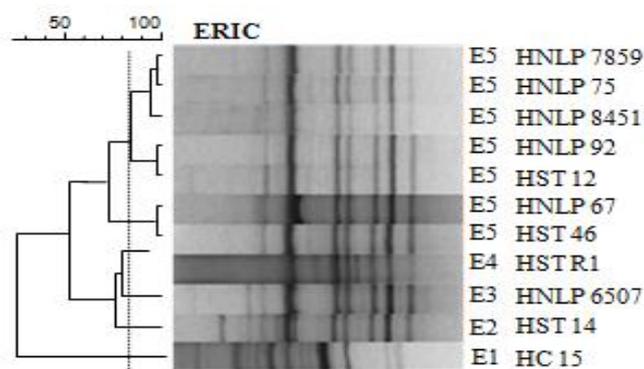


Figura 9. Perfiles de *fingerprinting* obtenidos usando los cebadores ERIC en los aislados clínicos de *B. contaminans*. Las cepas que se indican son representativas. El dendrograma fue construido mediante el método de UPGMA. La línea de punto indica un valor de *cut-off* del 85%.

3.6.3. BOX-PCR

Un mayor grado de discriminación entre los aislados pertenecientes a este grupo relativamente homogéneo de cepas que infectan pacientes fibroquísticos se obtuvo a partir de la aplicación de la técnica BOX-PCR. Como se indica en la Figura 10, se observan 10 perfiles distintos designados como BOX-subtipos B1 a B10. Las bandas en este caso mostraron, tamaños que van desde 280 pb a 2200 pb y entre 6 y 12 bandas según el perfil. La distribución

de los perfiles de amplificación de los aislados fue el siguiente: el subtipo B8, 50%; el subtipo B1, 22,9%; los subtipos B6 y B7, 6,75%; el subtipo B9, 5,4%, y la B2, B3, B7, subtipos B5 y B10, 1,35%, estos comprenden sólo el 1 aislar cada uno.

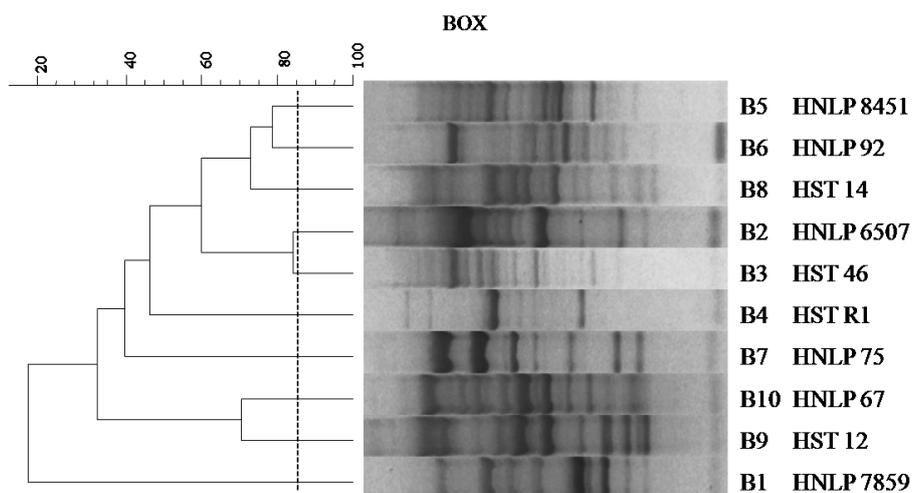


Figura 10. Perfiles de *fingerprinting* obtenidos usando los cebadores BOX-AR1 en los aislados clínicos de *B. contaminans*. Las cepas que se indican son representativas. El dendrograma fue construido mediante el método de UPGMA. La línea de punto indica un valor de *cut-off* del 85%.

Dado que BOX mostró ser una herramienta con la que se obtiene un alto grado de discriminación intraespecie para *B. contaminans* se decidió emplear dicha tecnología para analizar la incidencia de cada subtipo BOX. En los primeros aislados de *B. contaminans* recuperados de cada paciente durante el período de 2004-2010. Tres subtipos, B1, B7, B8 fueron los patrones más abundantes encontrados. En conjunto estos representaron al 75% de los aislamientos. El subtipo B6 se observó en 3 pacientes, mientras que los restantes 6 subtipos eran patrones únicos observados en sólo un paciente cada uno (Figura 11A). Con respecto a la distribución **geográfica**, mientras que los aislados con subtipos B7 y B8 se encontraron en ambos centros de referencia a una incidencia notablemente alta, todos los otros subtipos de BOX-estuvieron presentes en sólo una de las dos ubicaciones geográficas (Figura 11B). En cuanto a la prevalencia de cada subtipo BOX en el **tiempo**, se pudo comprobar que durante el período del brote (2004-2005), los pacientes fibroquísticos fueron en la mayoría de los casos, infectados con los subtipos B8 (55%), B7 (15%), y B6 (11%), pero también en una proporción mucho menor con cepas pertenecientes a otros genotipos (es decir, B2, B3, B4, B9 y B10; (Figura 11C). Si bien, luego del brote siempre se recuperó subtipo B8 en nuevas infecciones además otros subtipos como B1 y B5 también fueron recuperados.

Por lo tanto, se puede inferir que a pesar de estar subyacentes otros genotipos, el subtipo B8, y en menor medida el B7 fueron los clones principalmente extendiendo entre los pacientes

de manera más eficaz en el período del brote (Figura 11B y 11C). Sin embargo, el subtipo B1 presenta la mayor incidencia actual (Figura 11C).

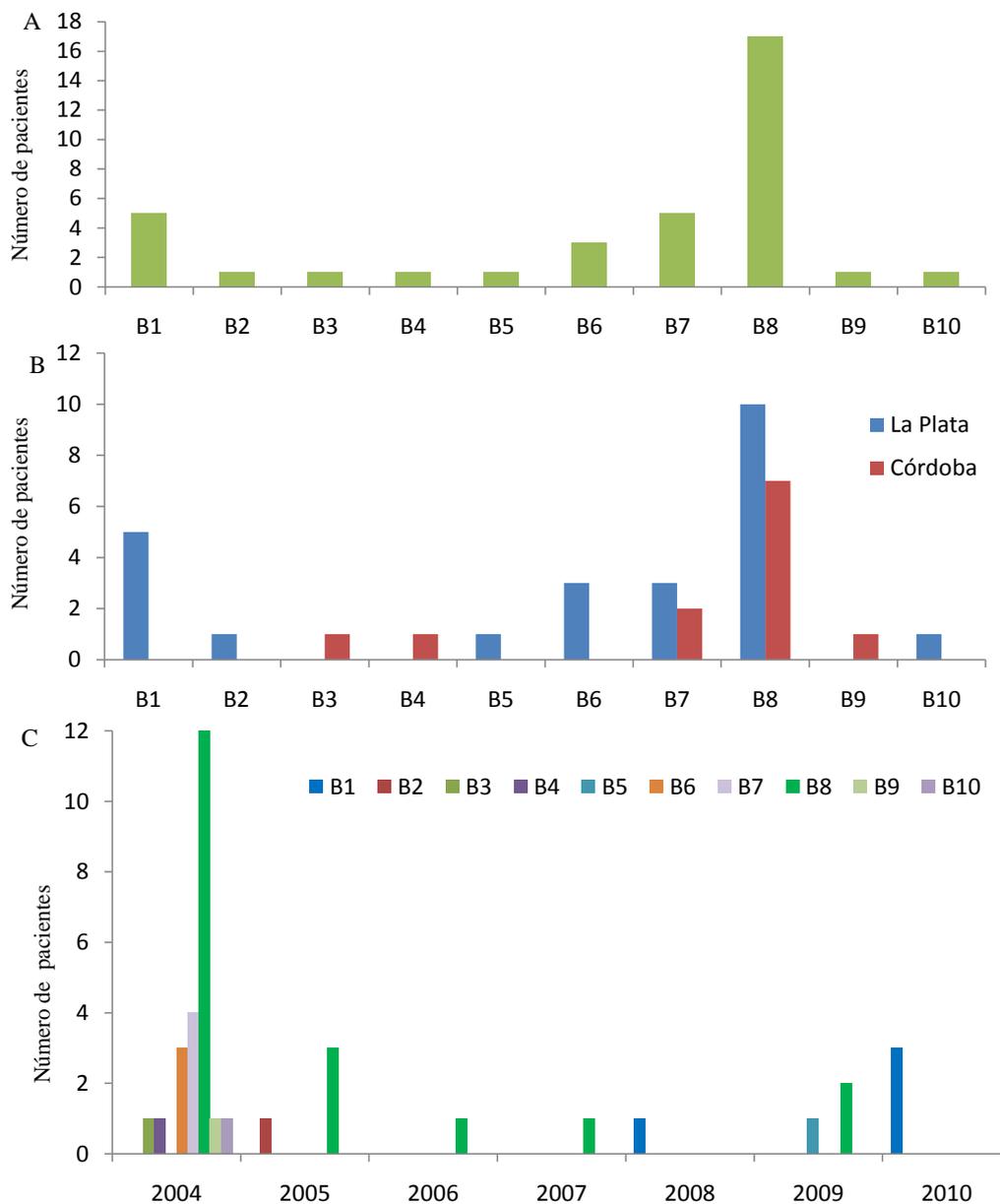


Figura 11. Distribución de subtipos de BOX (B1-B10) de *B. contaminans* recuperados durante un período de 7 años. Se consideró sólo el primer aislado de la especie a partir de cada paciente: A) incidencia, B) distribución geográfica, C) distribución temporal.

3.7. Determinación de la presencia de Marcadores de transmisibilidad

Los resultados obtenidos de genotipificación indicaban que al menos parte de los aislamientos que circularon durante el brote del 2004-2005 compartían el mismo subtipo genético (B8 (55%), B7 (15%), y B6 (11%) y que los aislamientos que actualmente infectan

nuevos pacientes comparten también principalmente dos subtipos (B1 y B5). Esto nos llevó a pensar que quizás una de las razones que hacía a estos subtipos más transmisibles podía ser la presencia en estos organismos de el cable pili (gen *cbIA*), presente en las llamadas cepas epidémicas o por la presencia del gen de transmisibilidad (BCESM), un gen asociado a una isla de patogenicidad (11)(28).

Se analizaron 60 cepas de *B. contaminans* aisladas de pacientes FQ (un aislado por paciente), no-FQ se evaluó la presencia de ambos marcadores según se indicó en la sección de métodos. En la Figura 12 se observa una imagen representativa de la reacción de PCR para dichos marcadores. El 69 % de los 60 aislados de *B. contaminans* presentaron bandas de 1.4 kb al ser analizados para el marcador BCESM, mientras que al analizar para el marcador *cbIA* ninguna de las reacciones de PCR dio positivo. La secuenciación del marcador BCESM confirmó que la banda detectada era específica para dicho marcador.

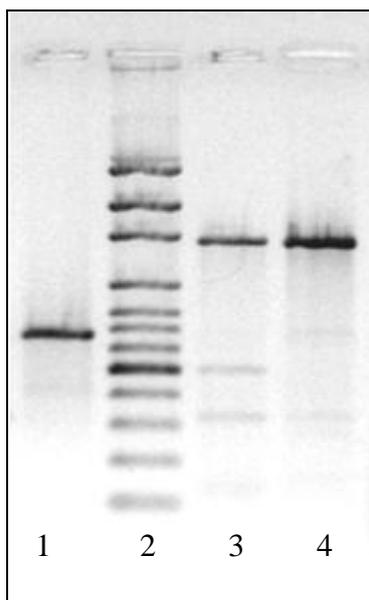


Figura 12. Estudio de marcadores de transmisibilidad. Línea 1: Amplicon de 680 pb del gen *cbIA* (*B. cenocepacia*, control positivo) 3 y 4: Amplicones de 1,4 kpb, del marcador BCESM, Control positivo y aislados de *B. contaminans*, respectivamente. 2: marcador de peso molecular 100 a 3000 pb (Axygen, Bioscience, EE.UU.)

A fin de analizar la relación entre aislados provenientes de infecciones ocurridas en un mismo periodo, esporádicas y ambientales de cepas de *B. contaminans* identificadas por BOX-PCR y la presencia del marcador de transmisibilidad; se examinó la distribución en aquellos aislados positivos para BCESM (Tabla 4). En 36 cepas recuperadas de distintos pacientes, tipificados por BOX-PCR, 18 de ellas fueron positivas para la presencia del marcador BCESM. En particular aproximadamente el 50 % de los aislamientos correspondiente a los

subtipos B1, B6-, B7- y B8. En cuanto a las muestras ambientales una de las dos muestras analizadas mostraron el subtipo B8 y el marcador BCESM. El 68% de los aislados con genotipo B8 era portador del marcador de transmisibilidad.

Tabla 4. Distribución del marcador BCESM según Subtipos BOX-PCR.

Nº aislados	Marcador	Subtipos Box-PCR									
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
FQ (36)	-	2	0	1	1	1	2	3	5	1	1
	+	2	1	0	0	0	1	2	12	0	0
No-FQ (15)	-	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0
	+	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0
Ambiental (1)	+	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

3.8. Diversidad fenotípica en aislados clínicos de *B. contaminans* (*recA* ST-71) mediante espectroscopia FT-IR

Usando enfoques genéticos complementarios, se exploró y analizó la diversidad dentro del grupo de aislados de *B. contaminans* que compartían el alelo *recA* ST-71 (grupo A en la Figura 8). Con el objetivo de conseguir una mayor comprensión de la diversidad bioquímica de estos aislados, hemos analizado su diversidad fenotípica por espectroscopia FT-IR. La Figura 13 muestra espectros FT-IR y sus correspondientes derivadas primera (panel A y panel B, respectivamente) para 4 diferentes aislamientos clínicos (HNLP 6406, HNLP 6507, HNLP 9015, HST 91), tomados como representantes de la población analizada. Las derivadas primeras pertenecientes a un mismo aislado mostraron una alta reproducibilidad (variación muy pequeña entre los distintos aislados), mientras que se observaron diferencias significativas en las características generales de las derivadas primeras en todo el rango espectral, al comparar diferentes aislados. Así, con el fin de comparar espectros FT-IR entre todos los aislamientos que llevan el *recA*-ST 71, se utilizó la información codificada en derivada primera de los espectros en los rangos espectrales W1, W2, W3, W4 y W5. Las distancias espectrales (D-valores, OPUS Software, versión 4.2, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania) fueron calculadas y un dendrograma basado en las distancias promedio fue construido (Figura 14) (ver Materiales y Métodos).

Los aislamientos con distancias espectrales menores que el valor de corte de $D = 6,8$ (indicado por la línea punteada en la Figura 14) fueron asignados al mismo fenotipo o tipo espectral. De esta manera la población estudiada está representada por 19 fenotipos o tipos espectrales (Figura 14) (F1 a F19). Teniendo en cuenta las distancias espectrales se pueden

diferenciar claramente en el dendrograma generado 4 grupos: un gran grupo α , que incluyó a más del 80% de los aislados clínicos que comprenden los tipos espectrales de F1 a F9, y tres grupos menores β , γ y ∇ que incluye los tipos espectrales F10 a F19. Curiosamente, el grupo α incluyó todos los aislamientos recuperados inicialmente en el momento del brote hospitalario.

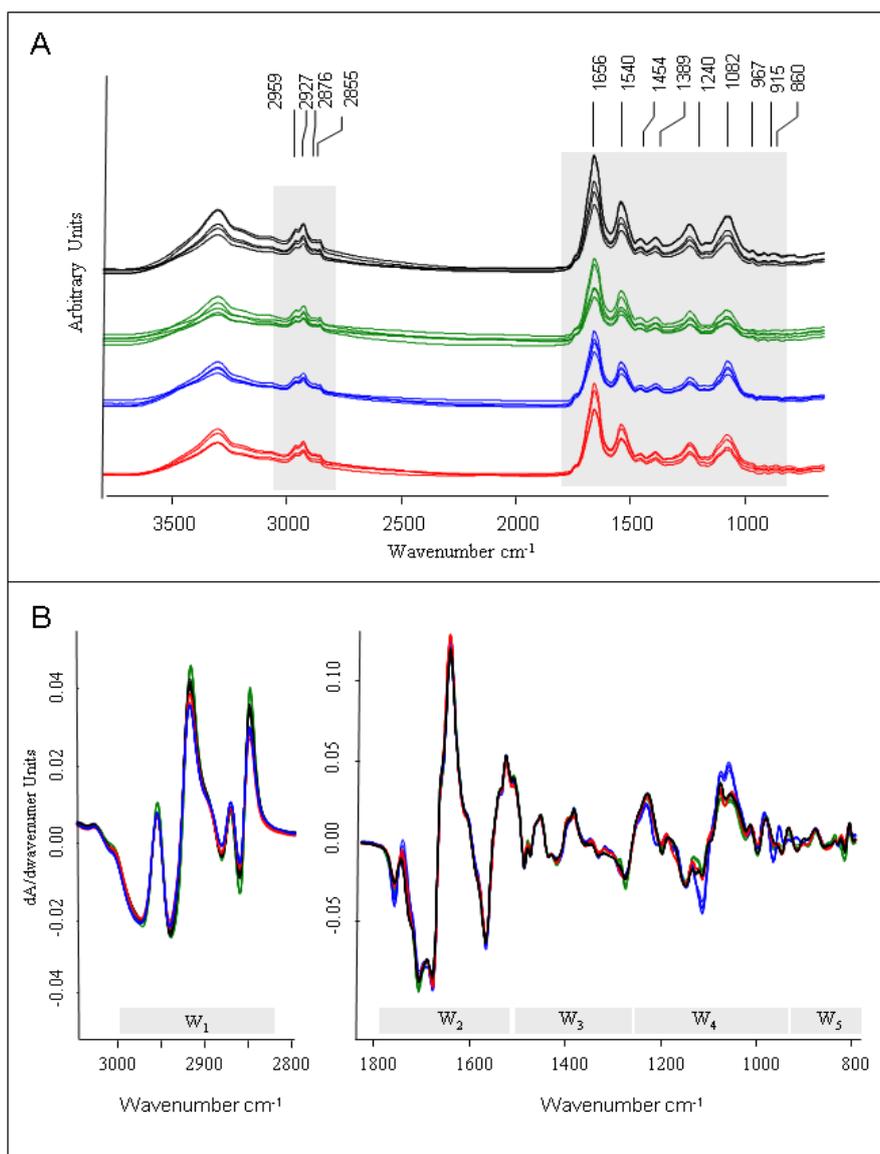


Figura 13. Espectros FT-IR de 4 diferentes aislamientos clínicos tomados como representantes de *B. contaminans* de la población con alelo *recA* ST 71 (5 espectros replicados medidos de forma independiente para cada aislamiento). B) Derivada primera de espectros normalizados vectorialmente en todo el rango espectral. La normalización se llevó a cabo en el intervalo 3000-750 cm^{-1} . (Véase la descripción de la asignación de banda de las regiones W1 a W5 en la introducción). Se indican bandas diferenciales en las regiones 3000-2800 cm^{-1} , y 1800-750 cm^{-1} .

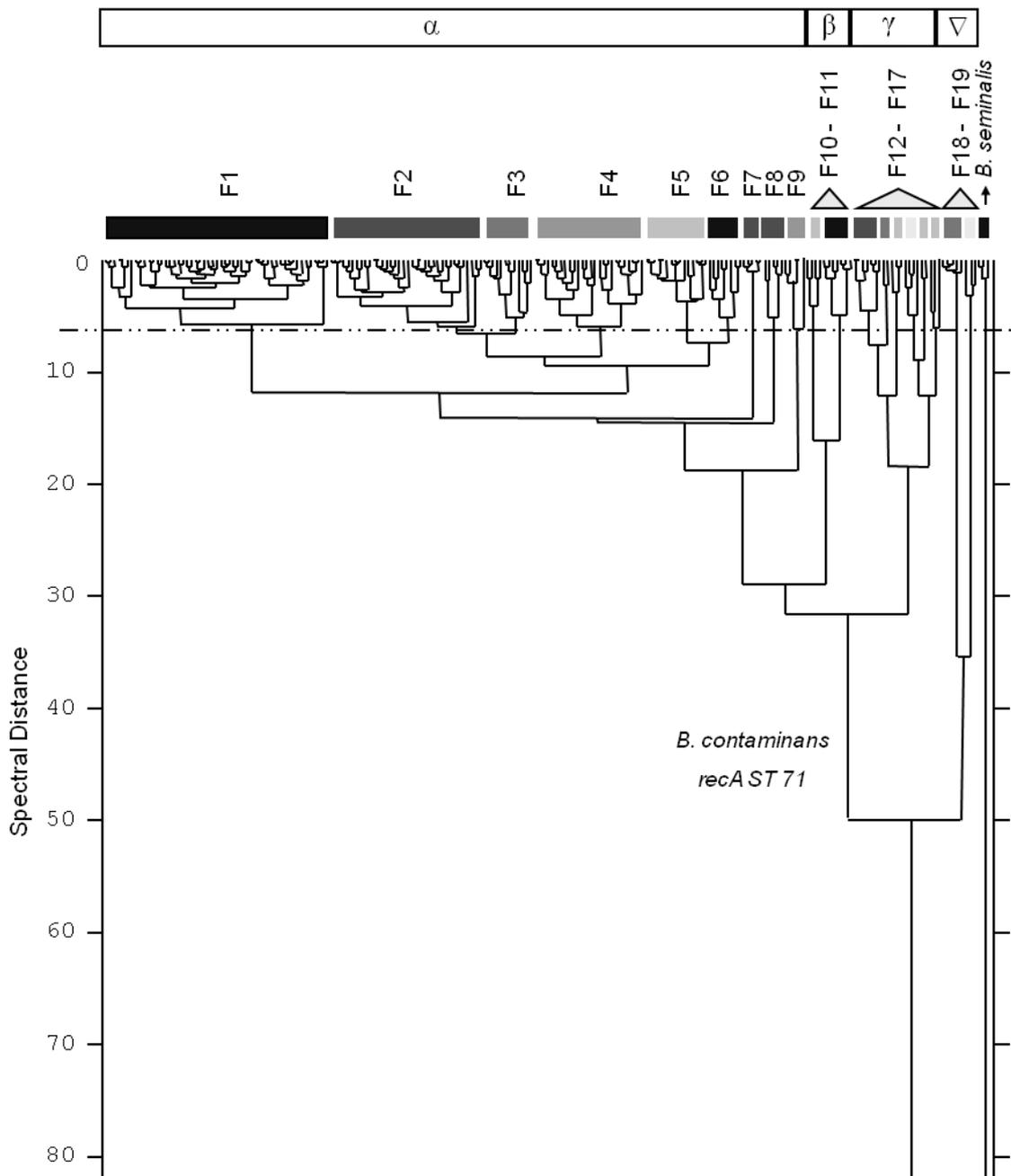


Figura 14. Dendrograma obtenido por análisis de agrupamiento jerárquico de espectros FT-IR de aislamientos clínicos de *B. contaminans* con *recA* ST 71 (Tabla 1). Se incluyó un aislado de *B. seminalis* utilizado como referencia de otra especie. El dendrograma se construyó utilizando la derivada primera de espectros normalizados vectorialmente en los rangos espectrales W3 (1500-1250 cm^{-1}), W4 (1200-900 cm^{-1}), y W5 (950-700 cm^{-1}), igualmente ponderados. Las distancias espectrales se calcularon utilizando los valores D-, y el dendrograma se obtuvo mediante el algoritmo *Average-Linkage*. La línea punteada representa el valor de corte que discrimina a los diferentes tipos espectrales o fenotipos que en este dendrograma se corresponde con un valor D de 6,8 (ver Materiales y Métodos). Los aislados clínicos agrupados con un valor de distancia espectral menor que el número de corte fueron asignados a un mismo tipo espectral.

Los aislamientos recuperados de pacientes infectados después del período de brote y los aislamientos obtenidos de pacientes con infección crónica por *B. contaminans* fueron agrupados en los grupos β , γ y ∇ . Es interesante notar que, que los aislamientos incluidos en los grupos β , γ , y ∇ mostraron alta diversidad fenotípica entre ellos, como se indica por el hecho de que 14 aislados se agruparon en 10 fenotipos espectrales diferentes (F10 a F19).

3.9. Infecciones crónicas

Tal como se analizó en el capítulo II (Figura 8 , capítulo II) en el periodo 2004-2010 de vigilancia y tratamiento, 66 pacientes FQ que concurren a hospitales de la región fueron diagnosticados con la presencia de bacterias de complejo *Burkholderia cepacia* en muestras de esputo y en 21 de ellos se estableció una infección crónica. En 8 de estos 21 pacientes colonizados crónicamente se pudo recuperar más de una especie del complejo *Burkholderia cepacia* a lo largo del curso de la infección (Tabla 1, líneas 1 a 3), ya sea como consecuencia de una co-infección o debido a una posterior colonización por una especie diferente (“reemplazo de especies”). En contraste, en los restantes 13 pacientes crónicos sólo se pudo recuperar *B. contaminans* a lo largo de toda la infección (Tabla 1, líneas 4 y 5).

Tabla 5. Reemplazo de especies en infecciones crónicas por cBc.

Especies del complejo <i>B. cepacia</i> recuperadas de la muestra inicial ^a	Especies recuperadas en muestras sucesivas	Número de pacientes
<i>B. contaminans</i>	<i>B. cenocepacia</i>	4
<i>B. cepacia</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	2
<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. contaminans</i> , <i>B. cenocepacia</i>	2 ^b
<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i>	2
<i>B. contaminans</i>	<i>B. contaminans</i>	5 ^c
<i>B. contaminans</i>	<i>B. contaminans</i>	8 ^d

^a Identificación de los 1^{eros} aislamientos clínicos disponibles recuperados de pacientes crónicos.

^b Especies diferentes de la inicial fueron detectadas y entonces, en cultivos posteriores, las especies iniciales se encontró de nuevo, indicando probable co-infección.

^c Se detectó un mismo subtipo de BOX en los cultivos posteriores.

^d Diferentes patrones de BOX fueron detectados en cultivos posteriores.

3.10. Evolución genética y fenotípica en aislados sucesivos de *B. contaminans* en la infección crónica

La Figura 15, ilustra los genotipos (panel izquierdo)(Tabla 5) y fenotipos espectrales obtenidos mediante espectroscopía FT-IR (panel derecho), que caracterizan a cada aislado de

B. contaminans recuperados del grupo de pacientes con infección crónica que no sufrieron “cambio de especies”. Entre estos 13 pacientes, se encontraron tres escenarios diferentes cuando se considera los genotipos (BOX-subtipos) y fenotipos (tipos de espectros FT-IR) de las bacterias presentes en cultivos de esputo recuperados a lo largo de la infección de cada paciente: (i) los aislados analizados conservan tanto su genotipo como su fenotipo (pacientes H, I y M de la Figura 15), (ii) los aislados secuencialmente recuperados conservan su genotipo pero cambiaron su fenotipo evaluado mediante espectroscopía FT-IR (pacientes B y J en la Fig. 15), y (iii), para el caso de los restantes 8 pacientes el genotipo y el fenotipo de los aislados recuperados cambian a lo largo de la infección crónica. Los escenarios (ii) y (iii) pueden haber ocurrido ya sea como consecuencia de una “sustitución de cepa/s” o lo que se cree más probable, debido a co-infecciones donde diferentes aislados son recuperados (al azar) en las tomas de muestras diferentes (en algunas oportunidades se aíslan unos y en otras oportunidades se aíslan otros, pero ambos tipos genéticos se encuentran coexistiendo). Análisis de la diversidad genotípica por BOX-PCR a lo largo del curso de las infecciones crónicas de los pacientes incluidos en los casos (ii) y (iii), mostraron que los aislados recuperados durante el primer año/s de la infección, pertenecían a subtipos de BOX diferentes (Fig. 15 panel izquierdo), siendo el subtipo B8 el predominante (muy probablemente porque fueron recuperadas durante el brote 2004-2005 donde predominaba en un 50 % B8). En contraste, los aislamientos recuperados subsiguientemente de infecciones prolongadas se ubicaron dentro de los subtipos B1 o B8. Estos dos subtipos de BOX-PCR parecen ser predominantes en los pacientes FQ infectados crónicamente en la Argentina. Curiosamente, a partir del examen de los fenotipos espectrales FT-IR de los aislados obtenidos de pacientes incluidos en los escenarios (ii) y (iii) (Fig. 15 a la derecha del panel), parece evidente que aislados recuperados durante los primeros años de la infección se caracterizan por tener diferentes fenotipos, pero bastante relacionados entre sí (los aislamientos fueron agrupados en un *clúster* denominado α donde aparecen estrechamente relacionados con los tipos espectrales F1 a F6, Figura. 14). Por el contrario, los tipos espectrales de FT-IR de los aislados obtenidos de pacientes después de un relativamente largo período de colonización crónica (más de un año) por *B. contaminans* resultaron significativamente distintos, y diferentes de los obtenidos durante el primer año de la infección (Figura 15, panel derecho).

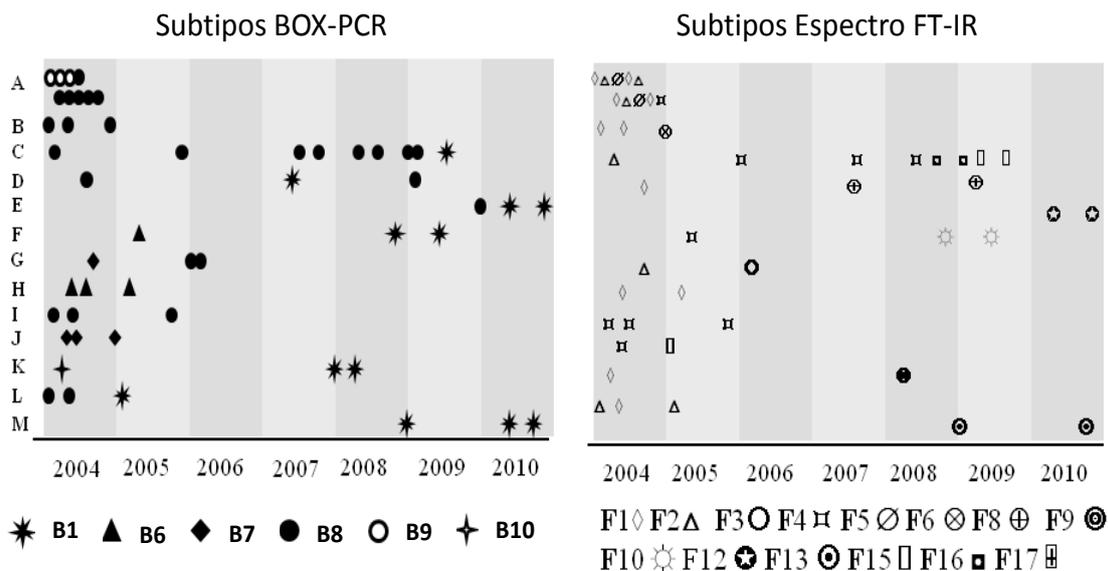


Figura 15. Diversidad genética por BOX-PCR (cuadro de la izquierda) y fenotípica por espectroscopía FT-IR (cuadro de la derecha) en aislados sucesivos de *B. contaminans* recuperado de 13 pacientes FQ. B1, B6-B10 corresponde a los genotipos identificados. F1 – F17 pertenecen a los tipos espectrales de FT-IR.

DISCUSIÓN

Los estudios de diversidad microbiana sugieren el empleo de un conjunto de tecnologías que resultan de gran importancia para diferentes propósitos. A nivel internacional el *National Institutes of Health* continua confrontando la diversidad asociada a patógenos microbianos en enfermedades emergentes. El conocimiento de la estructura de una comunidad microbiana, que incluye la diversidad y la abundancia total y relativa de sus integrantes así como su relación con los factores ambientales, es de gran importancia para comprender el papel de las bacterias en sus nichos naturales y detectar y predecir posibles patrones de comportamiento, ya que esta información permitiría un manejo más efectivo de los ecosistemas. Los estudios moleculares que comparan secuencias génicas de microorganismos han demostrado una gran diversidad bacteriana, al menos 100 veces mayor que las estimaciones basadas en técnicas dependientes del cultivo. Dentro de las técnicas moleculares utilizadas, las de *fingerprinting* como T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) (29)(5) y DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) permiten analizar la dinámica de la estructura de las comunidades en muestras ambientales(21)(38).

En los últimos años se han incorporado técnicas a gran escala como las metagenómicas, basadas en el análisis de fragmentos genómicos de microorganismos, y dentro de ellas, el uso de metodologías alternativas de secuenciación, para el estudio más detallado de la diversidad de comunidades microbianas naturales. Mediante estas técnicas se

obtienen secuencias génicas que proveen una base para la estimación de la diversidad filogenética y generan "inventarios taxonómicos" de las poblaciones microbianas de distinto interés. El aislamiento y la identificación de microorganismos presentes en un ambiente es el primer paso de una investigación para determinar las propiedades y características particulares de los diferentes géneros presentes. La diversidad de las especies que existen en un determinado hábitat es una consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente, y desde un punto de vista ecológico, nos interesa conocer porqué existe esta diversidad, cómo está organizada en la comunidad microbiana y qué valor tiene para la estructura y función de toda la comunidad. Actualmente existe un gran interés por el estudio de la biodiversidad en ambientes tan extremo como el pulmón del paciente FQ con el fin de determinar cuáles son las características peculiares que permiten a estos microorganismos persistir por años.

En nuestro caso en particular y tal como fue mencionado anteriormente, la especie *B. contaminans* ha sido recientemente descrita por lo que dada la alta representación local de dicha especie es necesario avanzar en el conocimiento de sus características genotípicas y fenotípicas. En este capítulo tiene entonces por objetivo presentar resultados acerca de la diversidad de la población local de esta especie.

Se obtuvo un árbol filogenético por comparación de las secuencias del gen *recA*, que permitió discriminar a la población en estudio en 10 diferentes grupos considerando una secuencia de 900 pb. A través del análisis de las secuencias de 339 pb disponibles en el MLST, se pudieron discriminar 6 diferentes tipos separados en un grupo A sumamente amplio y homogéneo conformado por sólo un *recA*-ST, y un grupo B, más heterogéneo conformado por 6 subtipos (*recA*-ST): ST 64, ST 71, ST 89, ST 152, ST 166 y ST 243. Curiosamente, ninguna de las secuencias del gen *recA* correspondientes a aislamientos agrupados en el *clúster* mayor, señalado como grupo A (Figura 8) fue representada por las secuencias de cepas de referencia disponibles en el GenBank. Sólo una secuencia de referencia que muestra el alelo *recA*-ST 71 que pertenece a una cepa aislada de un paciente FQ en Brasil (*B. contaminans* R 18428), agrupó a una distancia corta del grupo A (Figura 8). Este hecho sumado a los casos reportados en Brasil de pacientes FQ colonizados con organismos caracterizados por un patrón RFLP *recA* tipo K (16)(1), podrían estar indicando la existencia de una distribución regional de *B. contaminans*.

A fin de avanzar en el estudio de diversidad de esa población altamente relacionada *recA*-ST71, se realizaron investigaciones aplicando rep-PCR. Previamente, se habían reportado estudios en este sentido para otras especies del complejo *B. cepacia*. En este sentido, la aplicación de cebadores ERIC- y BOX-PCR (8)(12)(14) demostraron ser válidas como técnicas alternativas al PFGE. Nosotros en estos trabajos demostramos, por primera vez, que BOX-PCR

constituye un método de caracterización fiable para examinar la relación genética entre aislados de *B. contaminans*. Es interesante notar que esta metodología permitió discriminar subtipos genéticos dentro de un grupo muy relacionado de aislamientos como los que forman parte del grupo A en la Figura 8. Del mismo modo, hemos demostrado que el empleo de métodos fisicoquímicos como la espectroscopia FT-IR, que proporciona una vista “OMICA” del estado bioquímico total de la población bacteriana (39), también resulta adecuada para discriminar la población a nivel de subespecie. La aplicación de estos enfoques de tipificación genética y fenotípica para el grupo homogéneo de los aislados *B. contaminans* (alelo recA ST 71) originó una variación intraespecies de 10 genotipos (Subtipos BOX-PCR) y 19 fenotipos (tipos FT-IR espectrales).

La alta incidencia de aislamientos del subtipo designado como B8 recuperados en el período del brote infeccioso ocurrido entre 2004 y 2005 (Figura 11), nos permite inferir que parte de estas infecciones pudieron haberse transmitido eficientemente a través de una propagación clonal entre los pacientes (Figura 11B y C). Sin embargo, es importante destacar que en ese período otros subtipos BOX (B3, B4, B5, B6, B7, B9 y B10), también estuvieron presentes (Figura 11C). Es decir, que aunque un gran número de infecciones podría haberse debido a una transmisión interpaciente del BOX-subtipo B8, otras fuentes de infección, como el medio ambiente o productos peridomésticos podrían haber sido el origen de las infecciones en pacientes FQ en dicho período. Un fenómeno similar ha sido reportado anteriormente en diferentes brotes de otras especies de *Bukholderia* (4).

Es interesante notar que en los tres últimos años de nuestra vigilancia los genotipos únicos B3, B4, B5, B6, B7, B9 y B10, fueron muy ocasionalmente recuperados de nuevas infecciones. Sólo los genotipos B1-, B5- y B8 (Box-subtipos) han sido los recuperados de nuevas infecciones. Este hecho estaría a favor de la hipótesis que los genotipos únicos no pudieron persistir en sus nichos (medio ambiente, productos industriales, etc) y que no son típicamente trasmisibles de paciente a paciente. En contraste, los subtipos de BOX- B1 y B8 persistieron a lo largo de los 7 años de nuestra vigilancia en pacientes colonizados por primera vez (Figura 11C). Estos resultados muestran que la diversidad genética evaluada por subtipos de BOX- entre las cepas que infectan a pacientes con FQ durante el tiempo de nuestro estudio parecen disminuir, siendo los subtipos B1 y B8 los que persisten en la mayoría de los pacientes en estudio. Sin embargo, es interesante señalar que las características fenotípicas de los genotipos B1 y B8 fueron diversos con el tiempo: mientras que en el período de 2004-2007 los aislados pertenecientes a los genotipos B1 y B8 recuperados de las primeras infecciones comprendían una población fenotípica estrechamente relacionada (tipos espectrales agrupados en *clúster* α , Figura 14). En el período de 2008-2010 la población con subtipos de

BOX- B1 y B8 recuperados de pacientes fueron fenotípicamente muy diversas (se agrupan en grupos: β , γ o ∇), mostrando un alto grado de disimilitud (heterogeneidad) entre ellos y entre los aislados agrupados dentro del grupo α (Figura 14). Por lo tanto, estos resultados muestran que si bien la diversidad por subtipos de BOX entre las cepas que infectan a los pacientes durante el tiempo disminuye, su diversidad fenotípico aumenta significativamente. Estos hechos nos llevan a inferir que las bacterias pertenecientes a los subtipos B1 y B8 podrían haber sufrido cambios fenotípicos en el tiempo que les permitió sobrevivir en su nicho y colonizar nuevos pacientes FQ.

La presencia de cepas comunes a múltiples pacientes sugiere fuertemente una transmisión de persona a persona, sin embargo, también es posible la adquisición de bacterias de una fuente común (34). Trabajos realizados sobre las características genéticas de ciertas poblaciones *B. cenocepacia* demostraron que la transmisibilidad estaba asociada a la presencia del marcador BCESM (32)(28), Sin embargo posteriormente otros autores reportaron que tanto el marcador BCESM como el cable pili no son marcadores seguros para asociarlos a la transmisibilidad dentro de infecciones producidas por *B. cenocepacia* (34). Nosotros presentamos evidencia que un alto porcentaje de las cepas de *B. contaminans* causantes de infecciones múltiples o aisladas (única) en pacientes FQ presentan el marcador BCESM. Sin embargo este marcador también fue detectado en aislados ambientales y de pacientes No-FQ que compartían el mismo genotipo (subtipo de Box-B1, -B2 y -B8). Estos resultados estarían de acuerdo con la idea de que el marcador BCESM por sí solo no cubre la totalidad de las cepas transmisibles, pero permite una rápida y sencilla identificación de cepas transmisibles circulantes. Por otro lado el marcador cblA no fue detectado en ningún aislado recuperado durante los años de nuestra vigilancia.

3.11. Epidemiología de la infección crónica

Los pacientes con FQ son propensos a las infecciones crónicas de las vías respiratorias. Ha sido ampliamente reportadas por la bibliografía, que durante el curso de infecciones a largo plazo tanto la persistencia de una misma cepa o la colonización con una cepa diferente (de la misma o de diferente especie) puede ocurrir (3)(10)(27). Nosotros observamos este escenario en los pacientes FQ estudiados durante 7 años de vigilancia. Al igual que lo reportado previamente por otros autores (3)(63), no se observó reemplazo de cepa cuando *B. cenocepacia* o *B. multivorans* fue la especie inicial colonizadora. Sin embargo, en 2 pacientes se aisló *B. contaminans* aparentemente de manera transiente, cuando inicialmente fue detectada *B. cenocepacia*.

En cuanto a la persistencia de *B. contaminans* en infecciones crónicas, a partir de análisis de *fingerprinting* de ADN por BOX-PCR de los aislados obtenidos de 13 pacientes (panel de la izquierda, la fig. 15) se demostró que durante el primer año de colonización de los pacientes estos fueron infectados por bacterias que presentaron diferentes subtipos genéticos, con el subtipo B8, como relativamente predominante (pacientes C, D, F, K), probablemente debido a una propagación clonal durante el brote registrado en el período 2004-2005 en pacientes locales. Sin embargo, en las infecciones de largo plazo, sólo se recuperaron los genotipos B1 y B8 (panel izquierdo Fig. 15). Por lo tanto, estos subtipos fueron los genotipos que caracterizaron a la población infectada a largo plazo coexistente probablemente al mismo tiempo (63). Nuestros resultados mostraron, al igual que como ocurrió con los aislados implicados en las nuevas infecciones, que las cepas que se establecen como responsables de infecciones crónicas también mostraron una disminución de diversidad en cuanto a subtipos de BOX a lo largo del tiempo de la infección, con B1 y B8 siendo los genotipos prevalentes. Este tipo de eventos son los que se han descrito para infecciones por *P. aeruginosa* en donde después de un período de colonización recurrente, los pacientes con FQ se encuentran colonizados permanentemente con un único linaje (24)(47). Una vez que este linaje de *P. aeruginosa* se adaptó al entorno hostil del pulmón del paciente con FQ (“cepa dominante adaptada”), puede persistir durante varias décadas en las vías respiratorias de estos pacientes, superar los mecanismos de defensa del hospedador, así como también intensivas terapias antibióticas a que son sometidos los mismos (19)(24)(53)(64).

En contraste con los resultados de diversidad encontrada mediante el empleo de BOX-PCR, la espectroscopía FT-IR mostró un mayor número de fenotipos espectrales que el método de BOX-PCR, entre los aislamientos recuperados de infecciones crónicas. Mientras que el fenotipo de la mayoría de los aislados obtenidos durante el período inicial de las infecciones se agrupó en un *clúster* con tipos espectrales estrechamente relacionados (agrupados todos dentro de lo que denominamos grupo α) (Figura 14,), los fenotipos de los aislados clínicos recuperados después de una colonización prolongada de las vías respiratorias de pacientes FQ (más de un año de infección) se agrupan en los *clúster* β y ∇ , agrupaciones caracterizadas por 8 fenotipos FT-IR (F10 a F17, en la figura 14,). Por lo tanto, mientras que la diversidad genotípica de los aislados recuperados de una infección crónica disminuyó a lo largo del tiempo, los perfiles fenotípicos fueron mucho más diversos.

El uso cooperativo de las técnicas de BOX-PCR y FT-IR en el análisis de la diversidad de los aislados recuperados de pacientes B, C y J (Fig. 15) nos permitió obtener conocimientos sobre otro evento interesante. La serie de aislados recuperados de estos pacientes no podían distinguirse por su perfil de BOX, pero las características fenotípicas reflejadas en los

espectros IR eran significativamente diferentes, agrupando en distintos fenotipos. Estas observaciones sugieren fuertemente que, o bien se produjo una infección secuencial (o dual) con cepas diferentes pero genéticamente estrechamente relacionados, o bien que el mismo clon infectante ha acumulado mutaciones (variación clonal) que pudieron ser sólo “visualizadas” a través del análisis de su espectros FT-IR (este tema será abordado nuevamente en el capítulo IV y V). La diversificación fenotípica dentro de los aislados de *B. contaminans* observada en los pacientes que sobrellevan infecciones crónicas también fue reportada en los pacientes crónicamente colonizados por *P. aeruginosa*. Se informó en *P. aeruginosa*, que los linajes que permanentemente infectan los pulmones de pacientes con FQ se ven expuestos a un medio ambiente hostil tal como el pulmón de estos pacientes tratados con antibióticos de manera casi permanente lo cual lleva a estas poblaciones a buscar adaptarse a tales cambios como una forma de persistir por largo plazo en este nicho. En este aspecto, muy poca información se ha publicado en relación a la diversificación bacteriana durante la colonización pulmonar crónica por especies del complejo *Burkholderia cepacia*. Silva y colaboradores han informado recientemente, la aparición de diferentes morfotipos estudiando dos cepas clonales de *Burkholderia multivorans* recuperadas de una infección crónica de un paciente con fibrosis quística (52). Por otro lado, un reporte más reciente comenta la aparición de una expansión clonal de *B. cenocepacia* durante la colonización a largo plazo de un paciente con FQ. Interesantemente, los autores destacan que las bacterias más resistentes de esa serie clonal se aislaron después de la exacerbación pulmonar y un tratamiento agresivo con antibióticos (13), lo que sugiere que el estrés antibiótico impulsa la aparición de poblaciones resistentes de aislamientos de *B. cenocepacia*.

Curiosamente, los resultados mostrados en el panel derecho de la Figura 7 indicaron que los aislados recuperados después de la infección a largo plazo (más de 3 años de infección) de cada paciente infectado crónico mostraron un fenotipo único y característico. Esto se puede atribuir al hecho de que determinadas variantes fenotípicas se establecen en las vías respiratorias de cada paciente como resultado de las presiones de selección que son distintivas e individuales de cada paciente. En general, teniendo en cuenta que durante el curso de nuestro estudio, tanto los subtipos de BOX B1 y B8 persistieron, dando lugar a las nuevas infecciones y colonización crónica de pacientes FQ, podríamos inferir que las bacterias que se caracterizan por estos genotipos que son capaces de sobrevivir en un nicho ecológico determinado o en productos industriales, serían un tipo de población que mejor podría adaptarse a los pulmones FQ. Estos resultados si bien muestran una evidencia sólida para un proceso de diversificación, se investigará con mayor profundidad si la diversidad fenotípica observada podría estar asociada a la adaptación de las bacterias al tracto respiratorio de

pacientes con FQ. En ese sentido, se mostrarán en el capítulo siguiente la información sobre factores de virulencia y persistencia que estén actuando en estas poblaciones.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente capítulo, permiten abordar las siguientes conclusiones:

1. La diversidad observada a nivel de secuencia del gen *recA* en los aislados clínicos de *Burkholderia contaminans* es relativamente pobre.
2. El alelo *recA* ST-71 fue el más abundante de los 6 alelos observados en aislados recuperados exclusivamente de pacientes FQ.
3. La técnica de BOX-PCR resultó ser adecuada para explorar la diversidad de genotipos en aislados clínicos de *B. contaminans*.
4. De los 10 genotipos identificados por BOX-PCR, el genotipo B1 y B8 fueron los más abundantes.
5. Los nuevos pacientes analizados en los últimos años son colonizados por los genotipos B1, B5 y B8, indicando que son estos los genotipos que caracterizan a las cepas circulantes actualmente.
6. El marcador de transmisibilidad gen *clbA* no está presente en el genoma de aislados aquí estudiados de *B. contaminans*.
7. El marcador BCESM no es exclusivo de las cepas transmisibles.
8. La espectroscopia IR resultó ser adecuada para discriminar a nivel de cepa aislados de *B. contaminans*, permitiendo establecer un aumento en la diversidad fenotípica de los aislados B1 y B8 en el transcurso del tiempo.
9. No todos los genotipos de *B. contaminans* pueden producir infecciones crónicas en pacientes FQ.
10. En la serie de aislados clonales recuperados de un mismo paciente (pacientes B, C y J) se observó diversificación fenotípica.
11. Un mismo genotipo puede expresar fenotipos diferentes según el entorno (huésped). (por ejemplo genotipo B1 en los pacientes E, F, K, y M).

Anexo

Tabla 1. Colección de aislados de *B. contaminans* analizadas en este capítulo.

N° Aislados	Cepa	Pte.	Fecha	Origen	recA RFLP	recA allele	Mejor comparacion GenBank	Patrones		
								BOX - PCR	ERIC- PCR	FT- IR
1	CBC 1	P1	sep-08	CF	K	64	GU938636	-	-	-
2	CBC 2	P2		Non-CF	K	64	GU938636	-	-	-
3	CBC 3	P3		Non-CF	K	64	GU938636	-	-	-
4	CBC 4	P4	Apr-2009	CF	K	64	GU938636	-	-	-
5	CBC 5	P5	nov-04	CF	K	71	GU938664	B8	-	F4
6	CBC 6	P5	nov-04	CF	K	71	GU938664	B8	-	-
7	CBC 7	P5	jun-05	CF	K	71	GU938664	B8	E5	F15
8	CBC 8	P6	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F1
9	CBC 9	P6	oct-08	CF	K	71	GU938664	B1	E5	F8
10	CBC 10	P6	may-09	CF	K	71	GU938664	B9	E4	F8
11	CBC 11	P7	may-04	CF	K	71	GU938664	B8	E5	F2
12	CBC 12	P8	jul-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	-
13	CBC 13	P9	oct-09	CF	K	71	GU938664	B9	E3	F19
14	CBC 14	P9	may-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	F12
15	CBC 15	P9	oct-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	F12
16	CBC 16	P10	oct-03	CF	K	71	GU938664	B10	E5	F1
17	CBC 17	P10	oct-03	CF	K	71	GU938664	B10	E5	F2
18	CBC 18	P10	Jan-2004	CF	K	71	GU938664	B10	E5	F5
19	CBC 19	P10	mar-04	CF	K	71	GU938664	B10	E5	F1
20	CBC 20	P10	jun-04	CF	K	71	GU938664	B9	E4	F2
21	CBC 21	P10	jul-04	CF	K	71	GU938664	B9	E4	F1
22	CBC 22	P10	sep-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F2
23	CBC 23	P10	sep-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F5
24	CBC 24	P10	oct-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F1
25	CBC 25	P10	nov-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F4
26	CBC 26	P11	oct-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F4
27	CBC 27	P11	nov-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F4
28	CBC 28	P11	Jan-2006	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F4
29	CBC 29	P12	sep-08	CF	K	71	GU938664	B1	-	F13
30	CBC 30	P12	may-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	-
31	CBC 31	P12	nov-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	F13
32	CBC 32	P13	may-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F2
33	CBC 33	P14	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	B9	-	F2
34	CBC 34	P14	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F2
35	CBC 35	P14	oct-05	CF	K	71	GU938664	B1	-	F1
36	CBC 36	P15	oct-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F6
37	CBC 37	P16	nov-05	CF	AT	71	GU938664	B3	E5	F7
38	CBC 38	P17	sep-05	CF	K	71	GU938624	B9	E5	F11
39	CBC 39	P18	feb-04	CF	K	71	GU938664	B11	E5	F1

40	CBC 40	P18	sep-08	CF	K	71	GU938664	B1	E5	-
41	CBC 41	P18	may-10	CF	K	71	GU938664	B1	E5	F9
42	CBC 42	P19	oct-09	CF	K	71	GU938664	B6	E5	-
43	CBC 43	P20	sep-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	F18
44	CBC 44	P21	Aug-2005	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F11
45	CBC 45	P22	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F1
46	CBC 46	P22	may-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F1
47	CBC 47	P22	may-06	CF	K	71	EF602577	B9	E5	F6
48	CBC 48	P23	Jan-2005	CF	K	71	GU938664	B9	-	F3
49	CBC 49	P24	Apr-2006	CF	K	71	GU938664	B9	-	-
50	CBC 50	P25	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	B8	E5	F2
51	CBC 51	P25	Dec-2006	CF	K	71	GU938664	B9	E5	-
52	CBC 52	P25	Dec-2006	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F3
53	CBC 53	P26	may-04	CF	K	71	GU938664	B7	E5	F2
54	CBC 54	P27	oct-03	CF	K	71	GU938664	B5	E5	F4
55	CBC 55	P28	jun-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F3
56	CBC 56	P29	Aug-2004	CF	K	71	GU938664	B4	E5	F5
57	CBC 57	P30	may-04	CF	K	71	GU938664	B7	E5	F4
58	CBC 58	P30	oct-08	CF	K	71	GU938664	B1	E5	F10
59	CBC 59	P30	jun-10	CF	K	71	GU938664	B1	E5	F10
60	CBC 60	P31	oct-10	CF	K	71	GU938664	B1	-	-
61	CBC 61	P32	may-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F2
62	CBC 62	P32	sep-08	CF	K	71	GU938664	B9	-	F4
63	CBC 63	P32	oct-08	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F4
64	CBC 64	P32	Apr-2009	CF	K	71	GU938664	B9	E5	-
65	CBC 65	P32	jul-09	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F4
66	CBC 66	P32	sep-10	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F16
67	CBC 67	P32	sep-10	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F16
68	CBC 68	P32	Dec-2010	CF	K	71	GU938664	B1	-	F17
69	CBC 69	P32	Jan-2011	CF	K	71	GU938664	B1	-	F17
70	CBC 70	P33	may-04	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F2
71	CBC 71	P34	Apr-2009	CF	K	71	GU938664	B9	E5	F5
72	CBC 72	P35	Dec-2007	CF	K	71	GU951938	B9	E2	F14
73	CBC 73	P36		Non-CF	K	71	GU938664	B1	E5	-
74	CBC 74	P37		Non-CF	K	71	GU938664	B2	E1	-
75	CBC 75	P38		Non-CF	K	71	GU938664	B9	E5	F2
76	CBC 76	P39	jun-04	CF	K	71	GU938664	B7	-	-
77	CBC 77	P39	jun-04	CF	K	71	GU938664	B7	-	F1
78	CBC 78	P39	oct-05	CF	K	71	GU938664	B7	-	F1
79	CBC 79	P40	Dec-2002	CF	K	71	GU938664	-	-	F6
80	CBC 80	P41	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	-	-	F2
81	CBC 81	P42	Apr-2004	CF	K	71	GU938664	-	-	F1
82	CBC 82	P43	jun-04	CF	K	71	GU938664	-	-	-
83	CBC 83	P44		Non-CF	K	71	GU938664	-	-	F1
84	CBC 84	P45		Non-CF	K	71	EF602577	-	-	-
85	CBC 85	P46		Non-CF	K	71	EF602577	-	-	-

86	CBC 86	P47		Non-CF	K	89	EF602577	-	-	-
87	CBC 87	P48		Non-CF	K	89	EF602577	-	-	-
88	CBC 88	P49		Non-CF	AT	89	EF602577	-	-	-
89	CBC 89	P50		Non-CF	K	89	EF602577	-	-	-
90	CBC 90	P51		Non-CF	AT	89	EF602577	-	-	-
91	CBC 91	P52		Non-CF	AT	89	EF602577	-	-	-
92	CBC 92	P53		Non-CF	K	152	GU938664	-	-	-
93	CBC 93	P53	Apr-2009	CF	J	166	GU951969	-	-	-
94	CBC 94	P54	jun-08	CF	AT	243	GU144403	-	-	-
95	CBC 95	P55	Aug-2008	CF	K	-	-	-	-	-
96	CBC 96	P56	mar-08	CF	K	-	-	-	-	-
97	CBC 97	P57	Aug-2008	CF	K	-	-	-	-	-
98	CBC 98	P58	sep-09	CF	K	-	-	-	-	-
99	CBC 99	P59	may-10	CF	K	-	-	-	-	-
100	CBC 100	P60	may-09	CF	K	-	-	-	-	-
101	CBC 101	P61	sep-09	CF	K	-	-	-	-	-
102	CBC 102	P62	Aug-2008	CF	K	-	-	-	-	-

Publicado en *Martina et al. (2013) J. Clin. Microbiol. 51 (1):339-344.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Assaad W, Magalhães M, Plesa M, Hart CA, Cornelis P, Winstanley C.** 2006. Identical Burkholderia cepacia complex strain types isolated from multiple patients attending a hospital in Brazil. *Journal of medical microbiology* **55**:247–9.
2. **Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCJ, Govan JR, Speert DP, LiPuma JJ, Vandamme P, Dowson CG.** 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the Burkholderia cepacia complex. *Journal of clinical microbiology* **43**:4665.
3. **Bernhardt S a, Spilker T, Coffey T, LiPuma JJ.** 2003. Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **37**:780–5.
4. **Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ.** 2003. Evidence of transmission of Burkholderia cepacia , Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiology Letters* **228**:57–62.
5. **Blackwood CB, Marsh T, Kim S, Paul EA.** 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities.
6. **Bosch A, Miñán A, Vescina C, Degrossi J, Gatti B, Montanaro P, Messina M, Franco M, Vay C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O.** 2008. Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology* **46**:2535–46.
7. **Brisse S, Verduin CM, Milatovic D, Fluit a, Verhoef J, Laevens S, Vandamme P, Tümmler B, Verbrugh H a, Van Belkum a.** 2000. Distinguishing species of the Burkholderia cepacia complex and Burkholderia gladioli by automated ribotyping. *Journal of clinical microbiology* **38**:1876–84.
8. **Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Favari F, Cariani L, Sciacca A, Savoia D, Collura A, Fiscarelli E, Intinis G De, Busetti M, Cipolloni A, Aprile A, Provenzano E, Collebrusco I, Frontini P, Stassi G, Trancassini M, Tovagliari D, Lavitola A, Doherty CJ, Coenye T, Govan JRW, Vandamme P.** 2005. Transmission of Burkholderia cepacia Complex : Evidence for New Epidemic Clones Infecting Cystic Fibrosis Patients in Italy. *Society* **43**:5136–5142.
9. **Cesarini S, Bevivino a, Tabacchioni S, Chiarini L, Dalmastrì C.** 2009. RecA gene sequence and Multilocus Sequence Typing for species-level resolution of Burkholderia cepacia complex isolates. *Letters in applied microbiology* **49**:580–8.
10. **Chen JS, Witzmann K a, Spilker T, Fink RJ, LiPuma JJ.** 2001. Endemicity and inter-city spread of Burkholderia cepacia genomovar III in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics* **139**:643–9.
11. **Clode FE, Kaufmann ME, Malnick H, Pitt TL.** 2000. Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and nonepidemic strains of Burkholderia cepacia from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *Journal of clinical microbiology* **38**:1763–6.
12. **Coenye T, Spilker T, Martin A, Lipuma JJ.** 2002. Comparative Assessment of Genotyping Methods for Epidemiologic Study of Burkholderia cepacia Genomovar III. *Society* **40**:3300–3307.
13. **Coutinho CP, De Carvalho CCCR, Madeira A, Pinto-de-Oliveira A, Sá-Correia I.** 2011. Burkholderia cenocepacia phenotypic clonal variation during a 3.5-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Infection and immunity* **79**:2950–60.
14. **Currie BJ, Gal D, Mayo M, Ward L, Godoy D, Spratt BG, LiPuma JJ.** 2007. Using BOX-PCR to exclude a clonal outbreak of melioidosis. *BMC infectious diseases* **7**:68.
15. **De Bruijn FJ.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* **58**:2180–7.

16. **Detsika MG, Corkill JE, Magalha M, Glendinning KJ, Hart CA, Winstanley C.** 2003. Molecular Typing of , and Distribution of Genetic Markers among , Burkholderia cepacia Complex Isolates from Brazil. *Society* **41**:4148–4153.
17. **Fabian H, Lasch P, Boese M, Haensch W.** 2002. Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections. *Biopolymers* **67**:354–357.
18. **Fang Y, Lou M, Li B, Xie G-L, Wang F, Zhang L-X, Luo Y-C.** 2009. Characterization of Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis patients in China and their chitosan susceptibility. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**:443–450.
19. **Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM.** 2010. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS one* **5**:1–12.
20. **Frey P, Smith JJ, Albar L, Prior P, Saddler GS, Trigalet-Demery D, Trigalet a.** 1996. Bacteriocin Typing of Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum Race 1 of the French West Indies and Correlation with Genomic Variation of the Pathogen. *Applied and environmental microbiology* **62**:473–9.
21. **Green S, Leigh M, Neufeld J.** 2009. Microbiology of hydrocarbons; oils; lipids and derived compounds., p. 4137–4158. *In* Timmis, KN (Ed) (ed.), Springer, Heidelberg (Germany).
22. **Helm D, Naumann D.** 1995. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* **126**:75–79.
23. **Ishii S, Sadowsky MJ.** 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental microbiology* **11**:733–40.
24. **Jelsbak L, Johansen HK, Frost A-L, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagenen J a J, Høiby N, Molin S.** 2007. Molecular epidemiology and dynamics of Pseudomonas aeruginosa populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and immunity* **75**:2214–24.
25. **Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi N, Choo-Smith LP, Sockalingum G, Sandt C, Ami D, Orsini F, Doglia S, others.** 2001. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of clinical microbiology* **39**:1763.
26. **Kneipp J, Beekes M, Lasch P, Naumann D.** 2002. Molecular changes of preclinical scrapie can be detected by infrared spectroscopy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**:2989–97.
27. **Lipuma JJ.** 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* **23**:299–323.
28. **LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, Mahenthalingam E.** 2001. Disproportionate distribution of Burkholderia cepacia complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**:92–6.
29. **Liu W, Marsh TL, Cheng H.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S.
30. **Lynch KH, Dennis JJ.** 2008. Development of a species-specific fur gene-based method for identification of the Burkholderia cepacia complex. *Journal of clinical microbiology* **46**:447–55.
31. **Mahenthalingam E, Baldwin a, Dowson CG.** 2008. Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of applied microbiology* **104**:1539–51.
32. **Mahenthalingam E, Simpson D a, Speert DP.** 1997. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic Burkholderia cepacia strains recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology* **35**:808–16.

33. **Mahenthalingam E, Baldwin A, Drevinek P, Vanlaere E, Vandamme P, LiPuma JJ, Dowson CG.** 2006. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS one* **1**:e17.
34. **Manno G, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, Romano L, Giannattasio A, Chiarini L, Bevivino A.** 2004. Epidemiology and Clinical Course of *Burkholderia cepacia* Complex Infections , Particularly Those Caused by Different *Burkholderia* cenocepacia Strains , among Patients Attending an Italian Cystic Fibrosis Center. *Society* **42**:1491–1497.
35. **Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Ngo-Thi NA, Van Vreeswijk T, Stämmler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ.** 2003. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:324–329.
36. **Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ.** 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of microbiological methods* **51**:255–71.
37. **Maquelin K, Kirschner C, Vreeswijk T Van, Stämmler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ.** 2003. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bact. *Society*.
38. **MUYZER G, DE WAAL EC, UITIERLINDEN AG.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes **59**:695–700.
39. **Naumann D.** 2008. *Biomedical Vibrational spectroscopy* John Wiley. Hoboken, New Jersey, USA.
40. **Naumann D.** 2001. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews* **36**:239–298.
41. **Naumann D.** 2000. *Infrared Spectroscopy in Microbiology* 102–131.
42. **Nørskov-lauritsen N, Johansen HK, Mette G, Nielsen XC, Pressler T, Hanne V, Højby N, Fenger MG, Olesen H V.** 2010. Unusual Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species in Danish Cystic Fibrosis Clinics May Stem from Restricted Transmission between Patients Unusual Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex Species in Danish Cystic Fibrosis Clinics May Stem f. *Society* 1–4.
43. **Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthalingam E, Icrobiol APPL ENM.** 2005. Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. *Society* **71**:3917–3927.
44. **Pope CF, Gillespie SH, Moore JE, McHugh TD.** 2010. Approaches to measure the fitness of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Journal of medical microbiology* **59**:679–86.
45. **Rademaker JL, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, De Bruijn FJ.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50 Pt 2**:665–77.
46. **Rademaker JLW, Norman DJ, Forster RL, Louws FJ, Schultz MH, De Bruijn FJ.** 2006. Classification and Identification of *Xanthomonas translucens* Isolates, Including Those Pathogenic to Ornamental Asparagus. *Phytopathology* **96**:876–84.
47. **Rau MH, Hansen SK, Johansen HK, Thomsen LE, Workman CT, Nielsen KF, Jelsbak L, Højby N, Yang L, Molin S.** 2010. Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environmental microbiology* **12**:1643–58.
48. **Sajjan SU, Liu L, Lu A, Spilker T, Forstner J, LiPuma JJ.** 2002. Lack of cable pili expression by *cblA*-containing *Burkholderia cepacia* complex. *Microbiology (Reading, England)* **148**:3477–84.

49. **Sajjan SU, Sun L, Goldstein R, Forstner JF.** 1995. 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. *Journal of bacteriology* **177**:1030–8.
50. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
51. **Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lapan H, Lepouse C, Jaussaud M, Leon A, Pinon JM, Manfait M, Toubas D.** 2003. Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for Typing of Candida albicans Strains Isolated in Intensive Care Units. *Society* **41**:954–959.
52. **Silva IN, Ferreira AS, Becker JD, Zlosnik JE a, Speert DP, He J, Mil-Homens D, Moreira LM.** 2011. Mucoid morphotype variation of Burkholderia multivorans during chronic cystic fibrosis lung infection is correlated with changes in metabolism, motility, biofilm formation and virulence. *Microbiology (Reading, England)*.
53. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio D a, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson M V.** 2006. Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:8487–92.
54. **Tabacchioni S, Ferri L, Manno G, Mentasti M, Cocchi P, Campana S, Ravenni N, Taccetti G, Dalmastrri C, Chiarini L, Bevivino A, Fani R.** 2008. Use of the gyrB gene to discriminate among species of the Burkholderia cepacia complex. *FEMS microbiology letters* **281**:175–82.
55. **Tobes R, Ramos JL.** 2005. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environmental Microbiology* **225**–228.
56. **Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthalingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P.** 2009. Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**:102–11.
57. **Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthalingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P.** 2009. Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **59**:102–11.
58. **Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research* **19**:6823–31.
59. **Versalovic J, M S, FJ DB, JR L.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* **5**:25–40.
60. **Waine DJ, Henry D a, Baldwin A, Speert DP, Honeybourne D, Mahenthalingam E, Dowson CG.** 2007. Reliability of multilocus sequence typing of the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **6**:215–9.
61. **Wenning M, Seiler H, Scherer S.** 2002. Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy , a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Society* **68**:4717–4721.
62. **Winstanley C.** 2003. Improved flagellin genotyping in the Burkholderia cepacia complex. *FEMS Microbiology Letters* **229**:9–14.
63. **Yang JH, Spilker T, LiPuma JJ.** 2006. Simultaneous coinfection by multiple strains during Burkholderia cepacia complex infection in cystic fibrosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **54**:95–8.
64. **Yang L, Rau MH, Yang L, Hoiby N, Molin S, Jelsbak L.** 2011. Bacterial adaptation during chronic infection revealed by independent component analysis of transcriptomic data. *BMC Microbiology* **11**:184.



Capítulo IV

Análisis de factores de virulencia
y capacidad de formación de
biofilm en aislamientos de
B. contaminans recuperados de
infecciones pulmonares
crónicas en pacientes FQ

INTRODUCCIÓN	151
OBJETIVOS	154
OBJETIVOS GENERALES	154
OBJETIVOS PARTICULARES	154
MATERIALES Y MÉTODOS	155
2.1. MICROORGANISMOS	155
2.2. EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO	155
2.3 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	155
2.4. DETECCIÓN DE EXOENZIMAS	156
2.4.1. PROTEASAS	156
2.4.2. EXPRESIÓN DE LIPASA EXTRACELULARES	156
2.5. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)	157
2.6. CRECIMIENTO EN <i>BIOFILM</i>	158
2.6.1. CULTIVOS EN BIOFILM EN SISTEMA BATCH EMPLEANDO PERLAS DE POLIPROPILENO COMO SOPORTE	158
2.6.2. FORMACIÓN DE BIOFILM EN PLACAS MULTIPOCILLO	158
2.6.3. CULTIVO EN <i>BIOFILM</i> EN CÁMARAS CON FLUJO CONTINUO DE NUTRIENTES	159
2.7. MICROSCOPIA DE ESCANEADO LÁSER CONFOCAL (CLSM)	160
2.8. EXTRACCIÓN DE AHLs DE SOBRENADANTES DE CULTIVO	161
2.8.1. CEPAS BIOSENSORAS PARA DETECCIÓN DE SEÑALES DE QUÓRUM SENSING	162
2.8.2. CALIBRACIÓN DEL ENSAYO DE DETECCIÓN DE AHLs EN PLACA DE PETRI	163
2.8.3. BIOENSAYO DE DETECCIÓN DE AHLs POR DIFUSIÓN	163
2.8.4. IDENTIFICACIÓN DE AHLs MEDIANTE MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS	164
2.8.4.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	164
2.8.4.2. IDENTIFICACIÓN DE AHLs MEDIANTE HPLC MS/MS-MRM	165
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	166
RESULTADOS	167
3.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE AISLADOS CLÍNICOS DE <i>B. CONTAMINANS</i> EN CULTIVOS LÍQUIDOS	167
3.2. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDOS (EPS)	168
3.3. PRODUCCION DE PIGMENTOS	169
3.4. SECRECIÓN DE EXOENZIMAS	171
3.4.1. PROTEASAS Y HEMOLISINA	171
3.4.2. EXPRESIÓN DE LIPASA EXTRACELULARES	172
3.5.1. CINÉTICA DE ADHESIÓN A SUPERFICIES ABIÓTICAS	174
3.5.2. CRECIMIENTO EN <i>BIOFILM</i> EMPLEANDO PLACAS MULTIPOCILLOS	174
3.5.3. CRECIMIENTO EN <i>BIOFILM</i> EMPLEANDO EL SISTEMA DE CULTIVO <i>BATCH</i> CON RECAMBIO DE MEDIO	177
3.6. DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE AHL	178
3.7. IDENTIFICACIÓN QUÍMICA DE MOLÉCULAS DERIVADAS DE ACIL-HOMOSERÍN LACTONAS (AHL)	181
3.7.1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	181
3.7.2. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE HPLC MS/MS-MRM	182
3.8. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL <i>BIOFILM</i> FORMADO POR <i>B. CONTAMINANS</i>	187
DISCUSIÓN	189
CONCLUSIONES	195
ANEXO	196
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	202

INTRODUCCIÓN

La morbilidad y mortalidad en la fibrosis quística se relaciona muy directamente a la infección respiratoria crónica, donde pueden intervenir una variedad de especies bacterianas. Estas infecciones contribuyen de manera significativa al continuo deterioro de la función pulmonar (69). En particular, cuando *P. aeruginosa* y bacterias del complejo *Burkholderia cepacia* se establecen a nivel pulmonar, son prácticamente imposibles de erradicar; la bacteria es capaz de soportar tanto los ataques del sistema inmune del paciente como la exposición prolongada al tratamiento antibiótico (40)(51). Las infecciones pasan a ser crónicas y se asocian con disminución de la función pulmonar y un aumento del riesgo de insuficiencia respiratoria y muerte (35). Confirmada la formación de *biofilm* en pacientes FQ, aunque recientemente se propuso un mecanismo de crecimiento dentro del mucus, la investigación se centró en la comprensión de los factores que permiten al patógeno oportunista *P. aeruginosa* desempeñar un papel dominante durante el curso de infecciones de larga duración a nivel pulmonar (80)(3).

El pulmón del paciente FQ es un ambiente heterogéneo que se modifica durante el curso de la infección debido a cambios en su flora microbiana, como consecuencia de las actividades de la respuesta inmune innata y del daño en los tejidos, a través de los cambios producidos por tratamientos a largo plazo con antibióticos, y la compleja interacción de todos estos factores (35). Una población microbiana para subsistir a diferentes agentes antimicrobianos tiene que evolucionar, adaptarse. Los estudios de evolución bacteriana, representan un nuevo campo de investigación. Resultan interesantes los avances obtenidos en *Pseudomonas fluorescens*, organismo sobre el cual se ha demostrado que las bacterias muestran especialización en cuanto al nicho donde crecen y la respuesta adaptativa cuando se introducen en entornos espacial y químicamente heterogéneos (50)(63). Por extensión se puede esperar que *P. aeruginosa* se adapte al entorno cambiante del pulmón del paciente FQ mediante la regulación de su expresión génica.

Como se mencionó anteriormente, durante la colonización crónica de las vías aéreas del paciente FQ, las bacterias evolucionan en respuesta a las presiones de selección, en particular las derivadas de los mecanismos de defensa propios del sistema inmune, la terapia antimicrobiana, y la impuesta por un ambiente limitado en oxígeno (24)(35). Existe evidencia creciente de los mecanismos moleculares que llevan a la adaptación genética de *P. aeruginosa* al pulmón de pacientes FQ (3)(55)(69). La diversidad de morfotipos coloniales aislados de pacientes es de apoyo de la “radiación adaptativa” y la especialización en determinado nicho (52), siendo el fenotipo mucóide el más patognomónico para el pulmón fibroquístico. Por otro

lado, características comunes de adaptación que surgen por mutación durante la infección crónica son resistencia a antibióticos (muestran diferentes patrones de sensibilidad a los antimicrobianos), pérdida de los sistemas de secreción de tipo III, alteraciones en lipopolisacáridos, tamaño de los *biofilms* formados (mutación de LasR -regulador de la detección de *quórum sensing*), y otras diferencias fenotípicas, críticas en el contexto de la patogénesis bacteriana, entre otros (3)(18)(19)(28)(48).

La baja incidencia de *B. contaminans* en pacientes fibroquísticos a nivel mundial deriva en un escaso número de publicaciones internacionales sobre la misma. Nosotros recientemente (53) pusimos en evidencia la capacidad de esta nueva especie de colonizar de manera crónica las vías respiratorias de pacientes FQ. Sin embargo, la respuesta adaptativa de estas poblaciones microbianas a partir de una cepa colonizante inicial, a lo largo de la infección crónica, en la complejidad del pulmón fibroquístico, aun no ha sido develada. En base a lo reportado para otras especies del cBc, se decidió avanzar en el estudio de algunas características fenotípicas relevantes, en aislados recuperados de infecciones crónicas de pacientes FQ y compararlo con aquellos recuperados de aislamientos de primeras infecciones o iniciales, así como también incluir aislamientos recuperados de pacientes No-FQ y muestras ambientales a fin de tener un contexto comparativo amplio.

En los últimos treinta años, las *biofilms* han sido reconocidos como la principal forma de vida para la mayoría de las bacterias (60)(77). Este concepto ha traído grandes implicancias en el campo de la medicina ya que permitió iniciar estudios sobre muchas infecciones persistentes y crónicas, las cuales se comprobó que eran mediadas por el crecimiento de bacterias adheridas a superficies. El campo microbiológico, habituado a considerar a las bacterias como organismos unicelulares de vida libre, nadando en medios líquidos sin interacción entre las células, debió empezar a idear nuevas estrategias de crecimiento y de estudio de poblaciones que debían ser desarrolladas adheridas a distintas superficies. Se pudo comprobar con técnicas de proteómica y métodos moleculares que la respuesta fisiológica de microorganismos que crecen sobre soportes (células sésiles), ya sean bióticos como tejidos o abióticos, mostraba grandes diferencias con la respuesta fenotípica de las mismas células crecidas en medios líquidos (células planctónicas). La bibliografía mundial en el tema de *biofilm* se ha incrementado notablemente en estas dos últimas décadas (42). En el área de salud las investigaciones sobre *biofilms* microbianos permitieron empezar a encontrar explicaciones al dramático aumento en la resistencia a los antibióticos y las defensas del hospedador de las poblaciones sésiles (79). El tema de *biofilm* resulta fascinante y presenta un gran desafío para los microbiólogos.

Con el avance de los estudios en *biofilm* se pudo constatar que en la naturaleza muchas bacterias utilizan a menudo sistemas de comunicación célula-célula, denominados de *quórum sensing* (QS) para advertirse de la presencia de células vecinas. Estos sistemas de QS permiten a los organismos producir y percibir señales químicas que resultan en la expresión de genes los cuales pueden alterar fenotipos contribuyendo de esta manera a la patogénesis. En bacterias Gram-negativas, el sistema de QS más ampliamente estudiado implica la producción de moléculas del tipo de N-acil-homoserin lactonas (AHL) mediante sintetas de la familia de la proteína LuxI (17)(60). En el caso particular de todas las especies del complejo *B. cepacia* estudiadas (32)(49), se reportó que las mismas poseen el clásico sistema de detección de QS-LuxIR, denominado CepIR, que proporciona un mecanismo de adaptación rápida a los cambios ambientales (44). Además del sistema CepIR el cual se reportó como conservado, algunas especies del cBc poseen otros sistemas y tipos adicionales de señales químicas que se utilizan para la comunicación célula a célula (23). Por ejemplo, *B. cenocepacia* presenta el sistema CepR2 que no ha sido detectado en ningún otro miembro del cBc y algunas cepas independientemente portan el sistema CciIR (2). Diversos modelos experimentales de infección demostraron que el sistema de QS CepIR es importante para la virulencia (75), mientras que el sistema CciIR contribuye a la virulencia en un modelo de infección respiratoria crónica (2). Curiosamente, las señales químicas producidas y liberadas por *P. aeruginosa* pueden ser reconocidas por las bacterias del cBc y responder a *quórum sensing*, lo cual pone de relieve el posible papel de la comunicación entre las especies en el curso de la enfermedad de pacientes FQ co-infectados con *P. aeruginosa* y bacterias del complejo *B. cepacia* (65).

En organismos del complejo *B. cepacia*, el sistema de QS regula la expresión de diferentes factores de virulencia, como toxinas, la producción de proteínas extracelulares como proteasas (metaloproteasas), hemolisinas, lipasas y la producción de sideróforos. La movilidad tipo *swimming* y *swarming* y la formación de *biofilm* (76) son también reguladas a través de este sistema. De este modo, la evaluación de la expresión de potenciales factores de virulencia tales como presencia del cable pili, adhesinas, flagelos, sistemas de secreción Tipo III y Tipo IV, lipopolisacáridos, sideróforos, producción de proteínas extracelulares, señales de *quórum sensing* y otros factores constituyen los blancos para definir el potencial de un patógeno para vivir y persistir en determinado nicho ecológico y para diseñar estrategias de control.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

Avanzar en el conocimiento de la expresión de diferentes factores de virulencia, y de la capacidad de formación de *biofilm* en aislamientos de *B. contaminans* recuperados de infecciones pulmonares crónicas en pacientes FQ. Comparar las características fenotípicas encontradas, con las obtenidas para primeras infecciones, infecciones en pacientes no-FQ y para aislamientos ambientales.

Objetivos particulares:

1. Evaluar la expresión de factores de virulencia de aislamientos clínicos de la especie *B. contaminans*. Analizar comparativamente la expresión de estos factores en las poblaciones de aislamientos recuperados de infecciones crónicas, primeras infecciones, infecciones no-FQ y aislamientos ambientales.
2. Estudiar la capacidad de expresión de moléculas de *quorum sensing* en bacterias de la especie *B. contaminans* mediante el empleo de organismos biosensores y métodos químicos de alta resolución. Analizar comparativamente la producción de dichas señales en las diferentes categorías de aislamientos (FQ, NO-FQ, FQ-crónicos y Ambientales).
3. Estudiar la capacidad de formación de *biofilm* sobre superficies abióticas en aislamientos clínicos de *B. contaminans*. Analizar si existen diferencias en las características estructurales de los *biofilms* formados por organismos recuperados de infecciones crónicas respecto a los *biofilms* formados por aislamientos recuperados de primeras infecciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos

Para realizar el análisis y los estudios comparativos de las propiedades fenotípicas, factores de virulencia y formación de biofilm, los aislamientos utilizados (Tabla A, al final del capítulo), se clasificaron según su origen: obtenidos de infecciones crónicas (FQ-crónicos), obtenidos de primeras infecciones (FQ o FQ-iniciales), recuperados de pacientes no fibroquísticos (no-FQ) y obtenidos de muestras ambientales (AMB). La selección de los aislamientos para realizar las distintas pruebas fue al azar teniendo en cuenta en todos los casos considerar cepas provenientes de los diferentes Centros de Salud.

Los aislamientos provenientes del Hospital de niños Sor María Ludovica se indican con diferente nomenclatura según el período de tiempo en que la muestra ingresó al cepario del CINDEFI: "FQ", "FQ B", "NF" o "HNLP". Los aislamientos provenientes del Hospital Rossi de La Plata se denominaron "HR" o "HSM", y corresponden a aislados obtenidos de muestras de esputo de pacientes adultos (mayor a 14 años). Los aislamientos provenientes de pacientes no-FQ atendidos en el Hospital de Clínicas de Buenos Aires, UBA se denominaron "HC",

2.2. Evaluación de la cinética de crecimiento en medio líquido

Se seleccionaron al azar 9 aislados de *B. contaminans* para obtener los parámetros de la cinética de crecimiento en condiciones planctónicas. Los cultivos en caldo LB fueron iniciados con una DO_{650} de 0,05. El crecimiento se llevó a cabo en frascos Erlenmeyers agitados a 160 rpm y mantenidos a 37 °C. Se tomaron muestras cada 60 minutos a las cuales se les midieron su DO_{650} en un espectrofotómetro Beckman (DU 640, USA) y la biomasa en cada punto medida como peso seco. Con los valores de DO se construyeron curvas de crecimiento las cuales fueron comparadas entre los distintos aislados.

2.3 Determinación de la velocidad específica de crecimiento

Para la determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ), los cálculos se hicieron mediante la evaluación de la biomasa medidas por peso seco. A partir de cultivos iniciados con DO_{650} de 0,2 en medio LB crecidos en agitación a 160 rpm y 37 °C, se tomaron muestras de 5 ml cada 60 minutos las cuales se centrifugaron a 9000xg. El sedimento de cada muestra se lavó dos veces con agua destilada y se transfirió a un tubo de vidrio previamente tarado. La suspensión bacteriana se secó en estufa a 105°C. Con una balanza analítica (Adventurer, OHAUS, USA - 0,0001 g) se determinó el peso de los sólidos con los que se

calcularon los pesos secos (X) de cada muestra. Se graficó una curva de X (g / l) en función del tiempo y se realizó una regresión lineal de la fase exponencial para calcular la velocidad específica de crecimiento y poder correlacionar la biomasa con la DO del crecimiento bacteriano. El cálculo de los tiempos de duplicación se realizó mediante la siguiente fórmula,

$$T_d = \ln 2 / \mu_{\max.}$$

2.4. Detección de exoenzimas

2.4.1. Proteasas

Experimentalmente, para demostrar la actividad hidrolítica de las proteasas, se utilizó agar-leche 10% y para la actividad hemolítica agar-sangre 5%. En un matraz Erlenmeyer se disolvió la leche descremada en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0, en aproximadamente $\frac{1}{4}$ del volumen total a preparar y se esterilizó a 110 °C (para evitar reacciones de caramelización) durante 10 minutos. En otro matraz con los $\frac{3}{4}$ del volumen restante a preparar se disolvió el agar bacteriológico, este se llevó a ebullición durante 1 minuto y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. En condiciones asépticas se mezcló la leche descremada con el agar bacteriológico, y se transfirió a cajas de Petri estériles. Para las placas que contenían sangre al 5%, ésta fue adicionada al medio LB agar estéril. Una vez que solidificó el medio, las cajas fueron almacenadas a 4 °C hasta el momento de su uso. (64)(43).

Aislados bacterianos se cultivaron en caldo LB a 35 °C durante 20 h, bajo agitación suave (160 rpm). Alícuotas de 1 ml se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm y 10 μ l de los sobrenadantes se inoculó en placas de agar-leche. Luego de la inoculación se incubó por 36 h a 30 °C; las áreas claras alrededor de las colonias (proteólisis positiva) se forman si el microorganismo es capaz de secretar proteasas (6).

2.4.2. Expresión de Lipasa extracelulares

Aislados bacterianos se hicieron crecer durante 24 h a 37 °C, en un medio químicamente definido que consiste en 3 mM KCl, 12 mM (NH₄)₂SO₄, 3,2 mM MgSO₄, 1,2 mM K₂HPO₄, 0,02 mM FeSO₄, 3 mM de NaCl, y 20 mM de glucosa en 50 mM de ácido propanosulfónico 3-(N-morpholino) (MOPS, Sigma), pH 7,6. La turbidez de las suspensiones bacterianas se midió a 640 nm. Las células fueron cosechadas por centrifugación durante 10 min a 16.000Xg y los sobrenadantes se colectaron. La actividad lipasa se midió usando polioxietileno sorbitán (Tween 20 -éster de ácido láurico, Tween 40-éster de ácido palmítico y Tween 80-éster de ácido oleico) como sustratos. La reacción mezcla consistía en 0,1 ml de

Tween 10% en 50 mM de Tris (pH 7,6), 0,1 ml de CaCl_2 1 M en tampón Tris, 0,2 ml de sobrenadante filtrado. Las muestras se ensayaron por quintuplicado y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La turbidez de la reacción se midió a 400 nm. La actividad de la lipasa se expresó como unidades de enzima/0.2 unidades de densidad óptica a 400 nm. Una unidad lipolítica (LU) se define como la cantidad de actividad enzimática que después de 24 h, en las condiciones anteriores, se tradujo en un incremento de absorbancia de 0,01 a 400 nm (47).

2.5. Producción de exopolisacáridos (EPS)

Dado que la producción de EPS en los medios de laboratorio estándar, incluyendo Columbia Ágar Sangre, *B. cepacia* selectivo ágar, y Luria-Bertani ágar, no es fácilmente observable, se utilizó medio de Extracto de levadura (YEM; 0,5 g litro⁻¹ de extracto de levadura, 4 g litro⁻¹ de manitol y 15 g de ágar) para evaluar las capacidades de los aislamientos del cBc para producir EPS (66). Un método simple de evaluación fue desarrollado para describir la cantidad de EPS producido por cada aislamiento. Las bacterias se subcultivaron a partir de un stock congelado en una placa de 25ml YEM, y se incubaron a 35 °C durante 48 h. Los criterios para la puntuación se describen en la leyenda de la Figura. 1. Los distintos tipos de colonias mucoides se definieron como: no mucoides (-), parcialmente mucoides (+), moderada (++) , y francamente mucoides (+++) (81).

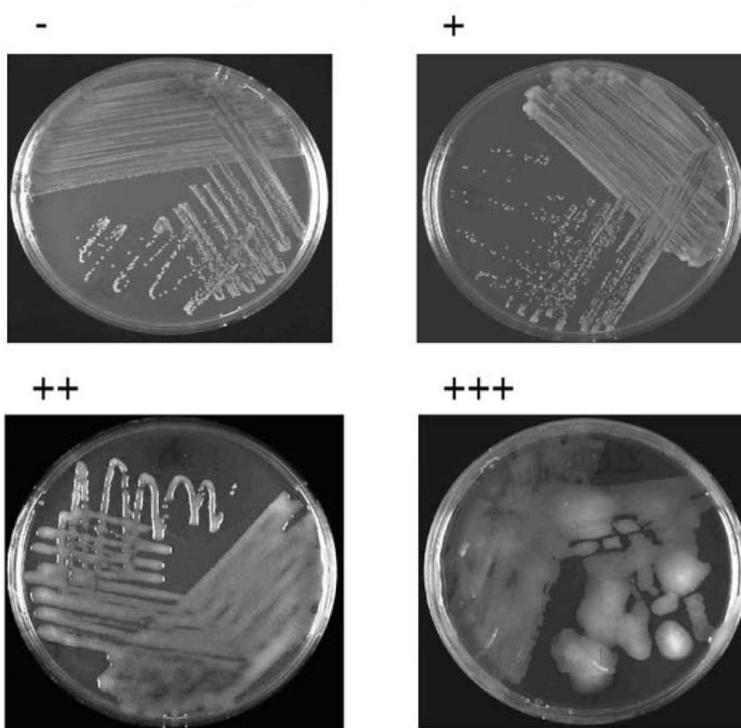


Figura 1. Fenotipos mucoides de *B. cenocepacia* en placas de agar YEM después de 48 h de crecimiento a 35 ° C. La puntuación de las no mucoides y fenotipos mucoides fue el siguiente: (-) el crecimiento no muestra evidencia de la producción de EPS y las colonias son secas con un acabado mate, (+) hay algunas pruebas de la producción de EPS en la región de crecimiento confluyente. La puntuación ++ y +++ son mucoides en apariencias y el crecimiento es plano; excepto (+++) que gotea en la tapa de la placa en posición invertida. Tomado y modificado (81).

2.6. Crecimiento en *biofilm*

2.6.1. Cultivos en *biofilm* en sistema *batch* empleando perlas de polipropileno como soporte

Para estudiar la capacidad de formación de *biofilm* de aislados clínicos de *B. contaminans* se realizaron cultivos en sistema tipo *batch* los cuales se emplearon como inóculos. Los cultivos en *biofilm* fueron iniciados a partir de suspensiones de células planctónicas con una DO_{650} de 0,2 a 0,8. Los resultados obtenidos se utilizaron para elegir una DO inicial para los restantes siguientes experimentos.

Para el cultivo en *biofilm* empleando un sistema de crecimiento tipo *batch*, se utilizaron tubos de vidrio los cuales contenían como soporte 3 g de perlas de polipropileno ($\theta = 4,2$ mm, $h = 2$ mm; Petroken, Argentina). Los tubos esterilizados se inocularon con 3 ml de suspensión bacteriana en caldo LB y se dejaron durante distintos tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 24, 48 y 72 h en condiciones estáticas. Cada tubo representaba un tiempo de crecimiento. Después de 24 h el medio fue cambiado por LB fresco. A cada tiempo indicado, los cultivos fueron detenidos, retirando el medio de cultivo y las perlas, las cuales se lavaron tres veces con solución de PBS estéril para eliminar las células no adheridas al soporte. Los *biofilm* se fijaron luego a las perlas por secado durante 1 hora a 60 °C. La biomasa adherida se evaluó por tinción con cristal violeta (CV). La tinción se realizó cubriendo las perlas con solución de CV al 0,1% durante 15 minutos, luego las perlas se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. El CV unido a la biomasa adherida se eluyó mediante la adición de dos volúmenes de etanol al 95% y se midió la Absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro. Para obtener la desviación estándar, se evaluaron cuatro muestras de cada experimento. Se tomaron como blanco perlas de polipropileno sin crecimiento de biomasa que fueron teñidas con CV.

2.6.2. Formación de *biofilm* en placas multipocillo

La capacidad de formación de *biofilm* fue ensayada en placas multipocillo empleando la metodología descrita por O'Toole y colegas con modificaciones menores (60). Aislados de *B. contaminans* fueron replicados en agar tripticase soja (ATS; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) y luego crecidos durante la noche en caldo LB (Britania, Buenos Aires, Argentina). Luego de ajustar la DO_{650} a 0,2 para cada cultivo empleando medio LB fresco, los mismos se usaron como inóculos agregando 200 μ l sobre cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos (Kartell, Italia). Las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C sin agitación, se retiró el medio con células no adheridas y se adicionó medio fresco estéril. Posteriormente las placas se

incubaron durante 48 h a 37 °C con agitación orbital de 100 r.p.m., con remplazo total del medio de cultivo a las 24 h. Los *biofilms* formados sobre la superficie de los pocillos fueron lavados suavemente dos veces con PBS y luego teñidos con 0,1% de cristal violeta (CV) por 15 minutos. Los pocillos fueron luego lavados 3 veces con agua, secado en estufa a 60 °C y finalmente el CV asociado a la células fue solubilizado con etanol al 95% (v/v). De esta forma la biomasa fue cuantificada indirectamente midiendo la Absorbancia a 590 nm (A_{590}) del CV disuelto usando un lector de placas multipocillo (Benchmark Plus, Biorad). Para cada cepa fueron realizados en paralelo 3 experimentos independientes con 5 réplicas cada uno. Controles del medio no inoculado (DOc) fueron incluidos en cada ensayo. El valor de corte fue definido como tres desviaciones estándar sobre la media del DOc.

Posteriormente, se evaluó otro diseño experimental de crecimiento de cultivo empleando el sistema de placas multipocillo. Se ensayaron 3 condiciones: A) inóculo DO_{650} 0,2 sin recambio de medio de cultivo; B) inóculo DO_{650} 0,2 con recambio de medio de cultivo a las 24 h; C) inóculo DO_{650} 0,02, con recambio de medio de cultivo a las 24 h, todas con incubación estática inicial de 4 h.

2.6.3. Cultivo en *biofilm* en cámaras con flujo continuo de nutrientes

El sistema de cultivo en *biofilm* en cámaras operadas con flujo continuo de nutrientes, consistió en el empleo de celdas rectangulares de acrílico de 3 x 10 x 1cm, de tamaño, diseñadas en nuestro laboratorio. Cada celda se conectó por un extremo y por medio de tubos de silicona, a un frasco Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que cumplió la función de reservorio para el inóculo, y a un recipiente de 1 L, el cual almacenó el medio de cultivo fresco. Este último recipiente se conectó mediante un tubo de silicona a un filtro el cual estaba asociado a un aireador con el fin de aportar de este modo aire estéril al medio de cultivo fresco. Por el otro extremo, el biorreactor fue conectado a un Erlenmeyer de 0,5 L el cual fue utilizado como reservorio del medio de cultivo agotado (Figura 2). El sistema de cultivo completo fue esterilizado con vapor. Este sistema se completó con una bomba peristáltica multicanal (GIBSON, Francia) para permitir la circulación del medio de cultivo a través de la celda de cultivo. La cámara fue inoculada con 1 ml de un cultivo planctónico en fase exponencial, al cual se le ajustó previamente la DO_{650} a 0.5 con medio LB. La suspensión celular se mantuvo en contacto con la superficie de crecimiento de manera estática, en cuarto estufa a 35 °C durante 4 h, para permitir de esta manera la adhesión de las células a la superficie. Posteriormente se inició la circulación de medio LB fresco a través de la celda, por acción de la bomba peristáltica, la cual se trabajó a una velocidad constante de 2,21 ml h⁻¹ y se drenó la suspensión de células no adheridas. El medio de cultivo fresco contenido en el reservorio se

mantuvo bajo condiciones de aireación constante ($0,1 \text{ L min}^{-1}$), mientras que el sistema completo de cultivo se mantuvo a 35°C . La biomasa adherida al soporte abiótico fue evaluada a las 48 h de iniciado el cultivo. A tal fin, luego del período de tiempo mencionado, se detuvo la circulación del medio fresco, se drenó el medio de cultivo contenido en la cámara y se procedió a fijar el *biofilm* crecido con p-formaldehído 4% (v/v) por 15 minutos, luego se lavó por circulación suave de PBS por acción de la bomba peristáltica. Finalmente se coloreó con solución de naranja de acridina (5 mg/L) y se observó por microscopía de escaneo láser confocal (Figura 2).

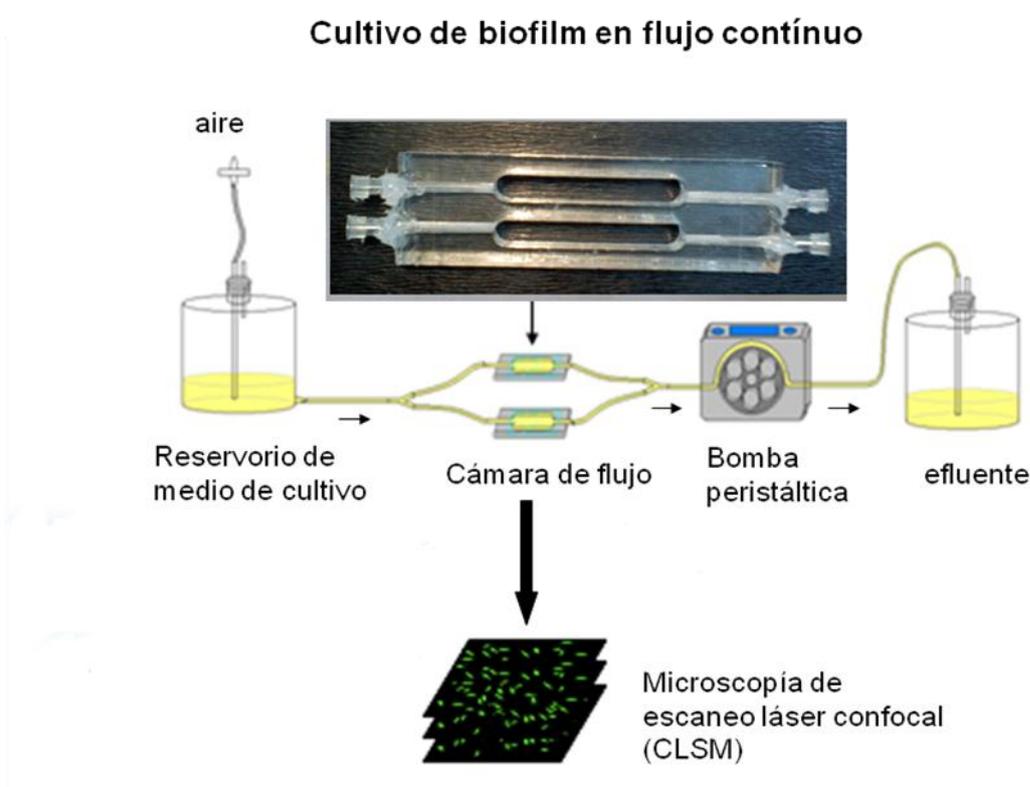


Figura 2. Esquema del sistema de cultivo en *biofilm* en cámaras operadas con flujo continuo de nutrientes. Las celdas son diseño original.

2.7. Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Se obtuvieron imágenes por microscopía de escaneo láser confocal en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5 con láseres de Argón y HeNe (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (Figura 3). Células de *Bc* crecieron durante 72 hs en forma de biofilms, adheridas a la base de vidrio de una cámara de flujo continuo. Los biofilms fueron lavados suavemente con PBS para remover células no adheridas y luego fijados durante 15 min con p-formaldehído 4% (v/v). Las células adheridas se lavaron con PBS, se tiñeron con naranja de acridina (dilución

final: 1:500000) durante 30 min, y luego se lavaron nuevamente con PBS. La detección de luz emitida se realizó secuencialmente con los valores óptimos para el naranja de acridina (con láser de argón a 502 nm de excitación y 525 nm de emisión). En cada experimento las imágenes fueron adquiridas en puntos seleccionados al azar, utilizando un objetivo 20 x de apertura numérica (NA) de 0.7, a intervalos de 1 μm a lo largo del eje z a través del biofilm. Esta colección de imágenes en el eje z fue observada y procesada utilizando el software LAS AF LITE versión 2.2.1 y el software Imaris (38)(39)(5).



Figura 3. Microscopio de escaneo láser confocal invertido Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany. La flecha señala una celda con una sección de manguera.

2.8. Extracción de AHLs de sobrenadantes de cultivo

Los sobrenadantes de cultivo fueron extraídos según el procedimiento descrito por McClean y colegas (54) y por Shaw y colegas (67). Para tal fin, los sobrenadantes libres de células, acidificados, se mezclaron en un vaso de precipitado con diclorometano (DCM) grado HPLC (U.V.E., Argentina) en una relación 70:30. La mezcla se agitó a 200 rpm con un agitador magnético durante 20 minutos para luego transvasar la emulsión a un balón de decantación permitiendo de esta manera la separación de las fases. Seguidamente, la fracción orgánica fue removida y se repitió la extracción con DCM de la fase acuosa. Ambas fracciones orgánicas se juntaron para ser tratadas con Na_2SO_4 anhidro (Anedra, Madrid, España) con el fin de eliminar restos de agua y luego se filtraron a través de papel Whatman (GE Healthcare, EUA). El extracto orgánico se llevó a sequedad total mediante un equipo rotavapor operado a 36 °C y venteado

con nitrógeno gaseoso. Los extractos secos se reconstituyeron en pequeños volúmenes de DCM tal que los correspondientes a los cultivos líquidos y en *biofilm* de cBc resultaron 30 veces concentrados.

2.8.1. Cepas biosensoras para detección de señales de quórum sensing

La cepa *Chromobacterium violaceum* CV026 fue provista por la Dra. Ángeles Zorreguieta de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina) y la cepa *C. violaceum* VIR07 por el Dr. Tomoshiro Morohoshi de la Universidad de Utsonomiya (Utsonomiya, Japón). *C. violaceum* CV026 es una mutante derivada de *C. violaceum* ATCC 31532 que no puede sintetizar AHLs, debido a una mutación en el gen *cvil* generada por la inserción del transposón Tn5. Tiene la capacidad de detectar AHLs de cadena acilada corta con o sin sustituyentes en el carbono 3, como también algunas homocisteín tiolactonas (54). La cepa *C. violaceum* VIR07 es una mutante derivada de *C. violaceum* ATCC 12472 con una delección en el gen *cvil* generada por la inserción de un casete de resistencia a kanamicina (*cvil::Km^r*), por este motivo no sintetiza AHLs. VIR07 es capaz de detectar en especial AHLs con cadena acilada larga con o sin sustituyentes (56). Ambas cepas biosensoras se crecieron a 30 °C en el medio LB. La cepa VIR07 se cultivó en la condición de restricción recomendada por bibliografía, para lo cual el medio fue suplementado con Kanamicina (50 µg ml⁻¹, Sigma). Estas cepas producen el pigmento violeta Violaceína cuando son inducidas por AHLs exógenas, siendo este proceso un indicador de la presencia de dichas moléculas. Las características genéticas relevantes de las cepas biosensoras así como también la resistencia a antibióticos se resumen en la Tabla 1. En Tabla 2 se detallan las moléculas de AHLs detectables por las cepas biosensoras utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. Cepas biosensoras utilizadas en este trabajo

Cepa biosensora	Características relevantes	Resistencia a antibióticos	Cita
<i>C. violaceum</i> CV026	Derivada de la cepa ATCC 31532 con mutación en el gen <i>cvil</i> por inserción del transposón Tn5 (<i>cvil::Tn5</i>)	Kanamicina	(54)
<i>C. violaceum</i> VIR07	Derivada de la cepa ATCC 12472 con mutación en el gen <i>cvil</i> por inserción de cassette de resistencia a Kanamicina (<i>cvil::Kmr</i>)	Kanamicina	(56)

Tabla 2. Rango de detección de moléculas de QS para las distintas cepas biosensoras

Cepa biosensora	Moléculas señal
<i>C. violaceum</i> CV026	C ₄ -HSL, C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₄ -HSL, 3-oxo-C ₆ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, benzoilacetil-HSL, C ₄ -homocisteín tiolactona, C ₆ -homocisteín tiolactona, 3-oxo-C ₆ -homocisteín tiolactona
<i>C. violaceum</i> VIR07	C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, C ₁₂ -HSL, C ₁₄ -HSL, C ₁₆ -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL, 3-oxo-C ₁₀ -HSL, 3-oxo-C ₁₂ -HSL

2.8.2. Calibración del ensayo de detección de AHLs en placa de Petri

El ensayo de detección de AHLs en placa de Petri, fue llevado a cabo empleando las cepas biosensoras CV026 y VIR07 de *C. violaceum*, como así también distintas cepas productoras de AHLs. Las cepas de *C. violaceum* fueron sembradas en placas conteniendo medio de cultivo sólido LB. Las cepas productoras de AHLs fueron sembradas perpendicularmente a las cepas biosensoras de manera tal que crecieran cercanas a estas últimas (Figura. 4). Posteriormente, las placas se incubaron a 30°C registrando el crecimiento y la inducción de las cepas biosensoras a distintos tiempos. Las cepas productoras de AHLs empleadas en esta calibración fueron: *B. cepacia* ATCC 25416, *S. marcescens* AS-1, *A. tumefaciens* R10, *P. aeruginosa* PAO1 y *B. pertussis* Tohama I. Cada cepa biosensora se sembró además frente a sí misma con el fin de corroborar que no eran capaces de generar su propia inducción.

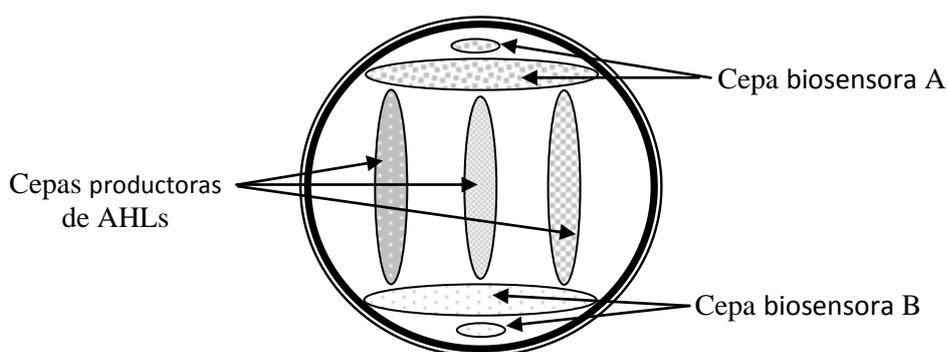


Figura 4. Esquema de sembrado de cepas para la detección de AHLs en placa de Petri. Las cepas biosensoras se sembraron perpendicularmente a cepas productoras de AHLs de manera que crecieran próximas y así permitir su inducción. Cada cepa biosensora se enfrentó a sí misma para confirmar que no tiene la capacidad de activar su propia inducción.

2.8.3. Bioensayo de detección de AHLs por difusión

La detección de acil-homoserín lactonas se aplicó también sobre los extractos obtenidos a partir de los distintos cultivos de organismos del CBc, mediante el bioensayo de

detección por difusión descrito por Morohoshi y colaboradores (56), utilizando las cepas biosensoras de *C. violaceum*. Brevemente, 50 ml de medio de cultivo LB semi-sólido (0,75% v/v de agar) fue inoculado independientemente en una relación 10:1 con un cultivo en fase exponencial de las cepas biosensoras de *C. violaceum* (CV026 y VIR07). Los medios semi-sólidos inoculados fueron transferidos a placas de Petri para luego colocar sobre la superficie del agar solidificado, discos de papel Whatman con un diámetro de 8 mm. Posteriormente, 15 µl de sobrenadante de cultivo centrifugados (13.000 rpm), obtenidos a partir de cultivos líquidos y de crecimiento en *biofilm*, fueron aplicados sobre los discos de papel. Luego, las placas se incubaron a 30°C durante 16-18 h. La presencia de AHLs en los extractos se determinó a través de la formación de halos de color violeta. El nivel de producción de AHLs por parte de los distintos tipos de cultivos de cBc se evaluó a través de los diámetros correspondientes a los halos de coloración. Se utilizaron extractos de cultivos líquidos de las cepas productoras de AHLs, para la obtención de controles positivos de la inducción de las cepas biosensoras por acción de dichas moléculas. Asimismo, se ensayaron como controles negativos extractos de los medios de cultivo líquidos SS y LB sin inocular como controles negativos. Este experimento se repitió al menos 2 veces utilizando extractos independientes de las cepas.

2.8.4. Identificación de AHLs mediante métodos fisicoquímicos

Los extractos obtenidos a partir de sobrenadantes de cultivo en *biofilm* de *B. contaminans* fueron estudiados mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y cromatografía líquida-espectrometría de masas con el fin de corroborar la detección de las AHLs e intentar dilucidar sus estructuras moleculares

2.8.4.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja (FT-IR) fue utilizada para la identificación de bandas de absorción características de las AHLs, potencialmente presentes en extractos concentrados de cultivos en *biofilm* de aislados de *B. contaminans*, según el procedimiento descrito por Chhabra y colegas (12). Asimismo, extractos concentrados obtenidos a partir de cultivos líquidos de *B. cepacia* ATCC 25416 y *P. aeruginosa* PAO1 ATCC 27853 fueron empleados como controles positivos de AHLs. Treinta µl de cada extracto concentrado fueron colocados en celdas de ZnSe (13x2 mm, Korth Kristalle GmbH, Alemania) y secados durante 60 min a temperatura ambiente con el fin de obtener films transparentes sobre la superficie de las celdas. Seguidamente, las celdas fueron leídas en un espectrómetro Spectrum One (Perkin-

Elmer, EUA) en modo absorbancia, bajo una purga continua de aire seco evitando así las interferencias causadas por vapor de agua. Los espectros IR se adquirieron en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , a una velocidad de medición de 1 cm/s , mediante 64 escaneos y una resolución de 6 cm^{-1} . El ajuste de dichos parámetros se llevó a cabo por medio del programa Spectrum 3.0 (Perkin-Elmer, USA). A partir de los espectros IR, se calcularon sus respectivas derivadas segundas aumentando de esta manera la resolución de los picos de absorción (59). Las derivadas segundas fueron empleadas para la detección de los máximos correspondientes a la absorción de grupos funcionales propios de los distintos tipos de moléculas AHLs, los cuales se ubican en rangos específicos del espectro IR. Es importante destacar que en estos rangos espectrales no se ubican otros grupos funcionales pertenecientes a moléculas biológicas solubles en solventes no polares. En la Tabla 3 se detallan los grupos funcionales característicos de cada tipo de AHL, junto con su ubicación en el espectro IR. Dichos grupos funcionales fueron utilizados para dilucidar el tipo de molécula de AHL (*N*-acil HSL, *N*-3-oxo-alcanoil HSL y *N*-3-hidroxi-acil HSL) presente en los extractos.

Tabla 3. Grupos funcionales característicos de los distintos tipos de moléculas AHLs y su ubicación en el espectro IR

AHLs	Grupo Funcional	Rango Espectral (cm^{-1})
<i>N</i> -acil-HSLs	C=O (Anillo lactona)	1780-1792
	C=O (Amida)	1643-1647
<i>N</i> -3-oxo-alcanoil-HSLs	C=O (Anillo lactona)	1781-1793
	C=O (Cetona)	1710-1724
	C=O (Amida)	1648-1654
<i>N</i> -3-hidroxi-acil-HSLs	C=O (Anillo lactona)	1774-1778
	C=O (Amida)	1638-1642

Los grupos funcionales característicos de las distintos tipos de moléculas de AHLs y sus rangos específicos de ubicación espectral fueron extraídos del trabajo publicado por Chhabra y colegas (12).

2.8.4.2. Identificación de AHLs mediante HPLC MS/MS-MRM

Extractos de cultivos de *B. contaminans* fueron analizados mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem con monitoreo de reacción múltiple (HPLC MS/MS-MRM) basándonos en el trabajo de Gould y colegas (33), con el fin de lograr la separación e identificación de moléculas del tipo AHLs. El proceso de separación se llevó a cabo mediante elución por gradiente y la identificación a través de las transiciones molécula +

H del ión (M+H) 102 correspondiente al grupo lactona. Del mismo modo, se analizaron estándares de AHLs y extractos obtenidos de cultivos de cepas productoras de AHLs, con el objeto de registrar los picos correspondientes a las transiciones de masa MRM de dichas moléculas y sus respectivos tiempos de retención. A partir de los datos obtenidos se llevó a cabo una comparación con los resultados conseguidos a partir de los extractos de aislados de *B. contaminans* y la cepa de referencia *B. cepacia* ATCC 25416. Para aquellas AHLs que no se dispuso de estándar, se evaluó el tiempo de retención relativo y la transición específica de masa con los obtenidos de los estándares analizados. El grado de concentración correspondiente a los estándares y extractos de cultivo, se expresó a través de las unidades Megacounts y kilocounts en el eje vertical de cada cromatograma. Este estudio de identificación fue realizado en el CIMA (Centro de Investigaciones en Medio Ambiente, CONICET-UNLP) con la colaboración del Dr. Damián Marino.

2. 9. Análisis estadístico

En el caso de las variables categóricas (expresión de exoenzima, EPS y señales de QS) en las que sólo se registró información cualitativa (ausencia o presencia), se recurrió a pruebas no paramétricas. Las diferencias se evaluaron a través una tabla de contingencia usando la prueba de χ^2 (Chi-cuadrado de Pearson).

Para los casos de formación de *biofilms* o secreción de lipasas, en los cuales se registró información de tipo cuantitativa, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). En primer lugar se realizó la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, y en el caso de n menor a 50 se utilizó Shapiro-Wilk) y se probó la homocedasticidad (igualdad de varianza) con la prueba de Levene. Para evaluar la significancia de las diferencias, en el caso de varianzas iguales se realizaron las pruebas *post-hoc* de DMS y Tukey ($p < 0,05$) y en el caso de varianzas no homogéneas se comprobó mediante la prueba de Games-Howell. Se utilizó para el cálculo de todos los casos la plataforma estadística *SPSS Statistics 17.0*. y los gráficos fueron construidos utilizando Excel 2010.

RESULTADOS

3.1. Cinética de crecimiento de aislados clínicos de *B. contaminans* en cultivos líquidos

Se evaluó en primer lugar el comportamiento en cuanto a la cinética de crecimiento en el medio de cultivo LB en sistema *batch* de 10 aislados clínicos de *B. contaminans* (tomados al azar de nuestro banco de cepas). Por medio de las curvas de crecimiento obtenidas se determinó que a partir de las 10 h de incubación, la mayoría de los aislados clínicos analizados alcanzaron la fase estacionaria. De la comparación entre las curvas se aprecia que los aislamientos clínicos estudiados poseen gran variabilidad fisiológica, bajo las mismas condiciones experimentales. En la fase estacionaria del crecimiento los aislados clínicos examinados exhibieron valores de DO_{650} desde 1,7 a 3,5. Asimismo, para calcular la velocidad específica de crecimiento se corrigieron los valores de DO_{650} por biomasa X (g/l) (Figura 6) y se calculó el logaritmo natural de los valores de X para graficarlos en función del tiempo de incubación (gráficos no mostrados). A partir de estos gráficos se determinó la ecuación de la recta cuyo valor de la pendiente corresponde a la velocidad específica de crecimiento (μ). Este parámetro se utilizó para el cálculo del tiempo de duplicación o tiempo generacional de las muestras analizadas. De esta manera se determinó que los aislamientos clínicos ensayados crecen con diferente velocidad específica de crecimiento. No se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aislamientos recuperados de infecciones crónicas y los demás aislados. En la Tabla 4 se detallan los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación para los aislados clínicos mencionados.

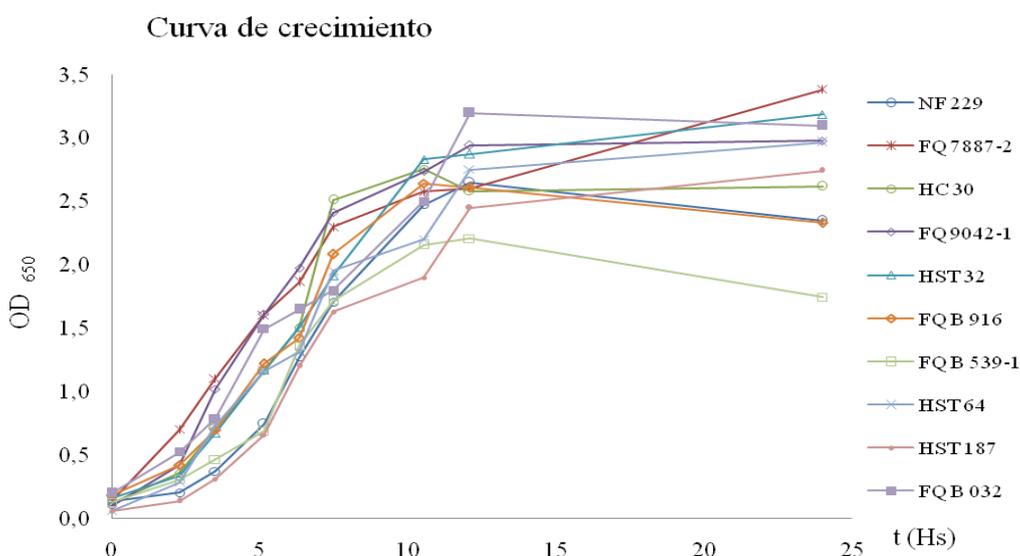


Figura 5. Curvas de crecimiento de 10 aislados clínicos de *B. contaminans* en medio LB.

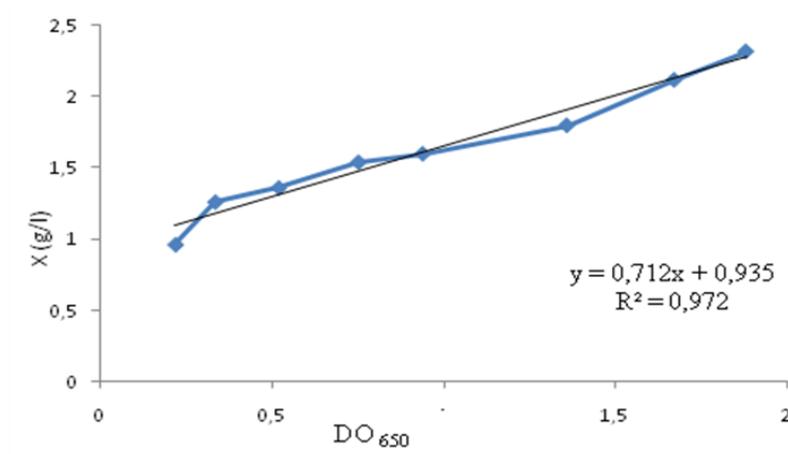


Figura 6. Correlación entre el desarrollo de biomasa evaluada por peso seco X (g/l) y por DO₆₅₀.

Tabla 4. Velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación en *B. contaminans*.

Cepa	μ_{\max}	R ²	t _d (horas)
NF 229	0,151	0,988	4,59
FQ 7887-2*	0,118	0,985	5,87
HC 30	0,149	0,994	4,65
FQ 9042-1*	0,154	0,980	4,50
HST 32	0,141	0,993	4,92
FQ B 916	0,137	0,987	5,06
FQ B 539-1*	0,152	0,988	4,56
HST 64	0,109	0,956	6,36
HST 187*	0,114	0,982	6,08
FQ B 032*	0,152	0,981	4,56

(*) Aislados recuperados de infecciones crónicas

3.2. Producción de exopolisacáridos (EPS)

Con el objetivo de evaluar la producción de EPS en cepas de *B. contaminans*, cultivamos 163 aislados recuperados de infecciones pulmonares crónicas, aislados de infecciones iniciales o primeras infecciones de pacientes FQ, no FQ y ambientales en un medio rico en fuente de carbono (relación C:N de 20:1). El 57.6 % de los aislados resultó positivo para el ensayo, sin embargo se encontraron diferencias en la capacidad de síntesis de EPS entre los distintos aislados. En la Figura 7 se puede observar la acumulación de EPS en la mayoría de las cepas de *B. contaminans* examinadas. Al analizar los productores de EPS según el origen de la muestra, se observó diferencias significativas en los aislados clínicos de pacientes FQ en

relación al tiempo de infección (77,4% infecciones tempranas vs 37,8% infecciones crónicas). El 90% de los aislados de origen ambiental analizados presentaban colonias mucoides (Figura 8).



Figura 7. Fenotipos mucoides de *B. contaminans* resultantes del crecimiento en placas de agar YEM después de 48 h de crecimiento a 35 °C.

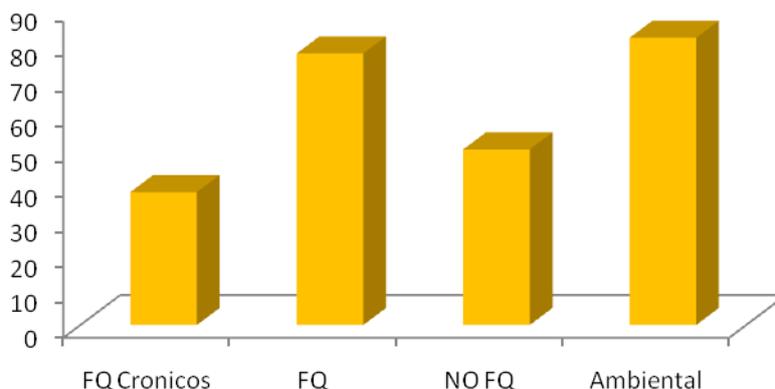


Figura 8. Expresión de EPS en 163 aislados de *B. contaminans* agrupados según origen de la muestra. Los valores corresponden al porcentaje de aislados positivos para EPS en cada clase. En la categoría “FQ-crónicos” la disminución de expresión de EPS es significativamente menor a la obtenida para los aislamientos que no provienen de infecciones crónicas “FQ” y a los aislamientos ambientales ($p < 0.05$).

3.3. Producción de pigmentos

Se utilizaron placas con medio de cultivo Mueller Hinton (MH) para determinar la producción de pigmentos (36). Si bien la pigmentación amarillo verdoso es una característica

de *B. contaminans*, sólo en 5 aislados se observó la difusión de un pigmento, siendo en 3 de ellos un pigmento bordó y en los 2 restantes amarillo verdoso (figuras 9 y 10).

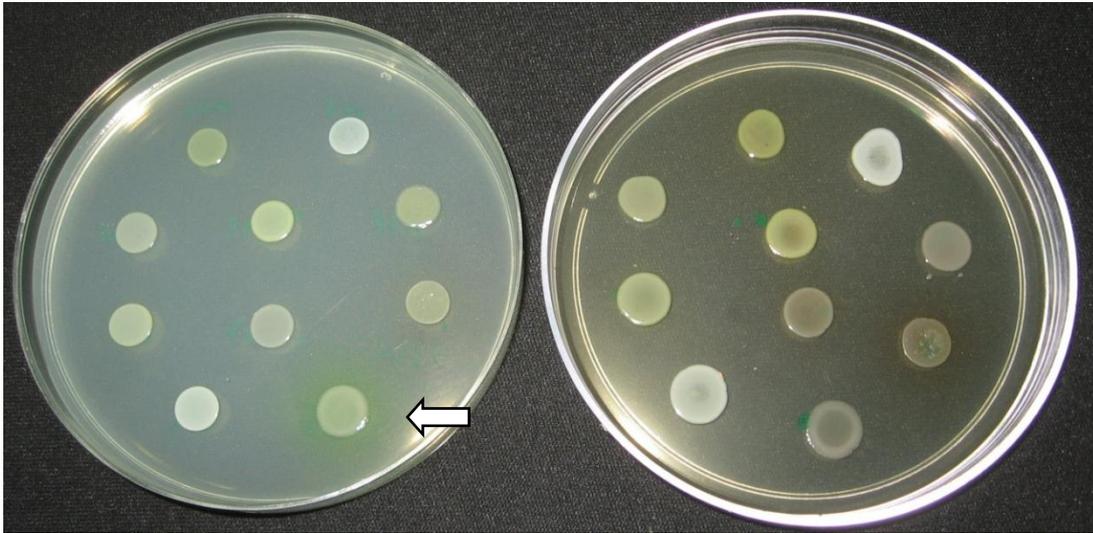


Figura 9. Aislados de *B. contaminans* crecidos en medio MH agar (izq.) y LB agar (derecha), luego de 30 h de incubación a 35 °C. Las colonias corresponden a los aislados HR 165, N3, NF 70, HST 210, MS 14, FQ B 016, FQ 9978, FQ B 539-1 (iniciando con la cepa señalada, en sentido del reloj) GH 1, HST 203 (centro arriba y abajo, respectivamente).



Figura 10. Aislados de *B. contaminans* crecidos en medio TSA al cabo de 30 h de incubación a 35 °C.

3.4. Secreción de exoenzimas

3.4.1. Proteasas y hemolisina

Ciento sesenta y cuatro aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans* fueron seleccionados para analizar la producción de proteasas y hemolisinas (Figura 11). El 43.3% de las cepas produjo hemolisina como se observa por una zona clara alrededor de las colonias en medio ágar sangre, mientras que 33.5% de las cepas produjeron proteasas. Interesantemente, solo el 18% de las cepas recuperadas expresó simultáneamente ambas enzimas y entre ellas el 4.3% corresponde a aislados recuperados de pacientes FQ con infección crónica para esta bacteria. En la figuras 12 y 13 se representa el % de aislados según el origen para ambas propiedades fenotípicas (hemolisina y proteasas). Las diferencias observadas en la expresión de ambos factores de virulencia entre los aislados recuperados de infecciones iniciales y de infecciones crónicas en pacientes FQ se evaluaron mediante la prueba de Chi cuadrado de Pearson, las diferencias fueron significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,07$, respectivamente).

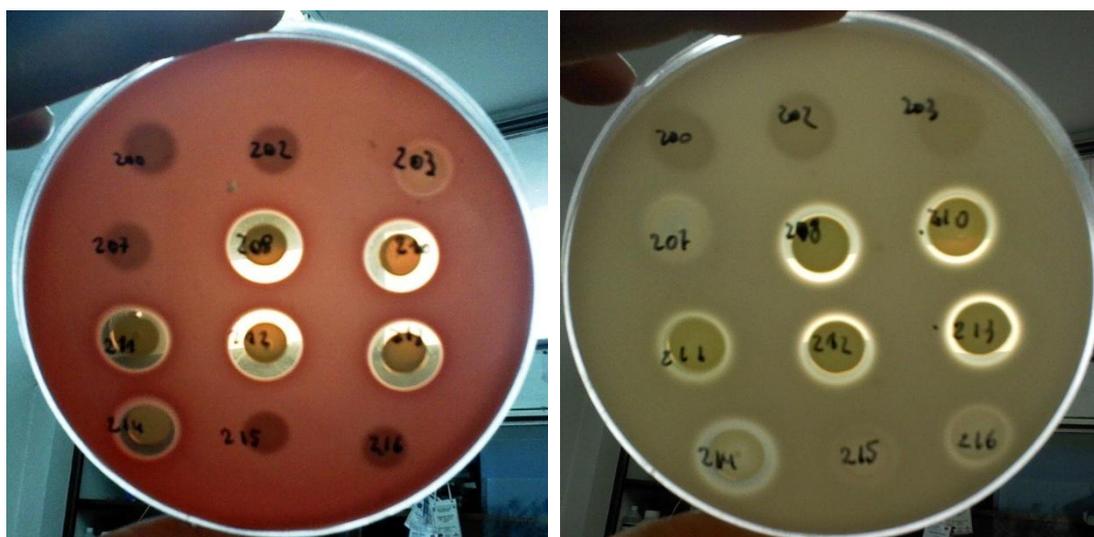


Figura 11. Expresión de exoenzimas por aislados de *B. contaminans*. Halos de transparencia corresponden a actividad proteolítica luego de 30 h de incubación a 35 °C. (izq. a derecha, medio enriquecido con sangre 5% y leche descremada 10%).

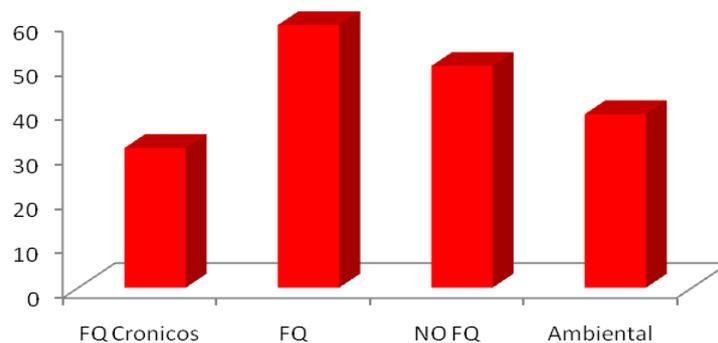


Figura 12. Expresión de hemolisina en 164 aislados de *B. contaminans* agrupados según origen de la muestra. Los valores corresponden al porcentaje de aislados positivos para Hemolisina en cada clase. En la categoría “FQ-crónicos” la disminución de expresión de hemolisina fue significativamente menor a la obtenida para las otras categorías “FQ” y NO FQ ($p < 0.01$) y significativamente menor a la obtenida para la categoría “Ambiental” ($p < 0.05$).

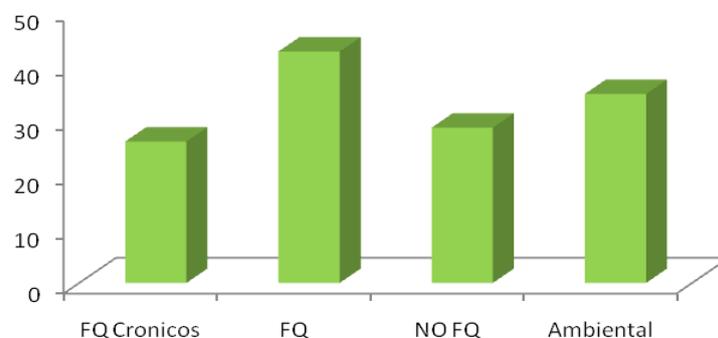


Figura 13. Expresión de enzimas proteolíticas en 164 aislados de *B. contaminans* agrupados según origen de la muestra. Los valores corresponden al porcentaje de aislados positivos para proteasas en cada clase. En la categoría “FQ-crónicos” la disminución de expresión de proteasas fue significativamente menor que la obtenida para la categoría “FQ” ($p < 0.05$), no presentando diferencias significativas con las otras dos categorías.

3.4.2. Expresión de Lipasa extracelulares

En 59 aislados de *B. contaminans*, agrupados en 4 categorías (FQ-crónicos, FQ-iniciales, No-FQ y ambientales), como se observa en la tabla B del Anexo (final del capítulo), se midió actividad de lipasa de sobrenadante de cultivo por el método descrito por Tirunarayanan y Lundbeck (72) usando sorbitanos de polioxietileno (Tweens 20, 40, 60, y 80; Sigma) como sustratos. Los Tweens 20, 40, 60, y 80 son ésteres de ácidos láurico, palmítico, esteárico y oleico, respectivamente. La actividad lipasa se expresó como unidades lipolíticas (UL) relativas sobre cada sustrato. La actividad informada de este modo osciló entre indetectable (0,0 UL) a 250 UL de actividad enzimáticas para Tween 20, 163 UL para Tween 40 y 113 UL para Tween 80. La figura 14, muestra en un diagrama de cajas la distribución de las medidas de actividad enzimática para cada uno de los sustratos ensayados agrupados según el origen de la cepa. El

análisis de varianza, mostró únicamente para lipasa con actividad lipolítica sobre Tween 20 diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aislados provenientes de infecciones crónicas (FQ crónicos) y los recuperados de primeras infecciones (FQ iniciales).

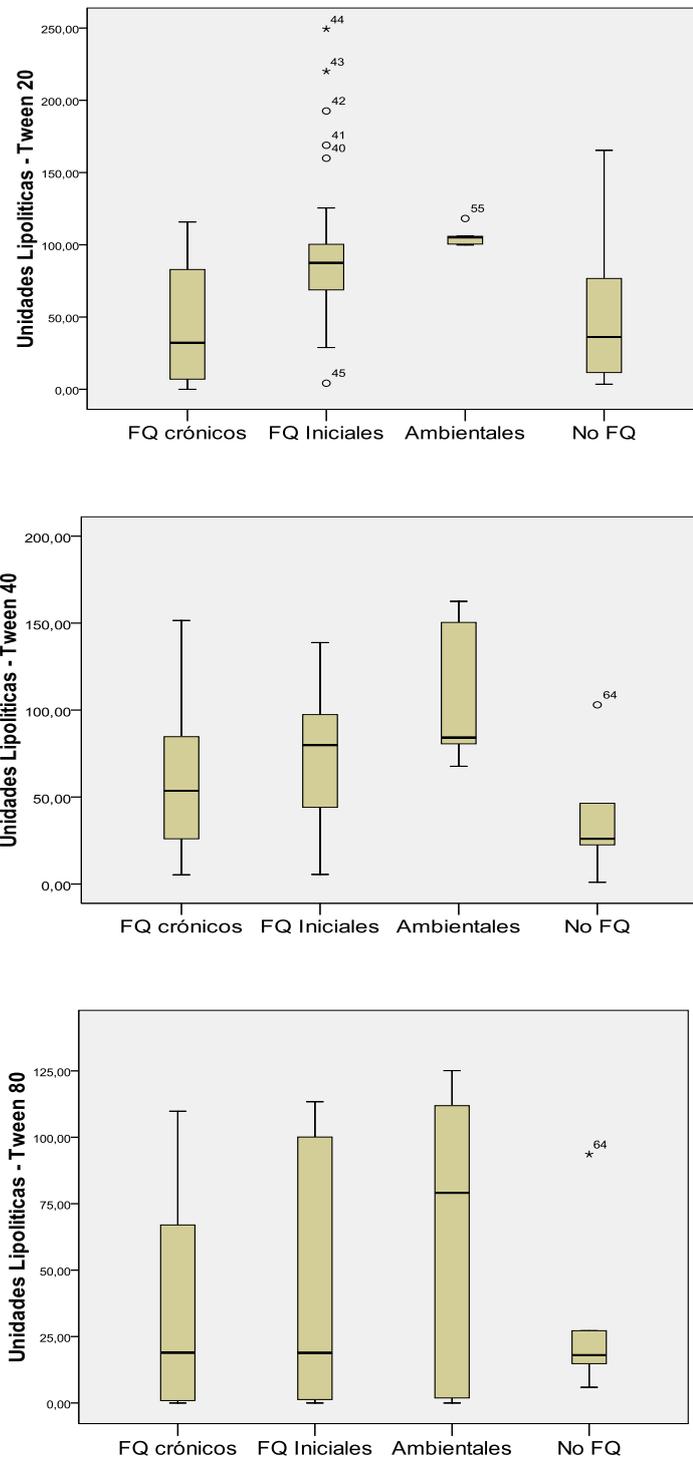


Figura 14. Diagramas de caja (*Box-Plot*) de los datos de actividad lipolítica sobre Tween 20, 40 y 80. Las barra externas señalan los valores mínimos y máximos, la caja representa el 50% de los datos y la barra interna señala la mediana.

3.5.1. Cinética de adhesión a superficies abióticas

Los estudios de adhesión a superficies abióticas se realizaron sobre perlas de polipropileno y placas multipocillo de poliestireno de modo comparativo entre los distintos aislados clínicos disponibles en nuestro laboratorio. Se evaluó la cinética de adhesión durante las primeras 5 horas de contacto bacteria-superficie. El estudio de adhesión puso de manifiesto que en promedio, los aislados clínicos alcanzan el máximo de biomasa adherida entre las 4 y 5 h de incubación a 35 °C (Figura 15). Este período de tiempo es menor al tiempo de duplicación promedio determinado para cultivos plantónicos creciendo en fase exponencial, por lo cual los resultados se asociaron a adhesión y no a crecimiento.

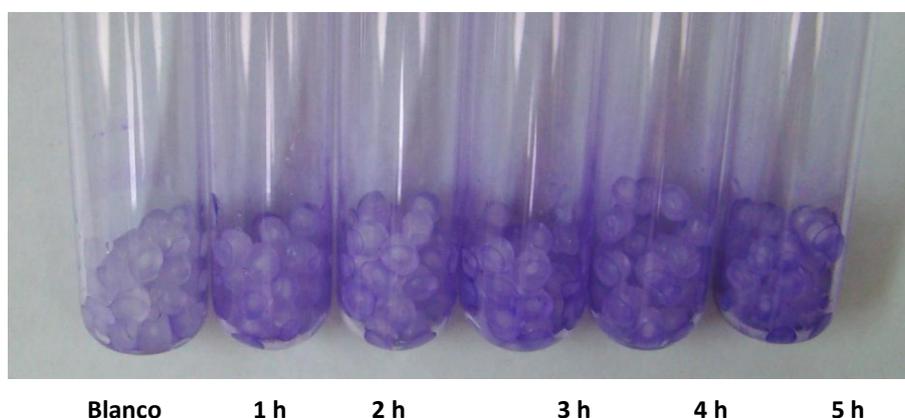


Figura 15. Cinética de adhesión a superficie abiótica del aislado clínico FQ 6407 de *B. contaminans*. El estudio de adhesión fue realizado utilizando como soporte perlas de polipropileno. Este análisis permitió determinar que al cabo de 4-5 h de incubación se obtiene el máximo de biomasa adherida a las perlas.

3.5.2. Crecimiento en *biofilm* empleando placas multipocillos

Una vez que se evaluó la capacidad de dos aislados clínicos de *B. contaminans* HST 64 (perteneciente al grupo FQ) y HST 187 (FQ-crónico) de adherirse a superficies de polipropileno se estudió la adhesión y crecimiento en un sistema clásico de testeo como las placas multipocillos. Se inocularon los pocillos con 200 μ l de suspensión celular ajustada a una $DO_{650}=0,2$. Al cabo de 4 h (etapa de adhesión) se observó un *biofilm* débil en las paredes de los pocillos, mientras que a las 24 h de incubación se observó un *biofilm* importante adherido a las paredes el cual se visualizó como un anillo definido en la interfase aire-líquido. Se utilizó en estos ensayos una cepa de referencia de *B. multivorans* como control. En la Figura 16 y figura 17 se observa la biomasa adherida mediante tinción con CV.

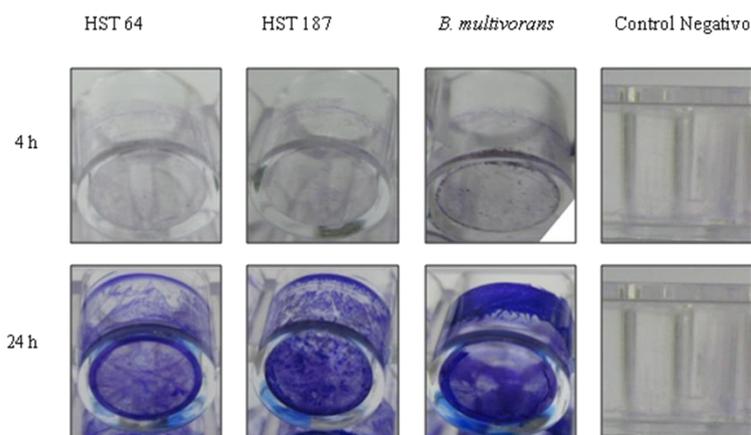


Figura 16. Crecimiento de los aislados clínicos de *B. contaminans* HST 64 (categoría FQ) y HST 187 (categoría FQ-crónico) en placa multipocillo. La biomasa adherida fue teñida usando CV 0.1%. Control positivo: *B. multivorans*, Control Negativo: medio LB sin inocular.

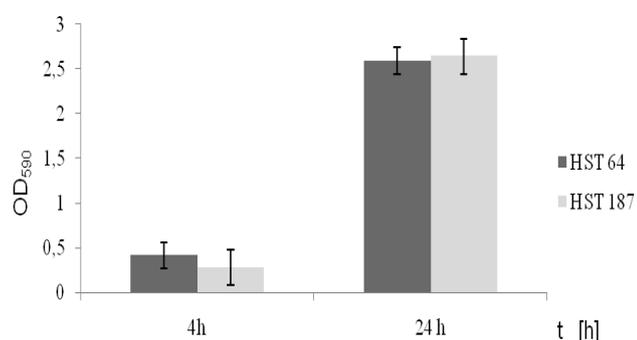


Figura 17. Crecimiento de los aislados clínicos de *B. contaminans* HST 64 (FQ) y HST 187 (FQ-crónico) en placa multipocillo. La biomasa adherida fue cuantificada indirectamente por medio del método de CV. Se indican los valores promedio y las desviaciones estándares obtenidos de tres experimentos independientes.

En un ensayo posterior se evaluó un esquema experimental de crecimiento bajo 3 condiciones mencionadas en Materiales y métodos a fin de estandarizar las condiciones para un ensayo con mayor número de aislados. Se observó que el tratamiento B (Figura 18) conduce al desarrollo de un *biofilm* más robusto.

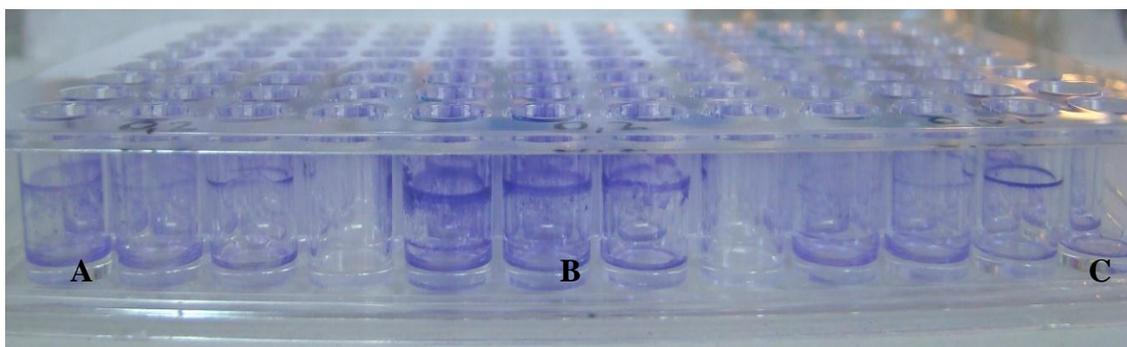


Figura 18. Formación de *biofilm* de 48 h en placas multipocillo bajo tres condiciones de operación diferentes: **A**: inóculo DO₆₅₀ 0,2, incubación sin recambio de medio de cultivo; **B**: inóculo DO₆₅₀ 0,2, incubación con recambio de medio de cultivo a las 24 h; **C**: inóculo DO₆₅₀ 0,02, con recambio de medio de cultivo a las 24 h. La biomasa adherida fue teñida usando CV 0.1%. Cada pocillo fue inoculado con 1.- *B. multivorans*, 2.- *B. contaminans* HST 64; 3.- *B. contaminans* HST 187; 4.- Control Negativo: medio LB sin inocular.

Posteriormente aplicando el tratamiento B, se evaluó en una colección de 115 aislados de *B. contaminans* en las 4 categorías de aislamientos (aislados de infecciones crónicas FQ crónicas, FQ de infecciones iniciales, No-FQ y ambientales) la capacidad para adherirse y formar *biofilm* en placas multipocillo. En la Tabla 5 (al final del capítulo) se muestran los resultados de formación de *biofilm* obtenidos luego de 48 hs de crecimiento, cuantificados por CV. En la Figura 19, se observa la distribución en porcentaje de aislados agrupados según la cantidad de *biofilm* formados.

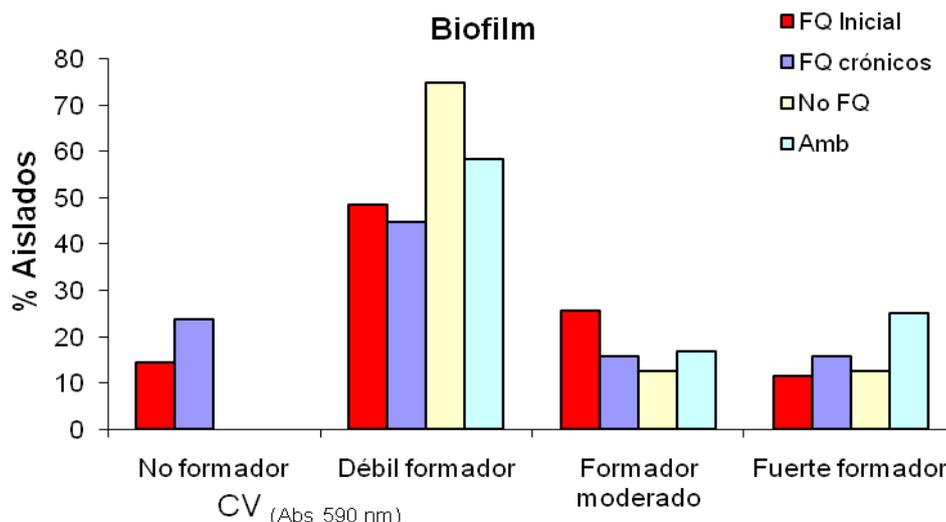


Figura 19. Formación de *Biofilm* en 59 aislados de *B. contaminans*.

Si bien como se observa en la figura 19, la distribución de aislados en función a la cantidad de *biofilm* formado parecería ser menor en aislados FQ crónicos, se evaluó mediante un análisis de varianza si la capacidad global de formar *biofilm* entre los grupos de aislamientos era semejante. Las diferencias observadas no fueron significativas ($p > 0,05$). En la Figura 20 se muestra la representación gráfica de la prueba de Levene para contrastar la hipótesis de homogeneidad de varianzas, comprobándose la homocedasticidad.

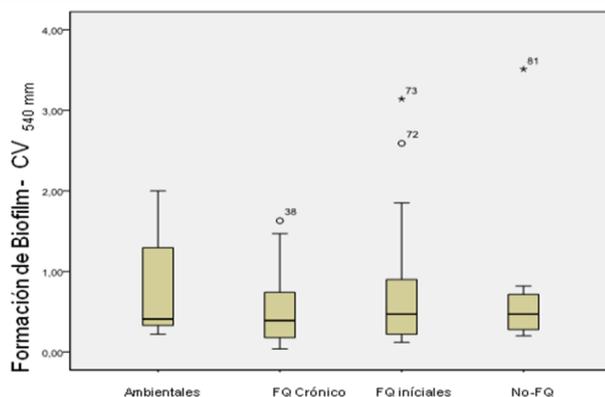


Figura 20. Diagrama de caja (*Box-Plot*) de la Prueba de Levene. Las barra externas señalan los valores mínimos y máximos, la caja representa el 50% de los datos y la barra interna señala la mediana.

3.5.3. Crecimiento en *biofilm* empleando el sistema de cultivo *batch* con recambio de medio

Empleando este sistema de crecimiento donde se reemplaza asépticamente el medio de cultivo agotado por medio fresco cada 24 h, se cuantificó el *biofilm* formado en condiciones aeróbicas en 2 aislados clínicos de *B. contaminans*. Como se muestra en la Figura 21 y Figura 22, luego de la etapa de adhesión inicial (4 h), los aislados clínicos crecieron sobre la superficie de las perlas de polipropileno incrementando notoriamente su biomasa adherida durante las primeras 48 h de cultivo. Sin embargo, se obtuvo un nivel máximo a las 72 h de iniciado el cultivo, momento al que se detuvo el experimento. Los resultados de este estudio indican que al menos estos 2 aislados clínicos de *B. contaminans* presentan la capacidad de desarrollarse bajo el modo de crecimiento en *biofilm*.

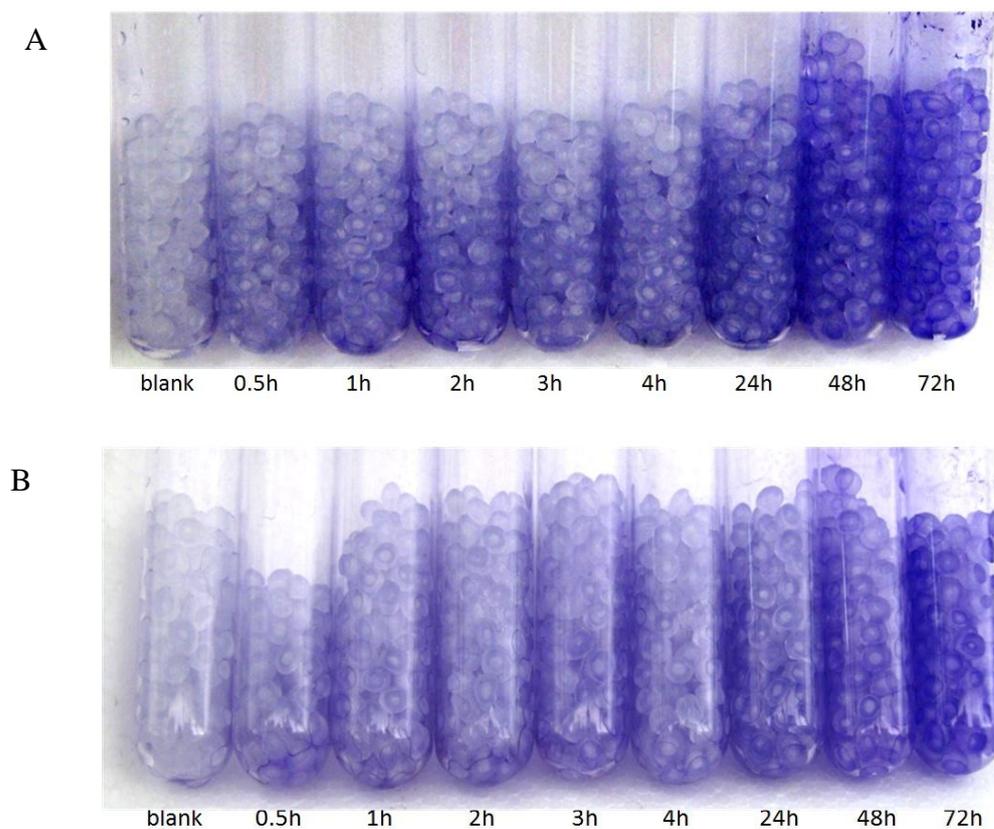


Figura 21. Cultivos en *biofilm* de *B. contaminans* HST 64 (A) y HST 187 (B). Los cultivos se hicieron empleando como superficie soporte perlas de polipropileno. Las bacterias fueron crecidas en reactores tipo columna por distintas horas en sistema tipo *batch*. Los cultivos fueron iniciados con un inóculo de OD_{650} 0,2.

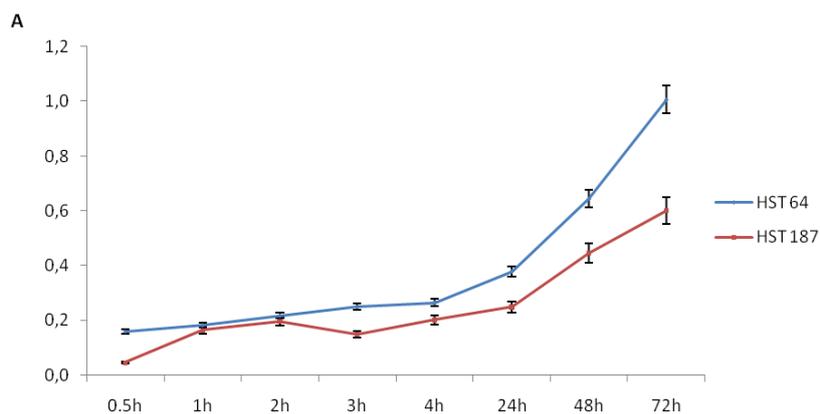


Figura 22. Curva de crecimiento en *biofilm* de *B. contaminans* HST 64 (FQ inicial) y HST 187 (FQ-crónico) empleando perlas de polipropileno como soporte. Los cultivos fueron realizados en sistema tipo *batch* iniciados con inóculos de $OD_{650}=0,2$. Luego de la adhesión inicial, el desarrollo del *biofilm* fue determinado a las 24, 48 y 72 h. La biomasa adherida fue cuantificada indirectamente por medio del método de CV. Los valores son promedios \pm desviaciones estándares de tres experimentos independientes.

3.6. Detección de moléculas de AHL

La bibliografía reporta que miembros del cBc son capaces de sintetizar moléculas de C_4 -HSL a C_{10} -HSL. Sin embargo, de acuerdo a nuestros conocimientos, nada ha sido reportado en este sentido para aislados clínicos o ambientales de *B. contaminans*. Previamente demostramos que estos organismos pueden crecer adheridos a superficie y formar *biofilm*, la pregunta es si pueden producir moléculas del tipo de las AHL. A efectos de llevar a cabo estos análisis se comenzó a trabajar sobre la detección de estas moléculas en cajas de Petri empleando como cepas biosensoras a *C. violaceum*. Estos agentes fueron sembrados perpendicularmente a las cepas potencialmente productoras de AHLs en placas de Petri conteniendo medio sólido LB. Dichas placas se incubaron a 30°C registrando los resultados de crecimiento y de inducción de las cepas biosensoras a distintos tiempos. Las cepas productoras de AHLs empleadas como controles positivos en esta calibración fueron: *B. cepacia* ATCC 25416, *P. aeruginosa* PAO1 ATCC 27853 y *S. marcescens* AS-1. La formación del pigmento violaceína en los cultivos de *C. violaceum* actuó como indicador de la inducción de dichas cepas biosensoras por la acción de AHLs liberadas por las cepas productoras de estas moléculas. En la Figura 23 (A) y (B) se puede observar los resultados del crecimiento de las distintas cepas mencionadas y de la inducción de las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07 a las 18 h de incubación. Todas las cepas alcanzaron óptimos crecimientos en el medio sólido LB. La formación del pigmento violeta consiguió ser correctamente visualizada a partir de las 14 h de incubación tanto para CV026 como para VIR07. Asimismo, a través de las imágenes de la Figura

24 se pudo comprobar que las cepas biosensoras de *C. violaceum* no poseen la capacidad de activar su propia inducción.

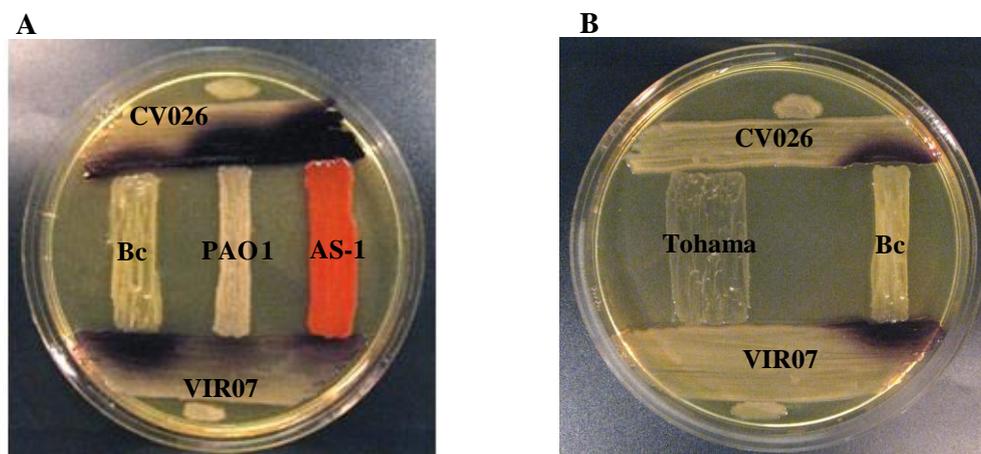


Figura 23. Calibración del ensayo de detección de AHLs en placas de Petri utilizando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. **(A)** Las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07 fueron sembradas perpendicularmente a cepas productoras de AHLs en placas de Petri con medio sólido LB. Las placas se incubaron a 30°C registrando el crecimiento de todas las cepas y la inducción de las cepas biosensoras a las 18 h. **(B)** Placas de Petri conteniendo medio BHA suplementado con 2,5% (v v⁻¹) de suero fetal bovino fueron utilizadas para sembrar *B. pertussis* Tohama I, *B. cepacia* y las cepas *C. violaceum* CV026 y VIR07. La formación de pigmento violeta es indicador de la inducción de las cepas biosensoras. CV026 y VIR07: Cepas biosensoras de *C. violaceum*. Bc: *B. cepacia* ATCC 25416, AS-1: *S. marcescens* AS-1, PAO1: *P. aeruginosa* PAO1. (Fotografía cedida gentilmente por El Dr. Diego G. Nosedá, Año 2011).

Una vez estandarizada la metodología basada en el crecimiento de la población en medio sólido, se probaron extractos de sobrenadantes de cultivos líquidos de cepas productoras de AHLs. Se emplearon como controles positivos de la inducción las mismas cepas que habían resultado positivas en el ensayo anterior y los mismos agentes biosensores. Se utilizaron placas conteniendo medio LB semi-sólido las cuales fueron inoculadas con las cepas biosensoras de *C. violaceum*. La formación de halos de color violeta de *C. violaceum* fue indicador de la presencia de AHLs en los extractos testeados. Los extractos de medio de cultivo fueron obtenidos a partir de un desarrollo de *B. cepacia* ATCC 25416 en 100 ml de medio. El extractivo en diclorometano concentrado 250 veces, originó la inducción de ambas cepas de *C. violaceum* formando halos con diámetros de 1,8 cm y 2,4 cm para CV026 (Figura 24 A) y para el biosensor VIR07 (Figura 24 B) respectivamente, mientras que una dilución 1:50 del mismo extracto generó halos considerablemente más pequeños con los dos biosensores. Cabe mencionar que los resultados obtenidos a partir de este extracto constituyen un control positivo y aval de la metodología empleada en la extracción de la molécula señal del medio de

cultivo. Un extracto obtenido de 600 ml de medio de cultivo líquido sin inocular y concentrado 5000 veces, no activó la formación de halos de coloración por parte de la cepa CV026 como tampoco de VIR07, sugiriendo que dicho medio de cultivo no contiene moléculas con actividad inductora de estas cepas biosensoras (Figura 24 A y 24 B).

En vista de estos resultados se analizó la presencia de señales de AHL en extractos de cultivos líquidos y en sobrenadante de *biofilm* (formados en placa multipocillo) de 84 aislados de *B. contaminans*. Los extractos se obtuvieron a partir de 3 ml de medio de cultivo y se concentraron 30 veces. Dichos extractos fueron aplicados directamente en un volumen de 10 μ l sobre la superficie de los medios agarizados. Los resultados de actividad QS se resumen en la Tabla A.

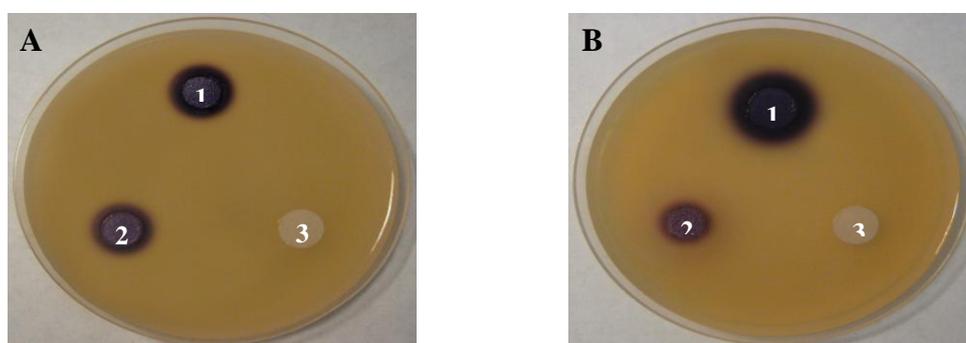


Figura 24. Ensayo de detección de AHLs por difusión empleando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos fueron aplicados a discos de papel colocados sobre medio LB semi-sólido inoculado con las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). La formación de halos de color violeta es indicador de la presencia de AHLs en los extractos. **1**: 1 μ l de extracto de *B. cepacia* 25416, concentrado 250 veces; **2**: concentrado 50 veces; **3**: 50 μ l de extracto de 600 ml de medio de cultivo sin inocular, concentrado 5000 veces.

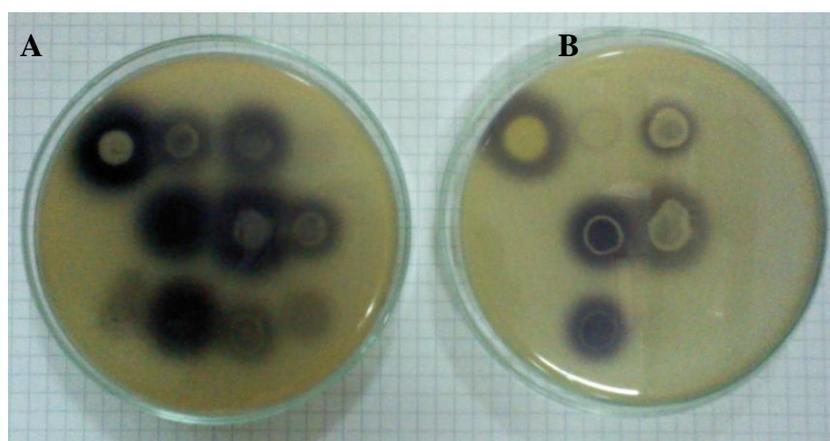


Figura 25. Detección de moléculas de AHLs a partir de extractos de sobrenadante de desarrollo en *biofilm* de 12 aislados clínicos de *B. contaminans* empleando las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y VIR07. Extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos y *biofilm* fueron aplicados directamente sobre medio LB semi-sólido inoculado con las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). La formación de halos de color violeta es indicador de la presencia de AHLs en los extractos de *B. contaminans*.

En la Figura 26, se observa el % de aislados positivos para la presencia de señales de QS (AHLs) según el origen del aislado. Al considerar solo los grupos de aislados denominados FQ-Crónicos y FQ-Iniciales, se observó una disminución en la expresión de señales de QS en los aislados FQ-Crónicos; mediante Chi-cuadrado de Pearson se verificó que esta diferencia era significativa ($p < 0,05$).

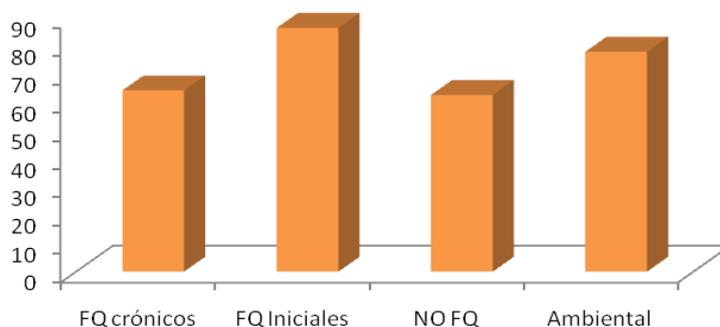


Figura 26. Detección de moléculas de QS en 84 aislados de *B. contaminans* agrupados según origen de la muestra. Los valores corresponden al porcentaje en cada clase. En la categoría “FQ-crónicos” la disminución de expresión de señales de QS sólo fue significativamente menor a la obtenida para la categoría “FQ-Iniciales” ($p < 0.05$).

3.7. Identificación química de moléculas derivadas de acil-homoserín lactonas (AHL)

3.7.1. Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier

Extractos de cultivos plañtónicos de fase estacionaria de un aislado clínico de *B. contaminans* seleccionado al azar, en el que previamente se detectó por cepas biosensoras producción de AHL, fue analizados mediante espectroscopía FT-IR con el fin de avanzar en la caracterización química del tipo de molécula señal sintetizada. Asimismo, extractos de cultivos líquidos de cepas productoras de AHLs fueron analizados en paralelo mediante la misma metodología. A partir de espectros IR adquiridos en el intervalo 4000 a 650 cm^{-1} , se calcularon las derivadas segundas con el fin de aumentar la resolución de las bandas de absorción. Dichas derivadas fueron utilizadas para la identificación de picos correspondientes a la absorción de grupos funcionales presentes en las moléculas derivadas de AHLs, ubicados en rangos específicos del espectro IR (Tabla 3, sección Materiales y métodos). En estos rangos no se sitúan otros grupos funcionales pertenecientes a moléculas biológicas solubles en solventes no polares. La Figura 27 muestra el espectro IR de un extracto concentrado correspondiente a un cultivo planctónico en fase estacionaria de *B. contaminans* y la derivada segunda del espectro IR. A su vez, en la Figura 28 se presenta específicamente ampliada la región 1820 - 1620 cm^{-1} de dicha derivada segunda del espectro IR. En esta región se identificaron picos de absorción,

1790 cm^{-1} el cual se adjudica al grupo carbonilo del anillo lactona de las acil-HSLs y de las 3-oxo-alcanoil-HSLs (12)(67). Asimismo, se detectaron picos a 1715 y 1710 cm^{-1} correspondientes al grupo carbonilo (cetona) y en 1650 cm^{-1} el grupo carbonilo de la amida.

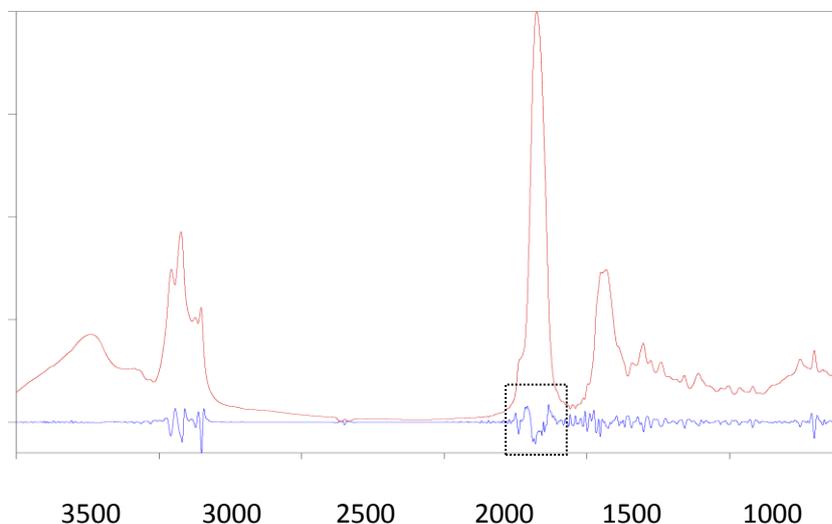


Figura 27. Espectro IR y su derivada segunda, correspondientes a un extracto de sobrenadante de cultivo de *B. contaminans* FQ7887. Espectro IR en el rango 3500-650 cm^{-1} (en rojo) y derivada segunda x -1 del espectro IR (azul).

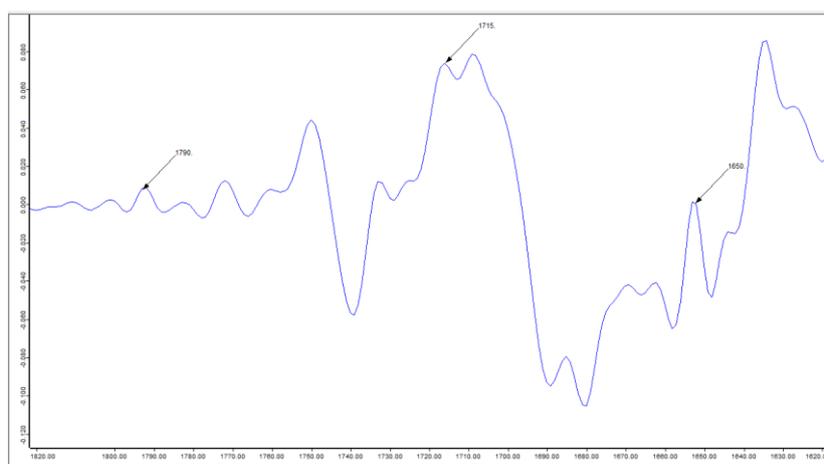


Figura 28. Región 1820-1620 cm^{-1} de la derivada segunda x (-1) del espectro IR de *B. contaminans* FQ 7887. Se indican los picos a 1790, 1715 y 1650 cm^{-1} , los cuales son característicos de la estructura 3-oxo-octanoil-HSLs (12).

3.7.2. Identificación mediante HPLC MS/MS-MRM

Con el fin utilizar una metodología de mayor precisión para identificar químicamente acil-homoserín lactonas sintetizadas por *B. contaminans*, extractos de sobrenadantes de cultivo en *biofilm* de estos organismos fueron analizados mediante HPLC MS/MS-MRM (Cromatografía Líquida-Espectroscopía de Masa en Tándem con Monitoreo de Reacción

Múltiple). Como se detalló previamente, el proceso de separación se realizó mediante elución por gradiente. La identificación de las AHLs, se realizó a través de las transiciones M+H del ión 102 correspondiente al anillo lactona. A los fines de la identificación primero se analizaron estándares de AHLs y luego los extractos de cultivos líquidos pertenecientes a cepas productoras de AHLs. Los análisis fueron llevados a cabo bajo las condiciones experimentales indicadas en la sección de Métodos, con el objeto de registrar los picos de las transiciones de masa de dichas moléculas y sus respectivos tiempos de retención.

En la Figura 29 se muestra el cromatograma superpuesto de los correspondientes estándares C_4 -HSL, C_6 -HSL, 3-oxo- C_8 -HSL, C_9 -HSL, C_7 -HSL, C_8 -HSL, 3-oxo- C_{10} -HSL y C_{10} -HSL. Estas moléculas fueron inyectadas en una concentración de 1 ppm y su análisis se realizó seleccionando sus respectivos valores de relación masa/carga (m/z). En la Tabla 5 se describen los valores m/z y los tiempos de retención concernientes a los estándares de AHLs examinados mediante HPLC MS/MS-MRM. Los tiempos de retención fueron utilizados posteriormente para la identificación de moléculas de AHLs a partir del análisis de los distintos extractos de cultivos pertenecientes a las cepas de *B. contaminans* productoras de AHLs.

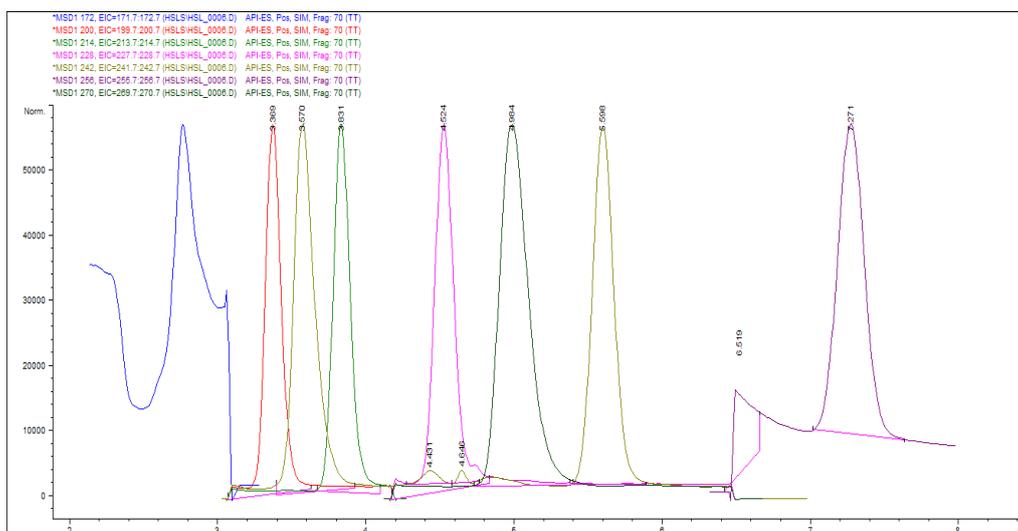


Figura 29. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM obtenidos a partir de estándares de AHLs. Estándares de AHLs en una concentración de 1 ppm fueron analizados por medio de HPLC MS/MS-MRM, registrando sus respectivos tiempos de retención. El estudio se realizó a través de la selección de los valores de m/z correspondientes a cada estándar. **1:** C_4 -HSL (172 m/z); **2:** C_6 -HSL (200 m/z); **3:** 3-oxo- C_8 -HSL y **7:** C_9 -HSL (242 m/z); **4:** C_7 -HSL (214 m/z); **5:** C_8 -HSL (228 m/z); **6:** 3-oxo- C_{10} -HSL (270 m/z), **8:** C_{10} -HSL (256 m/z).

Tabla 6. Tiempos de retención de estándares de AHLs analizados por HPLC MS/MS-MRM

Estándar de AHL	Relación Masa/Carga (m/z)	Tiempo de Retención (minutos)
C ₄ -HSL	172	2,80
C ₆ -HSL	200	3,36
C ₇ -HSL	214	3,83
C ₈ -HSL	228	4,52
C ₉ -HSL	242	5,58
C ₁₀ -HSL	256	7,27
3-oxo-C ₈ -HSL	242	3,57
3-oxo-C ₁₀ -HSL	270	4,98

Los estándares de AHLs se inyectaron en una concentración de 1 ppm y su análisis cromatográfico fue realizado mediante la selección de sus respectivos valores de masa/carga (*m/z*). C₄-HSL: Butanoil-homoserín lactona; C₆-HSL: Hexanoil-homoserín lactona; C₇-HSL: Heptanoil-homoserín lactona; C₈-HSL: Octanoil-homoserín lactona; C₉-HSL: Nonoil-homoserín lactona; C₁₀-HSL: Decanoil-homoserín lactona; 3-oxo-C₈-HSL: 3-oxo-octanoil-homoserín lactona; 3-oxo-C₁₀-HSL: 3-oxo-decanoil-homoserín lactona.

Empleando la misma metodología se analizó un extracto de sobrenadante de cultivo de la cepa de referencia *B. cepacia* ATCC 25416 identificando, por medio de los cromatogramas obtenidos, las moléculas C₄-HSL, C₆-HSL, C₈-HSL, C₉-HSL y C₁₀-HSL (Figura 30). Es importante destacar que la molécula C₈-HSL fue detectada con una abundancia de 140 Megacuentas en comparación con C₄-HSL, C₆-HSL, C₉-HSL y C₁₀-HSL, que exhibieron una intensidad de 400 Kcuentas, 1,5 Mcuentas, 1 Mcuentas y 5 Mcuentas, respectivamente. Asimismo, en este extracto se consiguió detectar trazas de 3-oxo-C₈-HSL pero no de 3-oxo-C₁₀-HSL. Los resultados obtenidos indican que la cepa *B. cepacia* ATCC 25416 no solo produce C₆-HSL y C₈-HSL, tal como fue reportado previamente, sino que además se comprobó que es capaz de sintetizar otras AHLs en baja concentración (Lewenza, *et al.*, 1999) (Gotschlich, *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los extractos pertenecientes a cepas de referencia productoras de AHLs, aplicando HPLC MS/MS-MRM, permitieron corroborar la capacidad que presenta esta metodología para la detección e identificación de distintas AHLs en extractos de cultivos, a pesar de que la concentración de dichas moléculas sea baja.

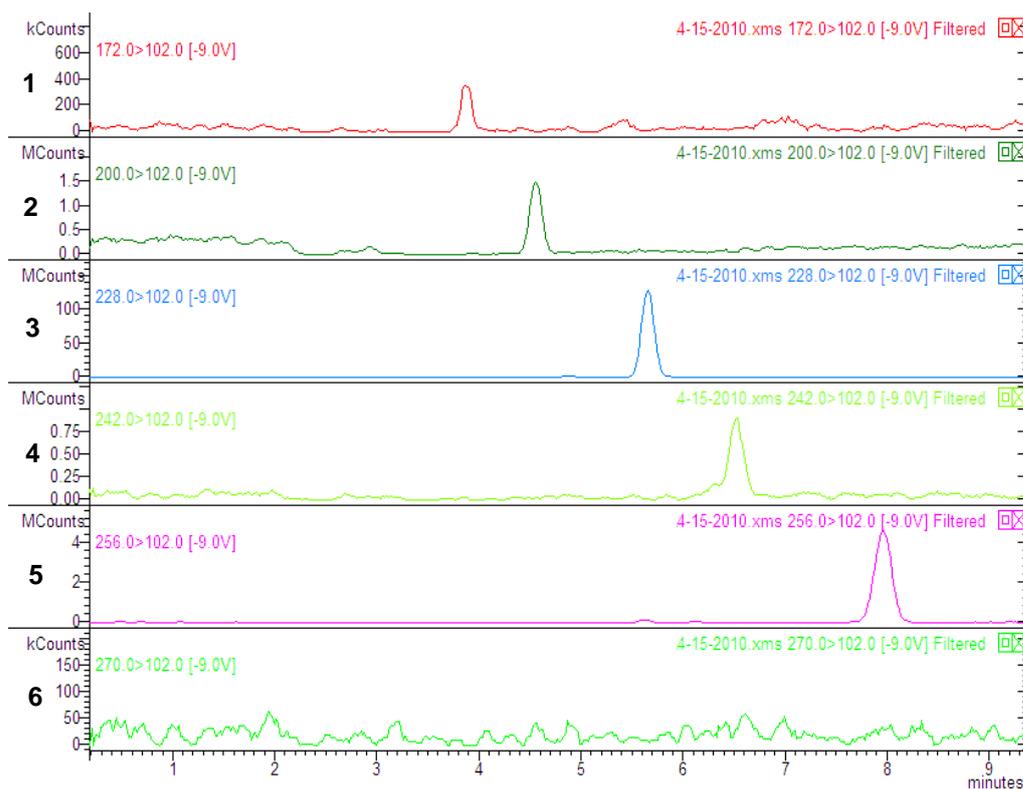


Figura 30. Cromatogramas HPLC MS/MS-MRM de un extracto de *B. cepacia* ATCC 25416. Un extracto concentrado obtenido de un cultivo líquido de la cepa *B. cepacia* ATCC 25416 fue examinado mediante HPLC MS/MS-MRM, seleccionando determinados valores de m/z correspondientes a distintas AHLs. 1: 172 m/z ; 2: 200 m/z ; 3: 228 m/z ; 4: 242 m/z ; 5: 256 m/z ; 6: 270 m/z .

En la Figura 31 se exponen los cromatogramas representativos obtenidos a partir del estudio de un extracto concentrado de cultivo plantónico de *B. contaminans*, con esta metodología 15 cepas fueron analizadas. Este análisis se realizó al igual que los anteriores, seleccionando determinados valores de m/z correspondientes a distintas moléculas AHLs. Los picos cromatográficos y tiempos de retención fueron comparados con los conseguidos a partir de los estándares y extractos obtenidos de cepas productoras de AHLs de *B. contaminans*. De esta manera se logró detectar en la mayoría de las cepas analizadas la presencia de un pico de alta intensidad con tiempo de retención 4,52 (min) correspondiente a la presencia de C₈-HSL (Figura 31). Por otro lado se logró detectar en el extracto de algunos aislados la presencia de un segundo pico aunque de menor intensidad, con un tiempo de retención de 7,37 minutos, al realizar la selección a 256 m/z . Estos resultados sugieren que al menos uno de los extracto de cultivo de *B. contaminans* adicionalmente produce C₁₀-HSL. Interesantemente en algunas cepas se logró detectar la presencia de 2 picos con tiempos de retención de 4,43 y 4,84 minutos, al realizar la selección a 242 m/z . Si bien esta señal podría corresponder a moléculas señal tipo 3-oxo-C₈-HSL, los tiempos no son coincidentes (Figura 32). Estos resultados sugieren

que en el extracto de cultivo de la cepa *B. contaminans* podrían estar presentes moléculas estructuralmente semejantes a derivados de AHL.

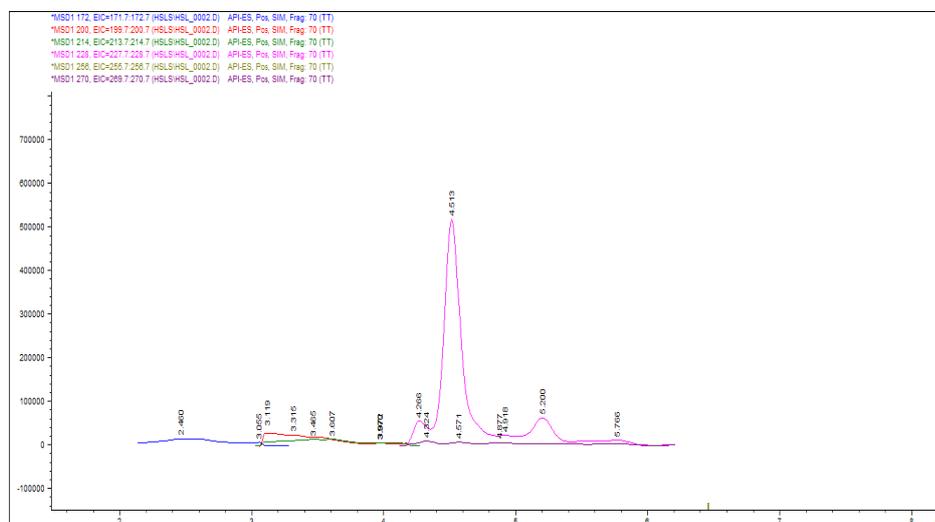


Figura 31. Cromatograma HPLC-MS de extracto de *B. contaminans*. Se observa un pico importante con tR 4.52 min., en modo SIM de 228 (m/z), que se corresponde a la molécula C₈-HSL.

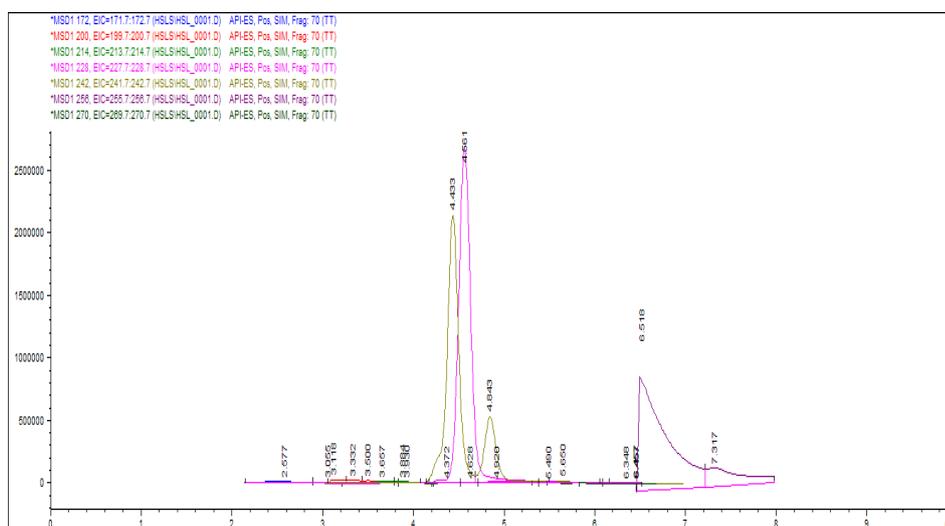


Figura 32. Cromatograma HPLC-MS de extracto de *B. contaminans*. Se observa un pico importante en modo SIM de 228 (m/z) con tiempo de retención que se corresponde a la molécula C₈-HSL (fucsia). Los picos en marrón, corresponden modo SIM 242 (m/z) para observar moléculas C₁₀-HSL, pero los tiempos de retención no son coincidentes para HSLs.

Para confirmar la presencia de moléculas C₈-HSL en el extracto de la cepa *B. contaminans*, se realizó seguidamente el mismo extracto de cultivo un espectro de masa, que se observa en la figura 33.

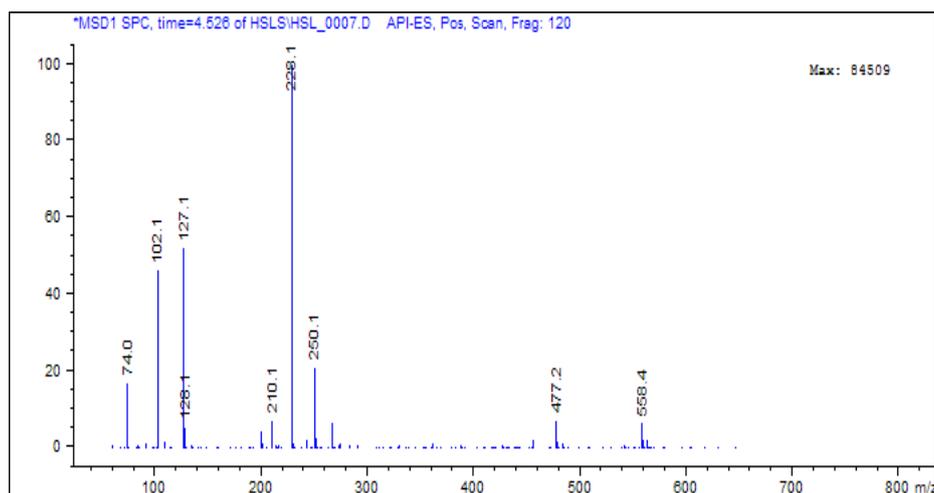


Figura 33. Espectro de masas característico del ion molecular 228 (M+H) de la molécula C₈-HSL, en modo SCAM. También se observa M+Na 250 y los fragmentos característicos 127 y 102.

3.8. Análisis estructural del *biofilm* formado por *B. contaminans*

A efectos de avanzar en el conocimiento estructural de *biofilms* formados por aislados clínicos de *B. contaminans* se decidió estudiar mediante microscopía láser confocal la arquitectura de los *biofilms* formados por dos aislados recuperados de muestras de esputo de un mismo paciente fibroquístico, en dos momentos de su vida. El aislado inicial, HST 64 recuperado en el año 2005 y el aislado HST 187 recuperado en el año 2008, cuando se consideró que la infección era crónica. Mediante microscopía de escaneo laser confocal (CLSM) diferenciamos estructuralmente el *biofilm* formado por cada aislado luego de crecer en una cámara de flujo continuo por 48 horas. Las imágenes tomadas con el microscopio fueron procesadas usando el programa IMARIS. Se obtuvo una reconstrucción 3D de la arquitectura del *biofilm*. La cepa HST 64 creció distribuida discretamente sobre toda la superficie y estableció un *biofilm* relativamente homogéneo con pequeños canales y con una altura máxima de 17 a 19 micrómetros (Figura 34). La cepa HST 187 (aislado crónico), mostró una estructura de mayor complejidad, pudiéndose observar canales de circulación de fluidos más definidos. La estructura del *biofilm* alcanzó en este caso alturas de 24 a 29 micras.

En la Figura 35 se muestran los *biofilms* formados por otros dos aislados clínicos de *B. contaminans* recuperados de una paciente colonizada por un período de 4 años. La cepa FQ 7887 creció distribuida uniformemente sobre toda la superficie, constituyó un *biofilm* homogéneo con aparentes microcanales de circulación y alcanzó una altura máxima de 25 a 28 micrómetros. La cepa HSM 001 (aislado crónico), mostró una estructura más robusta y densa. Aunque este *biofilm* alcanzó un tamaño superior entre 30 y 39 micras la ausencia aparente de

canales de circulación denotarían una estructura de menor complejidad al compararlo con los otros *biofilms* analizados.

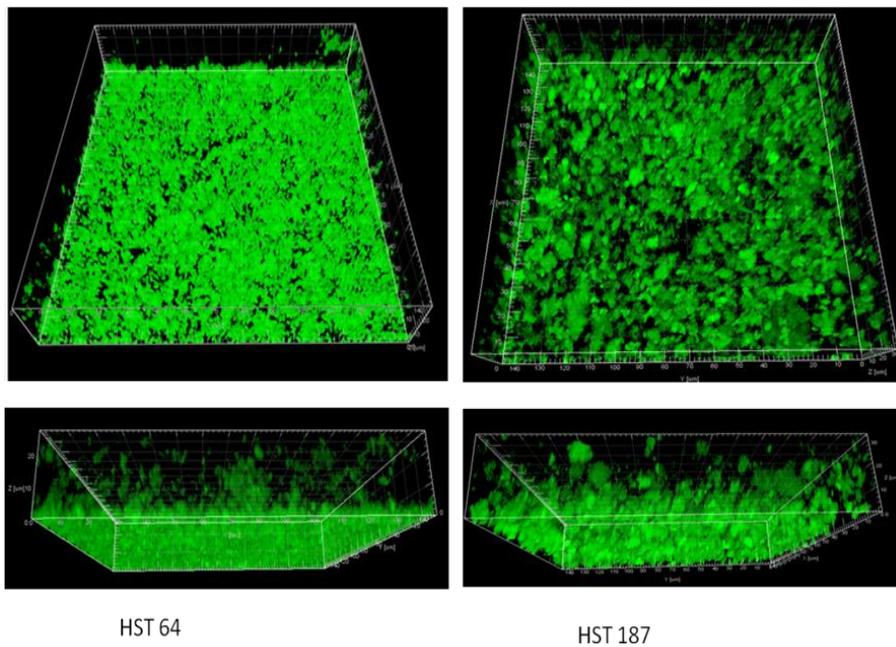


Figura 34. Microfografías de escaneo láser confocal de biofilm de 48 h formado por aislados de *B. contaminans*. Reconstrucción 3D, cepa *B. contaminans* HST 64 (FQ Inicial) (izquierda) y HST 167 (FQ-crónico) (derecha).

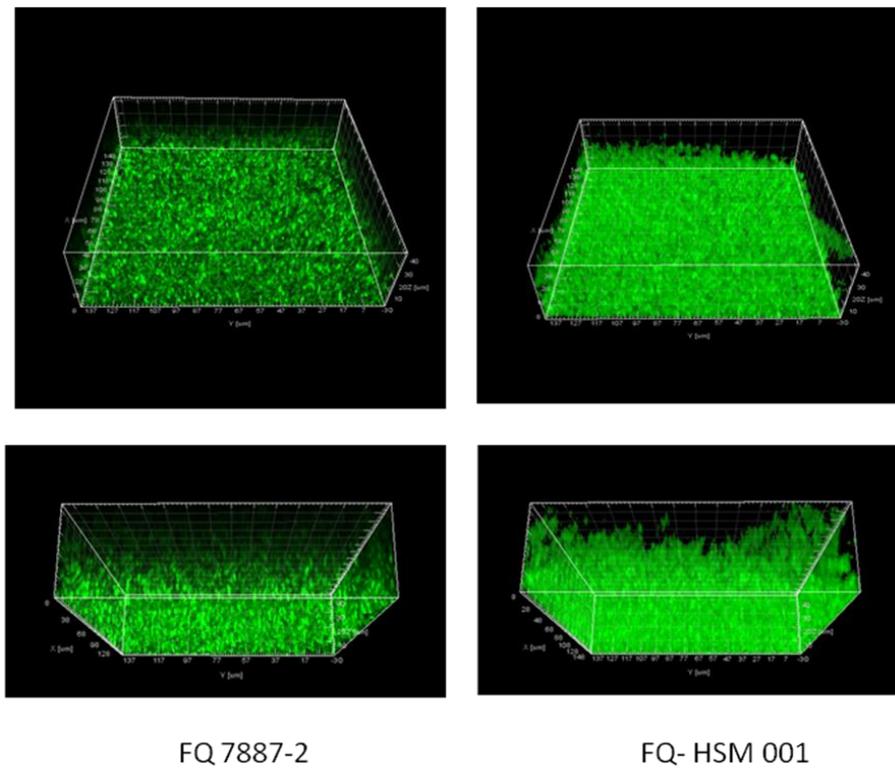


Figura 35. Microfografías de escaneo láser confocal de biofilm de 48 h formado por aislados de *B. contaminans*. Reconstrucción 3D, cepa *B. contaminans* FQ 7887-2 (FQ Inicial) (izquierda) y FQ HSM 001 (FQ-crónico) (derecha).

DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una de las principales bacterias que colonizan pulmones de pacientes con fibrosis quística. Por este motivo ha sido uno de los patógenos más estudiados. Las investigaciones se han centrado en los posibles mecanismos de patogenicidad desplegados por este organismo para sobrevivir en su hospedador. En general, los pacientes son inicialmente infectados con cepas fenotípicamente no mucoides que durante el curso de la infección pasan a ser crónicas donde adquieren un "fenotipo mucoide". El tipo mucoide responde a la formación de un polisacárido tipo alginato, viscoso. Aislamientos de *P. aeruginosa* mucoides a partir de las secreciones del tracto respiratorio en infecciones FQ, es tan común que se ha descrito como una observación patognomónica que ha sido asociada a una mayor morbilidad y mortalidad (34). El fenotipo mucoide no ha sido ampliamente descrito en las bacterias del cBc. Unos pocos informes recientes han sugerido que esto puede ser debido a una subestimación, ya que este morfotipo no es fácilmente detectado en el crecimiento en medios de rutina (21). Se reportó que bacterias del cBc pueden producir al menos cuatro diferentes EPS, de los cuales la caracterización de la estructura química y composición de los mismos mostró que se componen de glucosa, manosa, ramnosa, galactosa y ácido glucurónico (9)(10)(11). Aunque no se requieren para la iniciación de la formación de *biofilm*, se demostró que los EPS tienen un rol importante en el establecimiento de los mismos (21). Cultivos en medio líquido han demostrado que el EPS se produce tras la entrada en fase estacionaria. Los EPS de bacterias de la cBc parecen afectar los resultados de la experimentación en modelos animales de infección y en *B. cenocepacia* el fenotipo mucoide puede persistir más tiempo que sus variantes no mucoides (13).

Los datos presentados aquí demuestran por primera vez que *B. contaminans* puede expresar el fenotipo mucoide cuando se cultiva en agar YEM. El 37.8 % de los aislados considerados crónicos expresó el fenotipo mucoide, en contraste con el 77% de los aislados que colonizan transitoriamente pacientes FQ o aun no se han convertido en "crónicos". En cuanto a los aislamientos ambientales más del 80% expresó EPS. Sin embargo es curioso que, aunque con un número bajo, solo el 50% de los aislados recuperados de infecciones de pacientes No-FQ produzca EPS. Dado que los reportes en *B. cenocepacia* muestran que las variantes mucoides persisten más tiempo en los modelos de ratón e interactúan más pobremente con los componentes de los sistemas inmunes innatos que sus variantes no mucoides (13), es posible que el fenotipo mucoide dote a las bacterias de las herramientas necesarias para su persistencia durante la infección crónica en el paciente FQ. Esta idea es coherente con la observación de que *P. aeruginosa* se convierte en mucoide en el curso de la

infección crónica. El papel del EPS en la persistencia de los aislados mucoides de *B. contaminans*, se podría asociar con la capacidad del EPS de secuestrar especies reactivas de oxígeno, componentes clave del sistema de defensa del huésped pulmonar, y su interferencia en la quimiotaxis de neutrófilos como lo han sugerido en *B. cenocepacia* (7). Sin un análisis químico no se puede especificar la composición de los EPS producidos por cada uno de los aislados en un estudio. Sin embargo, estudios demostraron que el polisacárido más común entre los producidos por bacterias del cBc, es el denominado cepacian, aunque *B. multivorans* produjo otro polisacárido, PSI (37). Curiosamente en el caso de *B. cenocepacia*, una de las especies más virulentas dentro del cBc, Zlosnik y colaboradores informaron una alta frecuencia del fenotipo no mucoide (81). Esta observación plantea que el cambio fenotípico es en este caso de mucoide a no mucoide, lo cual es contrario a la observación de que la conversión de *P. aeruginosa* a un fenotipo mucoide está relacionada con un riesgo aumentado de morbilidad y mortalidad. La conversión mucoide a no mucoide en *B. cenocepacia* plantea la posibilidad de que los aislados no mucoides se asocian con aumento de la gravedad de la enfermedad, mientras que el fenotipo mucoide puede estar asociado con la persistencia. En ese sentido, se encontró que el polisacárido cepacian se requiere para la supervivencia en condiciones de desecación y en la resistencia a los metales tóxicos, destacando su papel en la supervivencia bacteriana en ambientes adversos (29). Por otro lado, resulta interesante el reporte de Silva y colegas en donde estudiaron dos cepas clonales de *B. multivorans* que mostraban diferentes morfotipos aislados de un paciente FQ con infección pulmonar crónica. En estos aislados los perfiles de expresión de la cepa no mucoide reveló disminución de la expresión de genes que codifican para productos relacionados con características asociadas con la virulencia y el metabolismo (68). Probablemente, este mecanismo está presente en *B. contaminans*, y estaría de acuerdo a nuestras observaciones, donde la presencia de fenotipo no mucoide es mayor en aislados crónicos.

La secreción de proteínas es también un mecanismo importante por el cual las bacterias son capaces de liberar al medio ambiente productos capaces de influir en la respuesta del hospedador y que en muchos casos son cruciales para la virulencia y la supervivencia del patógeno. Varios sistemas de transporte han sido implicados en la secreción de factores de virulencia por cepas del cBc. Entre las proteínas secretadas se describen proteasas, hemolisinas, y adhesinas. Sistemas de secreción Tipo I y Tipo II fueron reportados como responsables de la secreción de proteínas con actividad hemolítica en los aislamientos de *B. cenocepacia* (linaje ET12) y *B. vietnamiensis* (27)(78). Se ha reportado que bacterias del cBc son capaces de sintetizar numerosos productos extracelulares, pero curiosamente en la mayoría de estos informes el perfil de toxinas extracelulares producidas por las diferentes

especies del cBc no se han determinado. Además, en la mayoría de estos estudios, previo al año 1997, los aislados del cBc todavía eran considerados como parte de una sola especie bacteriana (14)(58). Un trabajo minucioso realizado por D'Allicourt-Carvalho y colaboradores en Brasil describe la secreción de proteasas, hemolisinas y lipasas entre otros factores de virulencia en aislados recuperados de 59 pacientes FQ que fueron colonizados por *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* y *B. ambifaria* (26). La actividad de proteasa se detectó sólo en *B. cenocepacia* y *B. ambifaria*. Este resultado está en concordancia con los hallazgos de Gotschlich y colegas (32) que informó de la actividad proteasa extracelular de *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. stabilis*, mientras que la actividad proteasa extracelular no se detectó en *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* y aislados de *B. dolosa*. Gingues y colaboradores (31) detectaron el gen *zmpA* de una metaloproteasa en los aislados de *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. ambifaria* y *B. pyrrocinia*. Sin embargo este gen estaba ausente en *B. multivorans*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa* y *B. anthina*. Corbett y asociados (16) demostraron que una metaloproteasa producida por *B. cenocepacia*, originalmente designado PSCP (*Pseudomonas cepacia* proteasa) contribuyó a la virulencia en el modelo de infección pulmonar (70). Sugirieron que PSCP directamente puede degradar tejido del huésped, lo que permite a los organismos poder replicar en el pulmón, alterando la respuesta inmune del hospedador por degradación de inmunoglobulina u otras proteínas que participan en la respuesta inflamatoria. Esto puede conducir a la disminución de la capacidad de los animales para desactivar las bacterias. Por lo tanto, la capacidad de *B. cenocepacia* para producir proteasas puede contribuir a la persistencia y al daño del pulmón en pacientes con FQ.

A nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se ha informa sobre diferentes características de proteínas secretadas por aislados clínicos de *B. contaminans*. En nuestro estudio, aislados locales de *B. contaminans* demostraron ser hemolíticos en el 43.2 % del total de los aislados analizados, al considerar los aislados definidos como crónicos este grupo experimentó una disminución significativa de la expresión de esta propiedad en contraposición a aislados iniciales de pacientes FQ y No-FQ. Sin embargo, en los aislados ambientales esta propiedad presentó una expresión similar al de los aislados crónicos, a pesar que la mayoría de ellos no han sido tipificados a nivel de cepa; parecerían ser diferente de las cepas que colonizan pacientes FQ. Esto probablemente significa, que es una característica necesaria al inicio de una infección/colonización. Nuestros datos difieren de los reportados por otros autores, que encontraron que la mayoría de los aislamientos (ambientales y clínicos) que pertenecen a *B. ambifaria* fueron hemolíticos y que el porcentaje de cepas hemolíticas del medio ambiente de *B. cenocepacia* fue notablemente más alto que el porcentaje de aislados clínicos (4). En contraste, D'Allicourt-Carvalho y colegas, observaron que sólo el 55% de

aislados clínicos de *B. vietnamiensis* fueron hemolíticos, mientras que *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, y *B. ambifaria* fueron negativos (26).

En relación a la expresión de enzimas proteolíticas, nuestros datos indican que el 32,9% del total de aislados de *B. contaminans* expresan este tipo de exoenzimas. Al considerar los aislados definidos como crónicos, este grupo experimentó una disminución significativa de la expresión de esta propiedad en contraposición a aislados tempranos o iniciales de pacientes FQ, sin embargo no se detectaron diferencias entre aislados No-FQ y ambientales. En contraste D'Allicourt-Carvalho en un trabajo publicado en 2007 reportan que exoproteasas fueron producidas por 97,5% de aislados de *B. cenocepacia* y por 75% de aislados de *B. ambifaria*, mientras que todos los aislados de *B. multivorans* y *B. vietnamiensis* fueron negativos para este exoenzima (26). Estas diferencias muestran posiblemente que estas bacterias deben poseer diferentes estrategias para la colonización de su hospedador.

Las lipasas fueron producidas por la mayoría de los aislamientos de *B. contaminans*, sin embargo, el nivel de actividad de la lipasa producida varía considerablemente entre los mismos. Únicamente observamos disminución significativa en la actividad lipasa sobre el sustrato Tween 20 al comparar los aislados crónicos vs los aislados iniciales de pacientes FQ. El papel fisiológico de las lipasas extracelulares producidas por bacterias es probablemente nutricional, las bacterias son propensas a hidrolizar los triglicéridos exógenos para proporcionar ácidos grasos libres para ser utilizados como fuente de energía. Estudios llevados a cabo por Lonon y colegas (47), han demostrado que una lipasa purificada producida por una cepa cBc (especie no identificada) no fue citotóxica para las células HeLa o a ratones, incluso después de la inyección intravenosa. En contraste, Mullen y colegas reportaron que en 2 líneas celulares de epitelio pre-tratadas con lipasas de cepas de *B. multivorans* y *B. cenocepacia* aumentaron significativamente la invasión celular (57). Por otro lado se ha informado que las lipasas reducen la actividad fagocítica de macrófagos en el pulmón de rata, permitiendo la evasión del sistema inmune, lo que sugiere que esta exoenzimas puede jugar un papel importante en la persistencia de cBc en los pulmones de pacientes con FQ (71).

La presencia de un pigmento amarillo-verdoso ha sido una característica de identificación de *B. cepacia*, pero que se encuentra más frecuentemente en cepas de origen vegetal y el suelo, lo que confirma otros informes que las cepas clínicas no son generalmente pigmentada (30). Nosotros observamos en la colección de *B. contaminans* que el 63,5% expresaban un pigmento amarillo-verdoso, 1,3% pigmento rojo y las restantes no evidenciaron pigmentación en el medio MH. Interesante al respecto es el reciente reporte de Porter y colega quienes observaron que un mutante de *B. cenocepacia* en la producción de pigmentos similar a la melanina son más sensibles al ataque oxidativo en el fagosoma de neutrofilos (61).

Sin embargo no todas las cepas de cBc aisladas de pacientes FQ producen este pigmento, lo que sugiere que otros mecanismos de resistencia deben existir.

La asociación de los *biofilms* bacterianos con enfermedad en el hospedador humano ha atraído más atención al estudio del desarrollo microbiano en comunidad. Los *biofilms* bacterianos han sido estudiados desde hace décadas, pero el reconocimiento de su importancia en las infecciones oportunistas ha llegado más recientemente, a partir del interés en el estudio de las infecciones pulmonares en pacientes FQ. Informes recientes demuestran la capacidad de *P. aeruginosa* para formar *biofilms* en pacientes FQ y la importancia de la producción de señales tipo *quórum sensing* en la regulación de la expresión génica en el proceso de formación de estas estructuras (22)(62).

Una característica importante de las especies del cBc es su capacidad de formar *biofilm*, considerado actualmente como una forma de virulencia microbiana. Los *biofilms* son conjuntos estructuralmente complejos de células, incluidos en una matriz exopolimérica en las que las bacterias viven en un estilo de vida propio, protegidas de las agresiones ambientales, generalmente resistentes a los efectos letales de los agentes antimicrobianos y las defensas del sistema inmune del hospedador (8). Hasta el presente trabajo no había sido reportada la capacidad de *B. contaminans* de adherirse y formar *biofilms* en modelos abióticos. Aunque con un número limitado de observaciones, en nuestros resultados no encontramos diferencias robustas en la capacidad de formar *biofilm* entre los aislados crónicos y aislados tempranos o iniciales recuperados de un mismo paciente. La visualización tridimensional directa de la estructura de los *biofilms* durante el desarrollo y maduración es por hoy el *gold standard* del análisis estructural del *biofilm*. Sin embargo, la mayoría de los *biofilms* fuera del laboratorio existen en comunidades multicelulares, a menudo con similares características morfológicas, que pueden hacer que la separación en especies individuales y sus efectos sobre la estructura y característica de la *biofilm* sean insuficientemente comprendidas. En la fibrosis quística, *P. aeruginosa* y organismos del complejo *B. cepacia* están implicados en co-infecciones del pulmón, que pueden repercutir en la patogenicidad microbiana en general en esta enfermedad (74)(73). En ese sentido es destacable el aporte del grupo de Cowan y colegas en el desarrollo del sistema de doble proteína fluorescente para el análisis no destructivo de las comunidades microbianas mediante microscopía confocal. Esa técnica podría ser particularmente beneficiosa para las investigaciones de *biofilm* formados por múltiples especies donde la arquitectura tridimensional es de gran interés (20) y con la cual a futuro pensamos trabajar en *biofilms* mixtos.

Se ha demostrado que el sistema CepIR del complejo *B. cepacia* desempeña un papel importante en la formación de *biofilm* (41). Además se ha reportado que la síntesis de

moléculas derivadas del grupo acil-Homoserin-Lactona (AHL) está muy extendida entre los miembros del cBc (32)(49). Nosotros evaluamos la expresión de moléculas de AHL dentro de una colección local de aislamientos clínicos y ambientales de *B. contaminans*. A tales efectos empleamos cepas biosensoras, espectroscopía FT-IR y HPLC MS/MS. El uso combinado de estas tecnologías nos permitió identificar la presencia de C₈-HSL. Conway y colegas, reportaron que C₈-HSL es la molécula señal más común dentro del cBc, mientras que especies como *B. multivorans*, *B. cenocepacia* y *B. vietnamiensis* pueden sintetizar adicionalmente C₆-HSL, C₄-HSL y C₁₀-HSL respectivamente (15). Posiblemente debido al número reducido de aislados analizados y/o a la metodología empleada, no nos fue posible detectar la expresión de otro tipo de AHL. Sin embargo, no se evaluó aún si esto se debía a una deficiencia genética. Es sabido además que señales ambientales específicas pueden modificar la expresión en los niveles de AHL. Las condiciones de crecimiento utilizadas aquí tal vez no han permitido que este nivel adicional de regulación sea manifestado en esos aislados; como es el caso de *Vibrio fischeri* y *P. aeruginosa*, que poseen un control jerárquico de regulación para producción de AHL (25)(46)(1), lo que también podría ser el caso de los organismos del complejo *B. cepacia*. Alternativamente, como lo señaló Lessie y colegas, las diferencias observadas en la síntesis de HSL puede ser el resultado de reordenamientos genéticos, ya que se sabe que los organismos del cBc tienen genomas complejos que contienen cromosomas múltiples y secuencias de inserción (45).

Estudiar la habilidad de estas bacterias de crecer sobre soportes, investigar si las mismas son capaces de producir señales de *quórum sensing*, identificar las mismas en caso positivo y caracterizar la arquitectura de los *biofilms* formados por organismos aislados de infecciones iniciales y crónicas representa iniciar un camino de trabajo con el objetivo final de desarrollar nuevas estrategias para controlar y prevenir este tipo de estructuras en el caso de que las mismas sean producidas. En esa dirección están siendo ejecutadas nuestras nuevas investigaciones.

CONCLUSIONES

1. Los aislamientos clínicos de *B. contaminans* pueden secretar exoenzimas (proteasas, lipasas y hemolisina) y expresar EPS bajo las condiciones ensayadas en este trabajo. Existe una disminución en la expresión de estos factores de virulencia en aislados recuperados de infecciones crónicas.
2. *B. contaminans* es capaz de adherirse y crecer sobre superficies abióticas formando *biofilms*. La capacidad de formación de *biofilms* de los aislamientos obtenidos de infecciones crónicas no presentó diferencias significativas respecto a la capacidad de formación de biofilm evaluada para aislamientos iniciales, no FQ o ambientales. Sin embargo la estructura tridimensional de los *biofilms* formado por aislamientos recuperados de infecciones crónicas fue diferente a la hallada para aislamientos iniciales.
3. Los organismos pertenecientes a la especie *B. contaminans* son capaces de expresar moléculas de *quórum sensing* en las condiciones ensayadas. La proporción de organismos productores de dichas señales es menor en los aislamientos recuperados de infecciones crónicas respecto a los aislamientos de primeras infecciones.
4. El uso de técnicas físico-químicas (espectroscopia FT-IR Y HPLC-MS) permitió confirmar que *B. contaminans* produce al menos un tipo de molécula HSL: C₈-HSL.

Anexo

Tabla A. Características fenotípicas de aislados de *B. contaminans*.

Nº	Origen	Cepa	Crónico	QS	Biofilm CV	β-hemol.	Proteólisis	EPS	Pigmento
1	FQ	CBC 1	+	+	0,044	-	-	-	
2	FQ	CBC 2	+	+	1,243	-	-	-	
3	FQ	CBC 3	+	-	0,047	-	-	-	
4	FQ	CBC 4	+	-	0,163	-	-	-	
5	FQ	CBC 5 FQB 032	+	-	0,718	-	+	-	Amarillo-verdoso
6	FQ	CBC 6	+	+	0,157	++	+	+	
7	FQ	CBC 7	+	+	0,26	-	-	-	Amarillo-verdoso
8	FQ	CBC 8 NF229	+		0,106	+	-	+	
9	FQ	CBC 9	+	+	0,198	+	++++	++	
10	FQ	CBC 10	+	-	0,13	-		-	
11	FQ	CBC 11	+	+	0,126	+	++	+	
12	FQ	CBC 12	+	+	0,3	-	-	-	
13	FQ	CBC 13	+	+	0,275	+	-	++	
14	FQ	CBC 14 FQ9042	+	+	0,37	+		+	
15	FQ	CBC 15	+	+	0,713	+		-	
16	FQ	CBC 16	+	+	0,179	+	+	+	
17	FQ	CBC 17	+	+	0,125	++	++	-	
18	FQ	CBC 18	+	-	0,154	-	-	-	Amarillo-verdoso
19	FQ	CBC 19	+		0,334	-	-	-	
20	FQ	CBC 20 FQ539	+	+	0,627	-	-	-	Amarillo-verdoso
21	FQ	CBC 21	+	-	0,744	-	-	-	Amarillo-verdoso
22	FQ	CBC 22	+		0,953	-	-	-	Amarillo-verdoso
23	FQ	CBC 23	+	+	0,958	-	-	-	
24	FQ	CBC 24	+		0,961	-	-	-	Amarillo-verdoso
25	FQ	CBC 25	+	-	1,219	-	-	-	marrón
26	FQ	CBC 26	+	+	1,443	-	-	-	
27	FQ	CBC 27	+			-	-	-	
28	FQ	CBC 28	+			-	-	-	
29	FQ	CBC 29	+			-	-	-	
30	FQ	CBC 30	+			-	-	-	
31	FQ	CBC 31	+			+	-	-	Amarillo-verdoso
32	FQ	CBC 32	+	-	0,517	-	+	-	
33	FQ	CBC 33	+			-	+	-	Amarillo-verdoso
34	FQ	CBC 34	+			-	+	-	Amarillo-verdoso
35	FQ	CBC 35	+	-	0,396	+	+	-	
36	FQ	CBC 36	+	-	0,11	-	-	+	Amarillo-verdoso
37	FQ	CBC 37	+	-	0,525	-	-	+	
38	FQ	CBC 38	+		0,572	-	-	+	
39	FQ	CBC 39	+	+	0,591	-	-	+	Amarillo-verdoso
40	FQ	CBC 40	+		0,82	-	-	+	
41	FQ	CBC 41	+	-	0,867	-	-	+	

42	FQ	CBC 42	+			-	-	+	Amarillo-verdoso
43	FQ	CBC 43	+			-	-	+	Amarillo-verdoso
44	FQ	CBC 44	+			-	-	+	Amarillo-verdoso
45	FQ	CBC 45	+			-	-	+	Amarillo-verdoso
46	FQ	CBC 46	+			-	-	+	Amarillo-verdoso
47	FQ	CBC 47	+			-	-	+	Amarillo-verdoso
48	FQ	CBC 48	+			-	-	+	
49	FQ	CBC 49	+			-	-	+	
50	FQ	CBC 50	+	+		-	-	+	
51	FQ	CBC 51	+			-	-	+	
52	FQ	CBC 52	+			-	-	+	
53	FQ	CBC 53	+			-	-	+	
54	FQ	CBC 54	+			-	-	+	
55	FQ	CBC 55	+	+	0,375	+	-	+	Amarillo-verdoso
56	FQ	CBC 56	+	-	0,381	+	-	+	Amarillo-verdoso
57	FQ	CBC 57	+	+	0,406	+	-	+	Amarillo-verdoso
58	FQ	CBC 58	+	+	0,472	+	-	+	Amarillo-verdoso
59	FQ	CBC 59	+	+	0,807	+	-	+	
60	FQ	CBC 60	+	-	1,185	+	-	+	Amarillo-verdoso
61	FQ	CBC 61	+	+	1,63	+	-	+	Amarillo-verdoso
62	FQ	CBC 62	+			+	-	+	Amarillo-verdoso
63	FQ	CBC 63	+			+	-	+	Amarillo-verdoso
64	FQ	CBC 64	+			+	-	+	Amarillo-verdoso
65	FQ	CBC 65	+			+	-	+	Amarillo-verdoso
66	FQ	CBC 66	+	+	0,2	-	+	+	
67	FQ	CBC 67	+		1,562	-	+	+	Amarillo-verdoso
68	FQ	CBC 68	+			-	+	+	Amarillo-verdoso
69	FQ	CBC 69	+			-	+	+	Amarillo-verdoso
70	FQ	CBC 70	+			-	+	+	Amarillo-verdoso
71	FQ	CBC 71	+			-	+	+	
72	FQ	CBC 72	+			-	+	+	
73	FQ	CBC 73 HST187	+	+	0,305	+	+	+	Amarillo-verdoso
74	FQ	CBC 74	+	+	1,467	-	++	+	
75	FQ	CBC 75	+		0,234				
76	FQ	CBC 76	+		1,24				
77	FQ	CBC 77		+	1,333	-	+	+	Amarillo-verdoso
78	FQ	CBC 78			0,056	-	-	-	
79	FQ	CBC 79 HST64		+	0,823	-	+	+	Amarillo-verdoso
80	FQ	CBC 80			0,014	+	+	+	
81	FQ	CBC 81			0,887	+	+	-	
82	FQ	CBC 82		+	0,248	-	++++	+	
83	FQ	CBC 83			0,04	+	-	+	
84	FQ	CBC 84		+	0,675	-	++++	-	
85	FQ	CBC 85		+	0,469	++	-	+	
86	FQ	CBC 86		+	0,078	+	-	+	Amarillo-verdoso
87	FQ	CBC 87		+	0,214	-	-	-	

88	FQ	CBC 88	+	0,63	++	-	+	
89	FQ	CBC 89 HST32		0,115	++	+	+	
90	FQ	CBC 90		0,181	+	+		ND
91	FQ	CBC 91	+	0,214	+	+	-	
92	FQ	CBC 92	+	0,138	+	-	+	
93	FQ	CBC 93	+	0,143	+	++	++	
94	FQ	CBC 94	+	0,149	+	+	+	
95	FQ	CBC 95		0,169	-	-	-	
96	FQ	CBC 96	+	0,456	+		+	
97	FQ	CBC 97	+	0,424	+	+	-	Amarillo-verdoso
98	FQ	CBC 98	+	0,228	+	+	+	
99	FQ	CBC 99	-	0,069	-	-	-	
100	FQ	CBC 100		0,239	-	-	+	
101	FQ	CBC 101		1,114	+	-	+	
102	FQ	CBC 102		0,237	+	-	+	
103	FQ	CBC 103		0,033	+	-	+	
104	FQ	CBC 104	+	0,154	+	+	+	
105	FQ	CBC 105			-	-	-	
106	FQ	CBC 106			-	-	-	
107	FQ	CBC 107	-	1,139	+	+	-	Amarillo-verdoso
108	FQ	CBC 108	+	2,59	+	+	-	Amarillo-verdoso
109	FQ	CBC 109	+	0,413	-	-	+	Amarillo-verdoso
110	FQ	CBC 110	-	0,908	-	-	+	Amarillo-verdoso
111	FQ	CBC 111	+	1	-	-	+	Amarillo-verdoso
112	FQ	CBC 112			-	-	+	
113	FQ	CBC 113			-	-	+	
114	FQ	CBC 114			-	-	+	
115	FQ	CBC 115			-	-	+	Amarillo-verdoso
116	FQ	CBC 116	+	0,229	+	-	+	Amarillo-verdoso
117	FQ	CBC 117	+	0,497	+	-	+	Amarillo-verdoso
118	FQ	CBC 118	+	0,535	+	-	+	Amarillo-verdoso
119	FQ	CBC 119	+	0,565	+	-	+	Amarillo-verdoso
120	FQ	CBC 120	1,13					
121	FQ	CBC 121			+	-	+	Amarillo-verdoso
122	FQ	CBC 122			+	-	+	Amarillo-verdoso
123	FQ	CBC 123			+	-	+	Amarillo-verdoso
124	FQ	CBC 124 FQB 916	-	1,851	-	+	+	
125	FQ	CBC 125	+		-	+	+	
126	FQ	CBC 126			-	+	+	
127	FQ	CBC 127			-	+	+	
128	FQ	CBC 128 FQ 7887	+	0,758	+	+	+	
129	FQ	CBC 129			+	+	+	
130	FQ	CBC 130			+	+	+	
131	FQ	CBC 131		3,14				
132	FQ	CBC 132						
133	Amb	CBC 133	+	0,269	-	-	+	

134	Amb	CBC 134	-	1,034	-	+	-	
135	Amb	CBC 135	+	1,042	+		+	
136	Amb	CBC 136	+	0,379	+	+	++	
137	Amb	CBC 137	+	0,063	+	+	+++	
138	Amb	CBC 138	+	0,221	+	+	++	
139	Amb	CBC 139	+	0,012	+	+	++	
140	Amb	CBC 140	+	0,414	+		+	
141	Amb	CBC 141	+	0,346	+	+	+	
142	Amb	CBC 142		0,084	+	+	-	
143	Amb	CBC 143	-	0,307				
144	Amb	CBC 144	+	0,411	-	-	+	Amarillo-verdoso
145	Amb	CBC 145	+	1,545	-	-	+	Amarillo-verdoso
146	Amb	CBC 146		1,557	-	-	+	
147	Amb	CBC 147		2,003	-	+	+	Amarillo-verdoso
148	Amb	CBC 148						
149	Amb	CBC 149			+	-	+	Amarillo-verdoso
150	Amb	CBC 150			-	-	-	Bordo
151	Amb	CBC 151			-	-	+	Amarillo-verdoso
152	Amb	CBC 152			-	-	+	
153	Amb	CBC 153			-	-	+	
154	Amb	CBC 154			-	-	+	
155	Amb	CBC 155			-	-	-	
156	No-FQ	CBC 156	+	0,26	+	-	-	
157	No-FQ	CBC 157	-	0,297	-	-	-	
158	No-FQ	CBC 158	-	0,403	-	-	-	
159	No-FQ	CBC 159	+	0,204	+	+	+++	
160	No-FQ	CBC 160		0,035	++	-	+	
161	No-FQ	CBC 161			-	-	-	
162	No-FQ	CBC 162	+	0,538	-	+	+	
163	No-FQ	CBC 163			-	+	+	
164	No-FQ	CBC 164	+	3,508	-	+	-	Amarillo-verdoso
165	No-FQ	CBC 165	+	0,613	-	-	+	Amarillo-verdoso
166	No-FQ	CBC 166			+	-	-	
167	No-FQ	CBC 167			+	-	-	
168	No-FQ	CBC 168 BC30	-	0,82	+	-	+	Amarillo-verdoso
169	No-FQ	CBC 169			+	-	+	

Tabla B. Actividad Lipolítica de aislados de *B. contaminans*.

Nº	Origen	Cepa	Lip 20	SD	Lip 40	SD	Lip 80	SD
1	FQ-Crónico	CBC 001	2,8	0,6	29,3	0,5	0,7	0,4
2	FQ-Crónico	CBC 002	3,8	0,1	9,1	5,8	0,9	0,3
3	FQ-Crónico	CBC 003	4,4	0,2	5,3	5,3	1,3	0,2
4	FQ-Crónico	CBC 004	6,5	0,4	ND	ND	0	0
5	FQ-Crónico	CBC 005	7,5	0,3	16,8	2	0	0
6	FQ-Crónico	CBC 006	24	3,2	60,3	3	26,5	1,8
7	FQ-Crónico	CBC 007	37,1	4	26	2	11,4	0,9
8	FQ-Crónico	CBC 008	45,6	0,9	54,4	8,7	7,8	4,7
9	FQ-Crónico	CBC 009	53,5	0	ND	ND	46,3	1,7
10	FQ-Crónico	CBC 010	60	3,4	84,7	2,9	68,7	2,7
11	FQ-Crónico	CBC 011	82,9	4	52,8	2,5	67	2,2
12	FQ-Crónico	CBC 012	95,3	1,2	35,4	4,8	27,9	4,2
13	FQ-Crónico	CBC 013	96,3	2,9	87	7,3	109,8	3,8
14	FQ-Crónico	CBC 014	99,1	0,8	137,9	1	97,1	13,3
15	FQ-Crónico	CBC 015	107,9	2,7	151,5	0,7	113,7	10,4
16	FQ-Crónico	CBC 016	115,8	0,7	54,8	1,4	34,3	1,5
17	FQ-1er Aisl.	CBC 077	0	2,4	53,1	5	1,3	0,8
18	FQ-1er Aisl.	CBC 078	7	1,9			0	2,1
19	FQ-1er Aisl.	CBC 079	13,1	2,8	103,2	4,1	0	6,8
20	FQ-1er Aisl.	CBC 080	26,8	8,4			0	0,7
21	FQ-1er Aisl.	CBC 081	28,3	4,5			9,4	3
22	FQ-1er Aisl.	CBC 082	36,1	3	ND	ND	18,9	0,3
23	FQ-1er Aisl.	CBC 083	37,5	6,5	125,4	3,3	12,3	2,8
24	FQ-1er Aisl.	CBC 084	39,6	1,6	ND	ND	17,1	1,1
25	FQ-1er Aisl.	CBC 085	50	0,4			44,1	1,4
26	FQ-1er Aisl.	CBC 086	50,5	3,6	30,7	1,7	16,1	1,6
27	FQ-1er Aisl.	CBC 087	66,2	4,1	22,5	0,9	37,7	1,2
28	FQ-1er Aisl.	CBC 088	71,4	5,1	79	5,8	0,5	0,4
29	FQ-1er Aisl.	CBC 089	76,1	36	68,6	16,5	18,8	1
30	FQ-1er Aisl.	CBC 090	80,4	0,3	44,1	0,9	61,8	0,8
31	FQ-1er Aisl.	CBC 091	84	0,3	80,7	0,3	104,3	2,5
32	FQ-1er Aisl.	CBC 092	87,5	1,4	103,8	1,4	100,1	3,7
33	FQ-1er Aisl.	CBC 093	87,8	2	84,6	2	101,7	0,7
34	FQ-1er Aisl.	CBC 094	90,6	0,9	87,3	0,9	104,6	0,8
35	FQ-1er Aisl.	CBC 095	92	0,6	5,7	3,5	0	1,8
36	FQ-1er Aisl.	CBC 096	94,4	3,1	138,8	5,4	105,1	3,5
37	FQ-1er Aisl.	CBC 097	96,9	0,9	93,6	0,9	113,4	3,6
38	FQ-1er Aisl.	CBC 098	103,8	1,1	84,8	0,9	89,7	2
39	FQ-1er Aisl.	CBC 099	125,5	5,3	5,5	2,9	0	4,7
40	FQ-1er Aisl.	CBC 100	159,9	70,5	97,4	1,7	70,9	4,5
41	FQ-1er Aisl.	CBC 101	168,9	0,6	55,9	0	33,6	0,2

42	FQ-1er Aisl.	CBC 102	192,6	2,5	41,4	2,7	31,6	3
43	FQ-1er Aisl.	CBC 103	220,1	0,8	72,3	6,5	36,4	2,2
44	FQ-1er Aisl.	CBC 104	249,4	7,9	102,2	4,5	64,3	4,6
45	Amb	CBC 133	4,2	8,3			0	2
46	Amb	CBC 134	28,9	4,5	ND	ND	1,9	1,9
47	Amb	CBC 135	76,3	11,8	150,4	2,4	125,1	3,3
48	Amb	CBC 136	83,9	1,4	80,6	1,4	111,9	5,1
49	Amb	CBC 137	87,7	0,6	ND	ND	79,1	1
50	Amb	CBC 138	99,9	0,6	67,7	0,7	87,4	0,5
51	Amb	CBC 139	100,5	6,2			59,3	1,7
52	Amb	CBC 140	105,1	0,6	162,5	2,4	108,6	1,5
53	Amb	CBC 141	105,9	2,9	84,2	1,4	55	2,6
54	Amb	CBC 142	118,2	0,3			81,1	0,2
55	No-FQ	CBC 156	3,5	3,7	1	0,9	18	0,1
56	No-FQ	CBC 157	11,6	13	26	4,7	14,8	4,3
57	No-FQ	CBC 158	36,2	3,5	22,5	4,6	5,9	1,5
58	No-FQ	CBC 159	76,7	4,2	103	0,6	93,6	1,8
59	No-FQ	CBC 160	165,4	3	46,4	0,5	27,2	0,4

SD: desviación estándar. Lip20, Lip40 y Lip80 corresponden a la actividad sobre los sustratos Tween 20, 40 y 80 respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Albus a M, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH.** 1997. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **179**:3928–35.
2. **Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J, Mahenthalingam E.** 2004. The *Burkholderia cepacia* Epidemic Strain Marker Is Part of a Novel Genomic Island Encoding Both Virulence and Metabolism-Associated Genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Society* **72**:1537–1547.
3. **Behrends V, Ryall B, Zlosnik JE a, Speert DP, Bundy JG, Williams HD.** 2012. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environmental microbiology*.
4. **Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Chiarini L, Belli ML, Piana S, Materazzo A, Vandamme P, Manno G.** 2002. *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria from Clinical and Environmental Sources in Italy: Genomovar Status and Distribution of Traits Related to Virulence and Transmissibility **40**:846–851.
5. **Bridier a, Dubois-Brissonnet F, Greub G, Thomas V, Briandet R.** 2011. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms . *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**:2648–54.
6. **Burke V, Robinson J, Richardson C, Bundiel C.** 1991. Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathology* **1**:45–8.
7. **Bylund J, Burgess L-A, Cescutti P, Ernst RK, Speert DP.** 2006. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* **281**:2526–32.
8. **Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M.** 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **26**:213–6.
9. **Cescutti P.** 2003. Exopolysaccharides produced by a clinical strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. *Carbohydrate Research* **338**:2687–2695.
10. **Cescutti P, Bosco M, Picotti F, Impallomeni G, Leitão JH, Richau J a, Sá-Correia I.** 2000. Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Biochemical and biophysical research communications* **273**:1088–94.
11. **Cescutti P, Foschiatti M, Furlanis L, Lagatolla C, Rizzo R.** 2010. Isolation and characterisation of the biological repeating unit of cepacian, the exopolysaccharide produced by bacteria of the *Burkholderia cepacia* complex. *Carbohydrate research* **345**:1455–60.
12. **Chhabra SR, Harty C, Hooi DSW, Daykin M, Williams P, Telford G, Pritchard DI, Bycroft BW.** 2003. Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *Journal of medicinal chemistry* **46**:97–104.
13. **Chung JW, Altman E, Beveridge TJ, Speert DP.** 2003. Colonial Morphology of *Burkholderia cepacia* Complex Genomovar III : Implications in Exopolysaccharide Production , Pilus Expression , and Persistence in the Mouse. *Infection and immunity* **71**:904–909.
14. **Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, Lipuma JJ.** 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:3427–3436.
15. **Conway BA, Venu V, Speert DP.** 2002. Biofilm formation and *Burkholderia*, acyl homoserine lactone production in the cepacia complex. *J. Bacteriol.* **184**:5678–5685.
16. **Corbett CR.** 2003. An extracellular zinc metalloprotease gene of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* **149**:2263–2271.
17. **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-scott HM.** 1995. Microbial biofilms . *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711–45.
18. **Coutinho CP, De Carvalho CCCR, Madeira A, Pinto-de-Oliveira A, Sá-Correia I.** 2011. *Burkholderia cenocepacia* phenotypic clonal variation during a 3.5-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Infection and immunity* **79**:2950–60.
19. **Coutinho CP, Dos Santos SC, Madeira A, Mira NP, Moreira AS, Sá-Correia I.** 2011. Long-Term Colonization of the Cystic Fibrosis Lung by *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria: Epidemiology, Clonal Variation, and Genome-Wide Expression Alterations. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **1**:12.

20. **Cowan SE, Gilbert E, Khlebnikov a, Keasling JD.** 2000. Dual labeling with green fluorescent proteins for confocal microscopy. *Applied and environmental microbiology* **66**:413–8.
21. **Cunha V, Sousa SA, Leita JH, Moreira LM, Videira PA, Sa I.** 2004. 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 **42**:3052–3058.
22. **Davies JC, Rubin BK.** 2007. Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **28**:312–321.
23. **Deng Y, Boon C, Eberl L, Zhang L-H.** 2009. Differential modulation of Burkholderia cenocepacia virulence and energy metabolism by the quorum-sensing signal BDSF and its synthase. *Journal of bacteriology* **191**:7270–8.
24. **Doring G, Parameswaran IG, Murphy TF.** 2011. Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Rev.* **35**:124–146.
25. **Dunlap P V, Greenberg EP.** 1988. Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit. *Journal of bacteriology* **170**:4040–6.
26. **D'Allicourt Carvalho AP, Carvalho Ventura GM, Borges Pereira C, Souza Leão R, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MCM, Merquior VLC, Albano RM, Marques EA.** 2007. Burkholderia cenocepacia, B. multivorans, B. ambifaria and B. vietnamiensis isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production 311–318.
27. **Fehlner-Gardiner, C.C. Hopkins TM, Valvano M.** 2002. Identification of a general secretory pathway in a human isolate of Burkholderia vietnamiensis (formerly B. cepacia complex genomovar V) that is required for the secretion of hemolysin and phospholipase C activities. *Microb. Pathog.* **32**:249–254.
28. **Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM.** 2010. Mucoidity, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS one* **5**:1–12.
29. **Ferreira AS, Leitão JH, Silva IN, Pinheiro PF, Sousa S a, Ramos CG, Moreira LM.** 2010. Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical Burkholderia strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Applied and environmental microbiology* **76**:441–50.
30. **Gilligan PH.** 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* **4**:35–51.
31. **Gingues S, Kooi C, Visser MB, Subsin B, Sokol PA.** 2005. Distribution and Expression of the ZmpA Metalloprotease in the Burkholderia cepacia Complex **187**:8247–8255.
32. **Gotschlich A, Huber B, Geisenberger O, Tögl A, Steidle A, Riedel K, Hill P, Tümmler B, Vandamme P, Middleton B, Camara M, Williams P, Hardman A, Eberl L.** 2001. Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the Burkholderia cepacia complex. *Syst Appl Microbiol.* **1**:1–14.
33. **Gould TA, Herman J, Krank J, Murphy RC, Churchill MEA.** 2006. Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Synthases Examined by Mass Spectrometry **188**:773–783.
34. **Govan JR, Deretic V.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia. *Microbiological reviews* **60**:539–74.
35. **Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley S a.** 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews* **24**:29–70.
36. **Henry D a, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP.** 1997. Identification of Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *Journal of clinical microbiology* **35**:614–9.
37. **Herasimenka Y, Cescutti P, Impallomeni G, Campana S, Taccetti G, Ravenni N, Zanetti F, Rizzo R.** 2007. Exopolysaccharides produced by clinical strains belonging to the Burkholderia cepacia complex. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **6**:145–52.
38. **Heydorn a, Ersbøll BK, Hentzer M, Parsek MR, Givskov M, Molin S.** 2000. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 1)**:2409–15.
39. **Heydorn a, Nielsen a T, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 1)**:2395–407.

40. **Hoiby N, Frederiksen B, Pressler T.** 2005. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros* **4**:49–54.
41. **Huber B.** 2002. Genetic analysis of functions involved in the Cepacia, late stages of biofilm development in *Burkholderia H111*. *Mol. Microbiol.* **46**:411–426.
42. **Karunakaran E, Mukherjee J, Ramalingam B, Biggs C a.** 2011. “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied microbiology and biotechnology* **90**:1869–81.
43. **Kiska D, Gilligan PH.** 2003. *Manual of clinical microbiology* 8th ed. Washington, DC.
44. **Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN.** 2004. Regulatory Bacteria, circuits and communication in Gram-negative. *Nature Rev. Microbiol.* **2**:581–592.
45. **Lessie TG, Hendrickson W, Manning BD, Devereux R.** 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS microbiology letters* **144**:117–28.
46. **Lippia EDE, Miller A, Quimiotipo NEB, Su LY, Con A, Componentes SUS.** 2007. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA Y ANTI-ASPERGILLUS DE ACEITES. *Scientia* **243–246**.
47. **Lonon MK, Woods DE, Straus DC.** 1988. Production of lipase by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of clinical microbiology* **26**:979–84.
48. **Luján AM, Moyano AJ, Segura I, Argaraña CE, Smania AM.** 2007. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain. *Microbiology (Reading, England)* **153**:225–37.
49. **Lutter E, Lewenza S, Dennis JJ, Visser MB.** 2001. Distribution of Quorum-Sensing Genes in the *Burkholderia cepacia* Complex **69**:4661–4666.
50. **Maharjan RP, Seeto S, Ferenci T.** 2007. Divergence and redundancy of transport and metabolic rate-yield strategies in a single *Escherichia coli* population. *Journal of bacteriology* **189**:2350–8.
51. **Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P.** 2002. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol* **51**:533–8.
52. **Malone JG, Jaeger T, Spangler C, Ritz D, Spang A, Arrieumerlou C, Kaeffer V, Landmann R, Jenal U.** 2010. YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **6**:e1000804.
53. **Martina P, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, Vay C, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O, Lagares A, Bosch A.** 2013. Genetic Diversity of *Burkholderia* contaminans Isolates from Cystic Fibrosis Patients in Argentina. *Journal of clinical microbiology* **51**:339–44.
54. **Mcclean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, John H, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P.** 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones.
55. **Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A.** 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *Journal of bacteriology* **190**:7910–7.
56. **Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T.** 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS microbiology letters* **279**:124–30.
57. **Mullen T, Markey K, Murphy P, McClean S, Callaghan M.** 2007. Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology **26**:869–77.
58. **Nakazawa T, Yamada Y, Ishibashi M.** 1987. Characterization of hemolysin in extracellular products of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of clinical microbiology* **25**:195–8.
59. **Naumann D.** 2000. Infrared Spectroscopy in Microbiology **102–131**.
60. **O’Toole GO, Kaplan HB, Kolter R.** 2000. BIOFILM FORMATION AS MICROBIAL DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Microbiol.* **49–79**.
61. **Porter L a, Goldberg JB.** 2011. Influence of Neutrophil Defects on *Burkholderia cepacia* Complex Pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **1:9**.
62. **Pradeep KS, Amy LS, Matthew RP, Thomas OM, Welsh MJ, Greenberg EP.** 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**:762–764.
63. **Rainey PB, Travisano M.** 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**:69–72.

64. **Ramírez Gama RM, Luna Millán B.** 1996. Manual de prácticas de Microbiología General. Laboratorio de Microbiología experimental. Facultad de Química. UNAM., México.
65. **Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Høiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L.** 2001. N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms 3249–3262.
66. **Sage A, Linker A, Evans LR, Lessie TG.** 1990. Hexose phosphate metabolism and exopolysaccharide formation in *Pseudomonas cepacia*. *Curr. Microbiol.* **20**:191–198.
67. **Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Rinehart KL, Farrand SK.** 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:6036–41.
68. **Silva IN, Ferreira AS, Becker JD, Zlosnik JE a, Speert DP, He J, Mil-Homens D, Moreira LM.** 2011. Mucoid morphotype variation of *Burkholderia multivorans* during chronic cystic fibrosis lung infection is correlated with changes in metabolism, motility, biofilm formation and virulence. *Microbiology (Reading, England)*.
69. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio D a, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson M V.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:8487–92.
70. **Speert D, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthalingam E.** 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis.* **8**:181–7.
71. **Straus D, Lonon M, Hutson J.** 1992. Inhibition of rat alveolar macrophage phagocytic function by a *Pseudomonas cepacia* lipase. *J Med Microbiol* **37**:335–40.
72. **Tirunarayanan MO, Lundbeck H.** 1968. Investigations on the enzymes and toxins of staphylococci. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 263–276.
73. **Tomlin KL, Coll OP, Ceri H.** 2001. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia Cepacia*. *J. Microbiol.* **47**:949–954.
74. **Tomlin KL, Clark SRD, Ceri H.** 2004. Green and red fluorescent protein vectors for use in biofilm studies of the intrinsically resistant *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of microbiological methods* **57**:95–106.
75. **Uehlinger S, Schwager S, Bernier SP, Riedel K, Nguyen DT, Sokol P a, Eberl L.** 2009. Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infection and immunity* **77**:4102–10.
76. **Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G, Aguilar C.** 2004. Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Research in microbiology* **155**:238–244.
77. **Watnick P.** 2000. MINIREVIEW Biofilm , *City of Microbes* **182**:2675–2679.
78. **Whitby PW, VanWagoner TM, Taylor A a, Seale TW, Morton DJ, LiPuma JJ, Stull TL.** 2006. Identification of an RTX determinant of *Burkholderia cenocepacia* J2315 by subtractive hybridization. *Journal of medical microbiology* **55**:11–21.
79. **Xu KD, McFeters G a, Stewart PS.** 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 3)**:547–9.
80. **Yang L, Rau MH, Yang L, Hoiby N, Molin S, Jelsbak L.** 2011. Bacterial adaptation during chronic infection revealed by independent component analysis of transcriptomic data. *BMC Microbiology* **11**:184.
81. **Zlosnik JE a, Hird TJ, Fraenkel MC, Moreira LM, Henry D a, Speert DP.** 2008. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of clinical microbiology* **46**:1470–3.

An abstract graphic consisting of three overlapping circles of varying sizes, each with a dark grey center and a lighter grey outer ring. Two thin lines intersect at a point between the top and middle circles, and another line extends from that intersection point down towards the bottom circle. The circles are arranged in a roughly triangular pattern.

Capítulo V

Hipermutación en el complejo

Burkholderia cepacia

INTRODUCCIÓN	208
1.1. HIPERMUTADORES EN INFECCIONES RESPIRATORIAS DE FQ	210
OBJETIVOS	212
MATERIALES Y MÉTODOS	213
2.1. COLECCIÓN DE CEPAS DE COMPLEJO <i>B. CEPACIA</i>	213
2.2. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD A RIFAMPICINA	213
2.3. ENSAYO DE DETECCIÓN DE CEPAS HIPERMUTADORAS	213
2.5. SECUENCIACIÓN DE GENES <i>MUTS</i> Y <i>MUTL</i>	214
2.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA	215
RESULTADOS	216
3.1. ENSAYO DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA	216
3.2. DETECCIÓN DE HIPERMUTADORES	217
3.3. PREVALENCIA CEPAS MUTANTES EN COMPLEJO <i>B. CEPACIA</i>	218
3.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS HIPERMUTADORAS	220
3.5. SUSCEPTIBILIDAD DE CÉLULAS PLANCTÓNICAS DEL CBC FRENTE A ANTIMICROBIANOS	221
DISCUSIÓN	223
CONCLUSIONES	226
ANEXO	227
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	234

INTRODUCCIÓN

La Infección respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa* es la principal causa de morbilidad y mortalidad en fibrosis quística (FQ) (9). El establecimiento de *P. aeruginosa* en la infección crónica está mediada por un complejo proceso adaptativo que incluye cambios fisiológicos producidos por la activación de rutas regulatorias específicas, incluyendo la inducción de la formación de *biofilms* o la expresión diferencial de genes de virulencia (43), y cambios genéticos que conducen a la selección de un número importante de mutaciones adaptativas requeridas para la persistencia a largo plazo (39)(30).

Los pacientes fibroquísticos con infección respiratoria crónica generalmente se infectan con una única cepa de *P. aeruginosa*, que en la mayoría de los casos persiste a lo largo de vida del paciente (38). Sin embargo, una de las características distintivas de tales infecciones es la aparición y el establecimiento de múltiples variantes fenotípicas de esa población clonal (29), proceso conocido como radiación adaptativa (34). Muchos de los fenotipos seleccionados que han sido claramente vinculados a la adaptación al entorno del pulmón, favorecen la persistencia de la infección respiratoria crónica (30). En efecto, una vez que se alcanza la fase de adaptación y la infección crónica está totalmente establecida, su erradicación es casi imposible. De modo que la erradicación de las enfermedades infecciosas se ve amenazada constantemente por microorganismos que desarrollan nuevas estrategias de supervivencia. Durante las últimas décadas, varios experimentos teóricos, fueron realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando que los fenotipos mutantes confieren una ventaja evolutiva en la adaptación bacteriana a nuevos entornos o condiciones estresantes (11).

Los primeros experimentos encaminados a detectar mutadores utilizando cepas de laboratorio mutagenizadas, evidenciaron diferentes estrategias de selección. En 1996 el grupo de LeClerc informó una alta frecuencia de mutación en *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, desafiando la teoría de que los hipermutadores o mutadores eran raros entre las poblaciones bacterianas (17). Tomando en conjunto estos resultados y el de otros investigadores se conjetura que las poblaciones naturales podrían responder a la selección del medio ambiente en dos maneras: i) a través de genes inducibles por estrés, usualmente partes del regulón SOS (hipermutabilidad transiente) y ii) a través de la inactivación de genes involucrados en sistemas de reparación de ADN (hipermutabilidad estable) (21). El estado mutador transitorio o transiente, que implica la reversión o recombinación dentro de los alelos mutantes o la relajación del sistema de reparación de bases mal apareadas (*mismatch-repair system*, MRS), permite que el organismo pueda beneficiarse temporalmente de la elevada frecuencia de

mutación para la adaptación, mientras que reduce el riesgo de acumulación de mutaciones deletéreas.

Hipermutadores (o mutador) son aquellos microorganismos que tienen una mayor tasa de mutación espontánea como resultado de defectos en los sistemas de reparación de bases mal apareadas. Estudios previos sugieren que los eventos mutacionales juegan un papel preponderante en la adaptación de las bacterias y confieren una ventaja selectiva (2)(4). Estas investigaciones demostraron que las células mutadoras, presentes regularmente en poblaciones bacterianas en una tasa del orden de 1×10^{-5} como consecuencia de mutaciones espontáneas en genes de reparación del ADN, pueden ser dramáticamente amplificadas por co-selección (*hitchhiking*) con mutaciones adaptativas, que juegan un papel importante en la evolución de las poblaciones naturales de bacterias, y particularmente en el campo de las enfermedades infecciosas (17)(29). Entre ellos, las infecciones respiratorias crónicas con *Pseudomonas aeruginosa* en la fibrosis quística fue el primer modelo natural para revelar la alta prevalencia y el papel importante de mutadores (29) (figura 1). El desarrollo de resistencia a antimicrobianos y adaptación de las bacterias durante infecciones crónicas están entre los más relevantes rasgos evolutivos vinculados hasta la fecha a hipermutación en esencia (29)(20).

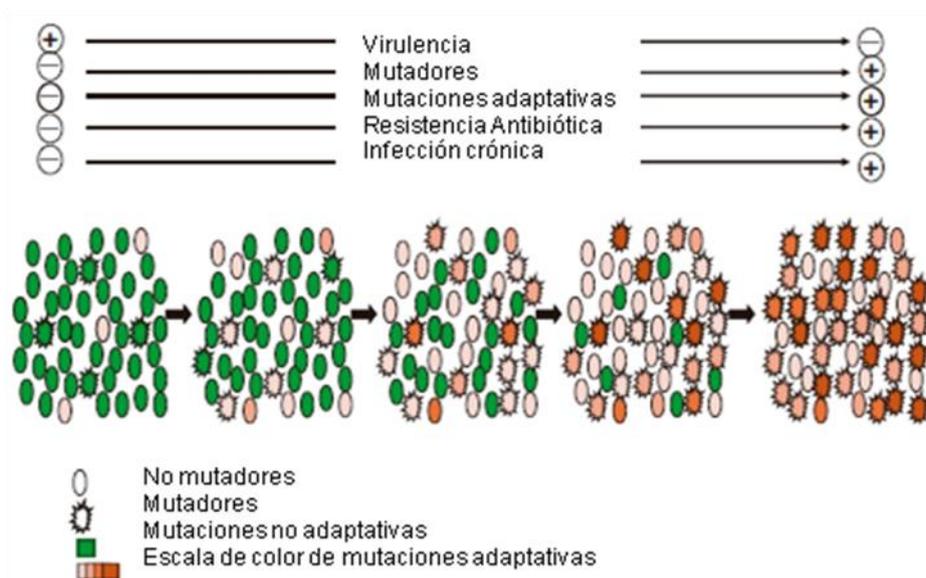


Figura 1. Representación esquemática de la evolución de *P. aeruginosa* durante la infección pulmonar por fibrosis quística crónica y el papel de los mutadores como catalizadores del proceso. Tomado de Oliver y Mena 2010 (28).

El fenotipo mutador es consecuencia de un defecto o varios en los sistemas de reparación de bases mal apareadas y, por esta razón, los genes implicados se conocen en

general como genes antimutadores (21). El sistema MRS detecta y repara errores de replicación incluyendo cualquier tipo de mal emparejamiento o pequeñas deleciones e inserciones. La inactivación de cualquiera de los genes clave implicados (*mutS*, *mutL*, *mutH*, así como *uvrD* o *mutU*) aumenta la tasa de mutación de 100 a 1000 veces y los tipos de mutaciones producidas incluyen transversiones G:C a A:T y A:T a G:C y deleciones o inserciones de 1-4 pb. Otros genes mutadores incluyen *mutM*, *mutY* y *mutT*, que están implicados en el sistema que impide que las mutaciones causadas por estrés oxidativo 8-oxodG (sistema GO). Las mutaciones en *mutM* y *mutY* dan lugar a un fenotipo mutador débil y moderado, respectivamente. Finalmente, otros genes mutadores comprenden los que participan en la prevención del daño oxidativo producidos por las especies reactivas del oxígeno, como los genes *oxyR* y *sodA*, mutador tRNAs (*mutA* y *mutC*) o como *radA* y *pfpl*, caracterizado recientemente en *P. aeruginosa* (21)(28)(35).

1.1. Hipermutadores en infecciones respiratorias de FQ

En los pacientes FQ, la alteración de las secreciones respiratorias determina una predisposición para infección/colonización broncopulmonar crónica, que es el principal motor de la alta morbilidad y mortalidad temprana de los mismos (10). La colonización con *S. aureus* y *H. influenzae* es frecuente en niños menores de 10 años, mientras que *P. aeruginosa*, es el patógeno más relevante en adultos con FQ y es responsable del progresivo deterioro broncopulmonar (18). En un trabajo pionero, Oliver y colaboradores mostraron una prevalencia extremadamente alta (20% de los aislamientos, el 37% de los pacientes) de mutadores de *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ crónicamente colonizados de España (29). Estos números contrastan especialmente con la ausencia de cepas mutadoras en las infecciones nosocomiales agudas de *P. aeruginosa* del mismo estudio, y con los datos existentes en *E. coli* y *Salmonella* de poblaciones naturales, en las cuales la presencia de mutadores era del 1%, considerándose que representa una alta prevalencia (17). Posteriormente, un estudio longitudinal detectó cepas mutantes en el 54% de los pacientes daneses con FQ que fueron crónicamente colonizados por *P. aeruginosa*. Notablemente, la proporción de aislamientos hipermutadores aumentó de 0% en el inicio o colonización temprana a 65% después de 20 años de la colonización crónica (3). Por otra parte, algunos autores (20)(22) reportaron que habían observado una prevalencia entre 5-10% de aislados hipermutadores en infecciones temprana de las vías respiratorias de FQ por *P. aeruginosa*; se atribuyó que esto podría reflejar la prevalencia basal en el medio ambiente de hipermutadores durante la colonización inicial de pacientes con FQ. Apoyo a esta hipótesis podría encontrarse

en un trabajo en donde se observó que el 6% de los aislados provenientes de muestras ambientales eran hipermutadores (15). Estos resultados en conjunto señalan, que la selección positiva de mutadores parece ser una característica común de las infecciones crónicas, y no exclusivamente asociada a infecciones de pacientes FQ, debido a que ha sido documentado una prevalencia muy alta de cepas hipermutadoras en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o bronquiectasias (19), mientras que los datos disponibles al parecer indican una selección negativa de mutadores en infecciones agudas (29)(12). Si bien los reportes no son tan amplios como en *P. aeruginosa*, se ha observado una alta prevalencia de cepas hipermutadoras en aislados de *Staphylococcus aureus* (33), *Streptococcus pneumoniae* (23), *Stenotrophomonas maltophilia* (42) y *Haemophilus influenzae* (36) de pacientes con FQ, lo que demuestra que este fenómeno no se limita únicamente a *P. aeruginosa*.

Dadas las características de las infecciones pulmonares crónicas FQ, los resultados sobre las características genotípicas y fenotípicas de los aislamientos recuperados de infecciones crónicas de los organismos del cBc, y los vastos estudios sobre hipermutabilidad o emergencia de cepas adaptativas en infecciones causadas por *P. aeruginosa*, nuestra hipótesis de trabajo, fue asumir que en infecciones crónicas producidas por complejo *Burkholderia cepacia* existirían cepas hipermutadoras que podrían estar implicada en la adquisición de cambios fenotípicos relacionados a virulencia favoreciendo su persistencia en el pulmón. Teniendo en cuenta el contexto mencionado y el hecho que hasta la fecha no se ha reportado esta propiedad en especies del complejo *Burkholderia cepacia*, nos propusimos evaluar la ocurrencia de cepas hipermutadoras dentro de la colección de aislados de complejo *Burkholderia cepacia* determinando la tasa de mutación empleando la técnica de resistencia a rifampicina y analizar si esta tiene una asociación con resistencia a antimicrobianos.

OBJETIVOS

1. Determinar en la colección de aislados de complejo *Burkholderia cepacia* disponibles la tasa de mutación empleando la técnica de resistencia a rifampicina. Evaluar la ocurrencia de cepas hipermutadoras en para las diferentes especies del cBc.
2. Caracterizar molecularmente los genes del sistema de reparación de bases mal apareadas (*mismatch-repair system*, MRS), principalmente genes *mutS*, y *mutL* en la población de microorganismos seleccionada como hipermutadora.
3. Evaluar una posible asociación entre hipermutación y resistencia antibiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colección de cepas de complejo *B. cepacia*

En esta sección se emplearon 125 aislamientos del cBc de la colección del CINDEFI (Tabla 5 al final del capítulo): 100 aislamientos fueron recuperadas de 50 pacientes FQ, 10 aislamientos provenían de 10 pacientes no-FQ y 15 de muestras ambientales. El 61% de los aislados de esputo de pacientes FQ correspondieron a infecciones crónicas.

2.2. Determinación de sensibilidad a rifampicina

Las concentraciones inhibitorias mínimas de antibióticos de células planctónicas se determinaron según los lineamientos del Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) establecidos en 1999, con algunas modificaciones. Las células bacterianas se resuspenden en medio MH hasta alcanzar una densidad de 0,5 en la escala de McFarland (DO:1 a 600 nm, $1-2 \times 10^8$ células/ml). De esta última suspensión se inoculan 15 μ l en placas de 96 pocillos conteniendo 135 μ l de las respectivas concentraciones de los antibióticos a ensayar (se hacen diluciones seriadas de 1 a 1024 mg/ml). Las placas luego se incuban a 37 °C por 24 horas. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se considera como la mayor dilución a la cual se produce inhibición del desarrollo microbiano (24) (37).

2.3. Ensayo de detección de cepas hipermutadoras

Las cepas hipermutables son reconocidas por su alta frecuencia de mutación. Las tasas de mutación son determinadas por diluciones de la cepa bacteriana ensayada crecida en caldo Luria-Bertani (LB), y plaqueadas en placas de LB agar y LB agar que contiene uno de varios posibles antibióticos: rifampicina (Baquero et al, 2004), spectinomicina, ácido nalidíxico (17), novobiocina (44), el ácido fusídico (26) o fosfomicina (5).

Se realizó la metodología descripta por Oliver y colegas (29) con modificaciones comunicadas personalmente, como se detalla abajo.

A partir de un stock microbiano se inoculó la cepa en medio LB e incubó toda la noche (ON) a 35 °C y 225 rpm. Luego se realizó la dilución del cultivo ON en LB, ajustando a $1 - 2 \times 10^5$ UFC. Seguidamente, se inició un cultivo ON de esta dilución en tubo de ensayo con 3 ml de medio LB (por quintuplicado). Se concentró el cultivo crecido a 0,3 ml mediante centrifugación (2 minutos a 6.000 rpm) y se sembró el mismo en placas con medio LB y LB suplementado. En

placas de LB agar se sembraron 100 μ l de una dilución 1×10^{-7} del cultivo concentrado y en placas de LB agar suplementadas con rifampicina 300 μ g/ml se sembraron 100 μ l del cultivo concentrado. Se incubó a 35 °C durante 24 horas y 36 horas (placas con antibiótico).

2.4. Determinación de Tasa de Mutación

La determinación de las tasas de mutación han sido previamente descripta (6). En *E. coli*, las categorías fenotípicas fueron establecidos por Baquero y colegas (2004) (1), quienes definen cuatro categorías de cepas bacterianas según sus frecuencias de mutación (f) para aislamientos clínicos: hipomutable ($f < 7 \times 10^{-9}$), normomutable ($7 \times 10^{-9} < f < 2 \times 10^{-7}$), mutador débil ($2 \times 10^{-7} < f < 1 \times 10^{-6}$) y mutador fuerte o hipermutador ($f > 1 \times 10^{-6}$). Denamur y colegas (2002) (5) propusieron que una cepa debe ser considerado un mutador cuando las frecuencias de las mutaciones que confieren resistencia a la rifampicina fueron 10-veces más alta que el valor medio de mutagénesis observado para todos las cepas en estudio. En este trabajo se consideró como mutador los aislados que tuvieran 20 veces más alta la tasa de mutación que la determinada para la cepa de referencia no mutadora de *Pseudomonas aeruginosa*-PAO1 ATCC 27253.

Para estimar la tasa de mutación se utilizó el programa informático FT (fluctuation test) de acceso libre (41).

2.5. Secuenciación de genes *mutS* y *mutL*

El ADN genómico de las cepas de complejo *Burkholderia cepacia* se extrajo utilizando un kit de aislamiento de ADN de Qiagen. En cepas de fenotipo salvaje y todas las cepas de fenotipo hipermutador, el gen *mutS* fue secuenciado en busca de mutaciones. Para tal fin se utilizaron los cebadores diseñados y descritos en la Tabla 1. La secuencia fue llevada a cabo en un ABI3700 MacroGen secuenciador automático de ADN. Los análisis de la relación entre la hipermutabilidad y mutaciones observadas en *mutS* y *mutL* incluyeron sólo mutaciones no sinónimas, que se espera para producir una pérdida parcial o completa de la función en los genes por la generación de codones de parada prematuros, por cambios de los marcos de lectura o deleciones / inserciones en la codificación de la secuencia. La secuencia del gen de la cepa *B. cenocepacia* J2315 (<http://www.genbank.com>) se utilizó para comparar y predecir el efecto de mutaciones no sinónimas (*missense*) en la función de la proteína. Se utilizó el software SIFT con parámetros configurado por defecto. Las mutaciones fueron considerados como no tolerada cuando $P < 0,05$ (16).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la secuenciación de genes antimutadores.

Genes		Secuencia
<i>mutS</i>	Fw 1	5'-ATGACCACGCTGTCGCC-3'
	Rv 1	5'-GGTCTGGCCGCGCGTGAC-3'
	Fw 2	5'-GCCAGATCGCCGACGTC-3'
	Rv 2	5'-CGCAGTTCGTACAGCAGGT-3'
	Fw 3	5'-TTACGCGTGCCCGTCGG-3'
<i>mutL</i>	Fw 1	5'-ATGTCCGATATCACCGAAACGG-3
	Fw 2	5'-CGTGCTGCACGGCGACCG-3 '
	Rv 1	5'TCAGCGTGAGCTGATACCA-3'

2.6. Determinación de la concentración inhibitoria

La concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada antibiótico y cepa fue obtenida usando un sistema automatizado Vitek2 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para los valores de corte de CIM se siguieron las recomendaciones del National Clinical and Laboratory Standarts Institute (NCLSI) (24)(25). El sistema Vitex2 posee un método homologado mediante el cual determina la CIM en base a algoritmos, que relacionan el crecimiento bacteriano en cuatro concentraciones de antibiótico, cubriendo concentración que van desde 0,5 a 64 µg/ml dependiendo de cada antibiótico. Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: ampicilina (AM), ampicilina-sulbatam (SAM), piperacilin-tazobactam (TZP), cefalotaxime (CF), ceftaxima (FOX), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AN), gentamicina (GM), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CIP), nitrofurin (FT), colistina (CS) y trimetroprime-sulfametoxazol (SXT). *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue usada como control en todos los ensayos.

RESULTADOS

3.1. Ensayo de resistencia a rifampicina

El ensayo de CIM permitió conocer en muestras aleatorias de los aislados analizados el grado intrínseco de resistencia al antibiótico rifampicina. Los resultados indican que este antibiótico podría utilizarse en concentraciones iguales a las descritas para analizar aislados de *P. aeruginosa*.

En la Figura 2 se muestra una placa multipocillo inoculada con cepas control y aislados clínicos. Las concentraciones cubren el rango de 1 a 1024 ug/ml de rifampicina. En la Tabla 2, se resume los resultados del estudio realizado sobre 20 aislados (tomados aleatoriamente de la colección a estudiar) y los valores detectados para las cepas de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 y su respectivo mutante.

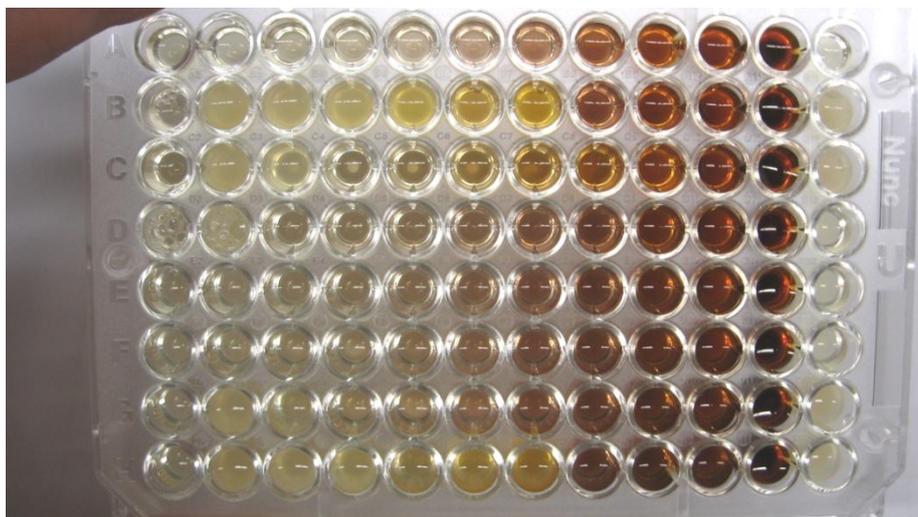


Figura 2. Placa multipocillo. Concentración de rifampicina de 1 a 1024 ug/ml (izquierda a derecha). A y B cepas de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa*-mutS; C- H, *Burkholderia contaminans*. Se observa que la última fila (H) corresponde a un fenotipo hipermutador.

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima a rifampicina.

Especies	(ug/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 -mutS	256
<i>Burkholderia contaminans</i> (aislados clínicos No-FQ)	2 - 4
<i>Burkholderia contaminans</i> (aislados ambientales)	1 - 2
<i>Burkholderia contaminans</i> (aislado clínico FQ)	2 - 8

3.2. Detección de hipermutadores

Para el cálculo de frecuencia y tasa de mutación se analizaron 1500 placas (Figura 3) correspondientes a 125 aislados identificados previamente a nivel de especies del complejo *B. cepacia* por secuenciación de gen *recA* (Tabla 4, al final del capítulo). El 13,6% (17 cepas) exhibieron un fenotipo mutador con una tasa de mutación mediana de $3,60 \times 10^{-6}$. Se considera un mutador cuando las frecuencias de mutación correspondientes fueron al menos 20 veces mayor que las observadas para no mutador de *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 4).



Figura 3. Colonias de *B. contaminans* crecidas en ágar LB suplementado con 300 ug/ml de rifampicina. A) Fenotipo hipermutador y B) fenotipo normomutador.

En 48 pacientes con FQ, tres grupos de aislamientos fueron distinguidos: un grupo de no mutadores, con una frecuencia de mutación mediana de $4,80 \times 10^{-9}$ ($1,20 \times 10^{-9}$ a $1,41 \times 10^{-8}$), un grupo de mutadores débiles, con una frecuencia de mutación mediana de $2,86 \times 10^{-8}$ ($1,50 \times 10^{-8}$ a $5,11 \times 10^{-8}$) y un grupo de mutadores con una frecuencia de mutación mediana de $7,23 \times 10^{-7}$ ($6,10 \times 10^{-7}$ a $5,23 \times 10^{-5}$) mostrando que en los pulmones de pacientes FQ están presentes diferentes subpoblaciones bacterianas. De los 100 aislamientos de cBc obtenidos de esputo de 48 pacientes con FQ, 14 aislamientos de 11 pacientes (22,9%) mostraron un fenotipo mutador. En estos pacientes, la proporción total de los aislamientos con fenotipo mutador frente a un fenotipo no mutador fue de 31,8%. En los restantes aislados de la colección, conformados por muestras de pacientes no-FQ y de muestras ambientales, se observó sólo en tres cepas (2 y 1, respectivamente) fenotipo hipermutador mediante el ensayo de tasa de mutación a rifampicina. En estos grupos, las cepas no mutadoras tenían un rango de tasa de mutación entre $6,14 \times 10^{-10}$ y $2,73 \times 10^{-8}$ (tasa de mutación mediana de $7,76 \times 10^{-9}$), mientras que los de las cepas mutantes eran entre $3,11 \times 10^{-7}$ y $9,3 \times 10^{-6}$. Como controles, se estimaron las tasas de mutación

de las cepas de laboratorio *P. aeruginosa* PAO1 y Pao1-*mutS*, siendo respectivamente de $2,84 \times 10^{-9}$ y $5,05 \times 10^{-7}$.

3.3. Prevalencia cepas mutantes en complejo *B. cepacia*

Dentro de los aislados clínicos con fenotipo mutador, un aislado recuperado de un único paciente fue de la especie *B. multivorans*, 2 aislados de un paciente fueron *B. cepacia*, 5 aislamientos fueron *B. cenocepacia* y fueron muestreados de cuatro pacientes y 8 aislamientos obtenidos de 7 pacientes fueron identificados como *B. contaminans*; mientras que una única muestra ambiental fue *B. lata*. Como se muestra en la Tabla 3, ningún aislamiento de *B. vietnamiensis* y *B. seminalis* presentaron fenotipo hipermutador.

Tabla 3. Porcentaje de aislados hipermutadores por especies.

Especies	Num. total de aislados	% Hipermutador
<i>B. cepacia</i>	13	15,4
<i>B. multivorans</i>	11	9,1
<i>B. cenocepacia</i>	16	31,2
<i>B. vietnamiensis</i>	3	0
<i>B. seminalis</i>	5	0
<i>B. contaminans</i>	74	10,8
<i>B. lata</i>	3	33,3

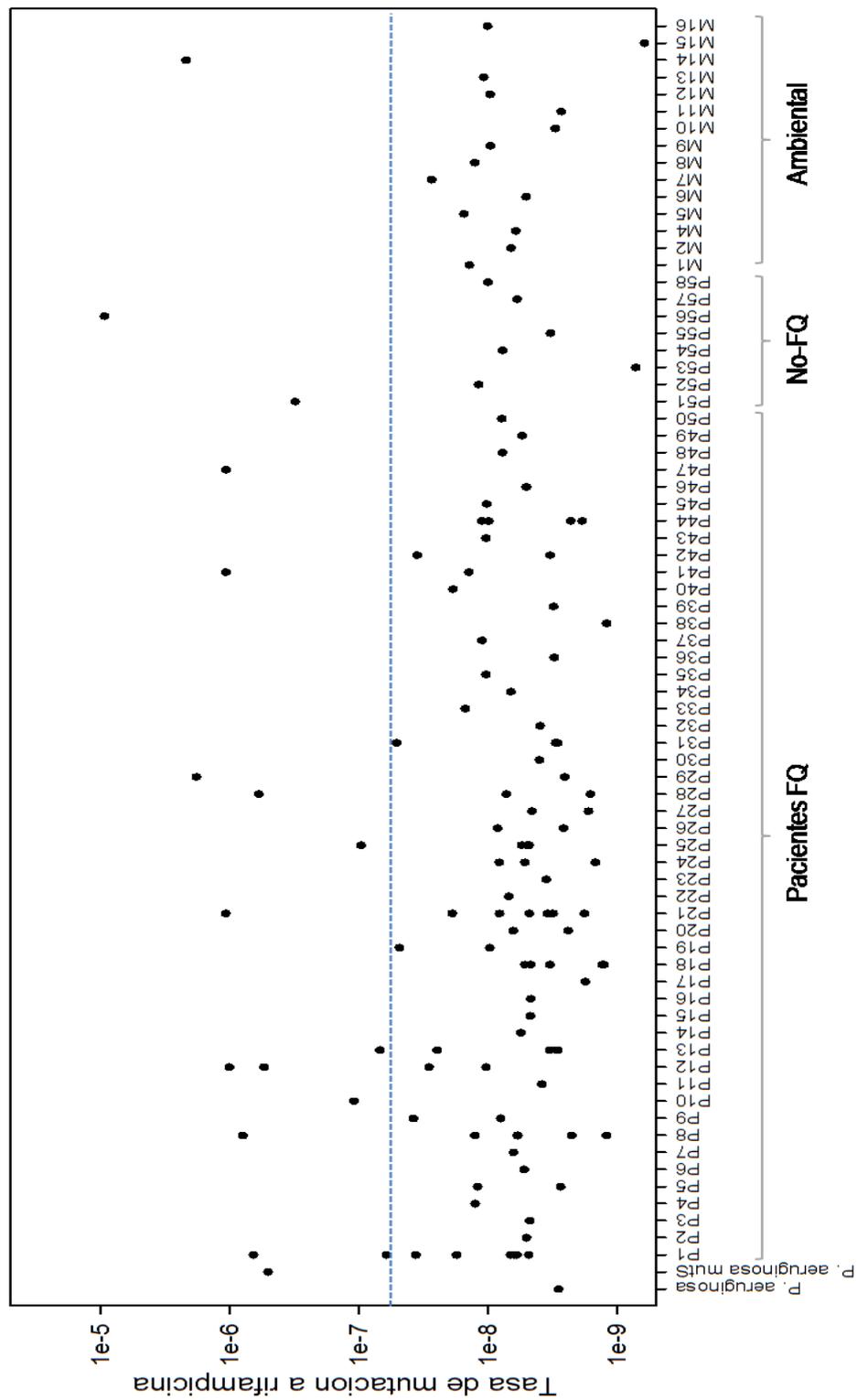


Figura 4. Tasa de mutación a Rifampicina para 125 aislamientos de cBc provenientes de 48 pacientes FQ, 8 aislamientos procedentes de pacientes no-FQ y 16 muestras del medio ambiente. El *P. aeruginosa* cepa PAO1 y PAO-*mutS*, se incluyeron como control. Las líneas discontinuas representan una tasa de mutación 20 veces mayor que la cepa PAO1 salvaje.

3.4. Caracterización molecular de las cepas hipermutadoras

La base genética para la hipermutabilidad se investigó mediante análisis de secuencia de los genes *mutS* y *mutL* en las 17 cepas de cBc hipermutables. Mediante el análisis con el software SIFT se determinó si las mutaciones eran responsables de la inactivación de la proteína y por lo tanto la causa del fenotipo hipermutador. En la Tabla 5, se observan los cambios a nivel de ADN y su efecto en la función de la proteína.

Tabla 5. Mutaciones en los genes *mutS* y *mutL*.

Cepas	Pte.	Tasa de Mutación	<i>mutS</i> - <i>mutL</i>	
			Mutación	A.A. cambio
<i>B. cepacia</i>				
CBC 003	P1	6,100E ⁻⁰⁸	no encontrada	no encontrada
CBC 009	P1	6,544E ⁻⁰⁷	no encontrada	no encontrada
<i>B. multivorans</i>				
CBC 018	P8	7,910E ⁻⁰⁷		
<i>B. cenocepacia</i>				
CBC 032	P13	6,882E ⁻⁰⁸		
CBC 025	P10	1,090E ⁻⁰⁷		
CBC 029	P12	5,428E ⁻⁰⁷	A a T en 68, T a G en 2111, G a A en 2113, A a C en 2114, G a A en 2116	K a M en 23, M a R en 704, D a T en 705, E a R en 706.
CBC 030	P12	1,009E ⁻⁰⁶		
CBC 103	P51	3,110E ⁻⁰⁷		
<i>B. contaminans</i>				
CBC 062	P25	9,609E ⁻⁰⁸	no encontrada	no encontrada
CBC 069	P28	5,958E ⁻⁰⁷	no encontrada	no encontrada
CBC 099	P47	1,067E ⁻⁰⁶		
CBC 088	P41	1,071E ⁻⁰⁶	no encontrada	no encontrada
CBC 054	P21	1,075E ⁻⁰⁶		
CBC 073	P29	1,812E ⁻⁰⁶		
CBC 108	P56	9,302E ⁻⁰⁶	no encontrada	no encontrada
CBC 074	P29	5,231E ⁻⁰⁵	T a C en 1890	G a R en 630
<i>B. lata</i>				
CBC 123	M14	2,184E ⁻⁰⁶		

Como se había comentado previamente, el desarrollo de resistencia a antimicrobianos y adaptación de las bacterias durante infecciones crónicas están entre los más relevantes rasgos evolutivos vinculados a hipermutación (29)(20). Por esta razón evaluamos la sensibilidad a 16 antibióticos y analizamos si existían diferencias entre la población de cepas mutadoras y no mutadoras recuperada de aislamientos clínicos y ambientales.

3.5. Susceptibilidad de células planctónicas del cBc frente a antimicrobianos

Se determinaron las CIM a 125 aislados de cBc empleando un sistema automatizado Vitek2, siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de una suspensión estándar 0,5 de McFarland se preparó una dilución con la cual se cargó cada tarjeta que contenía los 16 antibióticos a ensayar. En la Tabla 6 (al final del capítulo), se muestran los valores de CIM en ug/ml para todos los antibióticos y para cada cepa estudiada. En la Figura 5, se observa para cada antibiótico ensayado los porcentajes de aislados resistentes agrupados por especies.

En general, todas las especies de cBc analizadas en este estudio presentaron elevada resistencia a los antibióticos β -lactámicos y cefalosporinas de primera y segunda generación (CF y FOX). Es interesante notar que el 35% de aislados de *B. cepacia* mostraron resistencia ante cefalosporinas de tercera y cuarta generación y β -lactámicos en combinación a inhibidores como TZP; para este último también *B. contaminans* con más del 80%. Para los antibióticos tipo Carbapenem, excepcionalmente 3 aislados de *B. contaminans* recuperados de 2 pacientes FQ mostraron resistencia a MEM. Sin embargo, para el caso de IMP excluyendo a *B. lata* los restantes aislados del cBc, evidenciaron resistencia aproximadamente en un 50%. Para los antibióticos del tipo aminoglicósidos se observó resistencias variables entre las especies que abarcan entre el 35 al 90% de aislados, salvo para el caso de *B. lata* que fue sensible a AN. Entre los antibióticos denominados quinolonas, CIP y FT mostraron menor porcentaje de aislados resistentes en comparación con NA, sin embargo todas las especies presentaron resistencia entre el 10 y 70%. Como es de esperarse para CS solo unos pocos aislados de *B. contaminans* y *B. vietnamiensis* principalmente de muestras ambientales, mostraron sensibilidad, los demás fueron resistentes. Para el caso de sulfametoxazol-trimetoprima unos pocos aislados de *B. cenocepacia*, *B. contaminans*, *B. multivorans* y *B. vietnamiensis* evidenciaron resistencia.

En la figura 6, se muestra la actividad diferencial de los antibióticos mencionados sobre los aislamientos diferenciados como: FQ mutadores, FQ no mutadores y aislados no FQ. Para la mayoría de los antibióticos se observó homogeneidad en la resistencia para cada antibiótico entre los 3 grupos. Sin embargo, para aislamientos recuperados de pacientes FQ se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la resistencia a los antibióticos CAZ, FEP, IPM, MEN, AN, NA, CIP en relación a los aislados recuperados de pacientes No-FQ y ambientales

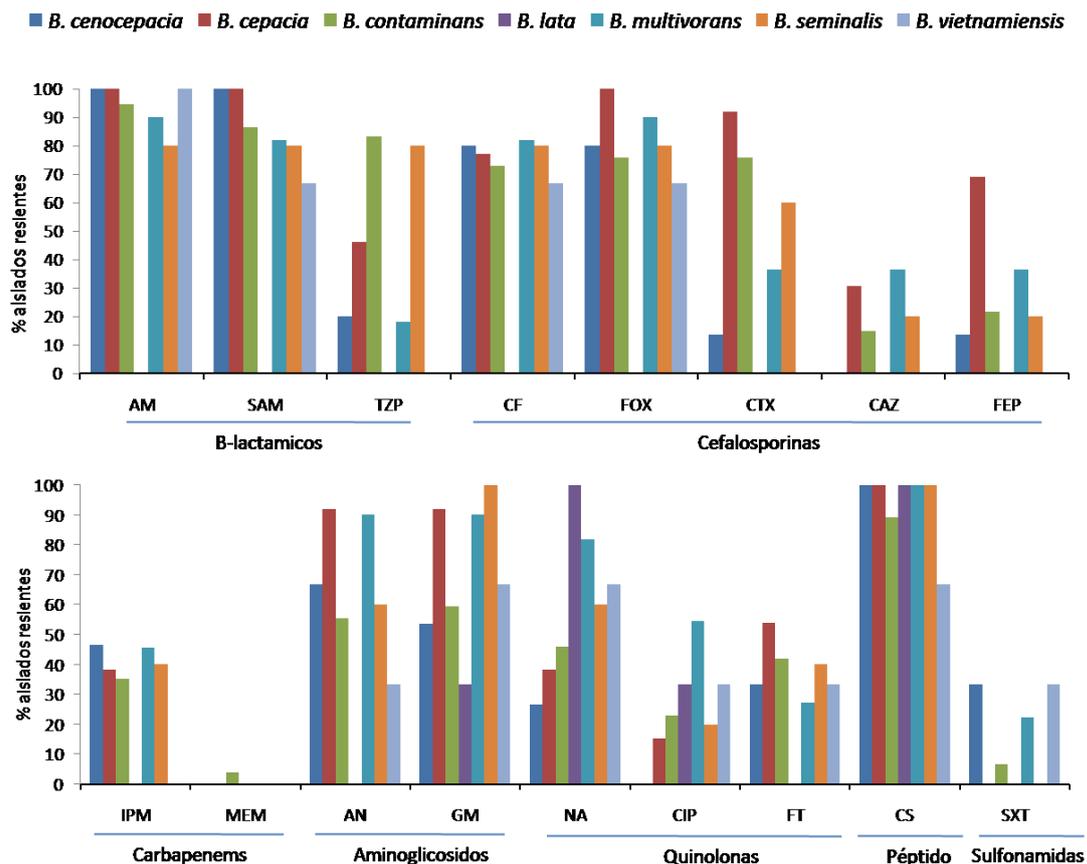


Figura 5. Diferencias en la susceptibilidad antibiótica en especies de cBc. Se muestra porcentaje de aislados resistentes, según normas CLSI M100-S17. El número de aislados analizados de cada especie fueron: 15 *B. cenocepacia*, 13 *B. cepacia*, 74 *B. contaminans*, 3 *B. lata*, 11 *B. multivorans*, 5 *B. seminalis* y 5 *B. vietnamiensis*.

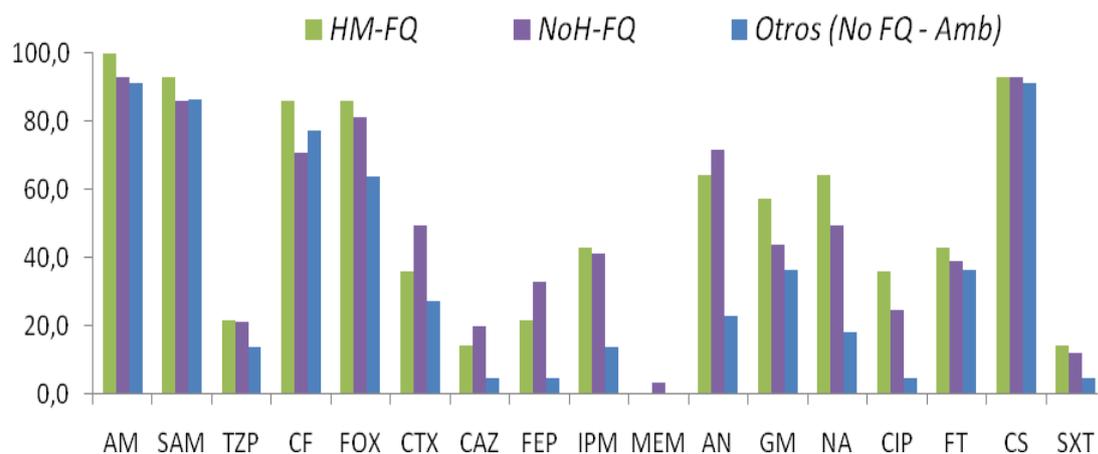


Figura 6. Diferencias en la resistencia a los antibióticos en cBc entre los 14 Hipermutadores FQ (barras verdes), 85 aislados FQ no mutadores (barras violetas) y 22 aislamientos No-FQ y ambientales (barras azul).

DISCUSIÓN

A excepción de *Burkholderia lata*, las cepas hipermutadoras presentes en *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans* provienen de aislados recuperados de infecciones crónicas. Este origen estaría de acuerdo al observado por otros autores donde reportaron la presencia de bacterias hipermutadoras en infecciones crónicas de pacientes FQ y no FQ (33)(23)(42)(36)(19). En cuanto al análisis molecular de los genes responsables del fenotipo hipermutador, el análisis de secuencia de los genes *mutS* y *mutL* reveló una heterogeneidad de las mutaciones en los mismos, responsables del fenotipo hipermutador en los aislamientos estudiados en este trabajo. Ninguna de estas mutaciones (*stop* y sustituciones de aminoácidos) se han descrito previamente en genes homólogos de otras especies con cepas mutadoras. Sin embargo, en los restantes aislados hipermutadores donde la secuencia de los genes *mutS* y *mutL* permaneció sin mutaciones (sin cambios funcional), otros genes alterados serían la causa de este fenotipo.

En el cBc se observó una frecuencia de cepas mutadoras mucho menor que la reportada en otras especies (31)(13) recuperadas de pacientes FQ. Este escenario podría deberse a: i) que los aislamientos pertenecen a pacientes FQ que llevan un corto período de cronicidad en infecciones por estas especies, o bien ii) la baja frecuencia de mutadores sea compensado con una mayor tasa de recombinación y el gran genoma que ofrece alta plasticidad metabólica.

En este capítulo se presentan los resultados de una comparación sistemática de la sensibilidad *in vitro* a 17 antimicrobianos de 125 aislamientos de diferentes especies del cBc obtenidos de pacientes con fibrosis quística (con infección crónica e inicial), aislamientos clínicos no FQ y ambientales. Los perfiles de resistencia a los antimicrobianos obtenidos destacan las altas tasas de resistencia antimicrobiana de aislados del cBc principalmente de pacientes con FQ. Los antimicrobianos más eficaces *in vitro* fueron Meropenem, Ceftazidima, Cefepina y la combinación de Piperacilina-Tazobactam y Trimetropima-Sulfametaxazol, confirmando indicaciones anteriores de que Ceftazidima es uno de los pocos agentes antimicrobianos eficaces contra las infecciones causadas por bacterias del cBc (40)(45). Notable similitud en las tasas de resistencia a Imipenem se observó entre los aislados pertenecientes a *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. contaminans* y *B. stabilis*, no así *B. lata* y *B. vietnamiensis* que fueron sensibles; sin embargo se debe considerar la baja representación con 5 aislados. Probablemente la alta sensibilidad mostrada a Meropenem se deba a que este sólo se administra en pacientes internados. La resistencia a los aminoglucósidos como la Gentamicina se debe a la presencia de enzimas modificadoras de

aminoglucósidos, conjuntamente con alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa. La resistencia a antibióticos b-lactámicos es usualmente mediada por la presencia de b-lactamasas inducibles, cuyos genes están localizados en el cromosoma bacteriano y pueden hidrolizar penicilinas, Cefalosporinas y Aztreonam en menor medida (32), mientras que las alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa pueden contribuir a la resistencia a los b-lactámicos; por otro lado la adquisición de b-lactamasas plasmídicas permiten hidrolizar con relativa facilidad Imipenem (27). Este completo arsenal en mecanismos de resistencia posee una base genética y pueden ser adquiridas por conjugación, transformación y / o transducción, y se incorporan a veces en la cepa receptora por eventos de recombinación y por otro lado la generación de fenotipos resistentes a los antibióticos puede ser causada por mutaciones en el promotor o las regiones codificantes de los genes estructurales o regulatorios. Estas mutaciones dan lugar a diversos niveles de resistencia a los antibióticos debido a lo siguiente: i) reducción de la absorción de los antibióticos; ii) incremento en la expresión de sistemas de eflujo que confieren resistencia a múltiples antibióticos; iii) modificación del sitio diana; iv) sobreproducción de la diana; v) expresión de b-lactamasas de espectro extendido (ESBL); vi) sobreproducción de b-lactamasas; y vii) expresión de proteínas secuestrantes de unión a antibiótico. La probabilidad de adquirir nuevas funciones por mutación y recombinación está aumentada considerablemente en cepas deficientes en el sistema MRS (14).

La supervivencia de *P. aeruginosa* en infecciones crónicas de pacientes FQ se basa en un proceso de adaptación genética que consiste en mutaciones en genes específicos, que pueden producir fenotipos ventajosos y asegurar su persistencia en el pulmón. Entre ellas, las mutaciones que inactivan el regulador MucA (biosíntesis de alginato), LasR (*quorum sensing*) y MexZ (multirresistencia por bomba de eflujo MexXY) son las más frecuentemente observadas, junto a la inactivación del sistema MRS, que da lugar a fenotipos hipermutadores que podrían contribuir a esta mutagénesis adaptativa en virtud de un aumento de la tasa de mutación (8). Sin embargo, Feliziani y colegas no observaron una asociación directa entre hipermutadores y la adquisición de aquellas mutaciones adaptativas, salvo el incremento de resistencia antibiótica (8). No obstante la conexión entre la hipermutación y resistencia a los antibióticos sigue siendo controvertida. Denamur y colegas (5) demostraron que cepas de *E. coli* uropatógenas mutadoras no son más resistentes a los antibióticos que las no mutadoras, y no encontraron cepas mutantes que mostraran resistencia a múltiples antibióticos. Sin embargo, evidencias claras y contundentes fueron presentadas por Oliver y colegas, al describir diferencias en el patrón de resistencia antibiótica entre cepas mutadoras y no mutadoras de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes FQ colonizados (29). En nuestros estudios, cepas

hipermutables presentaron una prevalencia del 13.6% y aunque se observaron diferencias en el porcentaje de aislados resistentes al comparar con el grupo no mutador, estas no fueron significativas.

En resumen, nuestros resultados muestran que cepas hipermutables están presentes en aislados del complejo *Burkholderia cepacia* y son de hecho más frecuentes en aislados recuperados de las infecciones crónicas, y que probablemente su co-selección no esté relacionada con mutaciones que confieren resistencia antibiótica sino más bien con mutaciones que permitan la adaptación a infecciones de largo plazo. Estos resultados son sin duda un paso adelante en nuestra comprensión de la epidemiología de las infecciones crónicas por microorganismos hipermutables de estas especies.

Evaluamos finalmente si los aislados identificados como hipermutadores presentan en conjunto características comunes a aquellos recuperados de las infecciones crónicas. Para ello se realizó un estudio comparativo de las propiedades fenotípicas (proteólisis, hemólisis, lipólisis, EPS, QS y formación de biofilm) de los aislamientos identificados como hipermutadores (Hipermutadores, P1), de los recuperados de primeras infecciones de pacientes FQ (FQ-iniciales, P2) y de los obtenidos de infecciones crónicas (FQ-crónicas, P3) empleando los resultados obtenidos en el capítulo IV en un contexto de estructura poblacional, utilizando el programa informático *Arlequin 3.5* y *NTSYSpc 2.20N* (7). Estos programas se emplean para estudios de genética de población y se aplica a marcadores genéticos. A través del mismo es posible realizar un análisis poblacional que permite inferir la presencia de grupos o subpoblaciones y la asignación de los individuos (en este caso aislados clínicos) a los mismos. El sistema realiza este procedimiento midiendo las distancias relativas entre los grupos, estableciendo a través de las mismas si las poblaciones están relacionadas o no, En nuestro caso analizamos las características fenotípicas de las 3 poblaciones introducidas al sistema de manera codificada,. Los resultados (Tabla 7, al final del capítulo) muestran que hay distancias significativas ($P < 0,05$) entre las poblaciones 1-2 (hipermutadoras vs FQ iniciales) y entre las poblaciones 2-3 (FQ iniciales vs FQ crónicas). La distancia entre las poblaciones 1-3 (hipermutadoras vs FQ crónicas) no mostró tener diferencias significativas, es decir que estas poblaciones estarían relacionadas. Si bien estos resultados son preliminares y deberíamos comprobarlos con otros sistemas multivariantes de análisis poblacional, nos da indicios que las características (asociadas a los factores de virulencia) expresadas en estos aislados hipermutadores estarían asociadas a la infección crónica.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente capítulo, permiten abordar las siguientes conclusiones:

1. El fenotipo hipermutador está presente en especies del complejo *B. cepacia*.
2. La hipermutación en especies del cBc estaría asociada al proceso de infección crónica, a excepción de *B. lata*.
3. Existe diferencias en el perfil de susceptibilidad antimicrobiana entre las diferentes especies del cBc a los distintos antibióticos ensayados.
4. El perfil de resistencia a los diferentes antibióticos fue similar entre las cepas hipermutadoras y los aislados de infecciones crónicas.
5. El análisis en conjunto de las características fenotípicas, sitúa a los aislados hipermutadores próximos en similitud a los aislados crónicos, lo que sugiere la expresión de características semejantes.

Anexo

Tabla 5. Tasa de mutación de aislados cBc.

Cepas	Especie	Pte.	Año	Origen	Muestra	Pcia.	Cronicidad	Tasa mutación
CBC 001	<i>B. cepacia</i>	P1	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	6,010E-09
CBC 002	<i>B. cepacia</i>	P1	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	4,831E-09
CBC 003	<i>B. cepacia</i>	P1	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	6,100E-08
CBC 004	<i>B. cepacia</i>	P1	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	3,615E-08
CBC 005	<i>B. cepacia</i>	P1	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	6,688E-09
CBC 006	<i>B. cepacia</i>	P1	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	1,750E-08
CBC 007	<i>B. cepacia</i>	P1	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	5,981E-09
CBC 008	<i>B. cepacia</i>	P1	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	6,297E-09
CBC 009	<i>B. cepacia</i>	P1	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	6,544E-07
CBC 010	<i>B. cepacia</i>	P2	2010	FQ	esputo	La Plata	+	5,039E-09
CBC 011	<i>B. cepacia</i>	P3	2010	FQ	esputo	Córdoba	nd	4,750E-09
CBC 012	<i>B. cepacia</i>	P4	2009	FQ	esputo	B. Aires	nd	1,256E-08
CBC 013	<i>B. multivorans</i>	P5	2008	FQ	esputo	La Plata		2,740E-09
CBC 014	<i>B. multivorans</i>	P5	2009	FQ	esputo	La Plata	+	1,200E-08
CBC 015	<i>B. multivorans</i>	P6	2010	FQ	esputo	La Plata	nd	5,254E-09
CBC 016	<i>B. multivorans</i>	P7	2012	FQ	esputo	Córdoba		6,34E-09
CBC 017	<i>B. multivorans</i>	P8	2010	FQ	esputo	La Plata		1,267E-08
CBC 018	<i>B. multivorans</i>	P8	2010	FQ	esputo	La Plata	+	7,910E-07
CBC 019	<i>B. multivorans</i>	P8	2011	FQ	esputo	La Plata	+	5,886E-09
CBC 020	<i>B. multivorans</i>	P8	2011	FQ	esputo	La Plata	+	1,207E-09
CBC 021	<i>B. multivorans</i>	P8	2012	FQ	esputo	La Plata	+	5,930E-09
CBC 022	<i>B. multivorans</i>	P8	2012	FQ	esputo	La Plata	+	2,245E-09
CBC 023	<i>B. cenocepacia</i>	P9	2009	FQ	esputo	La Plata		7,975E-09
CBC 024	<i>B. cenocepacia</i>	P9	2012	FQ	esputo	La Plata	nd	3,767E-08
CBC 025	<i>B. cenocepacia</i>	P10	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	1,090E-07
CBC 026	<i>B. cenocepacia</i>	P11	2012	FQ	esputo	La Plata		3,826E-09
CBC 027	<i>B. cenocepacia</i>	P12	2009	FQ	esputo	La Plata	+	1,036E-08
CBC 028	<i>B. cenocepacia</i>	P12	2011	FQ	esputo	La Plata	+	2,863E-08
CBC 029	<i>B. cenocepacia</i>	P12	2011	FQ	esputo	La Plata	+	5,428E-07
CBC 030	<i>B. cenocepacia</i>	P12	2012	FQ	esputo	La Plata	+	1,009E-06
CBC 031	<i>B. cenocepacia</i>	P13	2010	FQ	esputo	La Plata	+	2,895E-09
CBC 032	<i>B. cenocepacia</i>	P13	2010	FQ	esputo	La Plata	+	6,882E-08
CBC 033	<i>B. cenocepacia</i>	P13	2011	FQ	esputo	La Plata	+	3,303E-09
CBC 034	<i>B. cenocepacia</i>	P13	2011	FQ	esputo	La Plata	+	2,478E-08
CBC 035	<i>B. cenocepacia</i>	P14	2009	FQ	esputo	La Plata	+	5,556E-09
CBC 036	<i>B. cenocepacia</i>	P15	2009	FQ	esputo	La Plata	nd	4,698E-09
CBC 037	<i>B. vietnamiensis</i>	P16	2008	FQ	esputo	La Plata		4,671E-09
CBC 038	<i>B. vietnamiensis</i>	P17	2012	FQ	esputo	La Plata	+	1,762E-09
CBC 039	<i>B. seminalis</i>	P18	2003	FQ	esputo	Córdoba		1,265E-09
CBC 040	<i>B. seminalis</i>	P18	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	1,300E-09
CBC 041	<i>B. seminalis</i>	P18	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	3,320E-09

CBC 042	<i>B. seminalis</i>	P18	2007	FQ	esputo	Córdoba	+	4,663E-09
CBC 043	<i>B. seminalis</i>	P18	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	5,182E-09
CBC 044	<i>B. contaminans</i>	P19	2004	FQ	esputo	La Plata		4,839E-08
CBC 045	<i>B. contaminans</i>	P19	2009	FQ	esputo	La Plata	+	9,683E-09
CBC 046	<i>B. contaminans</i>	P20	2004	FQ	esputo	Córdoba		2,392E-09
CBC 047	<i>B. contaminans</i>	P20	2005	FQ	esputo	Córdoba		6,373E-09
CBC 048	<i>B. contaminans</i>	P21	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	3,204E-09
CBC 049	<i>B. contaminans</i>	P21	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	1,896E-08
CBC 050	<i>B. contaminans</i>	P21	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	3,128E-09
CBC 051	<i>B. contaminans</i>	P21	2010	FQ	esputo	Córdoba	+	3,461E-09
CBC 052	<i>B. contaminans</i>	P21	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	4,796E-09
CBC 053	<i>B. contaminans</i>	P21	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	8,134E-09
CBC 054	<i>B. contaminans</i>	P21	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	1,075E-06
CBC 055	<i>B. contaminans</i>	P21	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	1,790E-09
CBC 056	<i>B. contaminans</i>	P22	2012	FQ	esputo	La Plata		6,89E-09
CBC 057	<i>B. contaminans</i>	P23	2009	FQ	esputo	La Plata		3,547E-09
CBC 058	<i>B. contaminans</i>	P24	2004	FQ	esputo	Córdoba		1,474E-09
CBC 059	<i>B. contaminans</i>	P24	2004	FQ	esputo	Córdoba		5,162E-09
CBC 060	<i>B. contaminans</i>	P24	2003	FQ	esputo	Córdoba		8,156E-09
CBC 061	<i>B. contaminans</i>	P25	2005	FQ	esputo	Córdoba		4,946E-09
CBC 062	<i>B. contaminans</i>	P25	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	9,609E-08
CBC 063	<i>B. contaminans</i>	P25	2009	FQ	esputo	Córdoba	+	4,810E-09
CBC 064	<i>B. contaminans</i>	P25	2011	FQ	esputo	Córdoba	+	5,486E-09
CBC 065	<i>B. contaminans</i>	P26	2005	FQ	esputo	Córdoba		2,599E-09
CBC 066	<i>B. contaminans</i>	P26	2006	FQ	esputo	Córdoba	+	8,444E-09
CBC 067	<i>B. contaminans</i>	P27	2004	FQ	esputo	Córdoba		4,561E-09
CBC 068	<i>B. contaminans</i>	P27	2005	FQ	esputo	Córdoba	+	1,665E-09
CBC 069	<i>B. contaminans</i>	P28	2010	FQ	esputo	La Plata	+	5,958E-07
CBC 070	<i>B. contaminans</i>	P28	2011	FQ	esputo	La Plata	+	7,220E-09
CBC 071	<i>B. contaminans</i>	P28	2011	FQ	esputo	La Plata	+	1,608E-09
CBC 072	<i>B. contaminans</i>	P29	2011	FQ	esputo	La Plata	+	2,553E-09
CBC 073	<i>B. contaminans</i>	P29	2012	FQ	esputo	La Plata	+	1,812E-06
CBC 074	<i>B. contaminans</i>	P29	2012	FQ	esputo	La Plata	+	5,231E-05
CBC 075	<i>B. contaminans</i>	P30	2010	FQ	esputo	Córdoba	nd	3,988E-09
CBC 076	<i>B. contaminans</i>	P31	2008	FQ	esputo	La Plata		2,990E-09
CBC 077	<i>B. contaminans</i>	P31	2008	FQ	esputo	La Plata		5,110E-08
CBC 078	<i>B. contaminans</i>	P31	2010	FQ	esputo	La Plata	+	2,882E-09
CBC 079	<i>B. contaminans</i>	P32	2004	FQ	esputo	La Plata		3,954E-09
CBC 080	<i>B. contaminans</i>	P33	2012	FQ	esputo	La Plata		1,50E-08
CBC 081	<i>B. contaminans</i>	P34	2009	FQ	esputo	La Plata	+	6,66E-09
CBC 082	<i>B. contaminans</i>	P35	2010	FQ	esputo	La Plata	+	1,036E-08
CBC 083	<i>B. contaminans</i>	P36	2004	FQ	esputo	Córdoba	nd	3,080E-09
CBC 084	<i>B. contaminans</i>	P37	2004	FQ	esputo	La Plata	nd	1,113E-08
CBC 085	<i>B. contaminans</i>	P38	2010	FQ	esputo	Córdoba		1,203E-09
CBC 086	<i>B. contaminans</i>	P39	2005	FQ	esputo	La Plata		3,107E-09
CBC 087	<i>B. contaminans</i>	P40	2004	FQ	esputo	La Plata	+	1,869E-08

CBC 088	<i>B. contaminans</i>	P41	2011	FQ	esputo	La Plata	+	1,071E-06
CBC 089	<i>B. contaminans</i>	P41	2011	FQ	esputo	La Plata	+	1,410E-08
CBC 090	<i>B. contaminans</i>	P42	2004	FQ	esputo	La Plata		3,303E-09
CBC 091	<i>B. contaminans</i>	P42	2011	FQ	esputo	La Plata	+	3,536E-08
CBC 092	<i>B. contaminans</i>	P43	2010	FQ	esputo	La Plata	nd	1,037E-08
CBC 093	<i>B. contaminans</i>	P44	2004	FQ	esputo	La Plata		1,120E-08
CBC 094	<i>B. contaminans</i>	P44	2009	FQ	esputo	La Plata	+	9,852E-09
CBC 095	<i>B. contaminans</i>	P44	2010	FQ	esputo	La Plata	+	1,868E-09
CBC 096	<i>B. contaminans</i>	P44	2011	FQ	esputo	La Plata	+	2,294E-09
CBC 097	<i>B. contaminans</i>	P45	2004	FQ	esputo	La Plata		1,025E-08
CBC 098	<i>B. contaminans</i>	P46	2009	FQ	esputo	B. Aires	nd	5,048E-09
CBC 099	<i>B. contaminans</i>	P47	2009	FQ	esputo	B. Aires	nd	1,067E-06
CBC 100	<i>B. contaminans</i>	P48	2009	FQ	esputo	B. Aires	nd	7,731E-09
CBC 101	<i>B. multivorans</i>	P49	2005	No-FQ	sangre	La Plata		5,455E-09
CBC 102	<i>B. cenocepacia</i>	P50	2005	No-FQ	sangre	La Plata		7,831E-09
CBC 103	<i>B. cenocepacia</i>	P51	2005	No-FQ	sangre	B. Aires		3,110E-07
CBC 104	<i>B. contaminans</i>	P52	2012	No-FQ	sangre	La Plata		1,18E-08
CBC 105	<i>B. contaminans</i>	P53	2011	No-FQ	sangre	La Plata		7,156E-10
CBC 106	<i>B. contaminans</i>	P54	2005	No-FQ	sangre	B. aires		7,695E-09
CBC 107	<i>B. contaminans</i>	P55	2005	No-FQ	sangre	B. Aires		3,277E-09
CBC 108	<i>B. contaminans</i>	P56	2005	No-FQ	sangre	B. Aires		9,302E-06
CBC 109	<i>B. contaminans</i>	P57	2005	No-FQ	sangre	B. Aires		5,954E-09
CBC 110	<i>B. contaminans</i>	P58	2005	No-FQ	sangre	B. Aires		9,990E-09
CBC 111	<i>B. cepacia</i>	M1	2001	Amb	suelo	Córdoba		1,394E-08
CBC 112	<i>B. vietnamiensis</i>	M2	2009	Amb	agua	Córdoba		6,632E-09
CBC 113	<i>B. contaminans</i>	M4	2004	Amb	agua	La Plata		6,095E-09
CBC 114	<i>B. contaminans</i>	M5	1998	Amb	agua	B. Aires		1,536E-08
CBC 115	<i>B. contaminans</i>	M6	2009	Amb	agua	B. Aires		5,069E-09
CBC 116	<i>B. contaminans</i>	M7	2009	Amb	agua	B. Aires		2,732E-08
CBC 117	<i>B. contaminans</i>	M8	2008	Amb	agua	Córdoba		1,267E-08
CBC 118	<i>B. contaminans</i>	M9	2007	Amb	agua	Córdoba		9,580E-09
CBC 119	<i>B. contaminans</i>	M10	2007	Amb	agua	Córdoba		3,011E-09
CBC 120	<i>B. contaminans</i>	M11	2011	Amb	agua	Córdoba		2,711E-09
CBC 121	<i>B. contaminans</i>	M12	2005	Amb	agua	Córdoba		9,647E-09
CBC 122	<i>B. contaminans</i>	M13	2009	Amb	agua	Córdoba		1,080E-08
CBC 123	<i>B. lata</i>	M14	2009	Amb	agua	B. Aires		2,184E-06
CBC 124	<i>B. lata</i>	M15	2009	Amb	agua	Córdoba		6,146E-10
CBC 125	<i>B. lata</i>	M16	2009	Amb	agua	Córdoba		1,007E-08
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853								2,844E-09
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853-mutS								5,052E-07

Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima de aislados cBc. * R ≥ a: corresponde al valor de corte según NCCLS (24)(25).

Cepas	AM	SAM	TZP	CF	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	AN	GM	NA	CIP	FT	CS	SXT
*R ≥ a	32	32	128	64	64	64	32	32	16	16	64	16	32	4	512	8	4
CBC 001	32	32	128	64	64	64	16	64	16	8	64	16	8	1	256	16	1
CBC 002	32	32	128	64	64	64	8	32	4	2	64	16	16	2	512	16	1
CBC 003	32	32	32	64	64	64	8	16	16	1	64	16	32	4	512	16	1
CBC 004	32	32	32	64	64	64	4	64	8	2	64	16	16	2	512	16	1
CBC 005	32	32	32	32	64	64	32	32	2	2	64	16	32	2	128	16	1
CBC 006	32	32	32	2	64	64	8	1	1	4	64	16	16	0,5	128	16	1
CBC 007	32	32	128	64	64	64	32	64	16	8	64	16	8	1	256	16	1
CBC 008	32	32	128	64	64	64	32	64	16	8	64	16	8	1	512	16	1
CBC 009	32	32	128	64	64	64	16	64	16	4	64	16	16	2	512	16	1
CBC 010	32	32	4	64	64	8	2	1	2	0,5	16	8	32	2	256	16	1
CBC 011	32	32	32	32	64	64	32	32	2	2	64	16	32	2	128	16	1
CBC 012	32	32	32	64	64	64	4	32	4	1	64	16	32	4	512	16	1
CBC 013	2	2	4	16	64	2	16	8	1	0,5	64	16	32	0,5	32	16	1
CBC 014	32	32	128	32	32	32	2	1	1	4	8	4	32	0,5	64	16	1
CBC 015	32	32	4	64	64	8	4	2	8	2	64	16	16	1	256	16	1
CBC 016	32	2	4	64	64	32	32	8	2	4	64	16	32	1	32	16	1
CBC 017	32	32	4	64	64	16	4	8	8	1	64	16	32	4	256	16	1
CBC 018	32	32	4	64	64	8	2	4	16	1	64	16	32	4	256	16	1
CBC 019	32	32	4	64	64	64	16	64	8	1	64	16	32	4	256	16	5
CBC 020	32	32	4	64	64	64	64	64	16	2	64	16	32	4	512	16	-
CBC 021	32	32	4	64	64	64	32	64	16	2	64	16	32	4	256	16	-
CBC 022	32	32	128	64	64	64	64	64	16	2	64	16	32	4	512	16	4
CBC 023	32	32	128	8	32	32	8	1	1	4	8	4	16	0,5	64	16	4
CBC 024	32	32	4	64	64	8	2	2	16	1	64	16	8	1	512	16	1
CBC 025	32	32	4	8	8	4	1	1	1	4	4	1	8	0,5	64	8	2
CBC 026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBC 027	32	32	4	64	64	8	2	2	8	1	64	16	8	1	512	16	1
CBC 028	32	32	4	64	64	16	2	2	8	1	64	16	32	2	256	16	3
CBC 029	32	32	4	64	64	16	4	1	2	4	8	4	32	2	64	16	2
CBC 030	32	32	4	64	64	16	4	1	2	4	8	4	32	2	64	16	2
CBC 031	32	32	4	64	64	8	2	4	16	1	64	16	32	2	512	16	5
CBC 032	32	32	4	64	64	8	2	2	8	1	64	16	16	1	256	16	5
CBC 033	32	32	4	64	64	16	4	32	16	8	64	16	8	1	256	16	4
CBC 034	32	32	4	64	64	8	4	8	16	1	64	16	16	2	512	16	3
CBC 035	32	32	4	64	64	16	4	32	16	8	64	16	8	1	256	16	4
CBC 036	32	32	128	8	32	64	8	1	1	1	8	4	2	0,3	64	16	1
CBC 037	32	8	4	4	4	1	1	1	1	0,3	2	1	2	0,3	16	0,5	1
CBC 038	32	32	4	64	64		4	8	1	2	64	16	32	4	256	16	5
CBC 039	32	32	4	64	64	8	4	1	4	1	16	16	16	0,5	512	16	2
CBC 040	32	32	128	64	64	64	64	64	16	8	64	16	32	4	256	16	1

CBC 041	16	4	4	2	8	8	16	2	1	0,5	2	16	32	0,3	16	16	1
CBC 042	32	32		64	64	64	8	8	2	2	64	16	32	0,5	64	16	1
CBC 043	32	32	128	64	64	64	8	8	16	8	64	16	16	1	512	16	1
CBC 044	32	32	4	16	64	4	32	8	1	1	64	16	32	0,5	64	16	1
CBC 045	32	16	4	8	8	32	8	1	1	0,5	4	1	4	0,5	32	8	1
CBC 046	32	32	16	64	64	64	8	8	2	4	64	16	32	0,5	128	16	1
CBC 047	2	32	4	32	64	2	32	32	1	0,5	64	16	32	0,5	32	16	1
CBC 048	32	32	4	16	32	1	1	1	4	0,3	2	1	32	4	256	16	2
CBC 049	32	32	32	64	64	64	4	32	16	8	64	16	32	4	512	16	5
CBC 050	32	32	32	64	64	64	8	64	16	4	64	16	32	4	512	16	1
CBC 051	32	32	32	64	64	64	8	64	16	4	64	16	32	4	512	16	1
CBC 052	32	32	128	64	64	64	4	64	16	4	64	16	32	4	512	16	2
CBC 053	32	32	32	64	64	32	64	64	16	8	64	16	32	4	512	16	1
CBC 054	32	32	32	64	64	32	1	8	1	8	64	16	32	4	512	16	1
CBC 055	32	32	32	64	64	32	4	16	16	4	64	16	32	4	256	16	3
CBC 056	32	32	4	64	64	64	2	1	2	1	8	4	8	0,5	64	16	1
CBC 057	32	32	4	32	64	8	8	8	2	0,5	64	16	32	0,5	64	16	4
CBC 058	32	32	128	64	64	64	32	64	16	16	64	16	4	1	512	16	1
CBC 059	32	32	128	64	64	64	32	64	16	16	64	16	4	1	512	16	1
CBC 060	32	2	4	16	64	1	8	8	1	0,5	64	16	32	0,5	32	16	1
CBC 061	32	32	128	64	64	64	8	8	16	2	64	16	16	1	512	16	1
CBC 062	32	32	4	64	64	4	4	1	1	4	16	8	32	4	256	16	2
CBC 063	32	32	4	64	64	16	4	8	4	1	64	16	32	4	512	16	2
CBC 064	32	32	4	64	64	32	4	8	8	1	64	16	32	4	512	16	2
CBC 065	32	32	8	64	64	64	2	1	2	4	8	8	8	1	128	16	2
CBC 066	32	32	8	64	64	64	2	1	2	0,5	8	8	8	0,5	128	16	1
CBC 067	2	2	4	16	64	4	32	8	1	1	64	16	32	0,5	32	16	1
CBC 068	4	2	4	64	4	1	1	1	1	0,3	2	1	2	0,3	256	16	1
CBC 069	32	16	4	8	8	1	1	1	1	0,3	2	1	4	0,5	32	4	2
CBC 070	32	32	4	8	8	32	2	1	1	0,5	4	1	4	0,5	64	4	2
CBC 071	32	32	4	8	8	32	2	1	1	0,5	4	1	4	0,5	64	16	2
CBC 072	32	32	128	64	64	64	64	64	16	8	64	16	32	4	256	16	1
CBC 073	32	32	128	64	64	64	64	64	16	8	64	16	32	4	512	16	2
CBC 074	32	32	128	64	64	64	64	64	16	8	64	16	32	4	256	16	4
CBC 075	32	32	16	64	64	64	4	8	8	2	64	16	16	1	512	16	1
CBC 076	32	32	4	64	32	8	8	1	1	0,5	4	8	4	0,3	256	16	1
CBC 077	32	32	4	64	32	8	8	1	1	0,5	4	8	8	0,3	256	16	1
CBC 078	2	2	4	16	64	2	8	8	1	0,5	64	16	32	0,5	32	16	1
CBC 079	32	32	4	64	64	64	4	4	16	1	64	16	16	0,5	256	16	1
CBC 080	32	16	4	4	8	1	1	1	1	0,3	2	1	4	0,5	16	0,5	2
CBC 081	32	8	4	4	4	1	1	1	1	0,3	2	1	4	0,5	16	0,5	1
CBC 082	32	32	4	64	64	8	4	2	8	1	16	16	4	0,3	512	16	1
CBC 083	32	32	128	64	64	64	8	32	16	16	64	16	8	1	512	16	1
CBC 084	32	32	16	64	64	64	4	8	16	2	64	16	16	1	512	16	1
CBC 085	32	32	4	64	64	8	16	1	2	1	64	4	32	4	256	16	1
CBC 086	32	32	4	16	32	64	2	1	1	0,5	8	4	8	0,5	64	16	1

CBC 087	32	32	4	64	64	64	4	4	16	1	64	16	16	0,5	512	16	1
CBC 088	32	64	4	64	64	2	8	1	1	2	64	32	32	0,3	512	16	1
CBC 089	32	32	4	32	64	64	8	32	16	2	64	16	32	4	256	16	1
CBC 090	32	32	4	16	32	64	0,5	4	16	1	32	16	32	0,5	256	16	1
CBC 091	32	32	4	64	64		0,5	64	16	1	32	16	32	0,3	256	16	2
CBC 092	32	32	4	64	64	64	8	4	16	1	64	16	8	1	512	16	1
CBC 093	32	32	4	64	64	64	4	4	16	1	64	16	16	0,5	512	16	1
CBC 094	32	4	4	16	64	1	2	1	1	0,3	64	16	32	0,5	16	16	1
CBC 095	32	32	128	64	64	64	64	64	16	1	64	16	32	4	512	16	4
CBC 096	32	32	4	64	64	16	4	8	1	0,3	16	8	32	2	512	0,5	2
CBC 097	32	32	4	64	64	64	4	4	16	1	64	16	16	0,5	512	16	1
CBC 098	32	32	4	64	64	8	4	4	16	1	64	16	4	0,3	512	16	1
CBC 099	32	32	4	64	64	64	4	4	16	2	64	16	16	0,5	512	16	1
CBC 100	32	32	128	64	64	64	4	4	8	1	64	16	8	0,3	256	16	1
CBC 101	32	32	4	64	64	8	4	1	16	2	64	16	16	1	512	16	1
CBC 102	32	32	4	64	64	8	2	4	16	1	64	8	8	0,3	256	16	1
CBC 103	32	32	128	64	64	64	8	8	32	1	64	8	16	0,5	512	16	1
CBC 104	32	8	4	4	4	1	1	1	1	0,3	2	1	2	0,3	16	0,5	1
CBC 105	32	32	128	64	64	64	64	64	4	0,5	64	16	32	2	128	0,5	6
CBC 106	32	32	32	64	64	64	4	4	8	1	32	16	8	0,3	256	16	1
CBC 107	32	32	4	64	64	32	4	4	8	1	2	1	16	0,3	512	16	1
CBC 108	32	32	4	64	64	32	4	4	8	1	2	1	16	0,5	512	16	1
CBC 109	32	32	4	64	32	32	4	2	8	1	2	1	16	0,5	256	16	1
CBC 110	32	32	32	64	64	64	4	8	16	8	32	16	8	0,5	512	16	1
CBC 111	32	32	128	64	64	64	4	4	2	2	64	16	8	1	512	16	2
CBC 112	32	32	4	64	64	8	2	4	1	1	16	16	32	0,5	512	16	1
CBC 113	32	32	4	16	32	4	2	1	1	0,3	8	4	2	0,3	128	16	1
CBC 114	32	32	4	64	64	64	4	8	8	1	2	2	16	0,3	512	16	2
CBC 115	32	32	4	64	64	16	2	2	8	1	64	16	4	0,3	512	16	1
CBC 116	32	32	4	16	32	4	2	1	1	0,5	8	4	2	0,3	128	16	1
CBC 117	32	32	2	64	64	64	4	8	8	1	2	2	16	1	512	16	2
CBC 118	32	32	4	64	64	32	2	1	1	1	32	4	2	0,3	128	16	1
CBC 119	32	32	4	64	64	32	2	1	1	1	32	4	2	0,3	128	16	1
CBC 120	32	32	4	64	64	32	8	1	1	1	32	4	2	0,3	128	16	1
CBC 121	32	32	128	64	16	32	16	8	2	1	32	8	4	0,3	256	16	1
CBC 122	32	32	64	64	16	32	1	2	1	0,3	16	4	2	0,3	128	16	2
CBC 123	2	8	4	2	4	1	16	1	1	0,3	2	1	32	0,3	256	16	1
CBC 124	2	2	2	2	4	1	4	8	0,5	0,5	1	16	32	4	16	16	2
CBC 125	2	2	2	2	4	1	8	1	1	0,3	2	1	32	0,3	32	16	1
Pao1	32	32	4	64	64	16	2	2	1	0,5	2	1	32	0,3	512	0,5	4
Pao1-mutS	32	32	16	64	64	64	8	4	1	1	16	4	32	0,3	512	2	5

Tabla 7. Calculo de distancias usando el algoritmo FST.

Valores de FST P	1	2	3
Hipermutadores (1)	-		
FQ Iniciales (2)	0.00000+-0.0000	-	
FQ Crónicos (3)	0.09910+-0.0344	0.03604+-0.0148	-

Resultados obtenidos empleando el programa informático *Arlequin 3.5*, los cálculos fueron desarrollados como un caso especial de estadísticas F-Wright, empleada en genética de poblaciones. El índice de fijación (FST) es una medida de la diferenciación de la población debido a la estructura genética (en nuestro caso asociado a las propiedades fenotípicas). El estudio se realizó en el Instituto IMBICE de La Plata, bajo el asesoramiento de la Dra. Cecilia I. Catanesi.

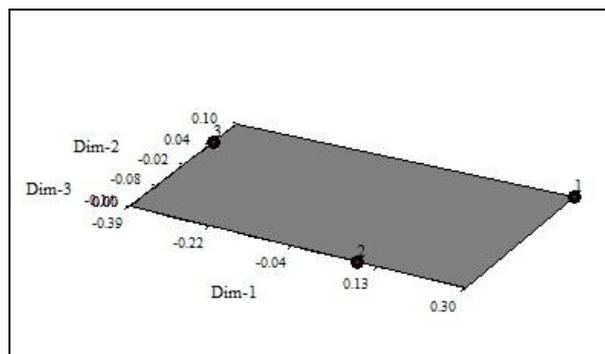


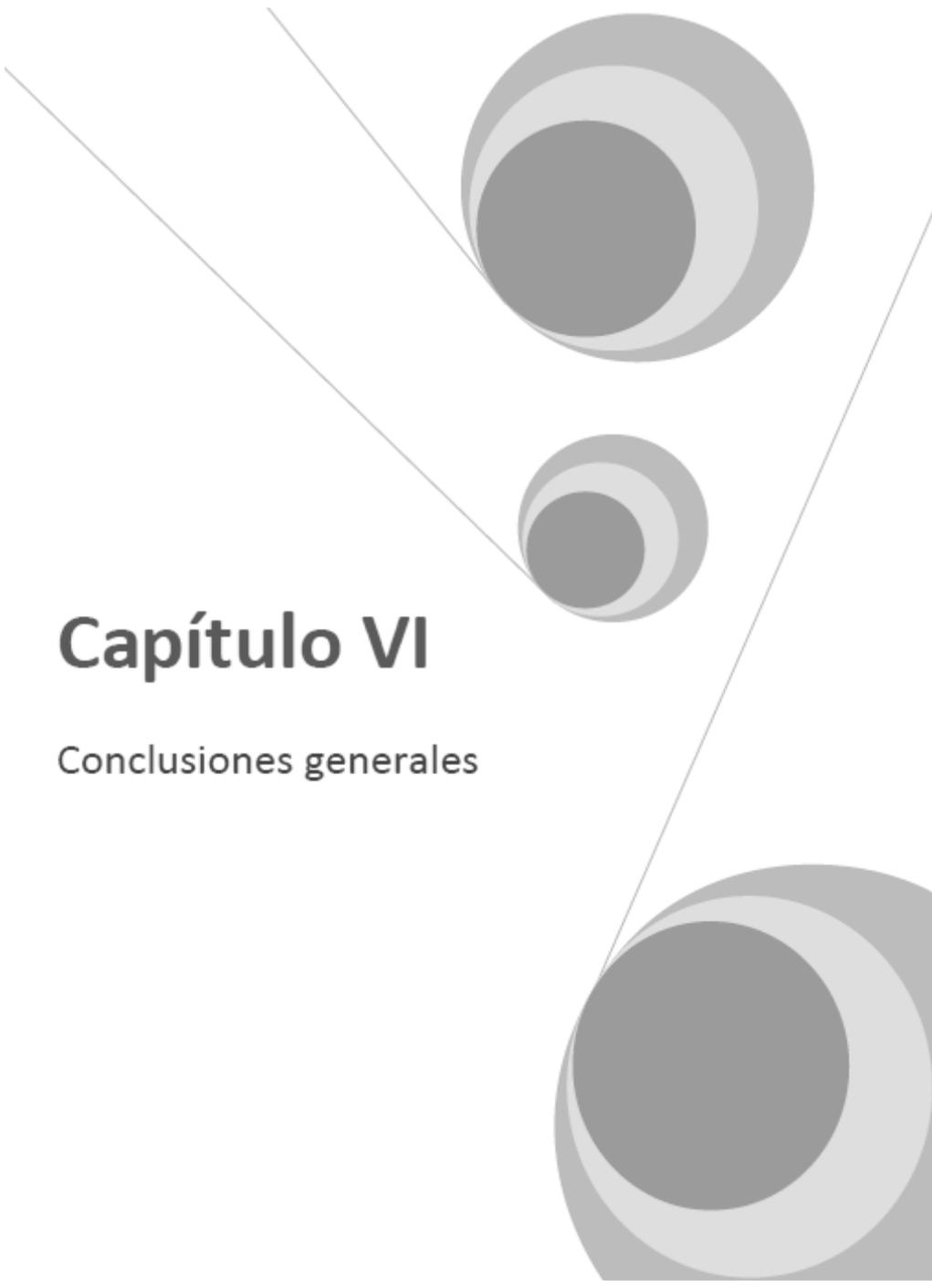
Figura 7. Diagramas de dispersión tridimensionales del espacio factorial, donde se puede observar de manera gráfica la contribución de cada carácter o variable a cada uno de los factores, que en este caso son solo los componentes principales. Obtenido aplicando el programa NTSYSpc ver.2.20N. (Gentileza, Lic. Laura Glesmann).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Baquero M, Nilsson AI, Turrientes C, Sandvang D, Martínez JL, Frimodt-møller N, Baquero F, Andersson DI.** 2004. Polymorphic Mutation Frequencies in *Escherichia coli*: Emergence of Weak Mutators in Clinical Isolates. *Journal of bacteriology* **186**:5538–5542.
2. **Chou H-H, Berthet J, Marx CJ.** 2009. Fast growth increases the selective advantage of a mutation arising recurrently during evolution under metal limitation. *PLoS genetics* **5**:e1000652.
3. **Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Høiby N.** 2005. Occurrence of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Is Associated with the Oxidative Stress Caused by Chronic Lung Inflammation. *Society* **49**:2276–2282.
4. **Cooper TF.** 2007. Recombination speeds adaptation by reducing competition between beneficial mutations in populations of *Escherichia coli*. *PLoS biology* **5**:e225.
5. **Denamur E, Giraud A, Duriez P, Hilali F, Amorin C, Bingen E, Andremont A, Picard B.** 2002. High Frequency of Mutator Strains among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates **184**:605–609.
6. **Eisenstadt, E., Carlton, B. C. & Brown BJ.** 1994. Gene mutation. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American S. Washington, DC.
7. **Excoffier L, Lischer HEL.** 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* **10**:564–7.
8. **Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM.** 2010. Mucoïdy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS one* **5**:1–12.
9. **Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW.** 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **168**:918–51.
10. **Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW.** 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* **168**:918–51.
11. **Giraud A, Matic I, Tenaillon O, Clara A, Radman M, Fons M, Taddei F.** 2001. Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut. *Science* **291**:2606–2608.
12. **Gutierrez O, Juan C, Oliver A.** 2004. Lack of Association between Hypermutation and Antibiotic Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Intensive Care Unit Patients. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **48**:3573–3575.
13. **Hogardt M, Schubert S, Adler K, Götzfried M, Heesemann J.** 2006. Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *International journal of medical microbiology*: *IJMM* **296**:313–20.
14. **Jolivet-Gougeon A, Kovacs B, Le Gall-David S, Le Bars H, Bousarghin L, Bonnaure-Mallet M, Lobel B, Guillé F, Soussy C-J, Tenke P.** 2011. Bacterial hypermutation: clinical implications. *Journal of medical microbiology* **60**:563–73.
15. **Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus V a, Govan JRW.** 2007. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**:1852–9.
16. **Kumar P, Henikoff S, Ng PC.** 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* **4**:1073–81.

17. **LeClerc J, Li B, Payne W, Cebula T.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**:1208–11.
18. **Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**:194–222.
19. **Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A.** 2005. Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Chronic Lung Infections. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **49**:3382–3386.
20. **Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A.** 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *Journal of bacteriology* **190**:7910–7.
21. **Miller JH.** 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annual review of microbiology* **50**:625–43.
22. **Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tümmler B, Cariani L, Conese M, Döring G, Bragonzi A.** 2007. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**:1445–54.
23. **Morosini M, Baquero M, Sanchez-Romero JM, Negri M, Campo R, Pérez-Díaz JC, Baquero F.** 2003. Frequency of Mutation to Rifampin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Strains: hexA and hexB Polymorphisms Do Not Account for Hypermutation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**:1464–1467.
24. **NCCLS.** 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A. Wayne, PA.
25. **NCLSI.** 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement Clinical a. Pennsylvania, USA.
26. **Neill AJO, Cove JH, Chopra I.** 2001. Brief reports *Staphylococcus aureus* 647–650.
27. **Niumsop P.** 2002. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**:445–455.
28. **Oliver a, Mena a.** 2010. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **16**:798–808.
29. **Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blázquez J.** 2000. High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science* **288**:1251–1253.
30. **Oliver A, Mena A, Maciá MD.** 2007. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity: from acute to chronic infections, p. 433–444. *In* Baquero, C, Nombela, G, Cassell, H, Gutiérrez, JA (eds.), *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*. ASM Press, Washington, DC.
31. **Oliver A, Baquero F, Blázquez J.** 2002. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molecular microbiology* **43**:1641–50.
32. **Poirel L, Rodriguez-Martinez J-M, Plésiat P, Nordmann P.** 2009. Naturally occurring Class A ss-lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:876–82.
33. **Prunier A, Malbrunty B, Laurans M, Brouard J, Duhamel J, Leclercq R.** 2003. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis.* **187**:1709–16.

34. **Rainey PB, Travisano M.** 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**:69–72.
35. **Rodríguez-Rojas A, Blázquez J.** 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* *pfpl* gene plays an antimutator role and provides general stress protection. *Journal of bacteriology* **191**:844–50.
36. **Román F, Cantón R, Pérez-Vázquez M, Baquero F, Campos J.** 2004. Dynamics of Long-Term Colonization of Respiratory Tract by *Haemophilus influenzae* in Cystic Fibrosis Patients Shows a Marked Increase in Hypermutable Strains. *J Clin Microbiol* **42**:1450–1459.
37. **Rose H, Baldwin A, Dowson CG, Mahenthiralingam E.** 2009. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**:502–10.
38. **Römling, U., B. Fiedler, J. Bobhammer, D. Grothues, J. Greipel H Von der, Hart and BT.** 1994. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa*, infections in cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **170**:1616–1621.
39. **Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D’Argenio D a, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson M V.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:8487–92.
40. **Speert DP.** 2002. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatr Respiratory Reviews* **0542**:230–235.
41. **Stewart FM.** 1994. Tests: How Reliable Are the Estimates of **1146**:1139–1146.
42. **Turrientes MC, Baquero MR, Sánchez MB, Valdezate S, Escudero E, Berg G, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Martínez JL.** 2010. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. *Applied and environmental microbiology* **76**:1746–58.
43. **Ventre, I., A. L. Goodman, I. Vallet-Gey, P. Vasseur, C. Soscia, S. Molin S, Bleves, A. Lazdunski, S. Lory and AF.** 2006. Multiple sensors control Virulence, reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:171–176.
44. **Zaleski P, Piekarowicz A.** 2004. Characterization of a *dam* mutant of *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiology (Reading, England)* **150**:3773–81.
45. **Zhou J, Chen Y, Tabibi S, Alba L, Garber E, Saiman L.** 2007. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**:1085–8.

The graphic features three overlapping circles of varying sizes, each composed of concentric layers in shades of gray. Two thin lines intersect at a point, forming a V-shape that frames the circles. The largest circle is at the top, a smaller one in the middle, and another large one at the bottom right.

Capítulo VI

Conclusiones generales

Conclusiones Generales

El problema que trae aparejado la falta de un diagnóstico certero y rápido de los patógenos respiratorios en pacientes fibroquísticos tiene un fuerte impacto en el tratamiento antimicrobiano, en el control de infecciones y principalmente en la calidad de vida y sobrevida de estos pacientes. En el caso particular de los organismos del complejo *Burkholderia cepacia*, que colonizan a estos pacientes, son ampliamente reconocidas las dificultades y limitaciones de los métodos bioquímicos tradicionales para su identificación. En los últimos años se han puesto muchos esfuerzos en desarrollar nuevos métodos de identificación rápidos, sencillos y de bajo costo que permitan la diferenciación e identificación inequívoca de bacilos no fermentadores, pertenecientes y no pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*. Este trabajo de Tesis fue concebido con la idea de avanzar en el conocimiento general sobre las técnicas de identificación, las características genotípicas y fenotípicas de organismos del complejo *B. cepacia* y a su vez resolver problemas de diagnóstico del sector hospitalario y epidemiológicos de nuestro País.

La aplicación de la técnica de PCR, RFLP-*HaeIII* y secuenciación de gen *recA*, *gyrB* y *lepA* (genes de la técnica MLST), sobre la colección de aislados recuperados durante más de 10 años de vigilancia en 2 centros de referencia de pacientes FQ y 5 hospitales públicos, permitió definir la distribución de especies dentro de los aislados clínicos pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia* que producen infecciones pulmonares en pacientes fibroquísticos no fibroquísticos. En contraste a la epidemiología mundial, *Burkholderia contaminans*, resultó ser la especie predominante del complejo *B. cepacia* en aislamientos clínicos en nuestro país. Los resultados alcanzados fueron publicados en revistas de referato internacional, en revistas de la clínica nacional y pudieron ser transferidas de manera exitosa al sector hospitalario. En particular, el servicio de Bacteriología del Hospital de Niños de La Plata, Sor Maria Ludovica aplica actualmente los avances logrados en este sentido en sus diagnósticos microbiológicos.

Nuestras investigaciones pusieron en evidencia la diversidad genética y la capacidad de *B. contaminans* para establecer infecciones crónicas en pacientes FQ. El uso de técnicas de rep-PCR, como método de tipificación de cepas mostró ser eficiente

para detectar la diversidad genética en los aislados recuperados durante el periodo de vigilancia, permitiendo dar respuesta a preguntas relacionadas con el origen clonal de un brote hospitalario ocurrido en el año 2004, como también ser una herramienta para monitorear la “evolución” de los organismos que participan de la infección crónica en general y en cada paciente. Dentro de las características genotípicas analizadas, la búsqueda de marcadores de transmisibilidad como BCSEM mostró que si bien un alto % de cepas transmisibles mostraban la presencia de dicho gen, no todas las cepas transmisibles eran portadoras del mismo. Esos resultados estarían de acuerdo con la idea de que el marcador BCSEM por sí solo no cubre la totalidad de las cepas transmisibles, pero la aplicación de estos cebadores permite una rápida y sencilla identificación de cepas transmisibles circulantes, reduciendo el riesgo de infección paciente-paciente entre la población con FQ.

Las técnicas de *fingerprinting* en combinación con técnicas de espectroscopia IR con transformada de Fourier demostraron ser complementarias para estudiar la evolución de cepas colonizantes en el pulmón del paciente FQ, permitiendo obtener evidencias de una reducción de la diversidad genotípica y un aumento de la diversidad fenotípica, muy probablemente por la adaptación que ocurre durante el curso de la infección crónica en el pacientes FQ. La respuesta adaptativa de estas poblaciones microbianas a lo largo de la infección crónica debido a las presiones de selección, en particular las derivadas de los mecanismos de defensa propios del sistema inmune, la terapia antimicrobiana, y la impuesta por un ambiente limitado en oxígeno, aun no han sido aclaradas en especies del complejo B. cepacia. Sin embargo en este sentido los avances en *Pseudomonas aeruginosa*, han dado indicios sobre muchas de las características fenotípicas podrían adoptar los organismos del complejo durante la adaptación en la infección crónica. En ese contexto nosotros avanzamos en la descripción de características fenotípicas (secreción de exoenzimas, producción de EPS, expresión de moléculas de QS, formación de *biofilm*), sobre las bacterias que están colonizando de manera crónica el pulmón de pacientes FQ. Los resultados en general muestran una clara tendencia a la disminución de la expresión de las características mencionadas en los aislados denominados crónicos en comparación a aquellos correspondientes a infecciones iniciales o de infecciones transcientes. Sin embargo, la formación de *biofilm* parecería ser una característica que no se modificó, posiblemente porque en esencia, esta sea la responsable de su persistencia. En general las

características observadas podrían explicarse como adaptaciones de las bacterias al ambiente con el objetivo de “no despertar” el sistema inmune o evitar la acción de antimicrobianos. Estas adaptaciones podrían darse a través de (i) regulación genética o (ii) podrían ser respuesta a la acumulación de mutaciones puntuales en un ambiente bajo presión.

La infección respiratoria crónica con *P. aeruginosa* en la fibrosis quística fue el primer modelo natural para revelar la alta prevalencia y el papel importante de mutadores. El desarrollo de resistencia a antimicrobianos y adaptación de las bacterias durante infecciones crónicas están entre los más relevantes rasgos evolutivos vinculados hasta la fecha a hipermutación en esencia. Nosotros en este trabajo no observamos una asociación entre la hipermutación y la resistencia antibiótica. Sin embargo, es importante destacar en nuestro estudio que la presencia de cepas hipermutadoras en especies del complejo *Burkholderia cepacia* nunca antes en nuestro conocimiento habían sido evaluadas y reportadas en la bibliografía.

Finalmente, como conclusiones destacables de esta tesis podemos decir:

1. El cuadro epidemiológico de especies del complejo *Burkholderia cepacia* recuperadas de pacientes FQ de nuestro país está compuesto por 8 especies (*B. contaminans*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. seminalis* y *B. ambifaria*).
2. *Burkholderia contaminans* es la especie prevalente dentro del complejo *Burkholderia cepacia* recuperados de muestras clínicas y ambientales en Argentina.
3. No todos los genotipos de *Burkholderia contaminans* son capaces de infectar de manera crónica pacientes FQ.
4. Técnicas de Box-PCR en combinación con espectroscopia FT-IR mostraron ser herramientas complementarias para detectar diversificación fenotípica en una serie de aislados de *B. contaminans* recuperados de un mismo paciente.

5. *B. contaminans* puede sintetizar C₈-HSL y esta propiedad no está directamente relacionada con la capacidad de formación de biofilm en superficies abióticas.
6. Se observó una reducción significativa en el nivel de expresión de las características fenotípicas vinculadas a la patogenia de *B. contaminans* en los aislados recuperados de infecciones crónicas.
7. La presencia de cepas hipermutadoras en especies del complejo *Burkholderia cepacia* están asociadas a las infecciones crónicas.