

Comparación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de especies del Taxón K perteneciente al complejo *Burkholderia cepacia*

Comparison of selective culture media for the isolation of Taxon K species belonging to the *Burkholderia cepacia* complex

María A. López De Volder¹; Verónica Pioli¹; Noelia Breglia¹; Sergio Teves¹; José Degrossi²

1. Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Argentina

2. Cátedra de Salud Pública e Higiene Ambiental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Argentina

<http://dx.doi.org/10.30827/ars.v60i2.8312>

Artículo original Original Article

Correspondencia Correspondence

José Degrossi. Junín 956, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: jdegrossi@ffyb.uba.ar

Financiación Fundings

Los fondos para la realización del presente trabajo fueron aportados por la cuenta "Métodos Microbianos" administrada bajo el ámbito de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Conflicto de interés Competing interest

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos Acknowledgements

Agradecemos a la Universidad de Buenos Aires las instalaciones y el equipamiento para realizar este trabajo. Agradecemos a la Dra. Laura Galanternik (Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez), Dra Claudia Hernández (Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan), Dr. Carlos Vay (Hospital de Clínicas José de San Martín) las cepas de origen clínico usadas en este estudio. Agradecemos al Dr. Matías Messina sus aportes y opiniones para el mejoramiento del presente trabajo.

Received: 04.12.2018
Accepted: 17.04.2019

RESUMEN

Objetivo: Dentro del complejo *Burkholderia cepacia* (cBc), el Taxón K, integrado por *B. contaminans* y *B. lata*, es frecuentemente aislado de muestras clínicas e industriales. Los métodos para aislar bacterias del cBc están consensuados en el ámbito clínico pero no para muestras de origen industrial y tampoco hay información documentada sobre la capacidad de recuperación de los medios de cultivo frente a especies del Taxón K.

Dada la importancia del uso correcto de medios selectivos para la recuperación de microorganismos, el objetivo de este trabajo fue comparar el agar Trypan Blue-Tetraciclina (TB-T), el agar selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA) y el BCSA comercial modificado (BCSA_m) en el aislamiento de cepas del Taxón K.

Métodos: empleamos el método ecométrico utilizado en el control de calidad de medios de cultivo. Analizamos criterios de productividad, selectividad y especificidad frente a cepas de referencia del cBc, aislamientos clínicos e industriales del Taxón K y cepas de otras especies.

Resultados: no se observaron diferencias de productividad y selectividad entre los medios BCSA. Con ambos se obtuvo adecuada productividad y selectividad parcial por permitir el crecimiento de especies taxonómicamente cercanas al cBc. El medio TB-T presentó menor productividad (especialmente con *B. contaminans*) y menor selectividad. Por otra parte, no se observaron diferencias atribuibles al origen clínico o industrial de los aislamientos.

Conclusión: los resultados permiten sugerir al BCSA o BCSA_m como los medios selectivos de elección para el aislamiento del Taxón K, tanto en muestras de origen clínico como industrial.

Palabras clave: complejo *Burkholderia cepacia*; medios de cultivo

ABSTRACT

Objective: Within the *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), the so called Taxon K, integrated by *B. contaminans* and *B. lata*, is frequently isolated from clinical and industrial samples. There is consensus in the use of culture media for the isolation of Bcc from clinical origin but not for industrial samples. By the other side there is no documented information about the performance of culture media recovering Taxon K species.

Regarding the importance of the proper use of selective media in the recovery of microorganisms from clinical and industrial samples, the objective of this work was to compare Trypan Blue-Tetracycline agar (TB-T), *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA) and commercial modified *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA_m) in the isolation of Taxon K strains.

Methods: we employed the ecometric method for culture media quality control. Productivity, selectivity and specificity criteria were analyzed by testing Bcc reference strains, clinical and industrial Taxon K isolates and non Bcc strains.

Results: no differences in terms of productivity and selectivity were observed between BCSA and BCSA_m. Both medium, displayed adequate productivity and partial selectivity since the growth of

non Bcc isolates was observed. Productivity (especially with *B. contaminans* isolates) and selectivity in TB-T was lower than BCSA medium. No differences were observed related to the clinical or industrial origin of isolates.

Conclusion: results allow us to suggest BCSA or BCSAm selective media for the isolation of Taxon K strains in clinical or industrial samples.

Keywords: *Burkholderia cepacia* complex; culture media

INTRODUCCIÓN

El complejo *Burkholderia cepacia* (cBc) está formado por al menos 20 especies de microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y desde la década del 80 han sido reportados como patógenos oportunistas para el ser humano^{1,2}. El grupo poblacional más afectado por estos microorganismos son los pacientes con fibrosis quística (FQ), a los que pueden causar desde infecciones respiratorias crónicas hasta el llamado "síndrome cepacia" caracterizado por un rápido deterioro de la salud, muchas veces con consecuencias fatales³. También se han reportado en forma cada vez más frecuente, infecciones intrahospitalarias por el uso de productos contaminados^{4,5,6}. Los miembros del cBc son resistentes a un gran número de antibióticos por lo que la prevención de las infecciones con estos microorganismos es una constante preocupación⁷.

La distribución de especies del cBc es variable según la región y el nicho estudiado. En Canadá, EEUU y parte de Europa, *B. multivorans* y *B. cenocepacia* son prevalentes en pacientes FQ^{8,9,10}. Sin embargo en otros países como Argentina, España y Portugal, *B. contaminans* está emergiendo como la especie más frecuentemente aislada^{11,12,13}. Esta última especie, junto a *B. lata*, integran un subgrupo dentro del cBc denominado Taxón K¹⁴.

Paralelamente a la situación clínica descrita anteriormente, otro aspecto negativo del cBc es la capacidad de sobrevivir y contaminar productos industriales. La presencia de estos microorganismos ha sido reportada en productos de limpieza, cosméticos, desinfectantes, y fármacos^{15,16}. En este aspecto, los miembros del Taxón K son detectados habitualmente como contaminantes y *B. lata* ha sido tomada como referencia en estudios sobre efectividad de conservadores y mecanismos de resistencia a los mismos^{2,14,17}. Por otro lado se han reportado infecciones con *B. contaminans* asociadas al uso de productos contaminados en países como Alemania y EEUU^{4,18,19}.

A pesar del potencial riesgo sanitario que implica el cBc como contaminante, la búsqueda de estos microorganismos en el control microbiológico de fármacos, cosméticos y desinfectantes no es obligatoria y no existe una metodología validada para tal fin²⁰.

Existen diversos medios selectivos para el aislamiento del cBc. Uno de los más usados, especialmente en clínica, es el agar selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA)²¹. Existe además, una versión comercial de este medio (BCSA modificado), que posee una menor concentración de colorantes que el medio original. Otro medio es el Agar Trypan Blue-Tetraciclina (TB-T) que ha sido empleado en investigaciones del cBc en ambientes naturales^{22,23}.

Los medios de cultivo para el aislamiento del cBc fueron desarrollados previamente a la definición del Taxón K, y si bien está aceptado que los mismos son adecuados para la recuperación de *B. contaminans* y *B. lata*, existe muy poca documentación al respecto. Además, tampoco existen estudios que indiquen la efectividad de tales medios de cultivo en la búsqueda del cBc en el ámbito industrial.

En este trabajo evaluamos la utilidad de los medios TB-T, BCSA y BCSAm para la recuperación de microorganismos del Taxón K mediante un análisis comparativo en términos de productividad, selectividad y especificidad frente a cepas de referencia del cBc, una colección de aislamientos del Taxón K y especies ajenas al cBc.

Para estudiar la posible influencia del origen de los aislamientos en la capacidad de recuperación de los medios de cultivo, incluimos aislamientos de *B. contaminans* y *B. lata* obtenidos de pacientes FQ, no FQ y del ámbito industrial. El estudio se realizó utilizando el método ecométrico, que es ampliamente empleando en los laboratorios microbiológicos de diferentes industrias para el control de medios de cultivo²⁴.

MÉTODOS

Cepas

Se utilizaron cepas de referencia del cBc y aislamientos de *B. contaminans* y *B. lata* obtenidos de diversos orígenes. Además, se emplearon cepas de *Achromobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia gladioli*, distintas especies de *Pseudomonas*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marsecens*, *Staphylococcus aureus* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Los aislamientos del cBc fueron identificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *recA* usando los primers BCR1 y BCR2 en las condiciones descritas originalmente²⁵. La asignación de especie fue realizada mediante secuenciación del amplicón del gen *recA* obtenido en la reacción de PCR y la comparación de dichas secuencias con secuencias depositadas en GenBank utilizando el *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Medios de cultivo

Se analizaron tres medios de cultivo selectivos para el aislamiento del cBc: el Agar Selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA: cloruro de sodio 5g/L, sacarosa 10g/L, lactosa 10g/L, tripteína 10g/L, extracto de levadura 1,48g/L, bacto-agar 16g/L, solución de cristal violeta 0,02% 10ml/L, solución de rojo fenol 0,8% 10 ml/L, polimixina B 600.000U/L, gentamicina 10mg/L, vancomicina 2,5mg/L)²¹; el Agar Selectivo para *Burkholderia cepacia* comercial modificado (BCSA m - Laboratorio Britania S.A., Argentina). Este medio posee igual composición que el BCSA pero con menor concentración de colorantes (solución de cristal violeta 0,02% 1ml/L, solución de rojo fenol 0,25ml/L); y el Agar Trypan Blue Tetraciclina (TB-T: glucosa 2g/L, bacto-agar 20g/L, L-asparagina 1g/L, bicarbonato de sodio 1g/L, fosfato monobásico de potasio 0,5g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 0,1g/L, trypan blue 0,05g/L, tetraciclina 0,02g/L)²².

Se emplearon además, Agar Tripteína Soja (TSA) (Laboratorio Britania S.A., Argentina) y Caldo Cerebro Corazón (Merck Química Argentina S.A.).

Comparación de medios de cultivo

Se utilizó el método ecométrico de Mossel²⁴. A partir de repiques frescos de las cepas a estudiar, se inocularon con una anzada, tubos con 5 mL de caldo cerebro corazón y se incubaron a 30°C durante 6 hs. Las placas preparadas con los medios a ensayar se dividieron en cuatro; cada cuarto se rotuló con una letra (A, B, C, D) y se trazaron líneas paralelas (figura 1). Con anza calibrada, se sembraron 5 uL de la suspensión microbiana crecida en el caldo cerebro corazón sobre las líneas marcadas, siguiendo el orden A1, A2, A3, A4, B1, B2, hasta D4 y finalmente un trazo en el centro de la placa. La misma operación se realizó con todas las cepas a ensayar en los tres medios de cultivo descritos anteriormente (BCSA, BCSAm y TB-T) y en TSA. Las placas se incubaron durante 48 hs a 30°C, registrándose datos a las 24 hs y a las 48 hs de incubación.

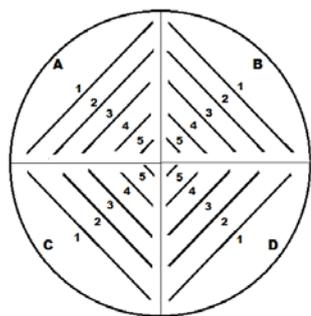


Figura 1. Esquema de siembra de placas en método ecométrico según Mossel

El registro del último trazo en donde se observó crecimiento en cada una de las placas se usó para determinar los índices de crecimiento absoluto (ICA) según valores expresados en Tabla 1 y los índices de crecimiento relativo (ICR) según la siguiente ecuación:

$$\text{ICR} = \text{ICA (en placa de ensayo)} \times 100 / \text{ICA (en placa control)}$$

El ICA en placa control corresponde al índice de crecimiento absoluto obtenido en las placas de TSA.

Tabla 1. Índices de crecimiento absoluto

Sector	ICA	Sector	ICA	Sector	ICA	Sector	ICA
A1	5	B1	10	C1	15	D1	20
A2	25	B2	30	C2	35	D2	40
A3	45	B3	50	C3	55	D3	60
A4	65	B4	70	C4	75	D4	80
A5	85	B5	90	C5	95	D5	100

ICA: Índice de Crecimiento Absoluto.

Valor asignado al último trazo de crecimiento bacteriano según el método ecométrico de Mossel

Los ensayos se realizaron en duplicado por operadores diferentes. Cuando se obtuvieron más de tres trazos de diferencia en el crecimiento de los duplicados, el ensayo fue descartado y realizado nuevamente.

Criterios de evaluación de los medios: se tuvieron en cuenta tres parámetros utilizados en el control de calidad de medios de cultivo según criterios previamente establecidos²⁶:

i) *Productividad*: definida como la capacidad de recuperación de los microorganismos de interés. Para este estudio consideramos productividad apropiada, cuando se obtuvieron valores de ICR superiores a 70. ii) *Selectividad*: dada por la inhibición del crecimiento de microorganismos que no son de interés. Se consideró selectividad adecuada cuando el ICR de aislamientos no pertenecientes al cBc fue inferior a 25. iii) *Especificidad*: se asocia a la diferenciación de las colonias de los microorganismos de interés por alguna característica determinada (morfología tamaño, color, etc). Dado que muchos aislamientos de *B. contaminans* presentan pigmentación amarillo verdoso en ciertas condiciones de crecimiento, se evaluó el color de las colonias y la facilidad de observación del mismo.

Tratamiento estadístico de los resultados

Se utilizó el Método no Paramétrico de muestras apareadas de Wilcoxon para comparar el desarrollo de las cepas en estudio en cada uno de los medios y el método de Análisis de

la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis para evaluar si existen diferencias en la performance de los medios de cultivo entre los tres grupos de cepas (de referencia, industriales y clínicas).

RESULTADOS

En la mayoría las cepas se observó adecuado crecimiento en TSA, evidenciado por valores de ICA superiores a 70 a las 24hs de incubación y de 90 a las 48 hs. Sólo dos aislamientos de *B. contaminans* (FFH 2050 obtenido de un paciente FQ y FFH 2026 aislado del ambiente hospitalario) mostraron bajo ICA en TSA con valores inferiores a 60 a las 24 hs y de 80 a las 48 hs de incubación.

El crecimiento en los medios BCSA, BCSAm y TB-T se analizó a través del ICR (Tabla 2). En todos los casos, el crecimiento en los medios analizados arrojó ICAs inferiores o iguales al ICA obtenido en TSA.

Productividad:

En los tres medios de cultivo la productividad resultó mayor a las 48 hs que a las 24 hs de incubación ($p < 0.001$). Asimismo se observó mejor recuperación en los medios BCSA y BCSAm que en el medio TB-T ($p < 0.001$). Los dos medios BCSA mostraron similar productividad tanto con cepas de referencia como con aislamientos del Taxón K. Con 24 hs. de incubación 50% de las cepas ensayadas fueron adecuadamente recuperadas en BCSA; mientras que en BCSAm el mismo resultado se obtuvo en 50% y 57,7% de las cepas de referencia y aislamientos del Taxón K respectivamente. Al incubar durante 48hs, los ICRs de todas las cepas del cBc fueron mayores a 70 en ambos medios.

En la mayoría de los aislamientos del cBc, el ICR obtenido en TB-T resultó significativamente inferior a los alcanzados en los dos medios BCSA. Sólo una cepa (*B. cenocepacia* B) alcanzó un ICR de 75 en el medio TB-T a las 24 hs de incubación. En tanto que a las 48 hs, en el 66,7% de las cepas de referencia y en 77% de los aislamientos se verificó una productividad adecuada. Con la cepa de referencia de *B. pyrrocinia* y con cinco aislamientos de *B. contaminans* los ICRs obtenidos en TB-T fueron menores a 25 aún a las 48 hs

de incubación. Dentro del taxón K, con todos los aislamientos de *B. lata* se obtuvo adecuada productividad a las 48 hs, en contraste con *B. contaminans* que arrojó valores de ICR inferiores a 70 en el 55% de las cepas estudiadas.

Teniendo en cuenta si el origen de los aislamientos es de pacientes o de otra fuente (productos industriales, agua, ambiente hospitalario), no hubo diferencias de productividad a las 48hs.de incubación en cada uno de los medios ensayados ($p > 0.45$).

Selectividad:

A las 48 hs de incubación, los tres medios evaluados evidenciaron selectividad frente a las cepas ensayadas de *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, el medio TB-T resultó el menos selectivo debido a los ICRs con valores mayores a 25 obtenidos en mayor cantidad de cepas de otras especies (*Achromobacter* sp., *Burkholderia gladioli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* y *Stenotrophomonas maltophilia*) (Tabla 2).

Por otro lado, los medios BCSA mostraron selectividad similar entre sí. Dicha selectividad no fue completa ya que se observaron valores de ICR superiores a 25 con los aislamientos ensayados de *Achromobacter* sp., *Burkholderia gladioli*, *Pseudomonas stutzeri*, *Proteus vulgaris* y *Serratia marcescens*.

Especificidad:

La cepa de *B. cepacia* ATCC25416^T y el 90,5% de los aislamientos de *B. contaminans* estudiados desarrollaron pigmentación amarillo verde cuando crecieron en TSA. Este mismo pigmento fue observado en los medios evaluados aunque en menor cantidad de cepas (*B. cepacia* ATCC25416^T y 66,6% de los aislamientos de *B. contaminans* en los medios BCSA; *B. cepacia* ATCC25416^T y 61,9% de los aislamientos de *B. contaminans* en TB-T). En este aspecto, si bien es un dato subjetivo que depende de los operadores, cabe señalar que la visualización del pigmento en el medio BCSAm resultó más evidente que en el medio BCSA.

Tabla 2. Índice de crecimiento relativo de las cepas empleadas en este estudio

Especie	Cepa	Origen	BCSA		BCSA m		TB-T	
			24hs	48hs	24hs	48hs	24hs	48hs
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416 ^T	Cebolla	65,0	95,0	62,5	95,0	12,5	75,0
<i>B. multivorans</i>	LMG13010 ^T	PFQ	40,6	87,5	31,3	87,5	12,5	72,5
<i>B. cenocepacia A</i>	LMG18863	PFQ	85,8	100,0	77,3	97,5	11,4	45,0
<i>B. cenocepacia B</i>	LMG16654	PFQ	69,5	97,5	72,2	100,0	83,3	100,0
<i>B. stabilis</i>	LMG18870	PFQ	71,8	100,0	64,1	100,0	12,9	100,0
<i>B. vietnamiensis</i>	LMG10929 ^T	Suelo	77,5	100,0	67,7	100,0	12,9	73,9
<i>B. dolosa</i>	LMG21820	PFQ	67,7	100,0	70,6	100,0	8,8	75,0
<i>B. ambifaria</i>	LMG19467	PFQ	94,6	100,0	92,0	100,0	24,4	95,0
<i>B. anthina</i>	LMG20983	PFQ	56,7	100,0	64,8	100,0	8,1	37,5
<i>B. pyrrocinia</i>	ATCC15958 ^T	Suelo	66,7	92,5	58,3	97,5	2,8	10,0
<i>B. ubonensis</i>	LMG20358 ^T	Suelo	79,4	97,5	70,6	100,0	20,6	50,0
<i>B. contaminans</i>	LMG23361 ^T	Oveja con mastitis	72,8	100,0	75,7	97,5	21,3	90,0
	FFI-6	Agua purificada	63,6	97,5	63,8	100,0	6,1	72,5
	FFI-10	Agua destilada	95,0	97,5	87,5	97,5	12,5	57,5
	FFI-15	Limpiador desinfectante	56,7	90,0	62,3	87,5	5,4	25,0
	FFI-28	Producto farmacéutico	25,0	94,9	16,7	92,4	13,9	25,7
	FFI-29	Producto farmacéutico	24,1	100,0	24,3	100,0	12,1	15,0
	FFI-30	Producto farmacéutico	87,5	100,0	93,8	102,6	6,3	43,6
	FFI-33	Crema cosmética	78,9	100,0	82,0	97,5	27,2	87,5
	FFI-34	Producto farmacéutico	65,8	100,0	60,5	100,0	39,5	82,5
	FFI-35	Agua purificada	97,2	100,0	94,4	100,0	8,5	60,0
	FFI-40	Agua purificada	83,8	100,0	89,2	100,0	37,9	100,0
	FFI-41	Agua purificada	58,8	100,0	67,6	100,0	29,4	62,5
	FFH-1026	PNFQ	69,4	100,0	83,3	100,0	11,1	82,5
	FFH-1050	PNFQ	76,4	100,0	91,7	100,0	0,0	7,8
	FFH-2026	Ambiente hospitalario	84,5	100,0	94,1	100,0	12,5	57,5
	FFH-2004	PFQ	77,7	100,0	90,4	100,0	35,6	85,0
	FFH-2022	PFQ	43,9	100,0	44,2	96,7	44,2	83,3
	FFH-2050	PFQ	19,2	100,0	11,5	100,0	3,8	16,7
FFH-2053	PFQ	82,5	100,0	87,5	100,0	20,0	70,0	
FFH-2057	PFQ	50,0	100,0	63,2	97,5	28,9	100,0	
FFH-6002	Gel de ecografía	45,6	100,0	27,4	100,0	6,1	25,0	
<i>B. lata</i>	FFI-17	Limpiador desinfectante	96,9	100,0	100,0	100,0	31,3	97,4
	FFI-18	Limpiador desinfectante	71,9	100,0	77,9	100,0	15,6	92,5
	FFI-20	Limpiador desinfectante	97,1	100,0	100,0	100,0	8,8	70,0
	FFI-21	Limpiador desinfectante	62,1	100,0	73,0	100,0	10,8	97,5
	FFH-2067	PFQ	55,6	97,5	61,1	100,0	33,3	87,5
	FFH-2074	PFQ	82,4	100,0	76,1	100,0	64,7	95,0
<i>Achromobacter spp.</i>	FFH-Ac2001	PFQ	5,9	50,0	5,9	52,5	26,5	67,5

<i>Acinetobacter baumannii</i>	FFH-Ab2002	PNFQ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5
<i>Burkholderia gladioli</i>	FFH-2071	PNFQ	85,3	95,0	50,0	95,0	14,7	75,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	Infección oído	0,0	0,0	0,0	0,0	30,6	85,0
	ATCC27853	Hemocultivo	0,0	0,0	0,0	0,0	13,2	87,5
	FFI-157	Limpiador desinfectante	0,0	0,0	0,0	0,0	19,4	82,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FFI-178	Limpiador desinfectante	0,0	22,5	2,9	25,0	11,8	22,5
<i>Pseudomonas putida</i>	FFI-180	Agua purificada	3,1	17,5	0,0	17,5	0,0	67,5
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	FFA-13	Agua de río	10,5	80,0	10,5	72,5	5,3	80,0
<i>Proteus vulgaris</i>	FFA-22	Agua de río	27,8	72,5	22,2	67,5	11,1	62,5
<i>Serratia marcescens</i>	FFH-S2003	PNFQ	0,0	77,5	6,3	80,0	21,9	97,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC658	PNFQ	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Stenotrophomas maltophilia</i>	FFH-Sm2011	PFQ	0,0	0,0	0,0	0,0	35,3	95,0

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas (USA); LMG: Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (Belgium); PFQ: Paciente Fibroquístico; PNFQ: Paciente No Fibroquístico

DISCUSIÓN

La elección de medios de cultivo selectivos es fundamental en la búsqueda de microorganismos, tanto en clínica como en la industria. Teniendo en cuenta la prevalencia que posee *B. contaminans* en pacientes FQ en diversas partes del mundo y la frecuencia con que son detectadas las bacterias del Taxón K en productos industriales, realizamos este estudio con el fin de aportar fundamentos teóricos para la elección de un medio de cultivo adecuado para el aislamiento de estos microorganismos. Si bien en el ámbito clínico el medio BCSA es utilizado para la recuperación del cBc, no existen trabajos que fundamenten esta elección para las bacterias del Taxón K. Por otro lado, no existen recomendaciones sobre qué medio usar en el ámbito industrial; y según nuestro conocimiento es el primer estudio donde se evalúa la efectividad de estos medios con aislamientos de dicho origen.

El método ecométrico utilizado en este estudio, a pesar de ser una técnica semicuantitativa desarrollada hace aproximadamente tres décadas, continúa siendo usado para el control de calidad de medios de cultivo en diversas industrias y además es empleado para evaluar y comparar la utilidad de nuevos medios de cultivo^{24, 27, 28, 29}. Una de sus principales desventajas es que pueden existir diferencias de resultados cuando el análisis es realizado por distintos operadores²⁷. En nuestro caso, para reducir esta clase de error los ensayos fueron realizados por duplicado por operadores diferentes. Se descartaron y repitieron aquellos ensayos con más de tres trazos de diferencia en el crecimiento observado. Sólo debieron ser repetidos cuatro ensayos: tres cepas del cBc (dos en medio BCSA y una en TB-T) y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en TB-T (datos no mostrados).

La composición de los medios estudiados podría explicar las diferencias observadas entre los medios BCSA y TB-T.

En el trabajo que describe el medio TB-T se señala que el uso de arginina como única fuente de nitrógeno y trypan blue como inhibidor probablemente afecte el desarrollo de ciertas especies del cBc²². En este sentido es interesante señalar que con todos los aislamientos de *B. lata*, el medio de TB-T mostró adecuada productividad, mientras que con *B. contaminans* sólo se obtuvo con el 47,6% de las cepas ensayadas, por lo cual no es adecuado para la recuperación de dicha especie. Considerando los tiempos de un laboratorio de microbiología, evaluamos los medios de cultivo dentro de las 48hs de incubación. No fue del alcance del estudio analizar si mayores tiempos de incubación hubieran mejorado la productividad del TB-T.

Por otro lado, al igual que otros trabajos donde se evalúan medios de cultivo, estudiamos la selectividad de los medios mediante la inclusión de especies ajenas al cBc aisladas de distintos orígenes³⁰. Si bien el medio TB-T resultó menos selectivo, la selectividad de los medios BCSA y BCSAm no es completa ya que permiten el desarrollo de diferentes especies, entre ellas *B. gladioli*. Esta especie, si bien no pertenece al cBc, comparte con estos microorganismos gran número de características³¹.

En cuanto a especificidad, solamente fue evaluada la posibilidad de observar el pigmento amarillo verdoso producido por *B. cepacia* y *B. contaminans*, dado que ninguno de los medios estudiados fue diseñado para producir colonias del cBc con características diferenciales del resto de los microorganismos. Consideramos que para el estudio este parámetro no fue determinante, ya que la producción de pigmentos es variable entre cepas de la misma especie y aún con la misma cepa en distintas condiciones de incubación². Sin embargo, gran parte de las cepas de *B. contaminans*

produjeron pigmentos en todos los medios pudiéndose observar mejor en el BSCAm debido a la menor concentración de colorantes. La disminución de concentración de cristal violeta en el BCSAm, podría permitir el crecimiento de microorganismos Gram positivos y afectar la selectividad, esto no fue observado con la cepa de *Staphylococcus aureus* empleada en el estudio.

Dada la combinación de antibióticos en el medio BCSA, este medio es ampliamente usado para la detección del cBc en muestras clínicas no sería de utilidad para el aislamiento de cepas de origen ambiental³². Recientemente fueron reportados mayor cantidad de genes involucrados en la resistencia a antibióticos en cepas clínicas que ambientales; lo cual avalaría esta idea³³. En este sentido, cabe preguntarse a cuál de los dos orígenes (clínico o ambiental) se asemejan los aislamientos obtenidos de la industria. Los aislamientos de agua purificada, podrían tener comportamiento similar a las cepas ambientales; y los aislamientos de productos que por su exposición continua a conservadores y otros agentes biocidas podrían asemejarse a las cepas clínicas. Sin embargo, no se observó diferencia de productividad en relación con el origen de las cepas.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos fundamentan la elección de medios BCSA (tanto formulado como el comercial modificado) para el aislamiento de las especies del Taxón K, en condiciones de incubación a 30° C durante al menos 48hs. Los mismos pueden ser empleados no sólo en clínica sino también en la recuperación estas especies a partir de muestras industriales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Smet B, Mayo M, Peeters C, et al. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(7):2265-2271. Doi: 10.1099/ijs.0.000251
- Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson C. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* 2008; 104(6):1539-1551. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03706
- Isles A, Maclusky I, Corey M, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 1984; 104:206-210.
- Marquez L, Jones K, Whaley E, et al. An Outbreak of *Burkholderia cepacia* complex infections associated with contaminated liquid docusate. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017; 38(5):567-573. Doi: 10.1017/ice.2017.11
- Shaban RZ, Maloney S, Gerrard J, et al. Outbreak of health care-associated *Burkholderia cenocepacia* bacteremia and infection attributed to contaminated sterile gel used for central line insertion under ultrasound guidance and other procedures. *Am J Infect Control* 2017; 45 (9):954-958. Doi: 10.1016/j.ajic.2017.06.025
- Vonberg RP, Gastmeier P. Hospital-acquired infections related to contaminated substances. *J Hosp Infect* 2007; 65(1):15-23. Doi: 10.1016/j.ajic.2017.06.025. Doi: 10.1016/j.jhin.2006.09.018
- Saiman L, Siegel J, LiPuma J, et al. Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; 35 Suppl 1:1-67. Doi: 10.1086/676882
- Baldwin A, Mahenthalingam E, Drevinek P, et al. Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):290-295. Doi: 10.1128/JCM.01818-07
- Lipuma J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:299-323. Doi: 10.1128/CMR.00068-09
- Zlosnik J, Zhou G, Brant R, et al. *Burkholderia* species infections in patients with cystic fibrosis in British Columbia, Canada. 30 years' experience. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12:70-78. Doi: 10.1513/AnnalsATS.201408-395OC
- Martina P, Bettiol M, Vescina C, et al. Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. *J Clin Microbiol* 2013; 51(1):339-344. Doi: 10.1128/JCM.02500-12
- Medina-Pascual M, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, Saéz-Nieto J. Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(2):150-156. Doi: 10.1016/j.cmi.2014.07.014
- Coutinho C, Barreto C, Pereira L, Lito L, Melo Cristino J, Sá-Correia I. Incidence of *Burkholderia contaminans* at a cystic fibrosis centre with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. *J Med Microbiol* 2015; 64(8):927-935. Doi: 10.1099/jmm.0.000094.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, et al. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. Nov., and *Burkholderia lata* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59:102-111. Doi: 10.1099/ijs.0.001123-0
- Jimenez L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. *PDA J Pharm Sci Technol* 2007; 61(5):383-399.
- Sutton S., Jimenez L. A review of reported recalls involving microbiological control 2004-2011 with emphasis on FDA considerations of "objectionable organisms". *Am Pharm Rev* 2012; 15:42-57.

17. Knapp L, Rushton L, Stapleton H, et al. The effect of cationic microbicide exposure against *Burkholderia cepacia* complex (Bcc); the use of *Burkholderia lata* strain 383 as a model bacterium. *J Appl Microbiol* 2013; 115(5):1117-1126. Doi: 10.1111/jam.12320.
18. Martin M, Christiansen B, Caspari G, et al. Hospital-wide outbreak of *Burkholderia contaminans* caused by prefabricated moist washcloths. *J Hosp Infect* 2011; 77(3):267-270. Doi: 10.1016/j.jhin.2010.10.004
19. Moehring R, Lewis S, Isaacs P, et al. Outbreak of bacteremia due to *Burkholderia contaminans* linked to intravenous fentanyl from an institutional compounding pharmacy. *JAMA Intern Med* 2014; 174(4):606-612. Doi: 10.1001/jamainternmed.2013.13768
20. Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, Friedman RL, Hussong D. *Burkholderia cepacia* this decision is overdue. *PDA J Pharm Sci Technol* 2011; 65(5):535-543. Doi: 10.5731/pdajpst.2011.00793
21. Henry D, Campbell M, LiPuma J, Speert D. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 1997; 35:614-619.
22. Hagedorn C, Gould W, Bardinelli T, Gustavson D. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53:2265-2268.
23. Jacobs J, Fasi A, Ramette A, Smith J, Hammerschmidt R, Sundin G. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(10):3121-3129. Doi: 10.1128/AEM.01941-07
24. Mossel, D. Quality control of solid culture media: a comparison of the classic and the so-called ecometric technique. *J Appl Bacteriol* 1980; 49:439-454.
25. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne S, et al. DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3165-3171.
26. Australian Society for Microbiology. Culture media special interest group. 2004. Guidelines for Assuring Quality of Food and Water Microbiological Culture Media.
27. Aguilera-Arreola M, Portillo-Muñoz M, Rodríguez-Martínez C, Castro-Escarpullia G. Usefulness of chromogenic CromoCen® AGN agar medium for the identification of the genus *Aeromonas*: assessment of faecal samples. *J Microbiol Methods* 2012; 90 (2):100-104. Doi: 10.1016/j.mimet.2012.04.013
28. Cox N, Richardson L, Cosby D, Berrang M, Wilson J, Harrison M. A four quadrant sequential streak technique to evaluate *Campylobacter* selective broths for suppressing background flora in broiler carcass rinses. *J Food Saf [edición electrónica]*. 2017; 37 (2):e12311. Doi 10.1111/jfs.12311
29. Sutton S. Quality control of microbiological culture media. *Pharm Microbiol Forum Newsletter* 2006; 12(1):2-11.
30. Weiser R, Donoghue D, Weightman A, Mahenthiralingam E. Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *J Microbiol Methods* 2014; 99:8-14. Doi: 10.1016/j.mimet.2014.01.010
31. Segonds C, Clavel-Batut P, Thouverez M, et al.. Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli*. *J Clin Microbiol* 2009; 47(5): 1510-1516. Doi: 10.1128/JCM.02489-08
32. Miller, S, LiPuma J, Parke J. Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:3750-3758. Doi: 10.1128/AEM.68.8.3750-3758.2002
33. Deng P, Wang X, Baird S, et al. Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. *Microbiologyopen* 2016; 5 (3):353-369. Doi: 10.1002/mbo3.333