



EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN EL COMPLEJO METROPOLITANO HARMODIO ARIAS MADRID

Yamilka Díaz¹, José Ángel Núñez¹, Brenda de Mayorga¹, Fidel Jaramillo², Olga Chen², M. de Paredes³, Magaly de Chial¹

¹Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Depto. de Microbiología y Parasitología. ²Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Depto. De Genética y Biología Molecular.

³Complejo Hospitalario Arnulfo Arias. Caja del Seguro Social.

contacto: Magaly de Chial Tel. 69117688. email:msdechial@yahoo.com.mx

RESUMEN

Para el estudio de la epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvieron 53 aislados de diferentes áreas anatómicas de pacientes del Complejo Metropolitano Harmodio Arias Madrid de la Caja del Seguro Social. Los aislados de *P. aeruginosa* fueron obtenidos durante un período de 1 año y fueron identificados fenotípicamente mediante el perfil bioquímico obtenido con la prueba de API 20NE (Bio Mérieux, Bruselas, Bélgica) y la sensibilidad de las cepas a antibióticos mediante un antibiograma que verificó la sensibilidad a estos. El diagnóstico molecular se realizó utilizando los genes de los receptores de pioverdina *FpvA*, los cuales fueron amplificados mediante la técnica de Multiplex-PCR. Los resultados en este estudio demostraron la baja sensibilidad de las pruebas fenotípicas ya que 39 aislados de un total de 53 pudieron ser identificados como *P. aeruginosa* por medio del sistema API 20E representando un 74% de las cepas analizadas. Igualmente mediante los antibiogramas se encontraron diferencias en la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y que reflejan cambios importantes en el perfil de susceptibilidad antimicrobiana a quinolonas. Todos los aislados fueron identificados con algunos de los genes de los receptores de pioverdina. La disponibilidad las secuencias de los receptores de pioverdina *fpvA* de *P. aeruginosa* han permitido estandarizar una técnica rápida para el siderotipaje de las cepas y sobre todo para cepas que no producen pioverdina y que por ende no pueden detectarse a través de métodos de cultivo convencionales. Esta técnica en este estudio ha demostrado su mayor especificidad y rapidez, en comparación con la prueba de API 20NE y el antibiograma.

PALABRAS CLAVES

P. aeruginosa, epidemiología molecular, API 20 NE, antibiograma, genes de receptores de pioverdina.

ABSTRACT

To study the molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, 53 isolates from different anatomic areas from patients of the Complejo Metropolitano Armodio Arias Madrid de la Caja del Seguro Social, were obtained and analyzed. The isolates of *P. aeruginosa* were obtained during a period of 1 year and were phenotypically identified by biochemical analysis carried out with the API 20NE (Bio Merieux, Brussels, Belgium) and antibiotic sensitivity of the strains as well. Molecular diagnosis was performed using Multiplex-PCR of the pyoverdin receptor genes FPVA. This study showed low specificity of phenotypic tests in use since 39 isolates from a total of 53 could not be identified as *P. aeruginosa* by using the API 20E system, representing 74% of the strains tested. Differences in susceptibility to antibiotics were found compare to previous studies, especially major changes in the antimicrobial susceptibility profile of quinolones were observed. All isolates were identified with any of the pyoverdin receptor genes. The availability of sequences of the pyoverdin receptor *fpvA* genes of *P. aeruginosa* allowed us to standardize a rapid technique for the siderotyping of all the isolated strains. This is extremely important for strains that do not produce pyoverdin, which cannot be detected by conventional culture methods. Our study showed that this test has demonstrated to be specific and rapid, when it was compared with the API 20NE test and the conventional antimicrobial sensitivity tests.

KEYWORDS

P. aeruginosa, molecular epidemiology, API 20 NE, antibiogram, pyoverdine receptor genes.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa aeróbica, con forma de bastón y con un flagelo ubicado polarmente. Dentro del grupo de bacterias pseudomonales fluorescentes, pertenecientes al grupo I de ARNr, es la única reconocida como patógeno humano (De Vos *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* es un microorganismo ubicuo en el ambiente y el mayor patógeno oportunista en los nosocomios. Es un patógeno oportunista en ciertos pacientes inmuno-comprometidos como fibrosis cística, quemados, infecciones nosocomiales y cáncer (Speert, 2002; Pirnay *et al.*, 2000, 2002; Campana *et al.*, 2004). Posee la habilidad de colonizar una gran cantidad de nichos y utilizar una gran cantidad de compuestos

ambientales como fuente de energía (Lyczak *et al.*, 2000; Goldberg, 2000).

Los brotes de infecciones nosocomiales constituyen un serio problema en los centros médicos. Aunque los hongos, virus y parásitos pueden causar estas infecciones, las bacterias constituyen la causa principal de éstas. En los hospitales el uso de catéteres, ventiladores, desinfectantes e instrumentos médicos proveen un medio óptimo para la adquisición de infecciones nosocomiales de manera que los esfuerzos para prevenir y controlar el problema son difíciles de lograr. En adición la emergencia de cepas multiresistentes a drogas complica el control de la infección nosocomial (Aendekerk *et al.*, 2005).

P. aeruginosa es naturalmente resistente a muchos antimicrobianos de uso habitual en la práctica clínica, debido a la barrera de permeabilidad ofrecida por su membrana externa de lipopolisacáridos, plásmidos de resistencia antimicrobiana, y otros factores como las alteraciones de las topoisomerasas, alteraciones de las porinas y bombas de eflujo (Vila J., 2002; Aendekerk *et al.*, 2005).

Las infecciones graves y nosocomiales por *P. aeruginosa* requieren generalmente un tratamiento antimicrobiano asociado con el fin de lograr un mayor efecto bactericida y reducir la aparición de resistencia a ellos. Los antimicrobianos con efecto antipseudomonal incluyen aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), cefalosporinas de 3^a (ceftazidima, cefoperazona) y 4^a generación (cefepime), monobactámicos (aztreonam), carbapenemos (imipenem, meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y penicilinas de espectro ampliado (ticarcilina, carbenicilina, ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina/tazobactam, mezlocilina) (Silva *et al.*, 1995, Zambrano & Herrera, 2004).

En países industrializados las infecciones nosocomiales afectan un 5-10% de pacientes hospitalizados (2 millones de pacientes/año en Estados Unidos) y tienen un impacto considerable en términos de la Salud Pública (contribuyendo al incremento de la morbilidad y mortalidad). En términos económicos consumen de un 15-20% del presupuesto del hospital, sobre todo porque una bacteria que haya sido adquirida durante hospitalización y que ha desarrollado resistencia a drogas puede permanecer en el paciente por mucho tiempo.

El diagnóstico de *P. aeruginosa* se realiza usualmente a través de técnicas de tipificación fenotípica. Esta bacteria ha sido caracterizada fenotípicamente mediante técnicas como el API 20E (Biomerieux, Bruselas, Bélgica), por su perfil de sensibilidad a los antibióticos y mediante pruebas de serotipaje entre otras. Aunque las técnicas de tipificación fenotípicas son útiles para entender la epidemiología de las infecciones agudas, éstas están limitadas por su capacidad discriminatoria y por su incapacidad para agrupar aislados bacterianos que no están relacionados fenotípicamente pero que son genéticamente homólogos.

Las técnicas de tipificación molecular son altamente específicas y son útiles para diferenciar cepas de pacientes con infecciones crónicas en donde el fenotipo bacteriano es variable (Speert, 2002). Entre los métodos moleculares usados para tipificar *P. aeruginosa* están los elementos repetitivos basados en PCR, PFGE, enzimas de restricción, ribotipificación, y RFLP (Speert, 2002). Recientemente se ha utilizado con éxito la técnica de Multiplex-PCR con secuencias parciales de los genes de receptores de pioverdina para la tipificación molecular de esta bacteria (de Chial, *et al.*, 2003, Winstanley *et al.*, 2005, Osayande, 2009, Pozuelo *et al.*, 2010).

P. aeruginosa, bajo condiciones limitantes de hierro, produce agentes quelantes de hierro llamados sideróforos (Neiland, 1982). La pioverdina es el principal sideróforo debido a su gran afinidad por el ión férrico. Se han identificado tres pioverdinas estructuralmente diferentes y para cada una de ellas es requerido un receptor específico (Cornelis *et al.*, 1989, Budzikiewicz, 1993, 1998, 2001, Cornelis *et al.*, 2002). La pioverdina es esencial para la virulencia de *P. aeruginosa* en ratones modelo con quemaduras (Litwin *et al.*, 1993. Meyer *et al.*, 1996; Hanfield *et al.*, 2000). Recientemente, secuencias de los genes del receptor de la ferripioverdina permitieron apreciar su conservación entre diferentes aislados clínicos usando un PCR múltiplex (de Chial *et al.*, 2003). Cada cepa probada parece producir solamente un único receptor lo que significa que sus genes son conservados (Meyer *et al.*, 1997, Poole *et al.*, 1993).

Esta observación permite una rápida identificación de aislados de *P. aeruginosa* que inclusive no producen pioverdina como por ejemplo aquellas observadas en cepas de fibrosis quística (de Chial *et al.*, 2003). Así, al usar marcadores moleculares de estos receptores la determinación del genotipo podría ser altamente específica, porque como regla general todas

las cepas pertenecientes a un grupo genómico bien definido producen una pioverdina idéntica (Fuchs *et al.*, 2001, Meyer, 2000 y Meyer *et al.*, 2002). En Panamá existe la necesidad de iniciar estudios epidemiológicos moleculares para caracterizar las diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Estudios polifásicos basados en pruebas de susceptibilidad a antibióticos y la utilización de genes de pioverdina como marcadores moleculares, podrían ser una herramienta sumamente útil para determinar que cepas de *P. aeruginosa* son responsables de brotes infecciosos en pacientes ingresados en el Hospital de la Caja de Seguro Social así como a otras instituciones de salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis Microbiológico: Las bacterias fueron aisladas de muestras clínicas por medio de procedimiento estándares durante el año 2006. Cincuenta y tres muestras mixtas de *P. aeruginosa* provenientes del Laboratorio de Microbiología de la Caja de Seguro Social fueron analizadas. Inicialmente los aislados fueron sembrados en Agar Cetrimida (AC) (Scharlau Chemie S.A., España) específico para *P. aeruginosa* y en Agar Acido Casamino Bacto (CAA) (Becton, Dickinson Company, Estados Unidos) para la producción de pioverdina, por 24 horas a 37°C. Todas las cepas fueron almacenadas en el medio CAA con glicerol al 50%.

Igualmente las cepas fueron identificadas mediante el perfil bioquímico obtenido con la prueba de API 20NE (Bio Mérieux, Bruselas, Bélgica). El sistema API 20 NE cubre 61 taxa de bacterias gram-negativas, no enterobacterias. La prueba fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bio Mérieux, Bruselas, Bélgica). La asimilación de los sustratos fue leída después de 24 a 48 horas. La interpretación de los resultados fue realizada después de 48 horas utilizando el software de identificación, versión 6.0. Las cepas fueron clasificadas a nivel de especie, género o no identificación (baja discriminación). De acuerdo a las instrucciones del fabricante la identificación de las cepas a nivel de especies fue dividida en cuatro subgrupos: excelente ($\geq 99\%$ de identificación y valor de T de ≥ 0.75); muy buena identificación ($\geq 99\%$ de identificación y valor de T de ≥ 0.5); buena ($\geq 90\%$ de identificación y valor de T de ≥ 0.25); aceptable ($\geq 80\%$ de identificación y valor de T de ≥ 0.00).

La sensibilidad de las cepas fue realizada mediante un antibiograma que verifica la susceptibilidad o resistencia a los antibióticos como: Amikacina, Aztreonam, Cefepime, Ceftazidime, Ciprofloxacina, Imipenem, Meropenem, Piperacilina, Piperacilina-Tazobac y Tobramycin.

Detección Molecular: La extracción de ADN se realizó de acuerdo a la metodología para bacterias gram negativas de Chen y Kuo (1993). El Multiplex-PCR fue realizado con 3 juegos de cebadores necesarios para la identificación de los genes de los tres tipos de receptores de pioverdina en *P. aeruginosa* (de Chial *et al.*, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Microbiológico y Molecular: Cincuenta y tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron aisladas de diferentes partes del cuerpo de pacientes hospitalizados en el Hospital del Complejo metropolitano Harmodio Arias Madrid (Cuadro 1). Todas las cepas crecieron en Agar AC y en el Agar CAA crecieron las cincuenta y tres cepas y solo seis cepas no produjeron pioverdina en este último (Cuadro 1).

La designación de *P. aeruginosa* utilizando la prueba fenotípica de API 20E (Bio Mérieux, Bruselas, Bélgica) fue posible para 39 del total de los 53 (74%) aislados categorizada como excelente, muy buena, buena y aceptable. Catorce de las muestras no fueron identificadas como *P. aeruginosa* (Cuadro 1). Aunque este sistema fenotípico ha contribuido a un manejo más efectivo de los pacientes, permitiendo la identificación de la bacterias de relevancia clínica rápida y específica, tienen ciertas limitaciones: (i) no todas las cepas dentro de especies pueden exhibir una característica en particular, (ii) la misma cepa puede exhibir resultados diferentes al repetir la misma prueba y (iii) las base de datos correspondientes son limitadas. Específicamente, bacterias no fermentadoras obtenidas de pacientes con fibrosis cística pueden ser problemáticas debido a las variaciones fenotípicas y tasa de crecimiento baja debido a la presión antimicrobiana significativa que estos organismos encuentran en los pulmones de estos pacientes (Bosshard *et al.*, 2006).

Para la prueba de susceptibilidad a antibióticos la tabla 2 muestra sensibilidad de los 53 aislados investigados. Para las pruebas de antibiograma se utilizaron ocho antibióticos: Para la amikacin los aislados mostraron un 75.47% de susceptibilidad y un 24.53% de resistencia que contrastan con los resultados encontrados (Zambrano & Herrera, 2004) que reportaron un porcentaje de resistencia de *P. aeruginosa* para amikacin de 36.8%. Para Cefepime, hubo un 69.56% de susceptibilidad y un 8.69% de resistencia, en cambio para Ceftazidime hubo un porcentaje de resistencia de 23.07%. La Ciprofloxacina es una quinolona para la cual en 1994 Silva *et al.* encontraron una baja resistencia en 64 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en dos centros hospitalarios; en cambio Zambrano & Herrera (2004), observó una baja susceptibilidad frente a este antimicrobiano, sin embargo nuestros resultados fueron de un 33.96% de resistencia y un 63.06% de susceptibilidad. Tales diferencias con respecto a nuestros resultados evidencian cambios importantes en el perfil de susceptibilidad antimicrobiana a quinolonas; siendo la Ciprofloxacina el antibiótico al que los aislados de *P. aeruginosa* mostraron mayor resistencia, de todos los utilizados en este estudio. Nuestros aislados mostraron una baja resistencia a Imipenem (17.30%), así como a Meropenem (15.21%), siendo este último antibiótico al que *P. aeruginosa* presentó mayor susceptibilidad (82.60%). Para Piperacilina y Piperacilina-Tazobac, los aislados mostraron un porcentaje de resistencia de 28.84% y 28% respectivamente. En un estudio previo Piperacilin-Tazobac presentó una resistencia de 6.8% (López *et al.*, 2002), la cual es mucho mas baja que la obtenida en este trabajo.

Los patrones de susceptibilidad a agentes antimicrobianos tienen poco poder de discriminación debido a que la resistencia antimicrobiana está bajo una tremenda presión selectiva en las instituciones de salud y a que frecuentemente está asociada con elementos genéticos móviles (transposones, plásmidos). Cambios en el antibiograma también pueden reflejar mutaciones puntuales espontáneas como las que han sido observadas para fluoroquinolonas. De manera que algunos aislados que están epidemiológicamente relacionados y son genéticamente indistinguibles pueden manifestar diferentes susceptibilidades antimicrobianas debido a la adquisición de nuevo material genético en el tiempo o pérdida de plásmidos. Contrariamente, aislados no relacionados pueden tener perfiles de

resistencia indistinguibles, que pueden representar la adquisición del mismo plásmido por especies múltiples (Tenover *et al.*, 1997).

La tipificación molecular del receptor de Pioverdina de los 53 aislados revela que el alelo más común es *fpvA I* (24 aislados, 45%) y *fpvAIII* (20 aislados, 38%). Esta distribución de los tipos de pioverdina entre los aislados se diferencia de las anteriormente reportados donde el fenotipo de más alto nivel de prevalencia fue el de tipo II de pioverdina (De Vos *et al.*, 2001, Pirnay *et al.*, 2002, Winstanley *et al.*, 2005) mientras que en este estudio solo 9 aislados (17%) presentaban el gen para *fpvAII*. En estos estudios la explicación concerniente a esta particularidad en la frecuencia mayoritaria del tipo II de pioverdina o bien la ausencia de aislados que producen el tipo III de pioverdina se debió a la prevalencia de un tipo particular de clon que circulaba en el ambiente hospitalario (De Vos *et al.*, 2001). La presencia de clones negativos para la producción de pioverdina se debe a la preferencia en estos pacientes por este tipo de clon y la adquisición de hierro ocurre entonces a través de otro sideróforo de menor afinidad por el hierro que es pioquelina una vez que el receptor está presente (De Vos *et al.*, 2001).

La disponibilidad de estas secuencias de los receptores de pioverdina *fpvA* de *P. aeruginosa* (de Chial, *et al.*, 2003) han permitido entonces estandarizar una técnica rápida para el siderotipaje de las cepas y sobre todo para cepas que no producen pioverdina y que por ende no pueden detectarse a través de métodos de cultivo convencionales. La especificidad, rapidez y sensibilidad de esta técnica se ha demostrado en este estudio en comparación con la prueba de API 20NE y el antibiograma. En los resultados obtenidos se puede apreciar esto ya que en las pruebas fenotípicas, un 27% de las cepas analizadas no son reconocidas como *P. aeruginosa*, mientras que al ser analizadas molecularmente, presentan uno de los tres genes que se están amplificando.

Se hace necesario entonces la implementación de esta técnica en nuestros centros hospitalarios como una técnica exacta y rápida para la identificación de *P. aeruginosa*.

Cuadro 1. Crecimiento de las cepas en los medios utilizados para su identificación (AC y CAA), resultados obtenidos en la prueba API 20E y de la identificación con los genes *fpvA*. El número de código asignado según registros en el Hospital. P+ (secreción de pioverdina); P- (no secreción de pioverdina).

Nº de muestra	Código	Agar cetrimida (AC)	Casaminoacids CAA	API 20E	Receptor FPVA	Parte Anatómica
1	106	p-	P+	+	2	Ulcera pie
2	10732	p-	P+		1	Tejido muñón
3	10692	P+	P+		2	Catéter
4	318	p-	P+		3	Ulcera
5	320	p-	p-		1	Secreción Endotraqueal
6	355	p-	P+		2	Ulcera Pie
7	471	p-	P+	+	3	Secreción Endotraqueal
8	465	p-	P+	0%*	1	Secreción Bronquial
9	502	p-	P+	0%	3	Secreción Endotraqueal
10	586	P+	P+	+	3	Catéter Femoral
11	663	P+	P+	+	1	Secreción herida quirúrgica
12	793	P+	P+	0%*	3	Fisura Faringocutánea
13	831	p-	P+	+	3	Secreción Endotraqueal
14	1296	P+	P+	+	3	Secreción herida quirúrgica
15	1333	P+	P+	+	1	Ulcera corneal
16	1352	p-	P+	+	1	Secreción nasal
17	1290	P+	P+	+	1	Catéter Femoral
18	1282	p-	P+	+	3	Secreción Gastrostomía
19	1377	p-	P+	+	3	Secreción herida
20	1477	P+	P+	+	3	Punta de catéter
21	1368	p-	P+	+	1	Secreción oído derecho
22	1365	p-	P+	+	3	Herida Pie
23	1504	p-	p-	+	2	Secreción endotraqueal
24	1517	p-	P+	+	1	Secreción pie
25	1638	p-	P+	+	3	Orina
26	1424	p-	p-	0%*	1	Espuito
27	1655	p-	P+	+	1	Ulcera pie
28	1617	P+	P+	+	1	Secreción orificio de Catéter
29	1891	p-	p-	+	2	Secreción Endotraqueal
30	2140	p-	P+	+(0%)	3	Punta de catéter
31	2142	p-	P+	+	3	Secreción de Herida Quirúrgica
32	2150	p-	P+	+	2	Secreción Tobillo

33	2176	p-	P+	+	1	Catéter venoso Central
34	2196	p-	P+	+	3	Secreción Endotraqueal
35	2206	p-	P+	+	1	Ulcera Maleolar
36	2251	p-	P+	+	3	Biopsia de hueso
37	2270	p-	p-	+(0%)	2	Secreción de Tobillo
38	2275	P+	P+	+	3	Secreción de Tobillo derecho
39	2256	p-	P+	+	3	Catéter Venoso
40	2400	p-	P+	+	3	Secreción de pie
41	2599	p-	P+	0%*	1	Secreción Gastrostomía
42	2674	p-	P+	0%	1	Secreción Herida Quirúrgica
43	2883	P+	P+	0%*	1	Secreción ocular
44	2897	P+	P+	+	3	Catéter Venoso
45	3456	P+	P+	0%*	1	Secreción de pie
46	3471	P+	P+	+	1	Secreción Endotraqueal
47	3489	P+	P+	+	1	Secreción Endotraqueal
48	3526	P+	p-	0%	1	Secreción. pie izquierdo
49	3529	P+	P+	0%	1	Secrecion de orificio peritoneal
50	3598	P+	P+	0%	2	Secreción. Herida Quirúrgica
51	3602	p-	P+	0%	2	Herida Abdominal
52	2635	p-	P+	+	1	Ulcera de pie
53	1665	P+	P+	+	1	Secreción pie izquierdo

Cuadro 2. Susceptibilidad de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* a diferentes antibióticos.

# muestra	AMIK	AZT	CEF	CEFT	CIP	IMIP	MER	PIP	PIP.T	TOBR	Parte Anatómica
1	16s	>32r	-	128r	>4r	<4s	-	>256r	-	1s	Ulcera de pie
2	>64r	>32r	-	>32r	>4r	>16r	-	>256r	-	>16r	Tejido. Muñon
3	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	<8s	-	Catéter
4	>64r	>32r	-	>32r	>4r	>16R	-	>256r	-	>16r	Ulcera.
5	>64r	-	16 i	16 i	>4r	16R	16r	<8s	32s	-	Secreción Endotraqueal
6	>64r	-	8s	16 i	>4r	>16r	>16r	>256r	64r	-	Ulcera.Pie
7	<2s	-	16 i	<8s	>4r	8 i	8 i	<8s	16s	-	Secreción Endotraqueal
8	<2s	-	>32r	>32r	>4r	<4s	<2s	>256r	>128r	-	Secreción Bronquial
9	<2s	-	16i	<8s	>4r	8i	>16r	<8s	16s	-	Secreción Endotraqueal
10	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	<8s	-	Catéter Femoral
11	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16s	-	Secreción de Herida quirúrgica
12	4s	<8s	-	<8s	<0.5s	<4s	-	<8s	-	<0.5s	Fisura.Faringocutánea
13	<2s	-	<4s	<8s	>4r	<4s	<2s	<8s	<8s	-	Secreción Endotraqueal
14	>64r	-	16i	16i	>4R	8i	<2s	32s	16s	-	Secreción de Herida quirúrgica
15	>2s	-	16 i	<8s	<0.5s	<4s	<2s	64s	64s	-	Ulcera corneal
16	<2s	-	8s	<8s	>4r	<4s	<2s	>256r	>128r	-	Secreción nasal
17	<2s	-	16 i	16 i	<0.5s	<4s	4s	64s	64s	-	Catéter Femoral
18	<2s	-	16 i	16 i	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16 s	-	Secreción-Gastrostomía
19	<2s	-	8s	<8s	<0.5s	>16 r	>16r	<8s	32s	-	Secreción herida
20	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16 s	-	Punta de catéter
21	>64r	>32r	-	>32r	>4r	>16r	-	>256r	-	>16r	Secreción oído derecho
22	<2s	-	<4s	16 i	<0.5s	<4s	<2s	>256r	32r	-	Herida dePie
23	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16 s	-	Secreción endotraqueal
24	<2s	-	16 i	<8s	>4s	<4s	<2s	<8s	32s	-	Secreción pie
25	-	-	-	-	<0.5s	-	-	-	-	<0.5s	Orina
26	>64r	-	>64r	>32r	>4r	>16r	>16r	>256r	64r	-	Espujo
27	>64r	-	>32r	>32r	>4r	>16r	<2s	>256r	>128r	-	Ulcera pie
28	<2s	-	8s	<8s	2 s	<2s	>128r	16s	16s	-	Secreción Orificio de Catéter
29	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16 s	32s	-	Secreción Endotraqueal
30	8s	-	<4s	>32r	<0.5s	<4s	<2s	>256r	64r	-	Punta de catéter
31	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16 s	16s	-	Secreción Herida quirúrgica
32	32 i	-	16i	16 i	<0.5s	<4s	>2s	>256r	32r	-	Secreción tobillo
33	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	16s	-	Catéter- Venoso Central
34	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	32s	-	Secreción Endotraqueal
35	>64r	-	16 i	>32r	>4r	<4s	<2s	16s	32s	-	Ulcera-Maleolar
36	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16s	-	Biopsia de hueso
37	<2s	-	<4s	<8s	>4r	<4s	<2s	<8s	16s	-	Secreción de tobillo
38	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	32s	-	Secreción de Tobillo derecho
39	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	<8s	-	Catéter Venoso
40	<2s	-	8s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	32s	32s	-	Secrecion -pie

41	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	>256r	32s	-	Secreción- Gastrostomía
42	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	16s	-	Sec. Herida Quirúrgica
43	8s	<8s	-	<8s	<0.5s	<4s	-	<8s	-	1s	Secreción- ocular
44	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16s	-	Catéter-Venoso
45	<2s	-	<4s	<8s	>4r	<4s	<2s	<8s	16s	-	Secreción pie
46	<2s	-	4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	16s	-	Secreción Endotraqueal
47	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	16s	-	Secreción Endotraqueal
48	16s	-	16 i	>32r	>4r	<4s	<2s	>256r	64r	-	Sec.pie izquierdo
49	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	16s	16s	-	Secreción Orificio peritoneal
50	<2s	-	<4s	<8s	<0.5s	<4s	<2s	<8s	16s	-	Secr. Herida quirúrgica

REFERENCIAS

Aendekerk, S., SP. Diggle, Z. Song, N. Høiby, P. Cornelis, P. Williams & M. Cámara. 2005. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology*. 151:1113-25.

Bosshard, P., R. Zbinden, S. Abels, B. Böddinghaus, M. Altwegg & E. C. Böttger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbio.* Vol. 44 (4): 1359-1366.

Budzikiewicz, H. 1993. Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.*104:209-228.

Budzikiewicz, H. 1998. Peptide siderophores from the bacterial genus *Pseudomonas*. In: *Advances in Biotechnology*. Edit. Askok Pandey, Educational Publishers & Distributors, New Delhi, India. pp 157-171.

Budzikiewicz, H. 2001. Siderophores of human pathogenic fluorescent pseudomonads. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:1-6.

Campana, S., G. Taccetti, N. Ravenni, I. Masi, S. Audino, B. Sisi, T. Repetto, G. Döring & M. de Martino. 2004. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cystic fibrosis center. *J Cyst Fibros.* 3(3):159-63.

Chen, W. & T. Kuo. 1993. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Gram Negative Bacterial Genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 21(9): 2260.

Cornelis, P., D. Hohnadel & J.M. Meyer. 1989. Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Infect. Immun*. 57:3491-3497.

Cornelis, P. & S. Matthijs. 2002. Diversity of siderophores-mediated iron uptake systems in fluorescents *Pseudomonas*: not only pyoverdines. *Environ. Microbiol*. 12:787-798.

deChial, M., B. Ghysels, S. Beatson, V. Geoffroy, J.M. Meyer, T. Pattery, C. Baysse, P. Chablain, Y.N. Parson, C. Winstanley, S. Cordwell & P. Cornelis. 2003. Identification of type II and tipe III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*.8:1095-1103.

De Vos, D., M. de Chial, C. Cochez, S. Jansen, B. Tummler, J.M. Meyer & P. Cornelis. 2001. Study of pyoverdine type and production by *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine negative mutations. *Arch. Microbiol*. 175: 384-388.

Fuchs, R., M. Schäfer, V. Geoffroy & J.M. Meyer. 2001. Siderophores –A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem*. 1:31-57.

Ghysels, B., B.T. Min Dieu, S.A. Beatson, J.P. Pirnay, U.A. Ochsner, M.L. Vasil & P. Cornelis. 2004. FpvB, and alternatipe type I ferrypyoverdine receptor of *P. aeruginosa*. *Microbiology*. 150:1671-1680.

Goldberg, J.B. 2000. *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol*. 8:55-57.

Handfield, M., D.E. Lehoux, F. Sanschagrín, M.J. Mahan, D.E. Woods & R.C. Levesque. 2000. In Vivo-Induced Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 68(4): 2359–2362.

Litwin, C.M. & S.B. Calderwood. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin.Microbiol.Rev.*6:137-149.

López, O., N. Tuhay, A. Gauna, H. Ramírez. 2002. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistencia a Betalactámicos e inhibidores de Betalactamasa (Piperacillin_Tazobac). *Revista de Postgrado de la Cátedra de Medicina - N° 121*.
<http://med.unne.edu.ar/revista/revista121/pseudomonas.htm>.

Lyczak, J.B., C.L. Cannon & G.B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lesson from a versatile opportunist. *Microbes and infection.*2:1051-1060.

Meyer, J.M., D. Hohnadel, A. Khan & P. Cornelis. 1990. Pyoverdine-facilitated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: immunological characterization of the ferripyoverdine receptor.

Meyer, J.M., A. Stintzi, D. De Voz, P. Cornelis, R. Tappe, K. Taraz, & H. Budzikiewicz. 1997. Use of siderophores to type pseudomonads: the tree *Pseudomonas aeruginosa* systems. *Microbiology.*143:35-43.

Meyer, J.M. 2000. Pyoverdine: pigments; siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch.Microbiol.*174:135-142.

Meyer, J.M., V.A. Geoffroy, N. Baida, L. Gardan, D. Izard, P. Lemanceau, W. Achouak, N.J. Palleroni. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* 68(6):2745-53.

Neiland, J.B. 1982. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50:715-731.

Osayande, J.O. 2009. Use of Polymerase Chain Reaction for the Determination of about 2.5 kb fpvA and fpvB Gene Sequences in *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *The Internet Journal of Microbiology.* 7 Number 2. DOI: 10.5580/18ce.

Pirnay, J.P., D. De Voz, C. Cochez, F. Bilocq, J. Pirson, M. Struelens, L. Duinslaeger, P. Cornelis, M. Zizi & A. Vanderkelen. 2003. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: Persistence of a multidrug – resistant clone. *Clinical Microbiology*.41: 1192-1202.

Pirnay, J.P., D. De Voz, C. Cochez, F. Bilocq, A. Vanderkelen, M. Zizi, B. Ghysels, & P. Cornelis. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *envirom.microbiol*.4:898-911.

Pirnay, J.P., D. De Voz, L. Duinslaeger, P. Reper, C. Vandenvelde, P. Cornelis & A. Vanderkelen. 2000. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid real – time polymerase chain reaction. *Crit.Care*. 4:255-261.

Poole, K., S. Neshat, K. Krebs & D. E. Heinrichs. 1993. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor *fpv A* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*.175:4597-4604.

Pozuelo, M. J., P. A. Jiménez, A. D. Valderrey, A. Fernández- Olmos, R. Cantón & R. Rotger. 2011. Polimorfismo de los genes *mucA* y *fpvA* en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29(1):26–31.

Silva, J., N. Herrera & V. Prado. 1995. Actividad comparativa *in vitro* de 6 fluoroquinolonas sobre bacterias patógenas de origen clínico. *Rev Chil Infect*. 12: 40-7.

Speert, D.P., M.E. Campbell, D.A. Henry, R. Milner, F. Taha, A. Gravelle, A.G. Davidson, L.T. Wong & E. Mahenthalingam. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. 2002. *Am J Respir Crit Care Med*. 1;166(7):988-93.

Tenover, F., R. Arbeit, R. Goering, the molecular typing working group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. 1997. How to select and interpret molecular typing methods for

epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. SHEA position paper. Vol 18 (6): 426-437.

Vila J., M. F. 2002. [Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002. 20(6):304-10.

Winstanley, C., S.B. Kaye, T.J. Neal, H. Chilton, S. Miksch, C. Hart, A. & the Microbiology Ophthalmic Group. 2005. Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. *J Med Microbiol*. 54:519-526.

Zambrano, A., & N. Herrera. 2004. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Rev Chil Infect* 2004; 21 (2): 117-124.

Recibido abril de 2012, aceptado septiembre de 2012.