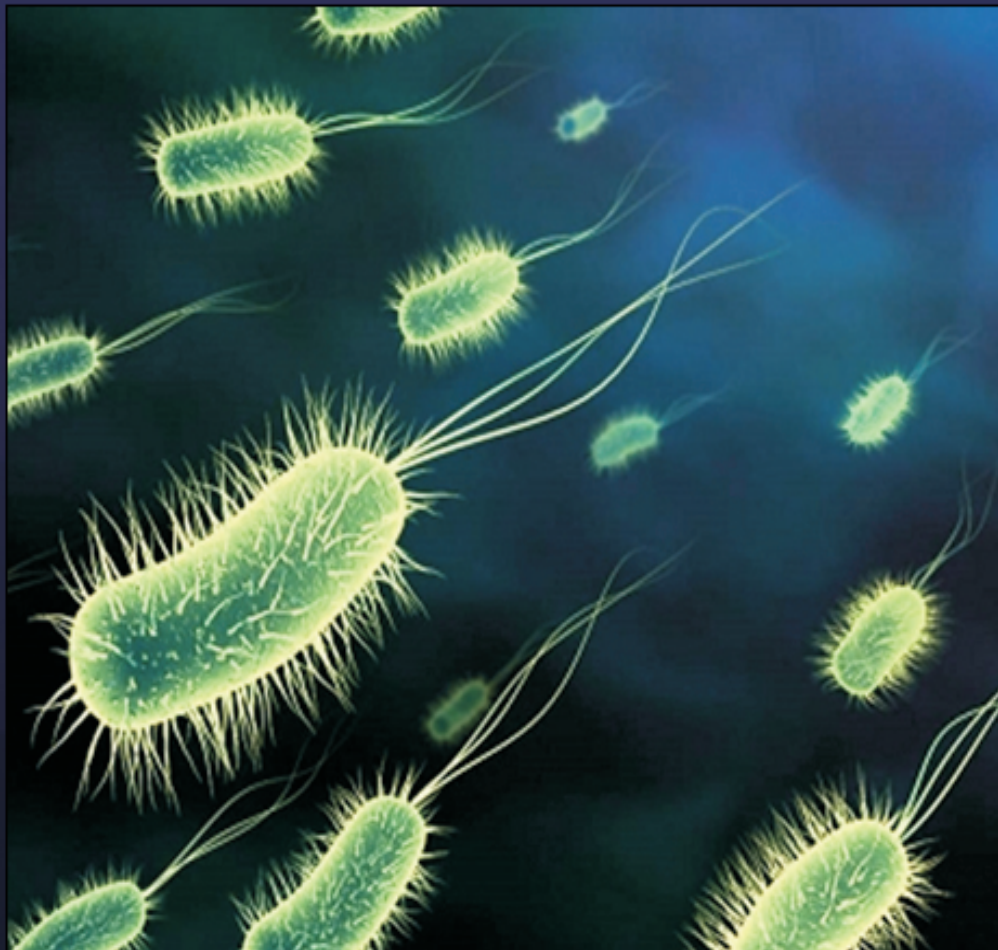


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

**Empleo de espectroscopía infrarroja y espectrometría
MALDI-ToF para la identificación de organismos
pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia* aislados
de pacientes fibroquísticos**

**Estudios comparativos de susceptibilidad a agentes antimicrobianos
entre poblaciones planctónicas y sésiles**



TESIS DOCTORAL

ALEJANDRO G. MIÑÁN

DIRECTOR: OSVALDO MIGUEL YANTORNO

Tapa: Células planctónicas del complejo *Burkholderia cepacia*

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI,
CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
(UNLP).

La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Año 2011

Dedico especialmente a mi Señor y Padre Celestial, por estar presente en cada instante de mi vida, por su fidelidad y amor verdadero.

A mí querida abuela Ángela (en memoria), por su incondicional amor y cuidado.

A mis amados padres, Alicia y Guillermo, por sus oraciones, apoyo e inigualable amor.

A mi amor Maira.

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES (CINDEFI), “DR. RODOLFO J. J. ERTOLA”, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. OSVALDO MIGUEL YANTORNO.

PARTE DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS HAN SIDO PUBLICADOS:

- **Miñán, A., A. Bosch, P. Lasch, M. Stammler, D. O. Serra, J. Degrossi, B. Gatti, C. Vay, M. D'Aquino, O. Yantorno, and D. Naumann. 2009.** Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry. *Analyst* **134**:1138-48.
- **Bosch A., Miñán A., Vescina C., Degrossi J., Gatti B., Montanaro P., Messina M., Franco M., Vay C., Schmitt J., Naumann D., and O. M. Yantorno. 2008.** Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2535-2546.
- **Miñán A, Bosch A, Vescina C, Degrossi J, Gatti B, Franco M, Yantorno O. 2005.** Identificación rápida de bacterias aisladas de pacientes fibroquísticos mediante espectroscopía infrarroja y análisis multivariante. *R. Ludovica pediátr.* **VII**, 4:110-121.

MI RECONOCIMIENTO:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas que permitieron el desarrollo del presente trabajo de Tesis.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) por haberme permitido realizar este trabajo de Tesis Doctoral en sus instalaciones.

A la Fundación FIPAN y al Laboratorio de Espectroscopía Biomédica por la beca otorgada que permitió el desarrollo de la pasantía en el Instituto Robert Koch de Berlín, Alemania.

Al Servicio de Microbiología del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata, por haberme brindado la posibilidad de realizar la pasantía en sus instalaciones.

Este trabajo de Tesis no hubiese sido posible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que el mismo llegue a un feliz término. Por ello, quiero utilizar este espacio para expresar mis agradecimientos:

Al Dr. Osvaldo Yantorno, porque me dio la oportunidad de ingresar al CINDEFI y me abrió las puertas para iniciarme en la investigación. Por su guía en este trabajo de Tesis que hizo posible que pudiera alcanzar este objetivo.

Agradezco también a la Dra. Alejandra Bosch por haberme introducido en el área de la biofísica de la mano de la espectroscopía FT-IR. Por transmitirme sus conocimientos en la temática.

Quiero agradecer a quienes han sido mis compañeros de laboratorio (en orden cronológico):

A Julio, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el trabajo de laboratorio y por su excelente asistencia técnica. Por los mates, compañía, y en especial por ser mi amigo, gracias!.

A María Eugenia por su apoyo y amistad.

A Laurita, por estar siempre ahí, con una sonrisa, y dispuesta a ayudarme en todo lo que necesitara.

A Diego S, por su colaboración, conocimiento, generoso aporte de ideas y sugerencias.

A Claudia, por su compañerismo, alegría y predisposición en ayudarme. Sin olvidarme de su rol de madre en el lab, proveyendo de galletitas en esas largas tardes donde el ayuno amenazaba.

A Yani, el “gilguerito del laboratorio” por su canto (silbido), pero sobre todas las cosas por su simpatía, aliento y disposición.

A Jime, por su buena onda, amistad, y por estar siempre dispuesta a dar una mano. Sin olvidarme de sus excelentes mates.

A Diego N, por su compañerismo y colaboración en todo lo que necesitara.

A Pablo M., por su amistad y buena predisposición. Gracias por la lista!!.

A Laura A., por su incondicional apoyo y amistad.

A Diana, Andrea y Celeste, “mis madres en el CINDEFI” por su excelente calidad humana.

Hago extensivo mi agradecimiento a los compañeros del CINDEFI, con los que compartí horas y horas, y de una u otra manera me ayudaron durante todo este tiempo.

También quiero agradecer a Blanca Gatti por permitirme concurrir al Servicio de Microbiología del Hospital de Niños de La Plata. Por su enseñanza de excelencia, aliento y apoyo en el desarrollo de mi trabajo doctoral, sin olvidarme de su excelente calidad humana.

A Cecilia Vescina y Marisa Bettiol, por enseñarme a dar mis primeros pasos en el manejo microbiológico de aislados clínicos y transmitirme generosamente sus conocimientos.

Quiero agradecer a mis amigos de la vida, Pablo, Emanuel y David. Gracias por los buenos momentos compartidos!. En especial a Pablo por esas tardes de charlas en inglés antes de viajar a Alemania.

No puedo dejar de expresar mi agradecimiento a la familia. A mis padres que han sido esenciales en mi vida, por su amor y apoyo incondicional, por el tiempo dedicado a mi desarrollo como ser humano, y por estar junto a mi en las buenas y en las malas. Por inculcarme valores y alentarme en todas las etapas de mi vida. Sin Uds no podría haber llegado hasta este punto. Muchas Gracias!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 FIBROSIS QUÍSTICA	3
1.1.1 Marco histórico de la enfermedad	3
1.1.2 Características del gen CFTR.....	4
1.1.2.1 Estructura y función.....	4
1.1.2.2 Genotipo, fenotipo y mutaciones en el gen CFTR	6
1.1.3 Manifestaciones clínicas.....	6
1.1.4 Diagnóstico y chequeo neonatal	9
1.1.5 Inflamación e infección pulmonar.....	10
1.1.6 Tratamiento de la FQ.....	12
1.1.6.1 Tratamiento antibiótico en exacerbaciones infecciosas pulmonares.....	13
1.1.6.2 Tratamiento antimicrobiano en la infección pulmonar crónica.....	15
1.1.6.3 Trasplante pulmonar	16
1.1.6.4 Tratamientos futuros.....	17
1.2 PATÓGENOS RESPIRATORIOS	18
1.2.1 Bacilos Gram-negativos y el complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	19
1.2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.2.1.3 Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	20
1.2.1.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	22
1.2.1.4 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	22
1.2.1.5 <i>Ralstonia spp.</i>	22
1.2.1.6 <i>Pandoraea apista</i>	23
1.2.1.7 <i>Inquilinus limosus</i>	23
1.2.2 Identificación de BNF y complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	23
1.2.3 Ubiquidad de organismos del cBc en el ambiente e industria, y su impacto en el área de salud	32
1.3 BIOFILMS MICROBIANOS	37
1.3.1 El concepto del biofilm y su rol en la microbiología actual.....	37
1.3.2 Biofilms en infecciones, su impacto en el área de salud	39
1.3.3 Estructura y composición de los biofilms microbianos.....	41

1.3.4 Etapas de formación del biofilm.....	43
1.3.5 Quorum sensing.....	46
1.3.6 Biofilms y mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	47
1.4 OBJETIVOS	49
1.5 BIBLIOGRAFÍA	53

CAPÍTULO 2. DISCRIMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ORGANISMOS PERTENECIENTES AL COMPLEJO <i>Burkholderia cepacia</i>, EN MUESTRAS DE ESPUTO DE PACIENTES FIBROQUÍSTICOS, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	73
---	-----------

2.1 INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER.....	75
2.1.1 Análisis de muestras biológicas por espectroscopía FT-IR.....	76
2.1.2 Caracterización, discriminación e identificación de microorganismos por espectroscopia FT-IR	79
2.1.2.1 Cultivo de microorganismos.....	80
2.1.2.2 Preparación de la muestra.....	80
2.1.2.3 Adquisición de espectros FT-IR.....	80
2.1.2.4 Requisitos de calidad de los espectros FT-IR.....	81
2.1.2.5 Tratamiento y análisis de espectros FT-IR	83
2.1.2.6 Herramientas de análisis empleadas en la caracterización, discriminación y/o identificación de microorganismos.....	85
2.2 OBJETIVOS	93
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
2.3.1 Microorganismos	95
2.3.2 Aislamiento e identificación fenotípica.....	95
2.3.3 Identificación molecular de bacilos no fermentadores de la glucosa	97
2.3.4 Identificación molecular de aislados del cBc	97
2.3.5 Identificación por análisis de secuencia del gen 16S rRNA.....	97
2.3.6 FT-IR, preparación de la muestra, medición y pre-procesamiento de datos	98

2.3.5 Determinación semicuantitativa de polihidroxiбутirato (PHB).....	100
2.3.6 Análisis jerárquico de cluster (AJC).....	101
2.3.7 Análisis de redes neuronales artificiales(RNAs).....	101
2.3.8 Microscopia electrónica de transmisión (MET).....	102
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
2.4.1 Preparación de la muestra para FT-IR.....	103
2.4.2 Discriminación de bacilos Gram-negativos no fermentadores aislados de muestras de esputo de pacientes fibroquísticos.....	113
2.4.3 Identificación por análisis de RNA.....	117
2.5 CONCLUSIONES	123
2.6 BIBLIOGRAFÍA	125
CAPÍTULO 3. DISCRIMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ORGANISMOS PERTENECIENTES AL COMPLEJO <i>Burkholderia cepacia</i>, EN MUESTRAS DE ESPUTO DE PACIENTES FIBROQUÍSTICOS, MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASA MALDI-TOF	131
3.1 INTRODUCCIÓN	133
3.1.1 Historia y desarrollo de la EM MALDI-ToF.....	133
3.1.2 Principios de la espectroscopía de masa MALDI-ToF.....	134
3.1.3 EM MALDI-ToF, un nuevo enfoque en la identificación bacteriana.....	135
3.1.4 Consideraciones experimentales en EM MALDI-ToF.....	138
3.1.4.1 Preparación de los cultivos e influencia del medio de cultivo en el espectro bacteriano.....	139
3.1.4.2 Efecto del tiempo de cultivo.....	140
3.1.4.3 Procedimiento de preparación de muestra.....	141
3.1.4.4 Efecto de la matriz y solventes en el análisis bacteriano.....	142
3.1.4.5 Discriminación e identificación de bacterias por EM MALDI-ToF.....	145
3.1.4.6 Quemometría.....	147
3.2 OBJETIVOS	149
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	151
3.3.1 Microorganismos.....	151
3.3.2 Aislamiento e identificación fenotípica.....	151

3.3.3 Identificación molecular de bacilos no fermentadores de la glucosa	153
3.3.4 Preparación de la muestra y adquisición de los datos por EMCE/MALDI-ToF	155
3.3.5 Análisis de datos de EMCE/MALDI-ToF.....	156
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
3.4.1 Reproducibilidad de EMCE/MALDI-ToF	159
3.4.2 Discriminación bacteriana basada en la selección de proteínas biomarcadoras de identificación específicas (SIBPs)	162
3.4.3 Identificación bacteriana basada en reducción de datos, selección de características y análisis de cluster jerárquico	168
3.5 CONCLUSIONES	175
3.6 BIBLIOGRAFÍA	177
CAPÍTULO 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE SUSCEPTIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS EN CÉLULAS PLANCTÓNICAS Y SÉSILES DEL COMPLEJO <i>Burkholderia cepacia</i>	185
4.1 INTRODUCCIÓN	187
4.1.1 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cultivos planctónicos ...	189
4.1.2 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cultivos en biofilms	191
4.2 OBJETIVOS	193
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	195
4.3.1 Microorganismos	195
4.3.2 Antibióticos	195
4.3.3 Formación de biofilm. Cuantificación de biomasa.....	198
4.3.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima en células planctónicas	199
4.3.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima en biofilms	199
4.3.6 Actividad bactericida de agentes antimicrobianos frente a biofilms.....	201
4.3.7 Efecto de antimicrobianos en la biomasa del biofilm.....	202
4.3.8 Análisis estadístico	203
4.4 RESULTADOS	205

4.4.1 Susceptibilidad de células planctónicas del cBc frente a agentes antimicrobianos	205
4.4.2 Concentración inhibitoria mínima para células de <i>B. cepacia</i> , <i>B. cenocepacia</i> y <i>B. contaminans</i> creciendo en biofilm (CIMB)	209
4.4.3 Actividad bactericida de antibióticos contra biofilms formados por organismos del cBc.....	214
4.4.4 Efecto de los agentes antimicrobianos sobre la biomasa de los biofilm de <i>B. cepacia</i> , <i>B. cenocepacia</i> y <i>B. contaminans</i>	218
4.5 DISCUSIÓN	221
4.5.1 Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cultivos planctónicos de <i>B. contaminans</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. cenocepacia</i>	221
4.5.2 Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de biofilms maduros de <i>B. contaminans</i> , <i>B. cepacia</i> y <i>B. cenocepacia</i>	224
4.5.3 Comparación de la concentración inhibitoria mínima de cultivos planctónicos y biofilm maduros de <i>B. cepacia</i> , <i>B. cenocepacia</i> y <i>B. contaminans</i>	225
4.5.4 Efecto bactericida y destructor de biofilms maduros de antibióticos individuales.....	226
4.5.5 Efecto bactericida y destructor del biofilm por combinación de dos antibióticos.....	228
4.6 CONCLUSIONES	233
4.7 BIBLIOGRAFIA	235
5 DISCUSIÓN FINAL	241

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPÍTULO 1

<i>Figuras</i>	Páginas
Fig. 1. Modelo estructural simplificado del canal de cloro CFTR..	5
Fig. 2. Dendrograma basado en secuencias parciales del gen 16S rRNA de BNF y especies del género <i>Burkholderia</i> ..	26
Fig. 3. Esquema de identificación de BNF relevantes y miembros del cBc.....	28
Fig. 4. Dendrograma basado en secuencias parciales del gen recA del género <i>Burkholderia</i>	29
Fig. 5. Biofilms bacterianos.....	38
Fig. 6. Esquema de biofilms en dispositivos médicos.....	41
Fig. 7. Patrones de heterogeneidad química en biofilms.....	43
Fig. 8. Etapas del desarrollo en biofilm de <i>P. aeruginosa</i> a partir de células planctónicas..	45
Fig. 9. Hipótesis sobre mecanismos de resistencia de biofilms a agentes antimicrobianos..	48

Tablas

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la FQ ..	7
Tabla 2. Síntomas y signos característicos de la exacerbación pulmonar en FQ..	14
Tabla 3. Miembros del Complejo <i>Burkholderia cepacia</i> ..	20
Tabla 4. Comparación de sistemas de identificación fenotípicos y genéticos.....	27
Tabla 5. Costo estimado de las metodologías de identificación de BNF..	31
Tabla 6. Principales infecciones en humanos asociados a biofilms..	39

CAPÍTULO 2

Figuras

Fig. 1. Espectro FT-IR de absorción de una muestra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> depositada sobre una celda de ZnSe.....	77
Fig. 2. Espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer con modificaciones en la cámara de lectura.....	81
Fig. 3. Aumento de resolución aplicado sobre bandas en la región 1200 – 900 cm ⁻¹ del espectro de un microorganismo.....	84
Fig. 4. Dendrograma resultante del empleo del análisis de cluster jerárquico.....	87
Fig. 5. Representación por análisis de componente principal (PC2 y PC3) de espectros FT-IR..	88
Fig. 6. Esquema de red neuronal donde se detallan las neuronas de entrada, de la capa oculta y las neuronas de salida...	89
Fig. 7. Esquema de desarrollo, entrenamiento y validación de una RNA.....	90
Fig. 8. Esquema de una RNA modular empleada en la identificación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas basada en espectros de FT-IR.....	92
Fig. 9. Esquema del procesamiento de muestras bacterianas para ser analizadas por espectroscopia FT-IR.....	98
Fig. 10. Espectro de absorbancia FT-IR en la región 1800 - 900 cm ⁻¹ de bacilos no fermentadores Gram-negativos..	104
Fig. 11. Espectro FT-IR (en la región 1800 – 600 cm ⁻¹) obtenido durante el crecimiento de un aislado clínico de <i>B. cenocepacia</i>	105
Fig. 12. Dendrogramas mostrando los niveles de reproducibilidad de los espectros (derivadas primeras normalizadas) de dos aislados clínicos.....	107
Fig. 13. Homogeneidad espectral de 15 replicados de <i>B. cenocepacia</i> NF59 y NF69 en el rango 1200 – 900 cm ⁻¹ en función del tiempo de agitación.....	108
Fig. 14. Derivada primera normalizada vectorialmente de espectros de dos aislados clínicos de <i>B. cenocepacia</i> NF 57 (A) y NF 69 (B) en el rango 1500 a 800 cm ⁻¹	110
Fig. 15. Dendrograma basado en el análisis de cluster jerárquico de las derivadas primeras normalizadas de los espectros FT-IR.....	112

Fig. 16. Derivada primera de espectros obtenidos de seis géneros de BNF en las principales ventanas espectrales.....	114
Fig. 17. Dendrograma basado en análisis de cluster jerárquico de bacilos no fermentadores Gram-negativos usando la derivada primera normalizada	115
Fig. 18. El análisis jerárquico de cluster (AJC) muestra la discriminación de los nueve genomovares del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> ..	116
Fig. 19. Sistema de identificación basado en redes neuronales artificiales modulares..	118

Tablas

Tabla 1. Cepas de bacterias Gram-negativas no fermentadoras usadas en este estudio..	96
Tabla 2. Test de calidad espectral.....	100
Tabla 3. Niveles de reproducibilidad obtenidos en células antes y después de remover los apéndices estructurales..	111
Tabla 4. Resultados de identificación de la RNA modular..	120

CAPÍTULO 3

Figuras

Fig. 1. Principio de la espectrometría de masa MALDI-ToF.....	134
Fig. 2. Esquema de la aplicación de EM MALDI-ToF en microbiología.....	136
Fig. 3. Análisis de espectros de masa MALDI-ToF de aislados clínicos correspondientes a nueve géneros de la familia Enterobacteriaceae.....	137
Fig. 4. Protocolo de inactivación por TFA de células vegetativas de microorganismos patógenos..	142
Fig. 5. Análisis de reproducibilidad de espectros de masa MALDI-ToF mediante la aplicación de “gel view” ó “vista en gel”..	145
Fig. 6. Esquema de procesamiento de una muestra bacteriana empleando EMCE/MALDI-ToF.....	155
Fig. 7. Reproducibilidad de espectros de masa MALDI-TOF..	160
Fig. 8. Reproducibilidad en espectrometría de masa MALDI-ToF.....	161

Fig. 9. Representación de la vista en gel de los espectros de masa de células enteras correspondientes a especies de <i>Burkholderia</i> y BNF relacionados.....	165
Fig. 10. Representación de la vista en gel de los espectros de masa de células enteras de cepas de <i>B. multivorans</i>	166
Fig. 11. Representación gráfica de PCA basado en los valores de SIBPs.....	167
Fig. 12. Relación entre las especies de <i>Burkholderia</i> basados en la presencia de SIBPs de especie y cepa.....	168
Fig. 13. Relaciones entre los espectros de masa “crudos” de células enteras de las especies de <i>Burkholderia</i> y los BNF..	169
Fig. 14. Relaciones entre los espectros de masa de células enteras pre-procesados de las especies de <i>Burkholderia</i> y los BNF.....	171
Fig. 15. Dendrograma mostrando las interrelaciones (similaridad) entre los espectros de células enteras correspondientes a las cepas.....	172

Tablas

Tabla 1. Matrices comúnmente empleadas en espectrometría de masa MALDI-ToF..	143
Tabla 2. Bacterias y cepas de referencia empleadas en este estudio..	152
Tabla 3. SIBPS usados para la discriminación de las especies de <i>Burkholderia</i>	164

CAPÍTULO 4

Figuras

Fig. 1. Etapas generales del ensayo de determinación de la concentración inhibitoria mínima del biofilm.....	191
Fig. 2. Representación del ensayo de concentración inhibitoria mínima del biofilm (CIMB) en microplaca.....	198
Fig. 3. Esquema del ensayo de formación de biofilm.....	200
Fig. 4. Representación del ensayo de determinación de la concentración inhibitoria mínima de biofilm.....	201
Fig. 5. Esquema del ensayo de determinación de la concentración bactericida del biofilm..	202

Fig. 6. Esquema del ensayo de destrucción de biofilm por uso de agentes antimicrobianos.....	203
Fig. 7. Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de aislados clínicos y ambientales de <i>B. contaminans</i> ..	212
Fig. 8. Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de aislados clínicos de <i>B. cepacia</i> y <i>B. cenocepacia</i>	213
Fig. 9. Efecto de los agentes antimicrobianos en la viabilidad de aislados clínicos y ambientales de <i>B. contaminans</i> crecidos como biofilm.....	215
Fig. 10. Efecto de meropenem (línea entera) y meropenem + levofloxacin (línea de trazo) en la viabilidad de bacteria sésiles de <i>B. cenocepacia</i> y <i>B. cepacia</i>	217

Tablas

Tabla 1. Características de los antibióticos empleados en el tratamiento de la FQ.....	191
Tabla 2. Aislados del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> usados en este estudio.....	196
Tabla 3. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de tres especies del cBc.....	205
Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima (CIM) para especies relevantes del cBc...	208
Tabla 5. Valores promedios de CIM de tres especies del cBc para los 6 antibióticos testeados.....	209
Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima de biofilms (CIMB) de aislados del cBc a diferentes antibióticos.....	210
Tabla 7. Efecto de los agentes antimicrobianos en el % de reducción de biofilm maduros (48-h) de tres especies del cBc.....	219

ABREVIATURAS

ACHC	Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHSL	Acil-homoserin-lactona
AJC	Análisis Jerárquico de Cluster
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
AS	Ácido Sinápico
ATB	Antibiótico
ATCC	Colección Americana de cultivos de referencia
ATS	Agar Trypticase Soja
BCCM	Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms
BCSA	Medio Selectivo para <i>Burkholderia cepacia</i>
BNF	Bacilos No Fermentadores
CAZ	Ceftazidima
cBc	Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CIM ₅₀	Concentración mínima de antibiótico que inhibe al 50 % de la población
CIM ₉₀	Concentración mínima de antibiótico que inhibe al 90 % de la población
CIMm	Concentración Inhibitoria Mínima media
CIM min	Valor mínimo de CIM
CIM max	Valor máximo de CIM
CIMB	Concentración Inhibitoria Mínima del Biofilm
CIMBm	Concentración Inhibitoria Mínima del Biofilm media
CIP	Ciprofloxacina
CIP/COX	Ciprofloxacina + Cotrimoxazol
CFTR	Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CMHAC	Caldo Mueller Hinton Ajustado en Cationes
COX	Cotrimoxazol

CTT	Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio
CV	Cristal Violeta
Da	Dalton
DO	Densidad Óptica
DOc	Densidad Óptica del control
DSMZ	Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares
EE	Especie-específico
EM	Espectrometría de Masa
EMB	Eosina Azul de Metileno
EMCE/ MALDI-ToF	Espectroscopía de Masa MALDI-ToF de Células Enteras
EPS	Exopolisacáridos
FQ	Fibrosis Quística
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
IL	Interleucina
LB	Luria Bertani
LEV	Levofloxacin
LEV/MEM	Levofloxacin + Meropenem
LMG	Laboratorium Microbiologie Gent Culture Collection, Gent, Belgium
m/z	Relación masa-carga
MALDI-TOF	Desorcion/Ionización Laser Asistida por Matriz – Tiempo de Vuelo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente
MSD	Membrane Spanning Domains
MEM	Meroopenem
MIN	Minociclina
MLST	Multilocus Sequence Typing
NBD	Nucleotide Binding Domains
NT	No Testeado
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCA	Análisis de Componente Principal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHB	Ácido poli-β-hidroxibutírico
PQA	Proteína Quinasa A

Abreviaturas

PFasa	Proteína Fosfatasa
RFLP	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
RNA	Red Neuronal Artificial
SIBPs	Proteínas Biomarcadoras Específicas de Identificación
ST	Secuencia clonal Tipo
TC	Test de Calidad
TFA	Ácido trifluoroacético
TIR	Tripsinógeno Inmunoreactivo
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VEF	Volumen Espiratorio Forzado
UFC	Unidad Formadora de Colonias

“Cuando vemos lo que sucede en el mundo de la ciencia y en el funcionamiento del universo, no podemos negar que existe un capitán en el puente.”

Thomas Edison

Capítulo 1

Introducción General

1.1 FIBROSIS QUÍSTICA

1.1.1 Marco histórico de la enfermedad

La fibrosis quística (FQ) o mucoviscidosis es la enfermedad autosómica recesiva más letal en individuos caucásicos, con una frecuencia estimada en Argentina de 1 en 5600 nacidos vivos [65, 183]. La misma fue descripta por primera vez en Holanda en 1595 por Peter Paaw, el cual realizó una autopsia en una niña fallecida de 11 años de edad, la cual se suponía que había sido “hechizada”. En sus anotaciones describió que la niña se encontraba muy delgada, con el páncreas abultado, cirrótico y de color blanco brillante. En 1677, se publicó un libro titulado “Observations Medicae Rariores” por Gearduis Blasius, director del Hospital de Amsterdam, donde se describe la autopsia de un niño de 9 años de edad, con una atrofia de páncreas, el cual se encontraba cirrótico (de consistencia fibrosa dura). En los pueblos de Europa, quedó instaurado en el imaginario de esa época que los niños con cuadro de desnutrición y que en su frente presentaran un excesivo sabor salado se encontraban embrujados. Debieron transcurrir varios siglos, hasta que en 1938 la enfermedad adquiere su nombre actual, cuando la patóloga norteamericana Dorothy Andersen, utiliza por vez primera el término "Fibrosis Quística del Páncreas". El doctor Sydney Farber, fue el primero en llamarla "Mucoviscidosis". Finalmente en 1989, Kerem y colaboradores publican que la fibrosis quística (FQ) es una enfermedad causada por la mutación en un gen que codifica un canal de cloro defectivo denominado regulador de conductancia transmembrana de la FQ (acrónimo en inglés Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; CFTR), el cual se expresa en muchas células epiteliales y sanguíneas [115, 191].

La FQ conduce a cambios patológicos en órganos que expresan el CFTR, incluyendo glándulas de secreción exocrina, pulmones, páncreas, hígado y gónadas. Los cambios más notorios se producen en las vías aéreas, donde este defecto genético da lugar a infecciones pulmonares crónicas las cuales son la principal causa de la morbilidad y mortalidad asociadas a estos pacientes. Hasta el presente se han identificado más de 1500 mutaciones en el gen CFTR aunque unas pocas de ellas tienen importancia funcional. Las diferentes mutaciones, el polimorfismo en otros genes del genoma y factores ambientales hacen que las manifestaciones clínicas de la FQ sean diferentes entre pacientes, aun exhibiendo la misma mutación en el CFTR [217, 254].

En las últimas décadas, gracias a los avances en la identificación temprana y mejoras en el tratamiento sintomático de esta enfermedad la expectativa de vida en pacientes FQ se ha incrementado hasta los 45 años de edad en países avanzados. Lamentablemente, la FQ permanece incurable y las terapias paliativas son onerosas.

1.1.2 Características del gen CFTR

1.1.2.1 Estructura y función

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, de los pares de bases 116.907.253 al par de base 117.095.955 (aproximadamente 250Kb) comprendiendo 27 exones [259]. La proteína CFTR es un polipéptido constituido por 1480 aminoácidos, la 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 (Fig. 1). Los primeros son denominados dominios MSD (membrane spanning domains), cada uno constituido por seis hélices alfa cuya función es anclar la proteína a 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 la proteína quinasa A. El carboxilo terminal de la proteína está unido al citoesqueleto por interacción con dominios proteicos PDZ (dominios de reconocimiento) [191, 202].

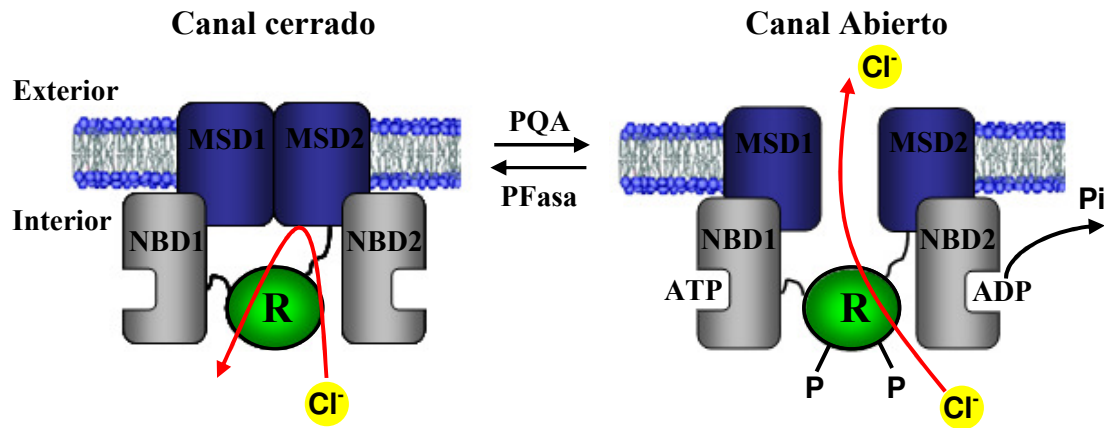


Fig. 1. Modelo estructural simplificado del canal de cloro CFTR. El flujo del cloro a través del canal está regulado por la fosforilación de una PQA dependiente de cAMP y ciclos de ATP ligados a la hidrólisis en los NBDs. Abreviaciones: MSD, dominio transmembrana; PQA, proteína quinasa A; PFasa, proteína fosfatasa; NBD, dominio de unión a nucleótido; P, fosforilación del dominio regulador R; Pi, fosfato inorgánico; R, dominio regulador. Esquema adaptado del trabajo publicado por Li y cols [133].

La proteína CFTR funciona como un canal de iones a través de la membrana celular, permitiendo el paso de cloro en respuesta a señales celulares. Estos canales son encontrados en tejidos que producen mucus, saliva, sudor, lagrimas y enzimas digestivas (ej. vías aéreas, pulmón, páncreas, intestino, etc.). El CFTR controla la composición de las secreciones epiteliales mediante la liberación o absorción de sales y agua, manteniendo así la fluidez de las mismas [182, 202]. Asimismo, regula la función de otros canales, como el vinculado al transporte de sodio a través de la membrana celular. El normal funcionamiento de estos canales asegura que órganos, tales como los pulmones y el páncreas funcionen apropiadamente.

La regulación del 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 es fosforilado en numerosos sitios de fosforilación consenso por una proteína quinasa A dependiente de cAMP. 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 [131]. 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).

1.1.2.2 Genotipo, fenotipo y mutaciones en el gen CFTR

Hasta el presente han sido identificadas más de 1500 mutaciones en el gen que codifica 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. La mutación más común a nivel mundial es la $\Delta F508$ (70% en individuos caucásicos), que lleva a una delección de la fenilalanina de la posición 508 de la proteína CFTR [134]. 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 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 salir del retículo endoplasmático y es degradada prematuramente [188]. Las mutaciones clase III, presentan 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, el 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 normal del CFTR. La amplia variedad de mutaciones en el CFTR explicaría parcialmente la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de la FQ. Si bien existe una fuerte correlación entre el fenotipo y genotipo en individuos que sufren insuficiencia pancreática, este comportamiento no se observa en la función pulmonar.

1.1.3 Manifestaciones clínicas

El canal de cloro CFTR se expresa principalmente en el tejido epitelial donde juega un rol crucial al regular la calidad y composición de las secreciones epiteliales. La

disfunción de CFTR produce una alteración en el transporte de iones y por ende en la secreción de sal y agua en los tejidos donde se expresa, conduciendo a una amplia variedad de manifestaciones clínicas a nivel gastrointestinal, respiratorio, y reproductivo (Tabla 1) [85].

Tabla 1. Manifestaciones Clínicas de la FQ

Enfermedad Pulmonar Crónica

Tos crónica

Colonización de las vías aérea por patógenos (ej. *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa*)

Obstrucción de las vías aéreas

Anormalidades persistentes en el tórax

Dedos en palillos de tambor

Pansinusitis

Pólipos nasales

Enfermedad Gastrointestinal

Íleo 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)

Infertilidad dada la azoospermia obstructiva

Tabla adaptada de Ratjen y Döring [188]

El principal órgano afectado en la FQ es el páncreas, alcanzando al 85-90% de los pacientes. La insuficiencia pancreática se origina por la acumulación de secreciones densas en los conductos pancreáticos. Esta obstrucción desencadena la activación prematura de proenzimas responsables de la destrucción del tejido y la fibrosis [82]. Al mismo tiempo se produce una disminución de la secreción de enzimas pancreáticas que causan una absorción deficiente de nutrientes esenciales y la subsiguiente desnutrición que lleva a un retraso en el crecimiento y desarrollo. En caso de las glándulas sudoríparas, la disfunción de CFTR da lugar a un sudor salado producto de una menor reabsorción de NaCl en el interior de los ductos, convirtiéndose en un marcador destacado de la enfermedad [182]. Las vías respiratorias están revestidas por diversas

clases de células incluyendo células ciliadas y caliciformes que cumplen una función crucial en la limpieza mucociliar y como primera línea de defensa frente a microorganismos en suspensión aérea [133]. Asimismo, las glándulas submucosas liberan mucinas y sustancias antimicrobianas al fluido pulmonar, manteniendo así al pulmón estéril. Sin embargo los pulmones de los individuos FQ presentan una falla tanto en la limpieza como a nivel del sistema inmune, lo cual conduce a una enfermedad respiratoria caracterizada por infecciones bacterianas persistentes [206]. Un factor de importancia relacionado a la limpieza ciliar eficiente, es una adecuada relación entre la altura y la viscosidad en la capa de líquido periciliar. Se piensa que en pacientes FQ la disminución de este líquido o su pérdida por una absorción anormal asociada a la disfunción de CFTR, conduce a la deshidratación del moco volviéndolo denso [154, 251]. Este moco se adhiere a la superficie epitelial, captura microorganismos y exhibe una disminución en su capacidad de remoción. Esta situación favorece a las bacterias ya que les permite sobrevivir empleando estrategias como el cambio a un fenotipo mucoso o la formación de biofilms [253].

La gravedad de la FQ varía considerablemente entre pacientes. Individuos con el mismo genotipo podrían tener una evolución clínica muy diferente, llevando a unos hacia la muerte o trasplante pulmonar a temprana edad y a otros a mostrar el deterioro pulmonar recién alcanzada la adultez. La fertilidad se encuentra disminuida en prácticamente la totalidad de los afectados de FQ. El 95% de los hombres son estériles, como consecuencia de la obstrucción y atrofia de los conductos deferentes y las estructuras asociadas o por la disminución de producción de semen y espermatozoides [78]. En las mujeres la infertilidad se produce generalmente como consecuencia del incremento de la densidad y viscosidad del moco vaginal, que impide la progresión normal del espermatozoide hacia el óvulo [123]. Además pueden mencionarse otras causas secundarias de infertilidad como una ovulación irregular, la existencia de pólipos cervicales y quistes ováricos.

1.1.4 Diagnóstico y chequeo neonatal

El diagnóstico temprano de la FQ, junto con un plan de tratamiento integral puede mejorar tanto la supervivencia como la calidad de vida del individuo. Por este motivo es esencial contar con metodologías que permitan el diagnóstico certero de la enfermedad. En individuos FQ el transporte anormal de iones se manifiesta por una alta concentración de NaCl en el sudor y una elevada diferencia de potencial eléctrico en el epitelio nasal, por tanto ambas características pueden ser usadas para el diagnóstico [194, 209, 252].

El test del sudor se practica mediante la estimulación de la sudoración en la superficie anterior del antebrazo empleando pilocarpina. El hallazgo de una concentración de NaCl superior a 60 mmol/L en análisis repetidos al menos 2 veces en días diferentes, es diagnóstico de FQ [164] aunque en el 5% de los casos existen resultados falsos negativos [73]. El diagnóstico puede ser confirmado por determinación genética de mutaciones del gen que codifica CFTR teniendo en cuenta las variaciones más frecuentes en la región a la que pertenece el individuo [194, 209, 252]. En el caso de pacientes con resultados dudosos del test de sudor se recomienda la identificación del gen de CFTR. Los pacientes con FQ manifiestan insuficiencia pancreática en el 85-90% de los casos y una concentración disminuida de quimotripsina o elastasa pancreática específica pueden ser también criterios de confirmación de este desorden.

Con el objeto de realizar un diagnóstico clínico precoz 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 del recién nacido y se basa en la medida de tripsinógeno inmunoreactivo (TIR) en sangre [56, 187]. Altas concentraciones de TIR sugieren injuria pancreática, consistente, aunque no específica con FQ. Este marcador se encuentra aumentado aún en neonatos con mutaciones clase IV y V asociados con insuficiencia pancreática. Los recién nacidos que exhiben una alta concentración TIR en el examen inicial deben someterse a una nueva determinación pasadas 1 a 3 semanas del primer examen (TIR/TIR), o por análisis de la muestra inicial para determinar una mutación del gen de CFTR específica (TIR/DNA) [46, 223]. La ventaja del análisis TIR/TIR es que evita los problemas asociados con la detección de mutaciones de clínica desconocida.

1.1.5 Inflamación e infección pulmonar

Los pulmones de los niños con FQ son al nacer normales en apariencia, pero con el tiempo 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 [200]. Se ha sugerido que la inflamación es previa a la infección posiblemente relacionada a fallas en CFTR [74, 121]. Los individuos FQ, aun encontrándose sanos, exhiben un incremento en la síntesis de diversos mediadores de inflamación, principalmente interleuquina (IL)-1, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α [63]. En paralelo, la disminución de los niveles de IL-10 con actividad antiinflamatoria, no logra autolimitar la inflamación y genera la acumulación de neutrófilos [116], los cuales liberan elastasas y proteasas que lesionan el tejido pulmonar e interfieren con los mecanismos fagocíticos [140]. Por estos motivos la inflamación es considerada uno de los principales factores de daño pulmonar.

La infección crónica de las vías aéreas, progresa a una bronquiectasia, 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 [193]. No obstante la colonización por *Pseudomonas aeruginosa* puede ocurrir en niños a partir de los 3 años de edad [28]. La infección bacteriana persistente conduce a la generación y secreción de citoquinas quimioattractantes, las cuales reclutan un gran número de células polimorfonucleares en las vías aéreas. *P. aeruginosa* amplifica el ciclo de inflamación e infección por liberación de toxinas y elastasas que cortan los principales marcadores de superficie en células polimorfonucleares. Estas células entonces liberan sus propias proteasas y elastasas que exacerban la injuria a cualquier célula en la región [102]. Posteriormente, las exotoxinas y los productos de los neutrófilos dañados estimulan el reclutamiento de más células polimorfonucleares, llevando a más inflamación, y a un aumento en el daño tisular. La liberación de ADN de células polimorfonucleares senescentes conduce al incremento en la viscosidad del esputo [61]. De este modo el pulmón entra en un ciclo vicioso de inflamación, injuria pulmonar e infección que llevará a la pérdida total de la función pulmonar y por ende a la muerte del paciente. Las vías aéreas de pacientes FQ favorecen el crecimiento de microorganismos por varias razones: ofrecen un microambiente adecuado dentro de nichos hipóxicos en placas de mucus adherente,

llevan a un incremento de bacterias unidas al epitelio, y disminución de la remoción bacteriana por mecanismos de la respuesta inmune innata [107, 155, 253].

Se ha reportado que *P. aeruginosa* crece inicialmente bajo formas no mucoides las cuales pueden ser removidas por el hospedador, o erradicadas por un tratamiento antibiótico agresivo [106, 221]. Con el tiempo, las células de *P. aeruginosa* adheridas a tejidos sintetizan una capa de alginato y forman biofilms [31], los cuales una vez establecidos son difíciles o imposibles de remover con el tratamiento antimicrobiano convencional. Por lo tanto, pacientes libres de *P. aeruginosa* poseen una vida más longeva [122, 125]. En este contexto, una práctica habitual es el monitoreo de la presencia de *P. aeruginosa*, con aplicación de estrategias para erradicar la infección temprana por el uso de antibióticos inhalatorios con o sin quinolonas orales en investigación [189, 227]. Las vías aéreas del paciente FQ pueden ser infectadas por otros patógenos, tales como *Burkholderia cepacia* (un complejo que comprende al menos 17 especies), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA), *Ralstonia pickettii*, *Pandoraea spp.*, *Acinetobacter spp.* y micobacterias atípicas. Muchas especies del complejo *Burkholderia cepacia* (cBc) tienen una resistencia a antibióticos innata, son transmisibles de persona-a-persona, y son altamente virulentas [142]. Asimismo, la infección por organismos del cBc puede causar la disminución de la función pulmonar, e incrementar la mortalidad en pacientes con FQ [72]. En ocasiones, la infección con el complejo puede ser invasiva y desencadenar una bacteriemia fatal, comúnmente denominada “Síndrome cepacia” [108]. *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 de este organismo de ocasionar una respuesta inflamatoria más robusta de las células del hospedador comparado con otras especies del cBc [75, 111]. Otras especies del cBc también pueden causar deterioro agudo. Por lo tanto es una necesidad para los centros de atención de pacientes FQ contar con una estrategia rápida y efectiva que permita identificar por un lado al patógeno y que permita controlar efectivamente la infección [114]. Otro patógeno relevante es MRSA que alcanza una frecuencia de infección del 15-20% entre pacientes FQ. Su presencia en vías aéreas está relacionada a una pobre función pulmonar [67]. El aislamiento de *S. maltophilia* es cada vez más frecuente en pacientes FQ, aunque su presencia no ha sido relacionada con el bienestar o el rápido deterioro pulmonar [93]. 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 [173-174]. 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 1-15% de los pacientes FQ según la región geográfica [153, 210].

1.1.6 Tratamiento de la FQ

En la actualidad no existe una cura definitiva para la FQ, el tratamiento en la práctica se basa en aliviar los síntomas de la enfermedad. El principal objetivo de toda terapia es prevenir o enlentecer la progresión del daño pulmonar. A este nivel el tratamiento está dirigido al control de la infección e inflamación y evitar la acumulación de mucus. Entre los procedimientos de rutina no-farmacológicos, se destaca la fisioterapia de tórax que tiene por objeto mejorar la remoción del moco pulmonar. Asimismo, esto puede ser complementado por inhalación de DNAsa, la cual ha demostrado ser útil en la reducción de la viscosidad del esputo, traer gran mejoría a la función pulmonar y disminuir los episodios de exacerbación respiratoria.

La terapia antiinflamatoria tiene un rol importante en el tratamiento de la enfermedad. Se basa principalmente en el uso de corticoides, macrólidos e ibuprofeno, aunque la administración de los mismos debe realizarse con cierta precaución. Los glucocorticoides orales e inhalados no son recomendados para uso rutinario [87], debido a que presentan efectos adversos significativos como cataratas, intolerancia a la glucosa y retardo en el crecimiento [83, 126], haciendo que la relación riesgo/beneficio a largo plazo sea desfavorable para el paciente. Solamente ante episodios de exacerbación grave, se indica la administración de corticoides sistémico como prednisona durante períodos breves. Los macrólidos (ej. azitromicina y claritromicina) son fármacos de conocida actividad antiinflamatoria, que actuarían a nivel de la cascada inflamatoria disminuyendo la actividad quimiotáctica de los neutrófilos, mediadores inflamatorios (citoquinas IL-TNF), generación de superóxidos y liberación de elastasa. El empleo de macrólidos se asocia a una mejoría en la función pulmonar y la disminución de la frecuencia de exacerbación respiratoria [84]. Otro fármaco antiinflamatorio empleado es ibuprofeno, cuya acción se asocia al retardo de la caída de la función pulmonar [127].

Sin embargo no se recomienda su administración rutinaria y requiere del dosaje de su concentración en sangre.

A pesar de todo lo indicado el tratamiento con antibióticos es el que mejora significativamente el pronóstico de vida del paciente infectado. Este tratamiento debe ser agresivo, temprano y realizado en centros especializados en esta enfermedad. En los primeros años de vida, la antibioticoterapia tiene un carácter profiláctico a fin de evitar el desarrollo de infecciones por bacterias como *S. aureus*. Sin embargo existe cierta controversia en el uso de esta estrategia. Doull y cols [81] señalaron contraindicaciones como la adquisición temprana de *P. aeruginosa*, facilitar la transición de cepas de *P. aeruginosa* no mucoides a cepas mucoides y la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes. Eventualmente, pese al tratamiento preventivo, *S. aureus*, *H. influenzae* y *P. aeruginosa*, logran establecerse en el pulmón. Asimismo la evolución de la enfermedad conduce a la aparición de resistencia bacteriana a los antimicrobianos y de bacterias intrínsecamente multi-resistentes como las del cBc, lo cual se asocia a un pronóstico desfavorable. La administración de antibióticos específicos de manera individual o en combinaciones, son la base tanto del tratamiento de la infección aguda (exacerbación) como de la infección bronquial crónica por estos microorganismos.

1.1.6.1 Tratamiento antibiótico en exacerbaciones infecciosas pulmonares

Se define una exacerbación respiratoria cuando los síntomas y signos se intensifican debido al aumento de la carga bacteriana e inflamación. Para considerar una exacerbación deben estar presentes al menos dos de las manifestaciones clínicas descritas en la Tabla 2. Si bien no existe una definición estricta que discrimine entre exacerbaciones leves, moderadas y graves, esta última se caracteriza por una disminución del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF₁) en un 15-20% respecto del valor basal y/o el paciente no responde a los antibióticos orales y/o presenta insuficiencia respiratoria. Por tanto el objetivo del tratamiento antibiótico es restaurar la situación basal clínica y funcional del paciente, previa al episodio de exacerbación.

Tabla 2. Síntomas y signos característicos de la exacerbación pulmonar en FQ

Síntomas	Signos
- Aumento de la frecuencia y duración de la tos	- Aumento de la frecuencia respiratoria
- Aumento de la producción de esputo	- Uso de la musculatura respiratoria accesoria
- Cambios en la consistencia y color del esputo	- Nuevos hallazgos auscultatorios en el tórax
- Aumento de la disnea	- Descenso de los parámetros funcionales respiratorios (VEF ₁ , CVF)
- Disminución de la tolerancia al ejercicio físico	- Disminución de la saturación arterial de oxígeno
- Astenia, anorexia	- Pérdida de peso, fiebre, leucocitosis, hemoptisis

VEF₁: Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo. CVF: Capacidad Vital Forzada. Tabla adaptada del trabajo publicado por Ramsey, B [186].

Exacerbaciones leves o moderadas: La elección del fármaco se basa en los resultados del cultivo, análisis antimicrobiano y en la respuesta clínica del paciente. Se recomiendan antibióticos de amplio espectro, de administración oral siempre que sea posible, especialmente dirigidos contra *H. influenzae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* [3]. Los antibióticos orales disponibles para las exacerbaciones por *P. aeruginosa* son escasos. El más eficaz es ciprofloxacina, con una elevada biodisponibilidad oral y excelente actividad contra la mayoría de los microorganismos de las vías respiratorias de pacientes FQ [168]. En el tratamiento de una exacerbación moderada, los antibióticos tienen que ser administrados en forma oral, inhalatoria (ej. colistina, gentamicina, tobramicina) o de ambas formas hasta que el paciente vuelva al estado basal en el que se encontraba previo a la exacerbación. En el caso particular del cBc, se recomienda la combinación de dos antibióticos orales como ciprofloxacina/cotrimoxazol [181]. La terapia demanda generalmente 14 días y en ocasiones puede extenderse una semana más si no ha llegado a su nivel basal [3, 35].

Exacerbaciones graves: Por lo general requieren administración endovenosa de uno o más antibióticos según la sensibilidad demostrada por la población responsable de la infección. La estrategia recomendada es emplear dosis altas de antibióticos durante 14 a 21 días para intentar conseguir la máxima eficacia con la mínima inducción de resistencias [166, 186]. Habitualmente los tratamientos endovenosos se practican bajo

internación hospitalaria, aunque en la actualidad debido a las presiones económicas y sociales se realizan en los mismos hogares de los pacientes. Este tratamiento se continúa hasta que el paciente mejore su función pulmonar, y como se mencionó esto requiere de un tiempo no menor a los 14 días. El régimen antibiótico habitual en pacientes colonizados por *P. aeruginosa* consiste en la asociación de un aminoglucósido (ej. amikacina, gentamicina, tobramicina) y un β -lactámico (ej. cefalosporinas o carbapenemes) [32, 35]. La ceftazidima suele ser el fármaco de primera elección por la sinergia que presenta con los aminoglucósidos [60] y la ventaja de su administración (dos o tres veces al día), lo que facilita el tratamiento intravenoso en el domicilio del paciente [32]. Es aconsejable reservar la ciprofloxacina para su administración oral.

En el caso de detectarse la presencia de organismos pertenecientes al cBc, los fármacos recomendados por vía endovenosa son meropenem y ceftazidima, mientras que por vía oral se puede emplear minociclina, cotrimoxazol y ciprofloxacina [14, 35]. Ha sido reportado que la utilización frecuente de antibióticos en estos pacientes incrementa la resistencia *in vitro* [130]. Una estrategia recomendable frente a aislados multi-resistentes del cBc y de *P. aeruginosa*, consiste en el uso de una combinación de dos o más antibióticos a dosis más altas de las habituales, basado en la sinergia de los antibióticos demostrada *in vitro* [1, 197] se observó una disminución de los síntomas asociados a la infección respiratoria en pacientes FQ. Si bien en infecciones causadas por el cBc no se ha establecido un tratamiento estándar ideal, se recomienda la combinación de un antibiótico endovenoso activo como meropenem junto a otro de administración oral como ciprofloxacina o cotrimoxazol [35]. Los pacientes colonizados por *S. aureus* y *H. influenzae* pueden tratarse con β -lactámicos (ej. cefalosporinas), por vía oral o endovenosa [35].

1.1.6.2 Tratamiento antimicrobiano en la infección pulmonar crónica

Se considera a una colonización / infección pulmonar como crónica cuando se aísla una misma especie microbiana de muestras de esputo del paciente, al menos en tres cultivos sucesivos durante un período de 6 meses. El tipo de terapia antibiótica a emplear en estos casos es de mantenimiento y busca minimizar el deterioro clínico funcional en pacientes que padecen este tipo de infección.

La elección del antibiótico y la vía de administración dependen del tipo de microorganismo aislado y su resistencia. En pacientes con infección bronquial crónica por *P. aeruginosa*, la vía de administración más recomendada es la inhalatoria. Los antibióticos son seleccionados de acuerdo a los resultados de sensibilidad del antibiograma, así se puede comenzar utilizando gentamicina, colistina e incluso se podría administrar amikacina. Asimismo la utilización intermitente (28 días de tratamiento y 28 de descanso) de tobramicina inhalatoria (TOBI) a dosis de 300 mg cada 12 h, en pacientes FQ colonizados por *P. aeruginosa* con afección pulmonar moderada-grave (VEF₁ entre el 25 y el 75% del teórico), disminuye el recuento de *P. aeruginosa* en el esputo, mejora la función pulmonar y reduce el número de ingresos hospitalarios sin favorecer la colonización por otros gérmenes [29]. Debido al elevado costo de TOBI en nuestro País (costo de tratamiento mensual \$ 18.000-20.000) existen restricciones prácticas para su utilización generalizada. Aunque no existe un consenso universal sobre la duración del tratamiento contra la colonización bronquial crónica por *P. aeruginosa*, resulta aconsejable el tratamiento prolongado, sin intermitencias.

La terapia antibiótica empleada en la infección crónica por bacterias del cBc sigue los lineamientos del tratamiento de infección crónica por *P. aeruginosa*. En algunos centros de referencia en FQ de nuestro País, y en particular en el Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata, se recomienda el uso de colistina inhalatoria en pacientes FQ. En caso que el paciente manifieste un cuadro de exacerbación pulmonar aguda, la terapia antibiótica será reemplazada, y se seguirá el procedimiento descrito en el ítem 1.1.6.1.

Es importante tener en cuenta que toda terapia antimicrobiana debe ser realizada bajo estrictas medidas de control de infecciones que incluyen el aislamiento del paciente, especialmente aquellos colonizados por el cBc, en áreas de atención separadas, lo cual reduce el riesgo de diseminación e infección paciente-paciente.

1.1.6.3 Transplante pulmonar

Los pacientes FQ que se encuentran en la etapa terminal de la enfermedad pulmonar tienen como última opción el transplante pulmonar, que si bien es un tratamiento no curativo puede prolongar la vida del paciente, la calidad de la misma mejorando la capacidad funcional del pulmón. Los criterios de indicación de trasplante pulmonar son: a) VEF₁ ≤ 30% del teórico, hipoxemia y/o hipercapnia grave;

b) deterioro respiratorio progresivo (aunque su VEF_1 sea mayor del 30% del teórico), evidenciado por un aumento de la frecuencia y duración de las exacerbaciones pulmonares graves; y c) complicaciones pulmonares con riesgo vital, como la hemoptisis masiva recurrente [256]. Sin embargo existen una serie de contraindicaciones absolutas que impiden la realización del trasplante pulmonar como: infecciones virales por HIV, Hepatitis B y C, y tuberculosis activa [35]. Otras contraindicaciones de carácter infeccioso pueden ser consideradas como relativas, como las causadas por: *P. aeruginosa* resistente a múltiples antibióticos, *Mycobacterium abscessus*, *S. aureus* meticilino resistente, cBc, y *Aspergillus fumigatus* [4, 105, 142, 257]. Es importante mencionar que en muchos centros nosocomiales se considera a la infección por cBc, y en especial por *B. cenocepacia*, como una contraindicación absoluta para trasplante pulmonar debido a la alta mortalidad post-trasplante que presentan estos pacientes [35].

1.1.6.4 Tratamientos futuros

La gran esperanza para el futuro es el desarrollo de terapias que resuelvan los defectos de base de los pacientes FQ. Los más recientes tratamientos están dirigidos a las mutaciones específicas del gen CFTR. En mutaciones clase I el empleo de aminoglucósidos ayuda a que la producción de proteína CFTR continúe. En mutaciones de clase II, el fenilbutirato y bifenilo bloquearían las proteínas encargadas de impedir el tránsito del CFTR. La estrategia más prometedora a futuro es el uso de terapia génica, cuyo objeto es restaurar la función normal del CFTR en el epitelio de las vías aéreas usando vectores virales o no virales. Dentro de los virales se encuentran adenovirus, o el virus sendai, los vectores no virales incluyen liposomas o polímeros catiónicos, los cuales están en desarrollo. Por tanto el rol de los pediatras es guiar a los pacientes de manera que alcancen su máximo desarrollo potencial y físico hasta que ellos puedan beneficiarse del desarrollo de la terapia génica.

1.2 PATOGENOS RESPIRATORIOS

La principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes FQ está asociada a ciclos de inflamación e infección causados por la colonización bacteriana del tejido pulmonar. Así, el aislamiento y la correcta identificación de patógenos respiratorios son considerados pasos críticos para el tratamiento antimicrobiano, manejo del paciente, prevención de diseminación de patógenos y para la expectativa de vida del individuo infectado. Aunque microorganismos como *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* se encuentran comúnmente asociados a infecciones pulmonares [19, 70], los pacientes FQ son además susceptibles a bacterias oportunistas como las pertenecientes al cBc, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *Pandoraea* spp, *Ralstonia* spp y otras especies [69, 162]. La mayoría de estas bacterias son bacilos Gram-negativos no fermentadores, ubicuos y multi-resistentes que persisten en el pulmón del paciente FQ a pesar de prolongados e intensos tratamientos antimicrobianos, como consecuencia probablemente de sus capacidades de formar biofilms. De esta manera las infecciones se vuelven crónicas con manifestación de varios episodios de exacerbación por año, que conducen al deterioro pulmonar progresivo. Las técnicas moleculares han permitido la identificación de un gran número de bacterias capaces de colonizar el pulmón FQ, revelando que la flora microbiana es más compleja de lo imaginado e introduciendo el concepto de la FQ como una enfermedad infecciosa polimicrobiana [203].

Fuera de este contexto, los bacilos no fermentadores (BNF) actúan como patógenos oportunistas en pacientes gravemente enfermos o inmunocomprometidos. Muchos de estos microorganismos representan un riesgo potencial de infección en centros nosocomiales, debido a su habilidad de sobrevivir en diversos hábitats como agua, ambientes húmedos (*P. aeruginosa*) o superficies secas (*Acinetobacter* spp). Entre los BNF, *P. aeruginosa* es el principal agente causal de infecciones nosocomiales, seguido por *Acinetobacter* spp, *S. maltophilia* y *Alcaligenes* spp. Las variaciones en la susceptibilidad a los antimicrobianos son comunes entre los BNF [196, 233], exhibiendo resistencia a la mayoría de los antimicrobianos de uso clínico, diferencias en su potencial patogénico y transmisibilidad [260]. A continuación se detallan las principales características de los BNF más relevantes para pacientes FQ.

1.2.1 Bacilos Gram-negativos no Fermentadores y el complejo *Burkholderia cepacia*

1.2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, perteneciente al grupo de las γ -proteobacterias, móvil por medio de un flagelo unipolar y positivo a la reacción de oxidasa. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza [51, 101], y se puede aislar de muestras de suelo, aguas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas. Esta bacteria es capaz de crecer utilizando diferentes compuestos orgánicos, lo cual le permite colonizar una amplia variedad de nichos, algunos tan diversos como el combustible de aviones, desinfectantes (clorhexidina) y jabón. *P. aeruginosa* representa un problema significativo en los centros de salud, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer, quemados o que padecen FQ [17]. *P. aeruginosa* coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de pacientes FQ, y a medida que progresa la infección se selecciona un fenotipo mucóide, el cual produce grandes cantidades del exopolisacárido alginato. Una vez establecida la infección pulmonar por estas cepas mucoides, los pacientes FQ entran en la etapa terminal de la enfermedad. La persistencia de la infección se debe a la capacidad de estas bacterias de desarrollar biofilms, permitiéndoles sobrevivir períodos muy prolongados en los pulmones de pacientes con FQ, resistiendo la acción del sistema inmune y la terapia antimicrobiana. Según estudios llevados a cabo por Vonberg y Gastmeier [242], *P. aeruginosa* es responsable de la colonización pulmonar de pacientes FQ en más del 50% de los casos. La prevalencia de esta bacteria se hace evidente en pacientes FQ adultos (mayores de 18 años) alcanzando cifras superiores al 80% [2, 226], comparado con su incidencia en niños (0-2 años) cercana al 20%.

P. aeruginosa puede presentar tres tipos de colonias. En general los aislados ambientales exhiben una colonia pequeña y rugosa. En cambio los aislados clínicos presentan colonias lisas pudiendo ser de dos tipos, una con forma de “huevo frito”, grande, con las bordes engrosados y otra de apariencia mucosa, asociada con la producción de alginato, la cual suele ser aislada de secreciones respiratorias y de tracto urinario. Tal diferenciación genera diversos problemas en el seguimiento médico,

debido a que es necesario en primera instancia identificar el morfotipo para luego elegir la estrategia del tratamiento [152, 197]. Desafortunadamente, *P. aeruginosa* se caracteriza por una notable resistencia a antimicrobianos, donde unos pocos son efectivos lo cual hace al tratamiento terapéutico un desafío para los clínicos.

1.2.1.2 Complejo *Burkholderia cepacia* (cBc)

El cBc es un grupo de bacilos Gram-negativos, aeróbicos, rectos o ligeramente curvados que presentan movilidad mediante flagelos. Durante muchos años éste complejo estuvo constituido por nueve especies formales, las cuales en principio fueron denominadas como genomovares (I-IX) [41, 136]. Recientemente las técnicas moleculares han permitido ampliar los miembros del cBc a 17 especies e incluir un taxón denominado K o grupo K [238-239]. Asimismo se han identificado por métodos genéticos bacterias que pertenecen al cBc pero que no corresponden a las especies conocidas, por tanto estas bacterias representan una fuente potencial de nuevas especies del cBc. En la Tabla 3 se listan las especies que forman parte de este complejo.

Tabla 3. Miembros del Complejo *Burkholderia cepacia*

Especies	Genomovar	Referencia
<i>Burkholderia cepacia</i>	I	[27, 236]
<i>Burkholderia multivorans</i>	II	[236]
<i>Burkholderia cenocepacia</i> subtipo IIIA	III	[235]
<i>B. cenocepacia</i> subtipo IIIB	III	[235]
<i>B. cenocepacia</i> subtipo IIIC	III	[235]
<i>B. cenocepacia</i> subtipo IIID	III	[235]
<i>Burkholderia stabilis</i>	IV	[236-237]
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	V	[92, 236]
<i>Burkholderia dolosa</i>	VI	[240]
<i>Burkholderia ambifaria</i>	VII	[42]
<i>Burkholderia anthina</i>	VIII	[234]
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	IX	[234]
<i>Burkholderia ubonensis</i>	-	[241]
<i>Burkholderia latens</i>	-	[239]
<i>Burkholderia arboris</i>	-	[239]
<i>Burkholderia diffusa</i>	-	[239]
<i>Burkholderia metallica</i>	-	[239]
<i>Burkholderia seminalis</i>	-	[239]
<i>Burkholderia lata</i> *	-	[238]
<i>Burkholderia contaminans</i> *	-	[238]

* Especies pertenecientes al Taxon K del cBc. Tabla adaptada del trabajo de Lipuma, J. [135].

El género *Burkholderia* es muy versátil, ubicuo y conocido por sus bajos requerimientos nutritivos, capacidades que le permiten sobrevivir en hábitat extremos y diversos. Estas características han posibilitado el empleo de organismos del cBc y otras especies del género en procesos benéficos para el ambiente como biorremediación [44, 169], biocontrol, fijación de nitrógeno [92] y promoción del crecimiento de plantas [175]. Sin embargo los miembros del cBc han sido reconocidos como notables patógenos oportunistas en pacientes severamente debilitados, inmunocomprometidos y FQ [108, 220]. La infección por bacterias del cBc es motivo de gran preocupación en individuos FQ, ya que se asocia a un rápido deterioro de la función pulmonar, aún mayor que el causado por otros patógenos como *P. aeruginosa* [54]. La principal causa de transmisión del cBc en pacientes FQ es por el contacto persona-a-persona, sin embargo es posible la adquisición de cepas a través de soluciones farmacéuticas contaminadas o del ambiente natural [142]. Una vez que el paciente es colonizado por un miembro del cBc, difícilmente esta bacteria logre ser erradicada. La respuesta clínica del paciente luego de un intenso tratamiento terapéutico suele ser variable, pudiendo el individuo recobrar y mantener la función pulmonar, ó padecer de un cuadro clínico fatal conocido como “síndrome cepacia” caracterizado por un rápido deterioro pulmonar, neumonía, fiebre y bacteriemia [108]. Las infecciones pulmonares causadas por el cBc son difíciles de tratar debido a que estas bacterias son intrínsecamente resistentes a numerosos antibióticos incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y fluoroquinolonas [14]. Asimismo bacterias del cBc son capaces de formar biofilms en el pulmón del paciente con FQ [204], condición que le confiere una elevada tolerancia a los pocos antibióticos efectivos [33, 211].

La incidencia en la transmisión, el pronóstico y la mortalidad son distintivamente característicos de cada especie del complejo, al igual que las estrategias empleadas en el tratamiento de pacientes FQ [207]. Desafortunadamente bacterias pertenecientes al cBc son difíciles de aislar debido a su lento crecimiento respecto de otros microorganismos con los cuales comparte un mismo nicho ya sea pulmonar o ambiental. Asimismo otras especies del género *Burkholderia* que no pertenecen al cBc pueden ser aisladas de pacientes FQ como es el caso de *B. gladioli* [18, 64] y *B. pseudomallei* [48, 167]. Por estos motivos, es fundamental contar con metodologías precisas, que permitan la detección rápida de las especies del cBc, lo cual es esencial para evaluar el riesgo, el pronóstico y la epidemiología en pacientes FQ [159]. Una

descripción más amplia de las características de las especies del cBc, epidemiología y métodos de identificación se detallan en el ítem 1.2.3.

1.1.2.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

Es un bacilo Gram-negativo, aerobio, que presenta movilidad mediada por un flagelo polar. *S. maltophilia* es catalasa positiva y oxidasa-negativa, pruebas que lo distingue de la mayoría de los BNF, además de ser positivo para el ensayo de DNAsa extracelular. *S. maltophilia* es un patógeno oportunista, frecuentemente aislado en los centros nosocomiales [77, 94, 158], y es frecuentemente recuperado de pacientes adultos que padecen FQ. Este microorganismo exhibe un elevado índice de coinfección previa con *P. aeruginosa* y el cBc [93-95]. La prevalencia de este patógeno en los pacientes FQ ha aumentado en los últimos años [245], y recientemente se ha asociado la infección crónica como un factor de riesgo de exacerbación pulmonar [244].

1.1.2.4 *Achromobacter xylosoxidans*

Es un bacilo Gram-negativo, móvil, oxidasa y catalasa positiva. Normalmente se distribuye por vía aérea, pero puede también ser un patógeno humano generador de bacteriemia, meningitis y neumonía [139]. Es reconocido como un patógeno emergente, con una incidencia creciente en los pacientes con FQ. Además exhibe un índice de coinfección elevado con *P. aeruginosa* [222, 232].

1.1.2.5 *Ralstonia spp.*

Se trata de un bacilo Gram-negativo, no fermentador del cual se conoce poco sobre su ocurrencia natural y patogenicidad. En principio esto puede ser explicado por las dificultades inherentes a la identificación, motivo por el cual suele ser incorrectamente caracterizado como *Pseudomonas fluorescens* o como un miembro del cBc [86, 255]. Algunos estudios indican que patógenos de este género poseen una baja frecuencia en pacientes FQ, sin embargo son considerados como patógenos emergentes. Coenye y cols [45] señalaron el potencial riesgo de infección por *Ralstonia spp.* al

demostrar la permanencia de esta bacteria durante más de 20 meses en el esputo de pacientes con FQ.

1.1.2.6 *Pandoraea apista*

Es una bacteria Gram-negativa no fermentadora que en los últimos años ha mostrado un aumento de su incidencia entre pacientes FQ, representando un posible patógeno emergente en tales pacientes [41, 112]. Atkinson y cols [13] analizaron cultivos de esputo de 2 pacientes adultos con FQ (de 30 y 36 años respectivamente), y encontraron que ambos estaban colonizados por esta bacteria y coinfectados con *P. aeruginosa*. Esta observación tiene una importancia notable debido al hecho que estos pacientes habían sido infectados en primer lugar por *P. aeruginosa*, lo que indica que tal patógeno puede actuar como un punto de partida para las infecciones con *P. apista*.

1.1.2.7 *Inquilinus limosus*

En 2002, Coenye y cols. [40] aislaron 8 cepas de las secreciones de las vías respiratorias en pacientes con FQ en los Estados Unidos. Fueron identificadas como un nuevo género llamado *Inquilinus*, perteneciente a las α -proteobacterias y más tarde conocido como *I. limosus*. Se trata de una bacteria mesofílica, Gram-negativa y que no forma esporas. Debido a su reciente caracterización, el conocimiento sobre su hábitat natural, prevalencia y patogenicidad es reducido pero se han identificado pacientes con FQ que están infectados con esta bacteria en centros hospitalarios de Francia, España y Alemania [62, 246].

1.2.2 Identificación de BNF y complejo *Burkholderia cepacia*

La identificación de BNF en el laboratorio clínico se basa principalmente en características morfológicas y metabólicas que incluyen crecimiento a diferentes temperaturas, determinación de actividades enzimáticas, asimilación de fuentes de carbono (azúcares) y nitrógeno (aminoácidos), y perfil de susceptibilidad a antibióticos. Algunos BNF, como *P. aeruginosa* son fácilmente identificados mediante algunos

rasgos fenotípicos característicos como por ejemplo, producción de pigmentos difusibles, prueba de oxidasa positiva, crecimiento a 42 °C, brillo metálico y olor típico a “frutas” [22]. Sin embargo otros BNF no pueden ser identificados por simples características morfológicas y es necesario emplear un mayor número de pruebas bioquímicas. En la actualidad se encuentran disponibles varios kit comerciales que censan simultáneamente diversas características metabólicas. Estos kits 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), PHOENIX (BD, Sparks, Md.), y MicroScan (Dade Behring, West Sacramento, EEUU.). La identificación final de un aislado bacteriano por medio de estos sistemas requiere de 6 a 48 h posteriores a su recuperación, dependiendo de la especie bacteriana, y del tipo de software de análisis. El requisito de estas metodologías es contar con un cultivo bacteriano puro. Los medios de cultivo empleados se adaptan en función de los aislados predominantes en FQ, en el caso de Gram-negativos son comunes los medios como EMB (Eosin methylene Blue), MacConkey y el medio selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA).

Todos los sistemas de identificación mencionados han contribuido al manejo y tratamiento de pacientes FQ. Sin embargo, las pruebas fenotípicas presentan limitaciones tales como: (i) no todas los aislados correspondientes a una determinada especie exhiben una determinada característica, (ii) una misma cepa puede dar resultados diferentes al repetir la prueba, y (iii) las bases de datos pueden encontrarse limitadas en el número de microorganismos. En particular, los BNF recuperados de los pacientes FQ pueden presentar problemas debido a variaciones fenotípicas y al lento crecimiento causado por la presión que ejercen los antimicrobianos sobre estos organismos, en los pulmones de estos pacientes.

Los métodos de identificación genotípica representan una alternativa o complemento de los procedimientos de identificación fenotípica tradicionales empleados de rutina en laboratorios hospitalarios. Así, el análisis de secuencia del gen 16S rRNA es una herramienta molecular que en principio fue ampliamente aceptada para la identificación de numerosas bacterias emergentes, incluidas las multi-resistentes que podían ser halladas en pacientes FQ [38, 86, 91]. En particular esta técnica tuvo éxito en la identificación de BNF que fueron incorrectamente identificados o que no fue posible su identificación mediante métodos fenotípicos de rutina [23].

En la Fig. 2 se muestra un dendrograma obtenido a partir del empleo del gen 16S rRNA para discriminar e identificar los organismos BNF más relevantes aislados de pacientes FQ. La principal ventaja de esta metodología se basó en el gran número de secuencias bacterianas del gen 16S rRNA disponibles en las bases de datos públicas (GenBank, la base de datos en la secuencia de nucleótidos el Laboratorio Europeo de Biología Molecular, Banco de Datos de ADN de Japón, RDP II), que permiten un análisis rápido y proporciona información filogenéticamente significativa. Esta metodología basada en la secuenciación del RNA ha contribuido a la identificación, clasificación y estudios taxonómicos de muchos microorganismos. Sin embargo el uso de la técnica de 16S rRNA fue objetado en el año 2000 por el grupo de Mahenthiralingam debido a que no era capaz de discriminar entre algunos genomovares del cBc (135). Por estas razones, otros métodos moleculares novedosos, más simples y rápidos se han desarrollado para la correcta identificación de BNF, tales como Real Time PCR para especies como *P. aeruginosa* [10, 247], cBc [179] e *I. limosus* [21] y metodologías de hibridización *in situ* con sondas fluorescentes aplicada a *P. aeruginosa* [247], cBc [25], *A. xylooxidans* y *Alcaligenes faecalis* [248].

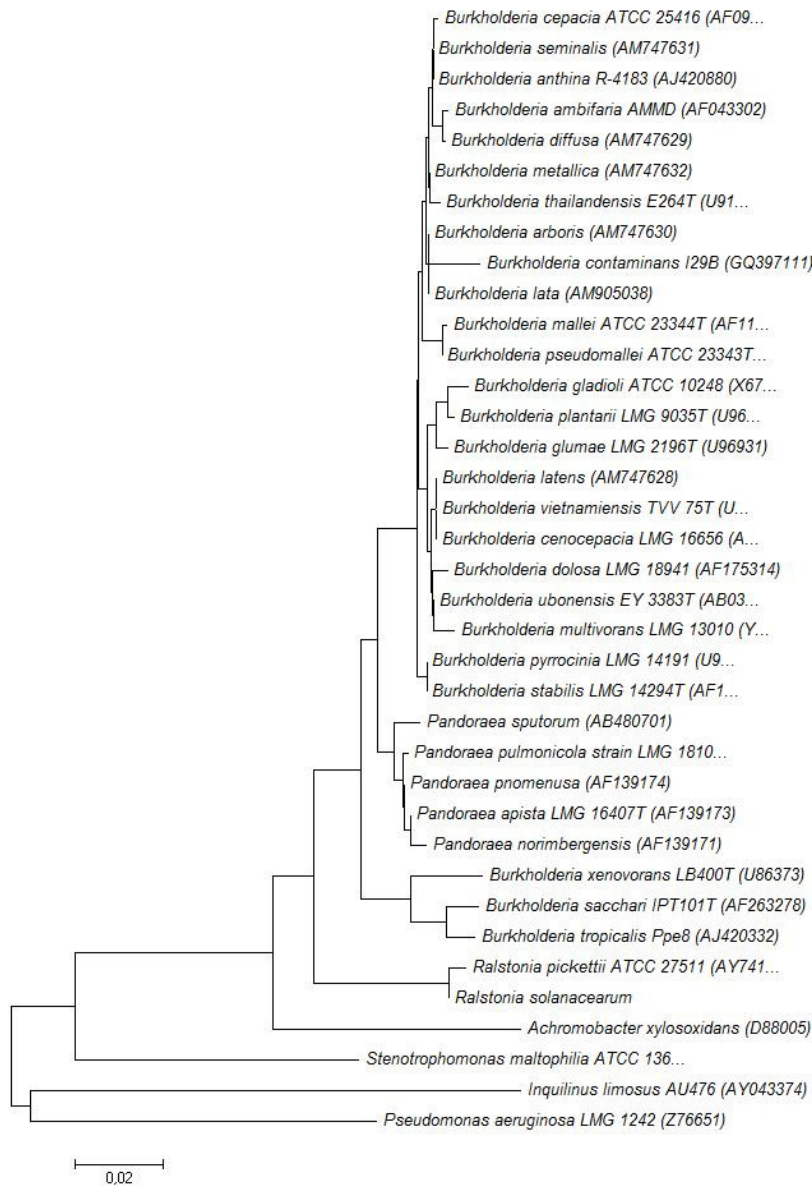


Fig. 2. Dendrograma basado en secuencias parciales del gen 16S rRNA de BNF y especies del género *Burkholderia*. El dendrograma fue construido usando el método de neighbour-joining basado en los parámetros de Jukes & Cantor [113]. Todas las secuencias empleadas en este análisis fueron obtenidas de las base de datos del GenBank. La barra indica 2 sustituciones cada 100 nucleótidos. En paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias pertenecientes a la base de datos del GenBank. La figura fue adaptada de las referencias [90] y [86].

Tabla 4. Comparación de sistemas de identificación fenotípicos y genéticos

Ensayo	% Correcta identificación a nivel taxonómico		% Incorrecta identificación a nivel taxonómico		
	Especie	Género	Especie	Género	No asignado
API 20NE	45,5 (n = 41)	10 (n = 9)	6,5 (n = 6)		38 (n = 34)
VITEK 2 (tarjeta fluorescente)	48 (n = 43)	2 (n = 2)	5,5 (n = 5)		44,5 (n = 40)
VITEK 2 (tarjeta colorimétrico)	59 (n = 53)	10 (n = 9)	20 (n = 18)	1 (n = 1)	10 (n = 9)
Secuenciación del gen 16S rRNA	90 (n = 81)	10 (n = 9)			

Tabla adaptada del trabajo publicado por Zbinden y cols [258]

Diversos estudios han comparado la utilidad de los métodos fenotípicos y moleculares en la identificación de especies relevantes de BNF [12, 23, 258]. En general, estos estudios demostraron que los métodos fenotípicos comerciales (API20NE, VITEK2 fluorométrico y VITEK2 colorimétrico) alcanzan un porcentaje de identificaciones correctas a nivel de especie que oscila entre el 45–59%, inferior a los métodos moleculares que corresponden a porcentajes mayores al 90%. La Tabla 4 compara resultados de identificación mediante métodos fenotípicos con el secuenciamiento del gen 16S rRNA. Los datos corresponden a una publicación del año 2007.

En particular, el sistema VITEK exhibe una mayor certeza en las identificaciones de BNF relevantes como *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia*, organismos del cBc y *Acinetobacter spp.* cuando estas se encuentran en la categoría de excelentes o muy buenas. Basados en estos resultados se ha propuesto un esquema de identificación de BNF donde en un primer nivel se emplean métodos fenotípicos y en un segundo nivel se utiliza un método genético para resolver la identificación de aquellas especies cuya caracterización fue dudosa en el nivel previo (Fig. 3). En el caso particular del cBc, la identificación a nivel de especie es importante debido a su correlación con el pronóstico clínico del paciente, en especial la infección por *B. cenocepacia* no solo se asocia al rápido deterioro de la función pulmonar sino también es considerada como una contraindicación de trasplante pulmonar.

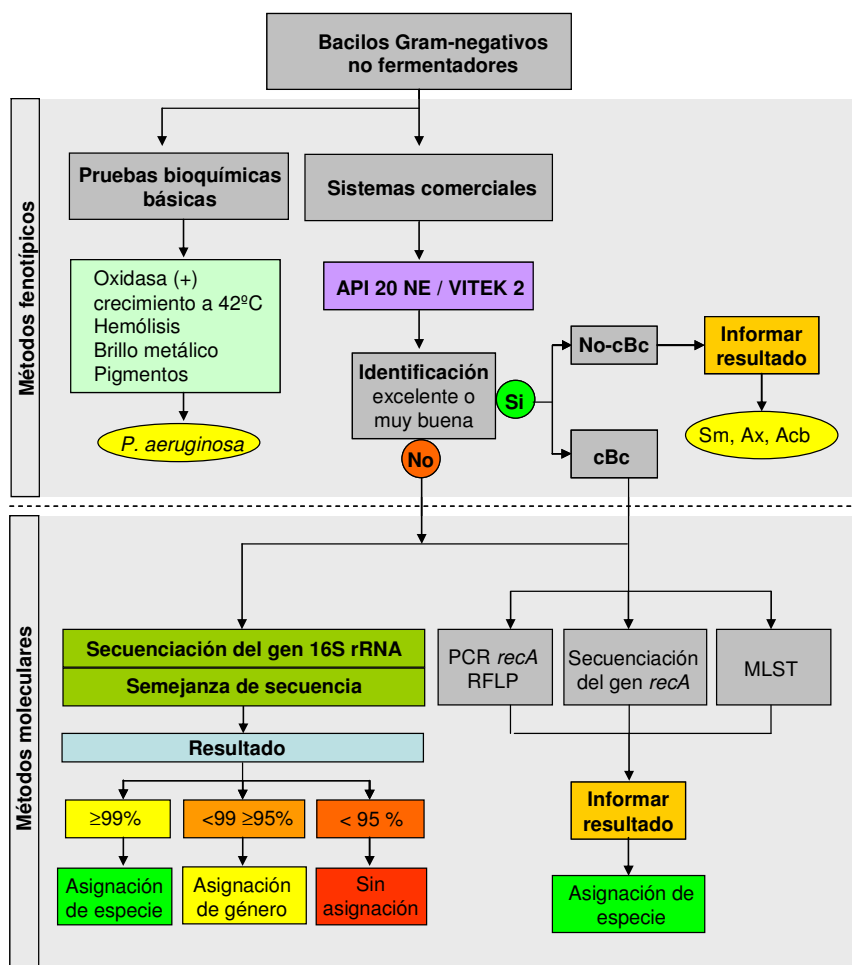


Fig. 3. Esquema de identificación de BNF relevantes y miembros del cBc. Sm: *Stenotrophomonas maltophilia*; Ax: *Achromobacter xylosoxidans*; Acb: *Acinetobacter baumannii*; MLST: Multilocus sequence typing; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism. Esquema adaptado del trabajo publicado por Bosshard y cols [23].

Desafortunadamente, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA no posee el nivel de resolución necesario para discriminar todas las especies del cBc, en particular *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. stabilis*, debido a la elevada homología (> 98%) de estas especies [16, 86]. En respuesta a esta limitación Mahenthiralingam y cols [144] desarrollaron otros métodos genéticos basados en la secuencia polimórfica del gen *recA*, como es el análisis de PCR-RFLP, primers especie-específicos (EE) y la secuenciación del gen *recA*. En este sentido la amplificación del producto del gen *recA* de 1040 pb usando los primers BCR1 y BCR2 [144] ha sido efectiva en la identificación de aislados pertenecientes al cBc. Sin embargo, las técnicas basadas en *recA* RFLP [157, 234] y primers EE presentan limitaciones en la identificación del actual número de especies (al

menos 17) del cBc [241]. De esta manera, solo la secuenciación del gen *recA* ha sido capaz de discriminar y clasificar un aislado dentro de las especies conocidas o en un nuevo grupo del cBc [176] (Fig. 4). Asimismo esta herramienta ha logrado discriminar 4 subtipos diferentes en la especie *B. cenocepacia* designados como A, B, C y D [235]. A pesar de la utilidad de la secuenciación del *recA* como método de identificación, esta técnica basada en un sola secuencia ha sido superada por una nueva metodología denominada Multilocus Sequence Typing (MLST).

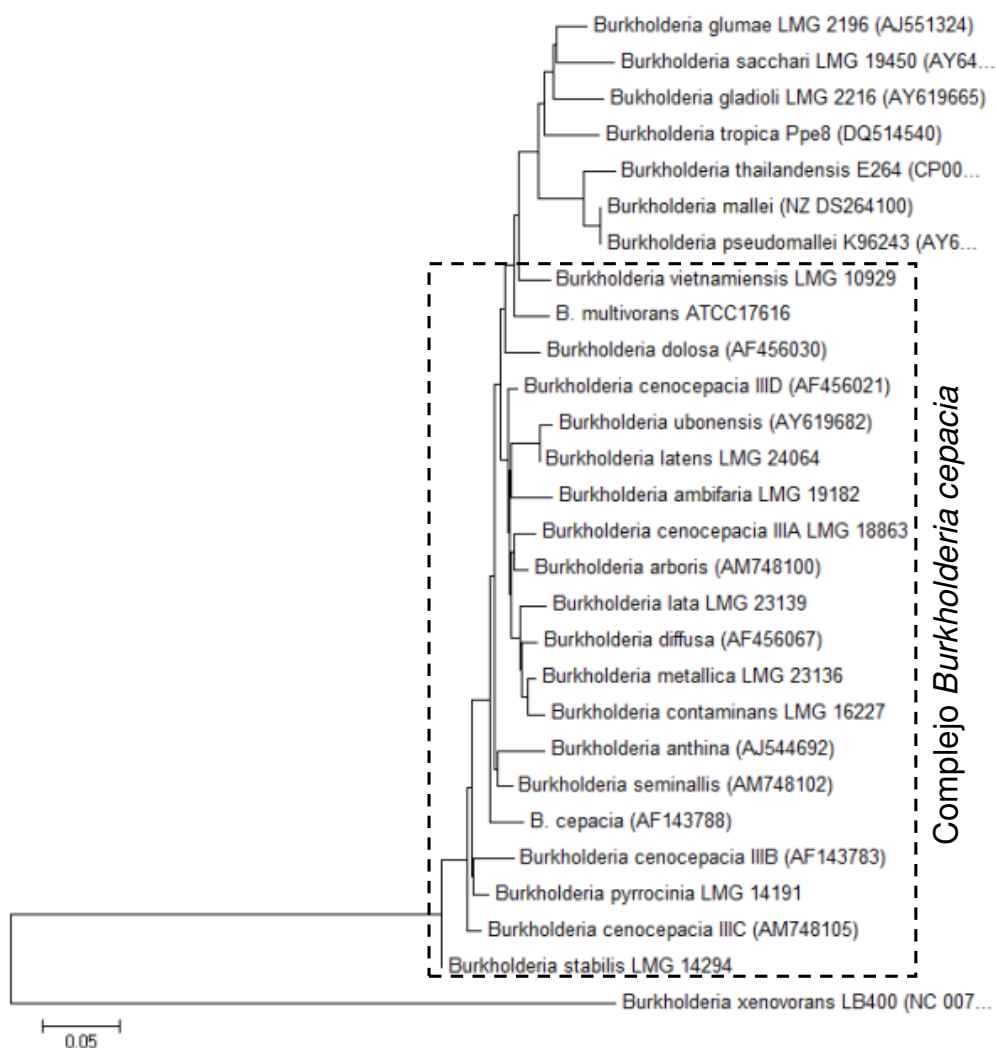


Fig. 4. Dendrograma basado en secuencias parciales del gen *recA* del género *Burkholderia*. El dendrograma fue construido usando el método de neighbour-joining basado en los parámetros de Jukes & Cantor. Todas las secuencias empleadas en este análisis fueron obtenidas de las base de datos del GenBank. La barras indican 5 sustituciones cada 100 nucleótidos respectivamente. En paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias pertenecientes a la base de datos del GenBank. Figura adaptada de las referencias [239], [238] y [176].

La estrategia empleada en MLST del cBc se basa en analizar los polimorfismos de siete genes vinculados al housekeeping que se encuentran en el primer y segundo cromosoma para luego usar el perfil de alelos resultante en la asignación de secuencias clonales tipo (ST) para cada cepa única [15]. Los genes empleados en el MLST son: cadena- β de ATP sintasa, *atpD*; subunidad mayor de glutamato sintasa, *gltB*; DNA girasa B, *gyrB*; recombinasa A, *recA*; proteína ligante de GTP, *lepA*; acetoacetyl-CoA reductasa, *phaC* y triptófano sintasa, *trpB*, donde de cada gen se amplifican fragmentos internos de aproximadamente 450-500 pb. En cada gen, a las diferentes secuencias alélicas se les asigna un número único arbitrario (alelo tipo), independientemente de las diferencias en el número de nucleótidos entre alelos. La combinación de estos 7 genes proporciona un perfil alélico, el cual representa una ST única. En este sentido, cepas que exhiben perfiles alélicos idénticos tienen las mismas STs y son definidas como clones porque son genotípicamente indistinguibles entre sí. Asimismo las STs pueden ser agrupadas en complejos de cepas estrechamente relacionadas (clonales) sobre la base de compartir un nivel umbral de identidad alélicas con al menos un ST de otro grupo. Habitualmente cada cepa del complejo exhibe cinco o seis STs comunes [229]. La ventaja más significativa en el uso de MLST es que con una sola técnica es posible la identificación a nivel de especie y la discriminación de cepas sin error [15, 150, 230] mediante una base de datos públicos de secuencias MLST del cBc. Sin embargo esta metodología no se emplea aún de rutina en nuestro País ya que no resulta sencilla de implementar en los servicios hospitalarios nacionales. Además la misma demanda un tiempo excesivo en la obtención de resultados si no se dispone de laboratorios locales que realicen la secuenciación de los genes blanco.

El carácter polimicrobiano de la infección respiratoria en pacientes FQ, exige el empleo de diversos métodos de identificación que tienen que conducir a un diagnóstico certero. Por este motivo la identificación de patógenos respiratorios en estos pacientes es una de las prácticas más costosas en el área de salud. La Tabla 5 resume los costos aproximados de cada una de las técnicas descriptas. Estos valores fueron estimados en conjunto con el personal del Servicio de Bacteriología del Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata. Es interesante notar que los métodos fenotípicos comerciales presentan un costo cercano a lo requerido en ensayos genéticos de mayor precisión (secuenciación).

Tabla 5. Costo estimado de las metodologías de identificación de BNF y de organismos del complejo *Burkholderia cepacia*.

Determinación	Costo en Pesos/determinación ^a
Pruebas bioquímicas básicas	14,5
API 20NE	31,1
VITEK 2 (tarjeta)	55,2
Secuenciación 16S rRNA	51,1
PCR RFLP <i>recA</i>	3,9
PCR <i>recA</i> primers EE^b	3,9
Secuenciación <i>recA</i>	51,1
MLST	51,1 - 357

En negrita se describen las metodologías de identificación de organismos del cBc a nivel de especie.

^a Los costos corresponden solo a los reactivos consumibles por determinación.

^b En la actualidad la técnica de PCR *recA* primers EE ha dejado de usarse por la elevada tasa de identificaciones erróneas a nivel de especie.

En la práctica clínica donde la identificación temprana es crucial, los métodos fenotípicos comerciales suelen ser más atractivos que los genéticos por su simplicidad, relativa rapidez y utilidad en la identificación de numerosos organismos, pese a su menor nivel de certeza. Los métodos moleculares basados en la secuenciación del ADN (16S rRNA, *recA* y MLST) aunque son más precisos, presentan ciertas desventajas al momento de su empleo rutinario como: (i) elevado costo, (ii) técnicas laboriosas, (iii) los resultados finales demandan un tiempo excesivo y (iv) requieren de equipo y personal especializado en técnicas de biología molecular. Este último punto es crítico debido a que las bases de datos públicas de ADN no realizan un control de calidad exhaustivo de las secuencias que se depositan en ellas, pudiendo contener secuencias erróneas o mal asignadas que conducen a una incorrecta identificación de los aislamientos. Asimismo la identificación por secuenciación de gen 16S rRNA de un aislado particular a nivel de especie, requiere de la asignación de un valor de corte de homología para este gen, el cual puede no estar claramente definido y variar entre diferentes géneros bacterianos. De esta manera se hace imprescindible contar con personal experimentado que pueda interpretar los datos de secuencias de ADN.

Por los motivos previamente mencionados, en nuestro País, la discriminación e identificación de organismos pertenecientes al cBc a nivel hospitalario, continúa siendo un problema de difícil solución.

1.2.3 Ubiquidad de organismos del cBc en el ambiente e industria, y su impacto en el área de salud

El cBc ha sido reconocido como uno de los grupos de bacterias más versátil, ubicuo y capaz de realizar procesos tan complejos como la degradación de contaminantes aromáticos, protección y promoción de crecimiento en plantas, como así también de provocar infecciones en humanos, animales y plantas. La descripción original de *B. cepacia* [27] y los estudios subsiguientes se enfocaron principalmente en la microbiología ambiental. Sin embargo, su rol como patógeno en humanos permaneció oculto hasta que a mediados de los 80's surgen las primeras publicaciones que asocian a esta bacteria con infecciones de carácter letal en individuos FQ [108, 220]. Estos trabajos describieron por primera vez la naturaleza virulenta de las infecciones por organismos del cBc, por esa época *Pseudomona cepacia*, los cuales a diferencia de otros patógenos pulmonares en FQ como *P. aeruginosa*, eran capaces de conducir a un rápido e incontrolable deterioro clínico, acompañado de bacteriemia (aprox. 10% de los casos), denominado "síndrome cepacia". En general la infección pulmonar por bacterias del cBc en pacientes FQ se correlaciona con una pronóstico desfavorable, largos períodos de internación y un incremento del riesgo de muerte [148]. Posteriores estudios moleculares demostraron que la transmisión de bacterias pertenecientes al cBc entre pacientes FQ era producto del contacto social [98, 137], lo cual fue motivo de gran preocupación en la población FQ. En respuesta a esta situación se publicó una guía nacional de cuidados y hábitos de conducta con el objeto de prevenir la adquisición de estas cepas [99]. La política de control de infección estableció que los pacientes FQ infectados con *Burkholderia* debían ser atendidos en clínicas, separados de aquellos pacientes con infección con *P. aeruginosa* o que no se encontraran infectados.

A mediados de los 90's se reportaron numerosos brotes epidémicos por miembros del cBc en pacientes FQ en Canadá, Reino Unido y EEUU [109-110]. Estos brotes se caracterizaron por el predominio de cepas de *B. cenocepacia* altamente transmisibles o mejor adaptadas a infecciones en humanos, donde sobresalen las cepas denominadas ET12 [75, 110, 147, 218], Philadelphia-District Columbia y Mid-West [43, 109]. A raíz de estas observaciones algunos marcadores de virulencia y transmisibilidad han sido descriptos, destacándose el marcador de cepa epidémico de *B.*

cepacia (*B. cepacia* epidemic strain marker (BCESM) y el gen de la subunidad de cable pili *cblA*) [146]. Lamentablemente, estudios posteriores indicaron que la presencia de dichos marcadores era poco frecuente en aislados del cBc haciéndolos inadecuados para uso como marcadores universales de patogenicidad [156]. Es interesante resaltar que si bien diversos estudios epidemiológicos revelaron la presencia de otras cepas epidémicas del cBc, la mayoría de las cepas problemáticas pertenecen a *B. cenocepacia*, en particular al subtipo A [145, 208]. Entre las características salientes de estas cepas de *B. cenocepacia* se destacan su facilidad en la transmisión paciente-a-paciente, su habilidad de producir una súper infección capaz de desplazar a otros microorganismos y su alta tasa de mortalidad post-infección en pacientes FQ [98, 149]. Asimismo, Jones y cols [111] han demostrado que el progreso de la enfermedad pulmonar crónica y la supervivencia del paciente FQ se encuentran fuertemente influenciadas por la especie del cBc presente. De esta forma la infección causada por *B. cenocepacia*, en especial con la cepa ET12 está asociada a una marcada disminución de la expectativa de vida. Paralelamente resultados clínicos con *B. multivorans* fueron similares a los observados en pacientes infectados con *P. aeruginosa* [111]. Aunque la mayoría de los primeros estudios epidemiológicos asociaron a *B. cenocepacia* con infecciones altamente virulentas y transmisibles en individuos FQ, esta no es la única especie del cBc con rasgos patogénicos. Brotes epidémicos de *B. multivorans* han sido descritos en Reino Unido [249], Francia [201] y EEUU [20]. Asimismo un gran número de pacientes FQ han sido infectados con *B. cepacia* en EEUU y Portugal [20, 58]. En este último caso la diseminación de *B. cepacia* fue producida a través de una solución salina contaminada empleada en numerosas terapias nasales en un mismo centro nosocomial de Lisboa [59].

En la última década, los estudios realizados en poblaciones de pacientes FQ han demostrado que en conjunto las especies *B. cenocepacia* y *B. multivorans* son responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones causadas por el cBc [190]. En general, *B. cenocepacia* es la especie dominante (45-67%), seguida por *B. multivorans* (17-38%) en países como EEUU, Canadá e Italia [138, 190]. Esta tendencia se sostiene en otros países como Australia donde *B. cenocepacia* y *B. multivorans* representan el 39% y 21% de las infecciones en pacientes FQ respectivamente [118]. En Brasil un estudio realizado por Carvalho y cols [34] demostró que *B. cenocepacia* fue la especie dominante (67%) aunque seguida en importancia por *B. vietnamiensis* (15%) sugiriendo que diferencias regionales podrían tener un efecto directo en la distribución

de cBc en FQ. En este sentido Argentina presenta características regionales propias, donde la especie prevalente (80%) es *B. contaminans*, perteneciente al Taxón K, seguida por *B. cenocepacia*. Si bien no existe a la fecha un estudio epidemiológico extensivo en todo el país, este resultado proveniente de datos recopilados por la Dra Laura Galanternik del servicio de Microbiología del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez” de la Ciudad de Buenos Aires, sugiere una marcada distribución regional de *B. contaminans*. Finalmente la frecuencia de infecciones en pacientes FQ causadas por las especies remanentes del complejo es inferior al 10%. Asimismo se observó que especies tales como *B. cepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* y *B. dolosa* son más comúnmente encontradas en pacientes FQ que *B. ambifaria*, *B. anthina* y *B. pirrocinia* [190].

Afortunadamente, los rigurosos procedimientos de control de infecciones han tenido éxito en el manejo de pacientes FQ reduciendo la diseminación de cepas [198]. Esta observación tiene sustento en un estudio llevado a cabo por el grupo de Govan [97], el cual describe la epidemiología del cBc en la población FQ del Reino Unido. En este estudio *B. multivorans* exhibió una mayor prevalencia respecto de *B. cenocepacia*, donde la mayoría de las infecciones causadas por *B. multivorans* se encontraban asociadas a nuevas cepas, sugiriendo la adquisición esporádica desde fuentes ambientales. Es importante mencionar que si bien las especies del cBc presentan diferente grado de agresividad y transmisión, las políticas de segregación de pacientes FQ no se basan en las características de las especies, sino en la existencia de infección por el cBc.

El entendimiento de la epidemiología clínica del cBc fuera del contexto de la FQ representa un desafío, especialmente debido al menor número de infecciones y los problemas asociados a su identificación. Reik y cols [190] examinaron 90 pacientes no-FQ que padecieron infecciones causadas por el cBc. En ese estudio, se analizó una amplia variedad de muestras clínicas provenientes de aspirados de traquea, esputo, sangre, lavado bronquial, medula ósea, aspirado pancreático, biopsia pleural y fluido espinal. En esas muestras las especies predominantes en pacientes no-FQ fueron *B. cenocepacia* (25,6%), *B. cepacia* (18,9%) y *B. multivorans* (15,6%). Asimismo aproximadamente el 20% de los aislados del cBc fueron indeterminadas a nivel taxonómico.

Otro aspecto relevante de la biología del cBc es su habilidad de sobrevivir dentro de un gran número de productos cotidianos, los cuales podrían actuar como vehículos de una eventual infección. Dentro de éstos podemos mencionar los farmacéuticos (ej. soluciones salinas y de antibióticos) [59, 143], cosméticos [5] y de higiene personal [177] y desinfectantes [172, 178]. Las especies que comúnmente actúan como contaminantes son grupo K ó Taxón K, *B. cenocepacia* (principalmente IIIB, seguido por IIIA), *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* y *B. cepacia*. Interesantemente las últimas especies han sido recuperadas de FQ, no-FQ y el ambiente natural, lo cual demostró una amplia distribución en comparación de las otras especies del cBc.

La caracterización de especies del cBc en el ambiente ha sido más limitada que en el ámbito clínico. Si bien el cBc ha sido frecuentemente descrito como ubicuo en el ambiente natural, y un importante componente de la comunidad microbiana del suelo, los nichos ambientales preferidos por cada especie del complejo no han sido claramente definidos. Diversos estudios sistemáticos examinando la distribución ambiental de especies del cBc se han enfocado en la poblaciones que interactúan con plantas de cultivo (ej. maíz, trigo) como uno de los hábitats más importantes de estas bacterias [175]. Los resultados han revelado que *B. ambifaria* fue la especie del complejo más aislada en la rizósfera de cultivos de maíz [66, 185]. Sin embargo otras especies como *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. dolosa* y *B. pyrrocinia* también han sido recuperadas, lo que sugiere que la rizósfera del maíz es rica en bacterias del cBc. Asimismo se observa una fuerte influencia regional en el predominio de especies del cBc, donde grupos del complejo aún sin clasificación a nivel de especie dominan sobre las especies formales.

Al considerar la ubicuidad y versatilidad de esta bacteria, se presenta el siguiente interrogante: ¿Representa el ambiente natural y/o industrial un potencial riesgo de infección por especies del complejo? Sin duda esta pregunta ha inquietado a la comunidad científica, en especial al momento de emplear bacterias del cBc como agentes de biocontrol o biopesticidas, los cuales representarían un potencial riesgo de infección por su carácter de patógeno oportunista [175]. Teniendo en cuenta que las bacterias del cBc se han recuperado de infecciones en humanos, se supone que el ambiente natural debería ser la principal fuente de infección. En este sentido, estudios genéticos han mostrado en varias ocasiones que cepas idénticas del cBc residentes del ambiente natural han sido encontradas en infecciones [96]. Una de las evidencias más

convincientes de este hecho ha sido reportada por Balwin y cols [15] quien analizó aislados clínicos y ambientales (natural o industrial) por MLST, revelando que más del 20% de los aislados clínicos eran indistinguibles de los aislados ambientales. De esta manera, aislados clínicos de *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* (IIIA y IIIB), *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* y *B. ambifaria* exhibieron un perfil alélico indistinguibles en los 7 loci de MLST comparados con aislados ambientales recuperados de distintos ambientes tales como río, cebolla, rizósfera de maíz, soluciones farmacéuticas, equipos hospitalarios, shampoo, e instalaciones industriales. Es interesante notar que estas últimas son propensas a la contaminación con bacterias del cBc siendo un tema que requiere de mayor investigación. El empleo de MLST demostró que muchos perfiles alélicos se superponen en fuentes clínicas, industriales y del ambiente. Este hallazgo no solo muestra la marcada versatilidad de este grupo de bacterias a sobrevivir o crecer en diversos ambientes sino que estos pueden actuar como posibles reservorios del cBc y dar lugar a futuras infecciones.

1.3 BIOFILMS MICROBIANOS

1.3.1. El concepto del biofilm y su rol en la microbiología actual

En la naturaleza las bacterias pueden adoptar dos formas de crecimiento, como células libres “nadando” libremente en medios líquidos (células planctónicas) o adheridas a superficies formando comunidades conocidas como biofilms bacterianos, (células sésiles). Se estima que el 99% de las bacterias en los ecosistemas naturales se hallan como biofilms, mientras que sólo el 1% se encuentra como células planctónicas [50, 52]. El desarrollo del concepto de biofilm en microbiología fue un proceso gradual, el cual solo alcanzó real protagonismo a fines del siglo pasado [50]. Desafortunadamente, un enfoque basado en bacterias planctónicas tiene poca relación con los ambientes microbianos verdaderos y por ende ha limitado la comprensión de las interacciones entre bacterias y hospedadores. Aunque en las últimas décadas ha sido reconocida la adhesión bacteriana a superficies y su rol en las enfermedades crónicas, el tratamiento terapéutico de la mayoría de las infecciones bacterianas continúa aun basado en el criterio planctónico.

Los biofilms se forman cuando las bacterias en estado libre encuentran una superficie a la cual pueden adherirse. A consecuencia de este desarrollo se producen señales químicas que coordinan la diferenciación y la formación de la estructura, incluyendo una cubierta extracelular protectora [49, 51]. Esta adhesión a una superficie ya sea inerte o viviente, debe ser de carácter irreversible, con lo cual el biofilm no logra ser removido [79]. Los microorganismos pueden desarrollarse en forma de biofilm en cualquier superficie dentro de un ambiente líquido, por lo tanto una interfase sólido/líquida en una superficie (ej. agua, sangre) proporciona un entorno apropiado para su fijación y crecimiento. Por esta razón, en la naturaleza los biofilms son ubicuos y se encuentran en todo cuerpo natural del agua (limo en jarrones, el material resbaladizo en las rocas de los ríos, placa dental, etc).

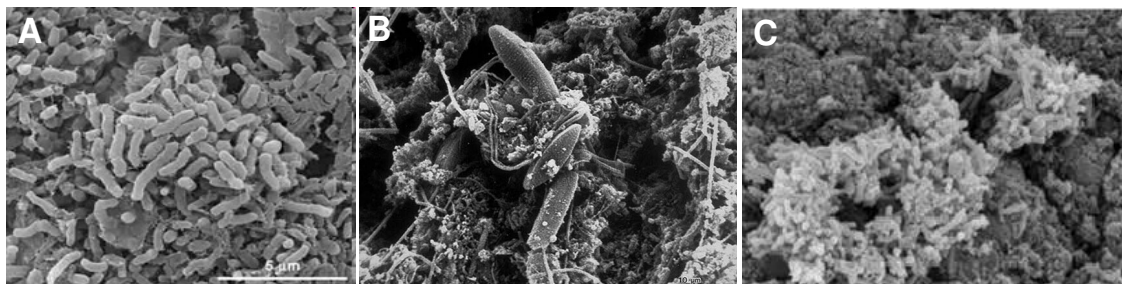


Fig. 5. (A) Biofilm en alimentos. Micrografía de barrido electrónico de un biofilm producido por *Escherichia coli* sobre una hoja de lechuga. Imagen tomada del trabajo publicado por Annous y cols [9]. (B) Biofilm en la industria. Micrografía de barrido electrónico de un biofilm natural sobre una superficie de acero de un sistema de agua industrial. Imagen tomada de: <http://www.microbelibrary.org>. (C) Biofilm en la clínica. Micrografía de barrido electrónico del biofilm producido por *Proteus mirabilis* sobre la superficie de un catéter de látex. Imagen tomada del trabajo publicado por Stickler, D. J [215].

La formación de biofilm proporciona a la bacteria una estrategia de sobrevivencia. Las ventajas obtenidas a partir de este modo de crecimiento otorgan protección frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura, pH y concentración de nutrientes. Por este motivo, la capacidad de formar biofilm no parece estar limitada a ningún grupo específico de microorganismos, sino que en la actualidad se considera una tendencia natural. No obstante, los biofilms bacterianos no se encuentran confinados a ambientes naturales, en el área de salud son responsables de numerosas enfermedades [195, 199, 224] y en la industria, es ampliamente conocido su rol en los procesos de corrosión (Fig. 5).

La definición del biofilm ha ido evolucionando en las últimas tres décadas. Una descripción ampliamente aceptada de un biofilm fue realizada por Donlan [80], estableciendo que es *“una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la velocidad de crecimiento y transcripción génica”*.

1.3.2. Biofilms en infecciones, su impacto en el área de salud

Previo al advenimiento de era de los antibióticos y de la vacunación, la humanidad fue victima de enfermedades epidémicas agudas causadas por patógenos especializados como el *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Bordetella pertussis* (tos convulsa) y el *Vibrio cholerae* (cólera). En la actualidad muchas infecciones agudas están siendo desplazadas por infecciones crónicas ocasionadas por microorganismos ubicuos (ej. *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*), que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y que no son prevenibles mediante inmunización. En este contexto, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos publicó recientemente que al menos el 65% del total de infecciones microbianas en humanos son causados por microorganismos que colonizan y persisten en sus hospedadores en forma de biofilms. A estas infecciones crónicas se les ha atribuido el aumento en el tiempo de internación, en los costos de atención y en la tasa de mortalidad de los pacientes que las padecen.

Tabla 6. Principales infecciones en humanos asociados a biofilms

Infección o Enfermedad	Principal especie bacteriana implicada
Fibrosis quística	<i>P. aeruginosa</i> y complejo <i>Burkholderia cepacia</i>
Caries dental	Cocos acidogénicos Gram-positivos (<i>Streptococcus</i>) y bacterias anaerobias Gram-negativas
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Prostatitis	<i>E. coli</i> y otros Gram-negativos
Infecciones biliares	Bacterias entéricas (<i>E. coli</i>)
Periodontitis	Bacterias anaerobias
Infecciones osteoarticulares	Bacterias Gram-positivas (<i>Staphylococcus</i>)
Endocarditis	<i>Streptococcus viridans</i>
Infecciones nosocomiales asociadas a dispositivos biomédicos	Principal especie bacteriana implicada
Válvulas mecánicas de corazón	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
Catéteres endovasculares	<i>Staphylococcus</i> sp.
Sistemas de drenaje de LCR	<i>Staphylococcus</i> sp.
Ventilación asociada a neumonía	Bacterias Gram-negativas
Tubos endotraqueales	Gran variedad de bacterias y hongos
Cistitis por catéter urinario	<i>E. coli</i> y otros Gram-negativos
Peritonitis por diálisis	Gran variedad de bacterias y hongos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos Gram-positivos
Implantes dentarios	Cocos acidogénicos Gram-positivos (<i>Streptococcus</i>)
Suturas	<i>Staphylococcus</i> sp.

LCR: líquido cefalorraquídeo. Tabla adaptada de las referencias [53] y [89]

En las últimas décadas, los biofilms han sido reconocidos como un importante factor en la patogenia de un gran número de infecciones humanas persistentes, que incluyen la placa dental, caries, neumonía por *P. aeruginosa* y cBc en pacientes con FQ, cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis, y prostatitis crónica (Tabla 6). De igual manera se ha demostrado que una amplia variedad de dispositivos médicos implantables pueden permitir la formación de biofilm, provocando infecciones asociadas, donde se destacan los catéteres endovenosos arteriales [184, 228]. Otros dispositivos de relevancia son válvulas cardíacas artificiales, sondas urinarias, lentes de contacto y prótesis ortopédicas, las cuales una vez colonizadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver mediante el empleo de antibióticos [79, 100, 163, 214].

Las infecciones en biofilm comparten ciertas características clínicas. Los biofilms se desarrollan preferentemente en superficies inertes (dispositivos médicos) y en tejido necrótico, aunque también lo pueden hacer en tejido vivo (ej. endocarditis). Los organismos sésiles crecen lentamente, en uno o varios sitios, y las infecciones por biofilms frecuentemente demoran en manifestar síntomas [243]. Las bacterias sésiles liberan antígenos que estimulan la producción de anticuerpos, los cuales posibilitan la eliminación de células planctónicas (Fig. 6 A) mediante mecanismos de activación del sistema de complemento y opsonización. Sin embargo estos anticuerpos no son efectivos en interaccionar con las células dentro del biofilm pero si pueden formar complejos inmunes que intensifican la respuesta inflamatoria, por liberación de factores quimiotácticos, y acumulación de células fagocíticas que secretan elastasas y enzimas proteolíticas que ocasionan daños en los tejidos lindantes como se aprecia en la Fig. 6 B-D [39]. Aun en individuos con excelente respuesta inmune celular y humoral, las infecciones por biofilm son raramente resueltas por los mecanismos de defensa del hospedador [117].

La terapia antimicrobiana habitualmente elimina los síntomas causadas por la liberación de células planctónicas desde el biofilm pero fracasa en eliminar las células sésiles. Por estas razones, las infecciones por biofilm comúnmente muestran síntomas recurrentes luego de ciclos de terapia antimicrobiana, hasta que la población sésil es removida quirúrgicamente del individuo [52]. En algún momento de la evolución de un biofilm, células tipo planctónicas son liberadas del mismo con el objetivo de colonizar nuevas superficies. Hay evidencia que sostiene la existencia de un patrón natural de

liberación programada [79]. Por tanto los biofilms pueden actuar como “nidos” de infección aguda si las defensas del hospedador no pueden eliminar las células planctónicas que son liberadas en algún momento durante la infección.

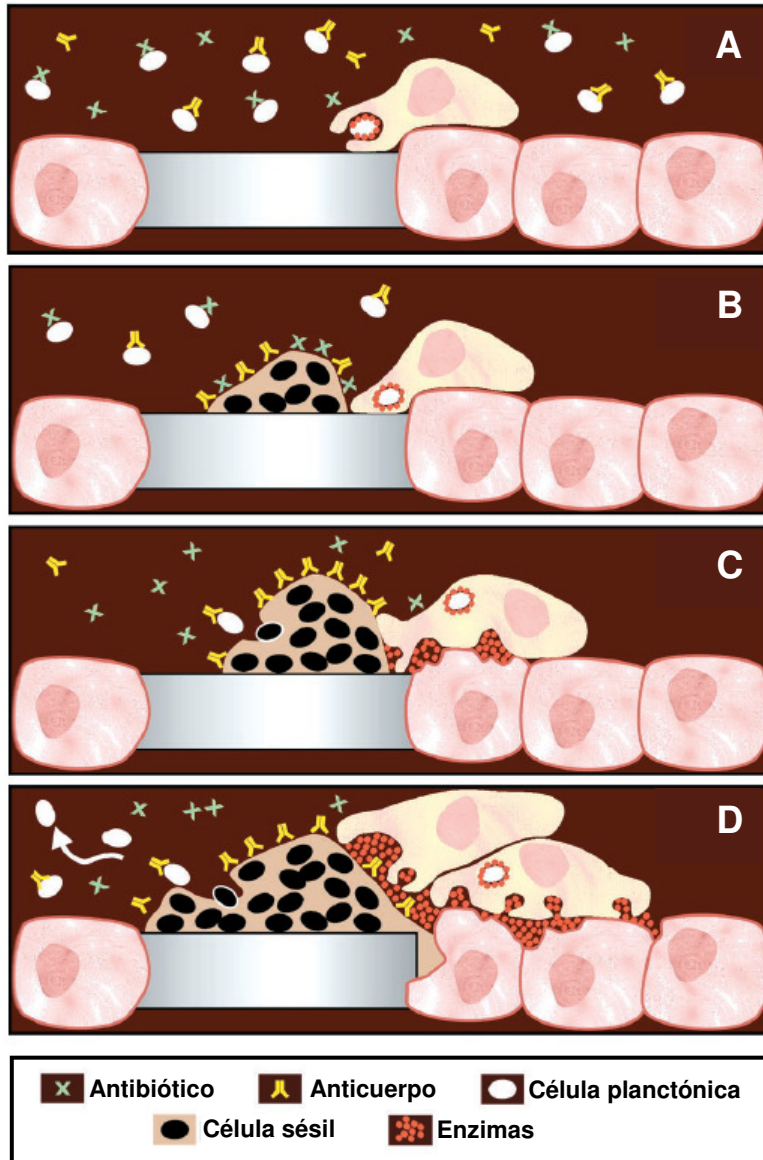


Fig. 6. Esquema de biofilms en dispositivos médicos.

(A) Las bacterias planctónicas pueden ser eliminadas mediante anticuerpos, células fagocíticas y presentan susceptibilidad a antibióticos.

(B) Las células bacterianas que forman biofilms son resistentes a anticuerpos, fagocitos y antibióticos.

(C) Los fagocitos son atraídos al biofilm. Si bien la fagocitosis es frustrada, las enzimas fagocíticas son liberadas.

(D) Tejido dañado alrededor del biofilm por acción de las enzimas secretadas por células fagocíticas, y liberación de bacterias planctónicas desde el biofilm. La liberación bacteriana podría causar diseminación e infección aguda en el tejido circundante. Esquema tomado del trabajo publicado por Costerton y cols [53].

1.3.3. Estructura y composición de los biofilms microbianos

Toda comunidad microbiana capaz de formar biofilm es única, sin embargo algunas características estructurales pueden ser consideradas universales. La observación microscópica (microscopía electrónica de barrido y laser confocal) ha revelado que los biofilms no son estructuras homogéneas formadas por monocapas de

microorganismos adheridos a una superficie, sino conglomerados celulares heterogéneos que forman estructuras semejantes a “torres” u “hongos”. Los biofilms se encuentran fuertemente hidratados y constituidos por células (15% del volumen) y una matriz polimérica extracelular (85 % del volumen). En general las células del biofilm crecen a una velocidad significativamente menor a la observada en el estado planctónico. La matriz presenta una composición variada, donde los componentes predominantes son los exopolisacáridos (EPS) y en menor cantidad otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de exopolímeros contribuye a la estabilidad de la estructura tridimensional, siendo además responsables de la adhesión a superficies y cohesión del biofilm. Los EPS pueden ser homopolisacáridos de carga neutra o heteropolisacáridos que consisten en una mezcla de azúcares neutros y cargados. Estos últimos pueden contener sustituyentes orgánicos o inorgánicos que afectan significativamente sus propiedades físicas y biológicas. Varios EPS conocidos como alginato, xantano y ácido colánico son polianiónicos. También existen policatiónicos, como la adhesina intercelular de *S. aureus* compuesta por residuos de β -1,6-N-acetilglucosamina [141]. Los heteropolisacáridos otorgan a la matriz la propiedad de actuar como una “resina de intercambio iónico” permitiendo el secuestro de cationes, aniones y antimicrobianos de la fase acuosa, evitando así su acción sobre las bacterias [180]. La arquitectura del biofilm puede ser influenciada fuertemente por la interacción de EPS aniónicos, que contienen grupos carboxílicos, con cationes multivalentes. Un ejemplo son los puentes formados entre Ca^{+2} y moléculas polianiónicas de alginato, los cuales permiten el desarrollo de biofilms compactos y de gran espesor incrementando su estabilidad mecánica. Finalmente, la producción de EPS se encuentra asociada a los nutrientes presentes en el medioambiente, así se ha observado que una disponibilidad excesiva de carbono y/o limitación de nitrógeno, potasio o fosfato promueve la síntesis de EPS [79, 219].

Otro aspecto de la arquitectura es que la matriz no es sólida, las bacterias en biofilms se extienden en forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas formando macrocolonias. Las células bacterianas en el interior se encuentran englobadas por exopolímeros, y separadas unas de otras por espacios intersticiales huecos, llamados canales de agua. Estos permiten el flujo de líquido y actúan como un “sistema circulatorio” primitivo para el transporte y difusión de nutrientes/oxígeno a las

bacterias ubicadas en su interior, incluso aquéllas situadas en las zonas más profundas del biofilm [71, 128]. Asimismo, constituye un mecanismo para la remoción de productos de desecho metabólico [79]. La existencia de estos canales de agua no impide, sin embargo, que dentro del biofilm se encuentren ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. De esta manera, se generan gradientes de pH y de oxígeno, haciendo metabólicamente más activas las áreas superficiales respecto de las más profundas (Fig. 7). En estas últimas, las bacterias deben adaptarse a una disponibilidad reducida de oxígeno [6, 71, 253]

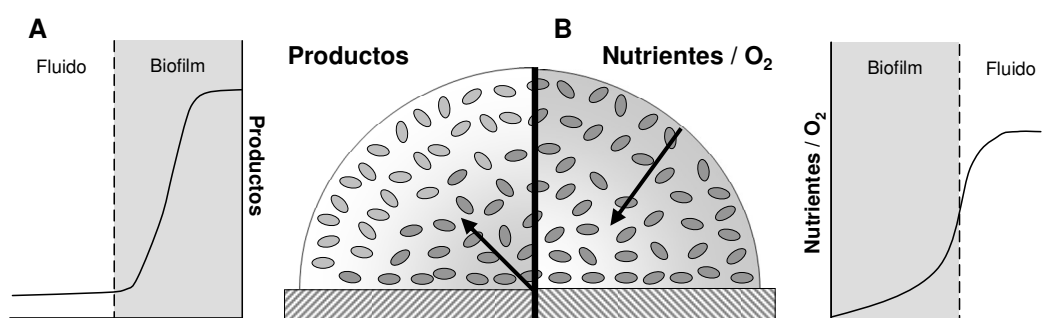


Fig. 7. Patrones de heterogeneidad química en biofilms. Esquema de difusión dentro del biofilm de un producto metabólico (A) y de un nutriente / oxígeno (B). La concentración de producto metabólico generado por las células sésiles, se concentra principalmente en el interior del biofilm. En cambio, la concentración de nutrientes como oxígeno se reduce a medida que son consumidos por las células sésiles, disminuyendo en las capas más profundas del biofilm. Adaptado del trabajo publicado por Stewart & Franklin [212].

1.3.4. Etapas de formación del biofilm

La formación de un biofilm es un proceso dinámico, el cual comprende una serie de etapas discretas y bien reguladas. Si bien, los mecanismos moleculares involucrados en este proceso pueden diferir entre microorganismos, las etapas que comprenden la formación del biofilm en general se encuentran conservadas. Este ciclo dinámico puede dividirse en tres fases: a) adhesión a una superficie, b) crecimiento y maduración c) separación o desprendimiento (Fig. 8).

La **primera fase** del desarrollo de un biofilm bacteriano es la adhesión de células libres a una superficie, lo cual en principio ocurre de manera reversible para finalmente tornarse irreversible [170]. Una serie factores ambientales condicionan esta unión, entre ellos propiedades de la superficie como la rugosidad y la hidrofobicidad,

así como también la temperatura, flujo y concentración de nutrientes [55, 192]. Asimismo los apéndices presentes en bacterias como flagelos, fimbrias y pili colaboran en la formación de una unión activa con la superficie [26, 124]. La motilidad mediante flagelos, como los presentes en *P. aeruginosa*, ayudaría a la bacteria a acercarse a la superficie, vencer las fuerzas repulsivas y lograr la adhesión [171] (Fig. 8 A). Sin embargo bacterias inmóviles también forman biofilms, un ejemplo de ello son las bacterias Gram-positivas donde participan proteínas de superficie [57, 225].

Durante la **segunda fase** de crecimiento y maduración, las bacterias adheridas a la superficie, comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia (Fig. 8 A). A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, las bacterias comienzan a producir exopolímeros que constituyen la matriz del biofilm. Así, éste comienza a desplegarse en una formación tridimensional, generando estructuras semejantes a “hongos”, como en *Pseudomonas*, aunque esto no es general [68, 213]. La matriz presenta una composición de EPS que difiere en cada microorganismo, siendo de alginato en *P. aeruginosa*; celulosa en *S. typhimurium*; un EPS rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*; poli-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Sin embargo, la matriz producida por algunos microorganismos como miembros del cBc se encuentra constituida por varios EPS diferentes [47]. Por ejemplo, un aislado clínico de *B. cenocepacia* denominado C9343 forma tres exopolisacáridos: polisacárido-I [37] (constituido por una unidad disacárida repetitiva formada por glucosa y galactosa, donde el residuo de galactosa se encuentra sustituido por ácido pirúvico en el C-4 y C-6); polisacárido cepacia [205] (polisacárido-II [36]; compuesto por una unidad heptasacárida repetitiva conteniendo galactosa, manosa, rhamnosa, glucosa y ácido glucorónico); y dextrano (α -1,6 glucano). Asimismo, se ha descrito que, incluso una misma cepa bacteriana, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir diferentes EPS [219].

Finalmente en la **tercera fase** o etapa de dispersión, una vez alcanzada la madurez del biofilm, algunas células pueden ser liberadas de la matriz, ya sea en forma aislada o en conglomerados bacterianos, para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el ciclo de formación y desarrollo del biofilm (Fig. 8 B). El desprendimiento puede ser resultado de procesos activos inducidos por el biofilm o por fuerzas externas al mismo [79]. En el primero de los casos, estudios realizados en *P. aeruginosa* indican que la disponibilidad de nutrientes tendría un rol relevante en la dispersión del biofilm,

incrementando la hidrólisis de alginato y la regulación mediante otros factores de la expresión del flagelo y fimbria tipo IV [120]. De esta manera, los cambios nutricionales inducirían una serie de eventos, contrarios a lo que ocurre durante la formación de microcolonias, un incremento en la hidrólisis del exopolímeros y en la expresión de flagelo junto a una disminución de la síntesis de fimbria tipo IV.

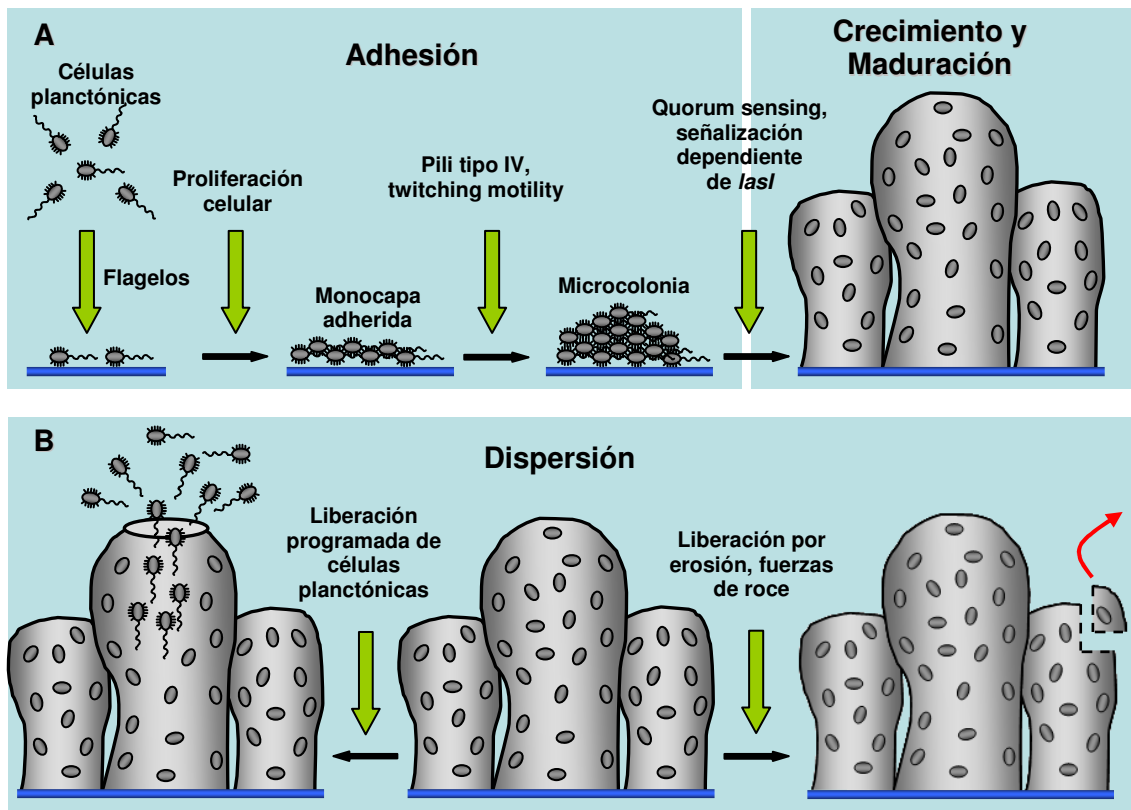


Fig. 8. Etapas del desarrollo en biofilm de *P. aeruginosa* a partir de células planctónicas. (A) Adhesión de células a una superficie, crecimiento y maduración de células en microcolonias. Los flagelos se encuentran involucrados en la adhesión y el pili tipo IV posibilita el twitching motility sobre la superficie y la formación de la monocapa bacteriana. El mecanismo de quórum sensing dependiente de *lasI* sirve como señal de maduración que conduce a la formación de estructuras diferenciadas, gruesas y maduras de biofilm. (B) Liberación y dispersión de células de la estructura del biofilm para colonizar otros ambientes. Se ilustran dos mecanismos, el primero es un conjunto de eventos programados dentro del biofilm que producen la hidrólisis del exopolisacárido de la matriz y la conversión de una subpoblación de células sésiles en células planctónicas móviles, las cuales abandonan el biofilm. El segundo es un mecanismo de liberación física en el cual un fragmento de la microcolonia se desprende y es llevado por el fluido circundante a un nuevo sitio e inicia el desarrollo de una nueva población sésil. Esquema adaptado del trabajo publicado por Costerton

En consecuencia la disminución de la adhesión de las células entre sí y el aumento de la movilidad, favorecería la dispersión de las bacterias fuera de la comunidad. Otros mecanismos de tipo físico que generarían el desprendimiento de conglomerados bacterianos podrían ser: la erosión (remoción continua de pequeñas porciones del biofilm), separación (remoción rápida y masiva) y abrasión (liberación por colisión de partículas del líquido circundante con el biofilm) [24]. La erosión es un fenómeno frecuentemente asociado a biofilms de gran espesor y fuerzas de roce ejercidas en la interfase líquido/biofilm. En cambio, el mecanismo de separación estaría relacionado a la disminución de nutrientes/oxígeno, lo cual permitiría a las bacterias migrar desde zonas densamente colonizadas a áreas más distantes que podrían favorecer el desarrollo de nuevos biofilms. Un ejemplo es la sepsis recurrente en un paciente con un catéter infectado [7, 160]. El fenómeno de abrasión puede tener lugar en biofilms en filtros o en ambientes cargados de partículas. La forma en que se produce la dispersión afectaría aparentemente, las características fenotípicas de los gérmenes. Los conglomerados desprendidos desde el biofilm conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas aisladamente podrían rápidamente volver a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los agentes antimicrobianos [211].

1.3.5. Quorum sensing

Un avance significativo en la comprensión del biofilm se produjo con el descubrimiento del mecanismo de auto-inducción o quórum sensing. La unión de los microorganismos a una superficie y la formación final de un biofilm requiere de una sucesión discreta de etapas, las cuales están coordinadas por señales químicas producto de la comunicación célula-célula [68]. La cercanía de las bacterias en el biofilm facilita esta interacción y la comunicación entre las mismas la cual se logra vía mensajeros (pequeñas moléculas). Este sistema de comunicación se denomina “quórum sensing” [103]. Las moléculas señales proporcionan información sobre la presencia de otros microorganismos vecinos, densidad de la población y permiten al microorganismo dar repuesta frente a cambios ambientales. El mecanismo de quórum sensing funciona debido a que cada bacteria unida a la superficie, produce una o varias moléculas señal,

de manera que el reclutamiento de bacterias en la superficie conduce a un aumento en la concentración local de mensajeros. Una vez alcanzada una concentración umbral, estos inducen diferentes fenómenos en la bacteria que finalmente permiten la diferenciación del biofilm. El objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que un número adecuado de células bacterianas esté presente en la vecindad, los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios [68, 204].

Los microorganismos que utilizan quorum sensing elaboran y secretan moléculas difusibles, denominados auto-inductores. En bacterias Gram-negativas los auto-inductores predominantes son las acil-homoserin-lactonas (AHSL), las cuales difieren entre si por las características de su cadena lateral (longitud, saturación y sustitución) [103, 216, 250], mientras que en Gram-positivos prevalecen oligopéptidos modificados [88, 161]. Las AHSLs bacterianas poseen un receptor que puede detectar específicamente al auto-inductor correspondiente. Cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor [30].

1.3.6. Biofilms y mecanismos de resistencia a los antibióticos

Las bacterias en biofilms son en general más resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador y a los antibióticos que sus contrapartes planctónicas. La matriz de un biofilm, formada por exopolímeros y conteniendo múltiples tipos de bacterias en su interior, hace a estas estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune a las mismas. De esta manera, la matriz del biofilm provee una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos frente a las defensas del hospedador, como opsonización, lisis por complemento, y fagocitosis [211]. Los biofilms provocan una respuesta inmune tanto celular como humoral, lo cual fue demostrado por la identificación de citoquinas liberadas por leucocitos expuestos a biofilms. Una ventaja importante desde el punto de vista clínico, es que las bacterias en biofilms son muy resistentes a los antibióticos, siendo capaces de sobrevivir frente a concentraciones de antibióticos cientos de veces mayor respecto a las bacterias planctónicas. Cepas de *Klebsiella pneumoniae* en estado planctónico presentan una concentración inhibitoria mínima de 2 µg/ml a la ampicilina. Estas mismas cepas, al

crecer como biofilm, exhiben 66% de supervivencia luego de terapia con 5000 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina [8]. Cuando la bacteria es disgregada del biofilm se vuelven rápidamente susceptibles a los antibióticos [1, 11]. Esto sugiere que la resistencia bacteriana no está necesariamente asociada a mutaciones adquiridas o plásmidos. Este fenómeno de resistencia a los antimicrobianos presenta un carácter multifactorial, el cual varía entre especies bacterianas pero se encuentra vinculada tanto a las características fisiológicas particulares de las bacterias como así también a la ultraestructura de los biofilms. Las principales hipótesis que explican este comportamiento son: (1) penetración lenta o incompleta del antibiótico en el biofilm y causas metabólicas, (2) presencia de enzimas atrapadas en la matriz, (3) alteración fenotípica en subpoblaciones sésiles, (4) expresión de genes de resistencia específica, y (5) sobreexpresión de enzimas por el microorganismo como respuesta a un entorno hostil (Fig. 9).

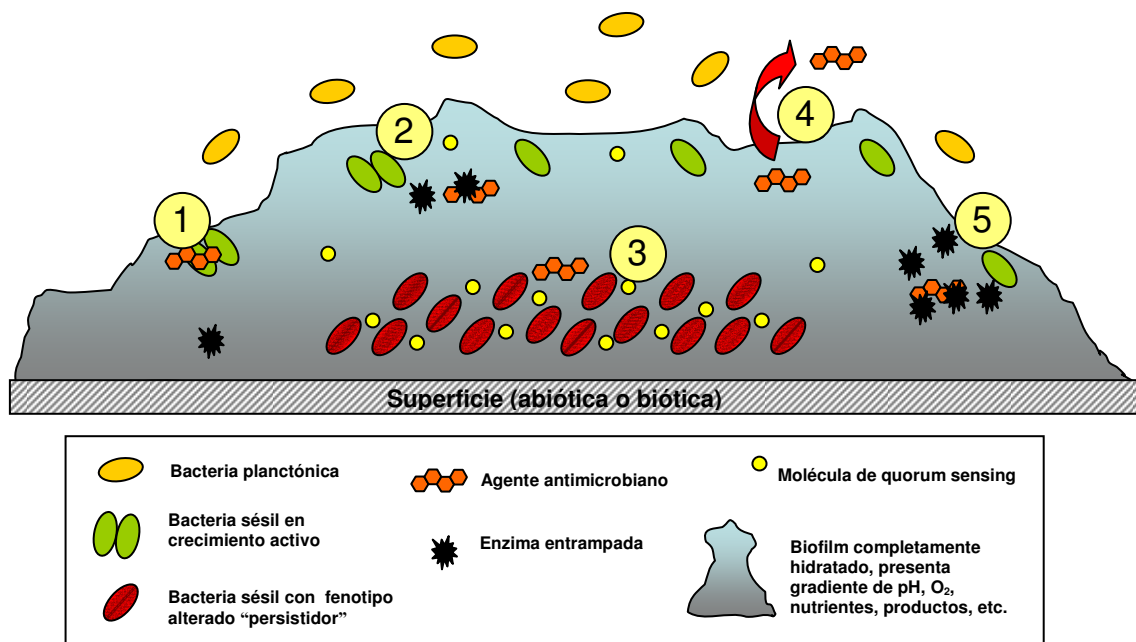


Fig. 9. Hipótesis sobre mecanismos de resistencia de biofilms a agentes antimicrobianos. (1) Permeabilidad: los agentes antimicrobianos penetran lenta y dificultosamente el biofilm. Las capas más externas absorben el mayor daño protegiendo de esta manera a las capas más internas. Causas metabólicas: la acción de los agentes antimicrobianos puede verse afectada en zonas de acumulación de residuos o el medio ambiente alterado (pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, etc). (2) Enzimas atrapadas: los antibióticos podrían ser destruidos por las enzimas atrapadas en la matriz del biofilm. (3) Velocidad de crecimiento alterada en el interior del biofilm: los antibióticos no podrían actuar sobre la subpoblación de células que no se encuentran en crecimiento ó que exhibe el fenotipo denominado "persistidor". (4) Expresión de genes de resistencia específica a los agentes antimicrobianos como por ejemplo bombas de eflujo. (5) La respuesta del microorganismo a un entorno hostil podría provocar la sobreexpresión de enzimas con capacidad de destruir los antibióticos. Esquema adaptado del trabajo publicado por del Pozo y Patel [76].

1.4 OBJETIVOS

La identificación de patógenos en cualquier proceso infeccioso es de suma importancia por su impacto en el tratamiento antimicrobiano, prevención de infecciones cruzadas como así también en la calidad de vida del paciente. Las herramientas moleculares modernas han contribuido significativamente en aumentar la certeza de la clasificación e identificación de nuevas especies, especialmente aquellas pertenecientes al cBc. Sin embargo el empleo de estas metodologías en el análisis microbiológico rutinario es prácticamente imposible a nivel nacional en virtud de los costos, requerimiento de personal entrenado y el tiempo en obtener los resultados finales que puede demandar entre 2 a 7 días dependiendo de la técnica empleada. Otras estrategias alternativas de identificación bacteriana que resultan de alto grado de certidumbre, rápidas, sencillas y económicas lo representan las técnicas vibracionales entre las que se encuentra la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) [104, 165], la espectrometría de masa MALDI-ToF [129], la espectroscopía Raman, etc. La información proveniente tanto de un espectro vibracional (bandas asociadas a enlaces químicos) como del espectro de masas (picos de péptidos y proteínas) de bacterias intactas provee un patrón altamente específico que permite a las células microbianas ser discriminadas en diferentes niveles taxonómicos. Estas técnicas han sido frecuentemente empleadas en la identificación rápida y precisa de microorganismos aun hasta nivel de cepas [104, 119, 129, 151, 231]. Otras ventajas salientes de estas técnicas fisicoquímicas son su fácil implementación, empleo de pequeñas cantidades de biomasa, y que no requieren de reactivos o consumibles [129, 165].

La identificación de bacterias recuperadas de muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística representa un serio problema para el laboratorio microbiológico, dada la diversidad de organismos que pueden colonizar los pulmones de dichos pacientes y las similitudes fenotípicas y genéticas entre muchos de ellos, en particular los que integran el cBc. Otro factor a tener en cuenta es que estas bacterias colonizan y persisten a nivel pulmonar como biofilm, donde su resistencia a agentes antimicrobianos no es generalmente igual que la que presentan sus contrapartes planctónicas [53, 132]. Una vez identificado el patógeno, el siguiente paso es la implementación rápida de un tratamiento antimicrobiano que intente resolver la infección pulmonar. En la actualidad, la terapia antibiótica empleada en pacientes FQ es

propuesta en función de las especies recuperadas y de la sensibilidad a los antimicrobianos, evaluada mediante pruebas sobre poblaciones crecidas en forma planctónica. No obstante, dado que estas poblaciones crecen a nivel pulmonar como biofilm, muchos de los antibióticos que resultaban elegidos y sus correspondientes dosis, determinadas mediante valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) *in vitro*, a nivel del paciente no lograban tener éxito.

Al momento de iniciar los estudios que dieron lugar a la presente Tesis Doctoral, la identificación de organismos del cBc en nuestro País presentaba serias limitaciones. Los métodos utilizados a nivel hospitalario eran las técnicas bioquímicas de rutina y los estudios de resistencia a antimicrobianos se hacían empleando los métodos de determinación de CIM convencionales. La epidemiología del cBc en Argentina era muy poco conocida y las metodologías de identificación basadas en técnicas de PCR (PCR-*recA* primers EE) se encontraban limitadas a un solo nosocomio. Asimismo, en los principales centros de atención de FQ del país se registraba en el año 2004 un aumento considerable de aislamientos de bacterias cuya tipificación era compatible con miembros de cBc. Esta situación fue motivo de gran preocupación en los centros de salud debido a que la identificación del cBc, a nivel de género, solía demorar entre 3 – 7 días debido a la naturaleza de las técnicas fenotípicas disponibles y en consecuencia esto implicaba un retraso en el inicio del tratamiento antimicrobiano y de las prácticas de aislamiento de los pacientes. En este contexto era de suma necesidad contar con un método rápido, económico y confiable que permitiera la identificación de los principales patógenos respiratorios recuperados de muestras de pacientes FQ y en especial de organismos del cBc. Esta situación motivó a Servicios de Bacteriología de hospitales locales (Hospital de Niños y Rossi de La Plata) a requerir de nuestro Instituto la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias de identificación de estos organismos. Ese año 2004 se registró un importante aumento en el número de aislados del cBc en una sala de pacientes FQ del Hospital de Niños de La Plata. Los aislados no pudieron ser discriminados a nivel de especie por el servicio de bacteriología local.

A partir de esta situación de base los **objetivos generales** de este trabajo fueron desarrollar métodos rápidos, sencillos y precisos que permitieran la discriminación e identificación de especies estrechamente relacionadas del cBc y de BNF presentes en infecciones pulmonares de pacientes FQ. Para este objetivo se decidió estudiar la aplicación de nuevas tecnologías fisicoquímicas basadas en la espectroscopía FT-IR y la

espectrometría de masa MALDI-ToF. Asimismo se consideró evaluar la acción de antimicrobianos comúnmente empleados en el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por el cBc empleando la metodología convencional y el modelo de crecimiento en biofilm.

En particular se propuso estudiar en detalle los siguientes ítems:

- 1.- Desarrollar el empleo de la espectroscopía FT-IR y métodos de análisis multivariantes (análisis de cluster y redes neuronales artificiales) como herramienta para la discriminación e identificación de especies pertenecientes al cBc y BNF relevantes en infecciones pulmonares de pacientes con FQ.
- 2.- Evaluar el uso de la espectrometría de masa MALDI-ToF mediante detección de biomarcadores específicos y análisis multivariante que conduzcan a la discriminación e identificación de especies pertenecientes al cBc y BNF relevantes en FQ.
- 3.- Determinar el perfil de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de especies del cBc procedentes de centros nosocomiales y del ambiente por test convencionales.
- 4.- Evaluar el efecto de los agentes antimicrobianos en cultivos en biofilms de aislados clínicos y ambientales del cBc.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

1. **Aaron, S. D., W. Ferris, D. A. Henry, D. P. Speert, and N. E. Macdonald.** 2000. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* **161**:1206-12.
2. **Aaron, S. D., K. Ramotar, W. Ferris, K. Vandemheen, R. Saginur, E. Tullis, D. Haase, D. Kottachchi, M. St Denis, and F. Chan.** 2004. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* **169**:811-5.
3. **Acton, J. D., and J. M. Stark.** 1999. Management of acute exacerbations of cystic fibrosis lung disease. *Clin Pulm Med* **6**:153-164.
4. **Aigner, C., P. Jaksch, G. Seebacher, S. Mazhar, W. Wisser, and W. Klepetko.** 2004. Cystic fibrosis and lung transplantation — Determination of the survival benefit. *Wiener Klinische Wochenschrift* **116**:318-321.
5. **Alvarez-Lerma, F., E. Maull, R. Terradas, C. Segura, I. Planells, P. Coll, H. Knobel, and A. Vazquez.** 2008. Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Critical Care* **12**:R10.
6. **Allan, V. J. M., L. E. Macaskie, and M. E. Callow.** 1999. Development of a pH gradient within a biofilm is dependent upon the limiting nutrient. *Biotechnology Letters* **21**:407-413.
7. **An, Y. H., and R. J. Friedman.** 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**:338-348.
8. **Anderl, J. N., M. J. Franklin, and P. S. Stewart.** 2000. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1818-1824.
9. **Annous, B. A., P. M. Fratamico, and J. L. Smith.** 2009. Scientific status summary. Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. *J Food Sci* **74**:R24-37.
10. **Anuj, S. N., D. M. Whiley, T. J. Kidd, S. C. Bell, C. E. Wainwright, M. D. Nissen, and T. P. Sloots.** 2009. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* **63**:127-31.
11. **Anwar, H., T. van Biesen, M. Dasgupta, K. Lam, and J. W. Costerton.** 1989. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1824-6.
12. **Araquea, Y., J. Vitelli-Floresc, A. Ramírezc, G. Alonsoc, and V. Rodríguez Lemoinec.** 2008. Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* **28**:82-88.

13. **Atkinson, R. M., J. J. Lipuma, D. B. Rosenbluth, and W. M. Dunne, Jr.** 2006. Chronic colonization with *Pandoraea apista* in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *J Clin Microbiol* **44**:833-6.
14. **Avgeri, S. G., D. K. Matthaiou, G. Dimopoulos, A. P. Grammatikos, and M. E. Falagas.** 2009. Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents* **33**:394-404.
15. **Baldwin, A., E. Mahenthiralingam, K. M. Thickett, D. Honeybourne, M. C. Maiden, J. R. Govan, D. P. Speert, J. J. Lipuma, P. Vandamme, and C. G. Dowson.** 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **43**:4665-73.
16. **Bauernfeind, A., I. Schneider, R. Jungwirth, and C. Roller.** 1999. Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III, and IV by PCR. *J Clin Microbiol* **37**:1335-9.
17. **Bergen, G. A., and J. H. Shelhamer.** 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect Dis Clin North Am* **10**:297-325.
18. **Bernhardt, S. A., T. Spilker, T. Coffey, and J. J. LiPuma.** 2003. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis: frequency of strain replacement during chronic infection. *Clin Infect Dis* **37**:780-5.
19. **Bethesda, M. D.** 2001. Patient registry 2000 annual data report. Cystic Fibrosis Foundation:1-2.
20. **Biddick, R., T. Spilker, A. Martin, and J. J. LiPuma.** 2003. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett* **228**:57-62.
21. **Bittar, F., A. Leydier, E. Bosdure, A. Toro, M. Reynaud-Gaubert, S. Boniface, N. Stremler, J. C. Dubus, J. Sarles, D. Raoult, and J. M. Rolain.** 2008. *Inquilinus limosus* and cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* **14**:993-5.
22. **Boone, D. R., R. W. Castenholz, G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley.** 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
23. **Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Boddingtonhaus, M. Altwegg, and E. C. Bottger.** 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 Microbiol* **44**:1359-66.
24. **Brading, M. G., J. Jass, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Dynamics of bacterial biofilm formation., p. 46–63. *In* H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge.
25. **Brown, A. R., and J. R. Govan.** 2007. Assessment of fluorescent in situ hybridization and PCR-based methods for rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex organisms directly from sputum samples. *J Clin Microbiol* **45**:1920-6.

26. **Bullitt, R., and L. Makowski.** 1995. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* **373**:164-167.
27. **Burkholder, W. H.** 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**:115-7.
28. **Burns, Jane L., Ronald L. Gibson, S. McNamara, D. Yim, J. Emerson, M. Rosenfeld, P. Hiatt, K. McCoy, R. Castile, Arnold L. Smith, and Bonnie W. Ramsey.** 2001. Longitudinal Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Young Children with Cystic Fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* **183**:444-452.
29. **Burns, J. L., and L. Saiman.** 1999. Burkholderia cepacia infections in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* **18**:155-6.
30. **Camilli, A., and B. L. Bassler.** 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* **311**:1113-1116.
31. **Campodonico, V. L., M. Gadjeva, C. Paradis-Bleau, A. Uler, and G. B. Pier.** 2008. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med* **14**:120-33.
32. **Cantón, R., N. Cobos, J. De Gracia, F. Baquero, J. Honorato, and S. Gartner.** 2005. Tratamiento antimicrobiano frente a la colonización pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol* **41 Supl 1**:1-25.
33. **Caraher, E., G. Reynolds, P. Murphy, S. McClean, and M. Callaghan.** 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**:213-6.
34. **Carvalho, A. P., G. M. Ventura, C. B. Pereira, R. S. Leao, T. W. Folescu, L. Higa, L. M. Teixeira, M. C. Plotkowski, V. L. Merquior, R. M. Albano, and E. A. Marques.** 2007. Burkholderia cenocepacia, B. multivorans, B. ambifaria and B. vietnamiensis isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. *APMIS* **115**:311-8.
35. **Castaños, C., and F. Rentería.** 2008. Consenso Nacional de Fibrosis Quística, Sociedad Argentina de Pediatría. *Arch Argent Pediatr (Supl)* **106 (5)**:1-52.
36. **Cérantola, S., A. Lemassu-Jacquier, and H. Montrozier.** 1999. Structural elucidation of a novel exopolysaccharide produced by a mucoid clinical isolate of Burkholderia cepacia. *Eur J Biochem* **260**:373-383.
37. **Cérantola, S., N. Marty, and H. Montrozier.** 1996. Structural studies of the acidic exopolysaccharide produced by a mucoid strain of Burkholderia cepacia, isolated from cystic fibrosis. *Carbohydr Res* **285**:59-67.
38. **Clarridge, J. E., 3rd.** 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**:840-62.
39. **Cochrane, D. M., M. R. Brown, H. Anwar, P. H. Weller, K. Lam, and J. W. Costerton.** 1988. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol* **27**:255-61.
40. **Coenye, T., J. Goris, T. Spilker, P. Vandamme, and J. J. LiPuma.** 2002. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of

- cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol* **40**:2062-9.
41. **Coenye, T., L. Liu, P. Vandamme, and J. J. LiPuma.** 2001. Identification of *Pandora* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. *J Clin Microbiol* **39**:4452-5.
 42. **Coenye, T., E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. P. Speert, and P. Vandamme.** 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1481-90.
 43. **Coenye, T., T. Spilker, A. Van Schoor, J. J. LiPuma, and P. Vandamme.** 2004. Recovery of *Burkholderia cenocepacia* strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. *Thorax* **59**:952-954.
 44. **Coenye, T., and P. Vandamme.** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**:719-29.
 45. **Coenye, T., P. Vandamme, and J. J. LiPuma.** 2002. Infection by *Ralstonia* species in cystic fibrosis patients: identification of *R. pickettii* and *R. mannitolilytica* by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* **8**:692-6.
 46. **Comeau, A. M., F. J. Accurso, T. B. White, P. W. Campbell, 3rd, G. Hoffman, R. B. Parad, B. S. Wilfond, M. Rosenfeld, M. K. Sontag, J. Massie, P. M. Farrell, and B. P. O'Sullivan.** 2007. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* **119**:e495-518.
 47. **Conway, B. A., K. K. Chu, J. Bylund, E. Altman, and D. P. Speert.** 2004. Production of exopolysaccharide by *Burkholderia cenocepacia* results in altered cell-surface interactions and altered bacterial clearance in mice. *J Infect Dis* **190**:957-66.
 48. **Corral, D. M., A. L. Coates, Y. C. Yau, R. Tellier, M. Glass, S. M. Jones, and V. J. Waters.** 2008. *Burkholderia pseudomallei* infection in a cystic fibrosis patient from the Caribbean: a case report. *Can Respir J* **15**:237-9.
 49. **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. *Bacterial Biofilms in Nature and Disease*. *Annu Rev Microbiol* **41**:435-464.
 50. **Costerton, J. W., G. G. Geesey, and G. K. Cheng.** 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**:86-95.
 51. **Costerton, J. W., R. T. Irvin, and K. J. Cheng.** 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **35**:299-324.
 52. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. *Microbial Biofilms*. *Annual Review of Microbiology* **49**:711-745.
 53. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. *Science* **284**:1318-1322.

54. **Courtney, J. M., K. E. Dunbar, A. McDowell, J. E. Moore, T. J. Warke, M. Stevenson, and J. S. Elborn.** 2004. Clinical outcome of Burkholderia cepacia complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros* **3**:93-8.
55. **Cowan, M. M., T. M. Warren, and M. Fletcher.** 1991. Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling* **3**:23-34.
56. **Crossley, J. R., P. A. Smith, B. W. Edgar, P. D. Gluckman, and R. B. Elliott.** 1981. Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots. *Clin Chim Acta* **113**:111-21.
57. **Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2001. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**:2888-96.
58. **Cunha, M. V., J. H. Leitao, E. Mahenthiralingam, P. Vandamme, L. Lito, C. Barreto, M. J. Salgado, and I. Sa-Correia.** 2003. Molecular analysis of Burkholderia cepacia complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol* **41**:4113-20.
59. **Cunha, M. V., A. Pinto-de-Oliveira, L. Meirinhos-Soares, M. J. Salgado, J. Melo-Cristino, S. Correia, C. Barreto, and I. Sa-Correia.** 2007. Exceptionally high representation of Burkholderia cepacia among B. cepacia complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* **45**:1628-33.
60. **Chaudhary, M., S. M. Shrivastava, and R. Sehgal.** 2009. Evaluation of efficacy and safety of fixed dose combination of ceftazidime-tobramycin in comparison with ceftazidime in lower respiratory tract infections. *Curr Clin Pharmacol* **4**:62-6.
61. **Chernick, W. S., and G. J. Barbero.** 1959. Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics* **24**:739-45.
62. **Chiron, R., H. Marchandin, F. Counil, E. Jumas-Bilak, A. M. Freydiere, G. Bellon, M. O. Husson, D. Turck, F. Bremont, G. Chabanon, and C. Segonds.** 2005. Clinical and microbiological features of Inquilinus sp. isolates from five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**:3938-43.
63. **Chmiel, J., M. Berger, and M. Konstan.** 2002. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **23**:5-27.
64. **Christenson, J. C., D. F. Welch, G. Mukwaya, M. J. Muszynski, R. E. Weaver, and D. J. Brenner.** 1989. Recovery of Pseudomonas gladioli from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **27**:270-3.
65. **D'Alessandro, V., F. Rentería, A. Fernández, M. I. Martínez, and E. Segal.** 2009. Comparación del estado clínico-funcional en niños con fibrosis quística detectados por pesquisa neonatal o por síntomas clínicos. *Arch Argent Pediatr* **107**:430-435.
66. **Dalmastri, C., A. Baldwin, S. Tabacchioni, A. Bevivino, E. Mahenthiralingam, L. Chiarini, and C. Dowson.** 2007. Investigating

- Burkholderia cepacia complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol* **9**:1632-9.
67. **Dasenbrook, E. C., C. A. Merlo, M. Diener-West, N. Lechtzin, and M. P. Boyle.** 2008. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **178**:814-21.
68. **Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg.** 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**:295-298.
69. **Davies, J. C., and B. K. Rubin.** 2007. Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **28**:312-21.
70. **Davis, P. B., M. Drumm, and M. W. Konstan.** 1996. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:1229-56.
71. **de Beer, D., P. Stoodley, and Z. Lewandowski.** 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* **44**:636-641.
72. **De Boeck, K., A. Malfroot, L. Van Schil, P. Lebecque, C. Knoop, J. R. Govan, C. Doherty, S. Laevens, and P. Vandamme.** 2004. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex colonisation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* **23**:851-6.
73. **De Boeck, K., M. Wilschanski, C. Castellani, C. Taylor, H. Cuppens, J. Dodge, and M. Sinaasappel.** 2006. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* **61**:627-35.
74. **De Rose, V.** 2002. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* **19**:333-40.
75. **De Soya, A., C. D. Ellis, C. M. Khan, P. A. Corris, and R. Demarco de Hormaeche.** 2004. *Burkholderia cenocepacia* lipopolysaccharide, lipid A, and proinflammatory activity. *Am J Respir Crit Care Med* **170**:70-7.
76. **del Pozo, J. L., and R. Patel.** 2007. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. *Clin Pharmacol Ther* **82**:204-209.
77. **Denton, M., and K. G. Kerr.** 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* **11**:57-80.
78. **Dodge, J. A.** 1995. Male fertility in cystic fibrosis. *Lancet* **346**:587-8.
79. **Donlan, R. M.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**:881-90.
80. **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
81. **Doull, I. J., H. C. Ryley, P. Weller, and M. C. Goodchild.** 2001. Cystic fibrosis-related deaths in infancy and the effect of newborn screening. *Pediatr Pulmonol* **31**:363-6.
82. **Durie, P. R., and G. G. Forstner.** 1989. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *J R Soc Med* **82 Suppl** 16:2-10.

83. **Eigen, H., B. J. Rosenstein, S. FitzSimmons, and D. V. Schidlow.** 1995. A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. *J Pediatr* **126**:515-23.
84. **Equi, A., I. M. Balfour-Lynn, A. Bush, and M. Rosenthal.** 2002. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* **360**:978-84.
85. **Farrell, P. M., B. J. Rosenstein, T. B. White, F. J. Accurso, C. Castellani, G. R. Cutting, P. R. Durie, V. A. Legrys, J. Massie, R. B. Parad, M. J. Rock, and P. W. Campbell, 3rd.** 2008. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* **153**:S4-S14.
86. **Ferroni, A., I. Sermet-Gaudelus, E. Abachin, G. Quesne, G. Lenoir, P. Berche, and J.-L. Gaillard.** 2002. Use of 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Recovered from Patients Attending a Single Cystic Fibrosis Center. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3793-3797.
87. **Flume, P. A., B. P. O'Sullivan, K. A. Robinson, C. H. Goss, P. J. Mogayzel, Jr., D. B. Willey-Courand, J. Bujan, J. Finder, M. Lester, L. Quittell, R. Rosenblatt, R. L. Vender, L. Hazle, K. Sabadosa, and B. Marshall.** 2007. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med* **176**:957-69.
88. **Fuqua, C., M. R. Parsek, and E. P. Greenberg.** 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**:439-68.
89. **Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart, and P. Stoodley.** 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**:34-40.
90. **Garrity, G. M., D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. R. Staley.** 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Parts A - C.* Springer - Verlag.
91. **Gee, J. E., C. T. Sacchi, M. B. Glass, B. K. De, R. S. Weyant, P. N. Levett, A. M. Whitney, A. R. Hoffmaster, and T. Popovic.** 2003. Use of 16S rRNA Gene Sequencing for Rapid Identification and Differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4647-4654.
92. **Gillis, M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, and M. P. Fernandez.** 1995. Polyphasic Taxonomy in the Genus *Burkholderia* Leading to an Emended Description of the Genus and Proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-Fixing Isolates from Rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol* **45**:274-289.
93. **Goss, C. H., N. Mayer-Hamblett, M. L. Aitken, G. D. Rubenfeld, and B. W. Ramsey.** 2004. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax* **59**:955-959.
94. **Goss, C. H., K. Otto, M. L. Aitken, and G. D. Rubenfeld.** 2002. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **166**:356-61.

95. **Goss, C. H., G. D. Rubenfeld, D. R. Park, V. L. Sherbin, M. S. Goodman, and R. K. Root.** 2003. Cost and incidence of social comorbidities in low-risk patients with community-acquired pneumonia admitted to a public hospital. *Chest* **124**:2148-55.
96. **Govan, J. R.** 2000. Infection control in cystic fibrosis: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex. *J R Soc Med* **93 Suppl 38**:40-5.
97. **Govan, J. R., A. R. Brown, and A. M. Jones.** 2007. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* **2**:153-64.
98. **Govan, J. R., P. H. Brown, J. Maddison, C. J. Doherty, J. W. Nelson, M. Dodd, A. P. Greening, and A. K. Webb.** 1993. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* **342**:15-9.
99. **Group-CFTIC.** 1999. A statement on *Burkholderia cepacia*, London: Cystic Fibrosis Trust.
100. **Hancock, E. W.** 1994. Artificial valve disease, p. 1539-1545. *In* R. C. Schlant, R. W. Alexander, R. A. O'Rourke, R. Roberts, and E. H. Sonnenblick (ed.), *The heart arteries and veins*, 8th ed, vol. 2. McGraw-Hill, Inc, New York, N.Y.
101. **Hardalo, C., and S. C. Edberg.** 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* **23**:47-75.
102. **Hartl, D., P. Latzin, P. Hordijk, V. Marcos, C. Rudolph, M. Woischnik, S. Krauss-Etschmann, B. Koller, D. Reinhardt, A. A. Roscher, D. Roos, and M. Griese.** 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* **13**:1423-30.
103. **Hartman, G., and R. Wise.** 1998. Quorum sensing: potential means of treating gram-negative infections? *The Lancet* **351**:848-849.
104. **Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn, and D. Naumann.** 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* **137**:69-79.
105. **Helmi, M., R. B. Love, D. Welter, R. D. Cornwell, and K. C. Meyer.** 2003. *Aspergillus* infection in lung transplant recipients with cystic fibrosis: risk factors and outcomes comparison to other types of transplant recipients. *Chest* **123**:800-8.
106. **Hoiby, N., B. Frederiksen, and T. Pressler.** 2005. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros* **4 Suppl 2**:49-54.
107. **Imundo, L., J. Barasch, A. Prince, and Q. Al-Awqati.** 1995. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:3019-23.
108. **Isles, A., I. Maclusky, M. Corey, R. Gold, C. Prober, P. Fleming, and H. Levison.** 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* **104**:206-10.
109. **Janet, S. C., A. W. Kimberly, S. Theodore, J. F. Robert, and J. L. John.** 2001. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J Pediatr* **139**:643-649.

110. **Johnson, W. M., S. D. Tyler, and K. R. Rozee.** 1994. Linkage analysis of geographic and clinical clusters in *Pseudomonas cepacia* infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* **32**:924-30.
111. **Jones, A. M., M. E. Dodd, J. R. Govan, V. Barcus, C. J. Doherty, J. Morris, and A. K. Webb.** 2004. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* **59**:948-51.
112. **Jorgensen, I. M., H. K. Johansen, B. Frederiksen, T. Pressler, A. Hansen, P. Vandamme, N. Hoiby, and C. Koch.** 2003. Epidemic spread of *Pandoraea apista*, a new pathogen causing severe lung disease in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* **36**:439-46.
113. **Jukes, T. H., and C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21–132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3. Academic Press, New York.
114. **Kalish, L. A., D. A. Waltz, M. Dovey, G. Potter-Bynoe, A. J. McAdam, J. J. Lipuma, C. Gerard, and D. Goldmann.** 2006. Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **173**:421-5.
115. **Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L. C. Tsui.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**:1073-80.
116. **Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso, and D. W. Riches.** 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **151**:1075-82.
117. **Khoury, A. E., K. Lam, B. Ellis, and J. W. Costerton.** 1992. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J* **38**:M174-8.
118. **Kidd, T. J., S. C. Bell, and C. Coulter.** 2003. Genomovar diversity amongst *Burkholderia cepacia* complex isolates from an Australian adult cystic fibrosis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**:434-7.
119. **Kirschner, C., K. Maquelin, P. Pina, N. A. Ngo Thi, L.-P. Choo-Smith, G. D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S. M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G. J. Puppels, and D. Naumann.** 2001. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1763-1770.
120. **Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jørgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**:1511-1524.
121. **Konstan, M. W., and M. Berger.** 1997. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* **24**:137-42.
122. **Konstan, M. W., W. J. Morgan, S. M. Butler, D. J. Pasta, M. L. Craib, S. J. Silva, D. C. Stokes, M. E. Wohl, J. S. Wagener, W. E. Regelman, and C. A. Johnson.** 2007. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in

- one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr* **151**:134-9, 139 e1.
123. **Kopito, L. E., H. J. Kosasky, and H. Shwachman.** 1973. Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril* **24**:512-6.
124. **Korber, D. R., J. R. Lawrence, B. Sutton, and D. E. Caldwell.** 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb Ecol* **18**:1-19.
125. **Kosorok, M. R., L. Zeng, S. E. West, M. J. Rock, M. L. Splaingard, A. Laxova, C. G. Green, J. Collins, and P. M. Farrell.** 2001. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol* **32**:277-87.
126. **Lai, H. C., S. C. FitzSimmons, D. B. Allen, M. R. Kosorok, B. J. Rosenstein, P. W. Campbell, and P. M. Farrell.** 2000. Risk of persistent growth impairment after alternate-day prednisone treatment in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **342**:851-9.
127. **Lands, L. C., R. Milner, A. M. Cantin, D. Manson, and M. Corey.** 2007. High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial. *J Pediatr* **151**:249-54.
128. **Lawrence, J. R., D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton, and D. E. Caldwell.** 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **173**:6558-6567.
129. **Lay, J. O.** 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**:507-516.
130. **Leitao, J. H., S. A. Sousa, M. V. Cunha, M. J. Salgado, J. Melo-Cristino, M. C. Barreto, and I. Sa-Correia.** 2008. Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**:1101-11.
131. **Lewis, H. A., S. G. Buchanan, S. K. Burley, K. Connors, M. Dickey, M. Dorwart, R. Fowler, X. Gao, W. B. Guggino, W. A. Hendrickson, J. F. Hunt, M. C. Kearins, D. Lorimer, P. C. Maloney, K. W. Post, K. R. Rajashankar, M. E. Rutter, J. M. Sauder, S. Shriver, P. H. Thibodeau, P. J. Thomas, M. Zhang, X. Zhao, and S. Emtage.** 2004. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* **23**:282-93.
132. **Lewis, K.** 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Micro* **5**:48-56.
133. **Li, H., Z. Cai, J. Chen, M. Ju, Z. Xu, and D. N. Sheppard.** 2007. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel: a versatile engine for transepithelial ion transport. *Acta Physiol Sin* **59**:416-30.
134. **Liedtke, C.** 1992. Electrolyte transport in the epithelium of pulmonary segments of normal and cystic fibrosis lung. *FASEB J.* **6**:3076-3084.

135. **Lipuma, J. J.** 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **23**:299-323.
136. **Lipuma, J. J.** 2005. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. *Curr Opin Pulm Med* **11**:528-33.
137. **LiPuma, J. J., S. E. Dasen, D. W. Nielson, R. C. Stern, and T. L. Stull.** 1990. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* **336**:1094-6.
138. **LiPuma, J. J., T. Spilker, L. H. Gill, P. W. Campbell, 3rd, L. Liu, and E. Mahenthalingam.** 2001. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **164**:92-6.
139. **Liu, L., T. Coenye, J. L. Burns, P. W. Whitby, T. L. Stull, and J. J. LiPuma.** 2002. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **40**:1210-3.
140. **Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier.** 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**:194-222.
141. **Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**:175-83.
142. **Mahenthalingam, E., A. Baldwin, and C. G. Dowson.** 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* **104**:1539-51.
143. **Mahenthalingam, E., A. Baldwin, P. Drevinek, E. Vanlaere, P. Vandamme, J. J. LiPuma, and C. G. Dowson.** 2006. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS One* **1**:e17.
144. **Mahenthalingam, E., J. Bischof, S. K. Byrne, C. Radomski, J. E. Davies, Y. Av-Gay, and P. Vandamme.** 2000. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* **38**:3165-73.
145. **Mahenthalingam, E., M. E. Campbell, J. Foster, J. S. Lam, and D. P. Speert.** 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **34**:1129-35.
146. **Mahenthalingam, E., D. A. Simpson, and D. P. Speert.** 1997. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **35**:808-16.
147. **Mahenthalingam, E., T. A. Urban, and J. B. Goldberg.** 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* **3**:144-56.

148. **Mahenthiralingam, E., and P. Vandamme.** 2005. Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. *Chron Respir Dis* **2**:209-17.
149. **Mahenthiralingam, E., P. Vandamme, M. E. Campbell, D. A. Henry, A. M. Gravelle, L. T. Wong, A. G. Davidson, P. G. Wilcox, B. Nakielna, and D. P. Speert.** 2001. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* **33**:1469-75.
150. **Maiden, M. C.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**:561-88.
151. **Maquelin, K., C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, and G. J. Puppels.** 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Meth* **51**:255-271.
152. **Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. Govan, B. W. Holloway, and V. Deretic.** 1993. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8377-81.
153. **Mastella, G., M. Rainisio, H. K. Harms, M. E. Hodson, C. Koch, J. Navarro, B. Strandvik, and S. G. McKenzie.** 2000. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. *Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Eur Respir J* **16**:464-71.
154. **Matsui, H., B. R. Grubb, R. Tarran, S. H. Randell, J. T. Gatzky, C. W. Davis, and R. C. Boucher.** 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**:1005-15.
155. **Matsui, H., V. E. Wagner, D. B. Hill, U. E. Schwab, T. D. Rogers, B. Button, R. M. Taylor, 2nd, R. Superfine, M. Rubinstein, B. H. Iglewski, and R. C. Boucher.** 2006. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:18131-6.
156. **McDowell, A., E. Mahenthiralingam, K. E. A. Dunbar, J. E. Moore, M. Crowe, and J. S. Elborn.** 2004. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *J Med Microbiol* **53**:663-668.
157. **McDowell, A., E. Mahenthiralingam, J. E. Moore, K. E. Dunbar, A. K. Webb, M. E. Dodd, S. L. Martin, B. C. Millar, C. J. Scott, M. Crowe, and J. S. Elborn.** 2001. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **39**:4247-55.
158. **McGowan, J. E.** 2006. Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum. *Am J Med* **119**:S29-S36.
159. **Melo Coutinho, H.** 2007. *Burkholderia cepacia* complex: Virulence characteristics, importance and relationship with cystic fibrosis. *Indian J Med Sci* **61**:422-429.

160. **Messing, B.** 1998. Catheter-sepsis during home parenteral nutrition: use of the antibiotic-lock technique. *Nutrition* **14**:466-468.
161. **Miller, M. B., and B. L. Bassler.** 2001. Quorum sensing on bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:165-199.
162. **Miller, M. B., and P. H. Gilligan.** 2003. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **41**:4009-15.
163. **Miller, M. J., and D. G. Ahearn.** 1987. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses and other substrata. *J Clin Microbiol* **25**:1392-7.
164. **Mishra, A., R. Greaves, K. Smith, J. B. Carlin, A. Wootton, R. Stirling, and J. Massie.** 2008. Diagnosis of Cystic Fibrosis by Sweat Testing: Age-Specific Reference Intervals. *J Pediatrics* **153**:758-763.e1.
165. **Naumann, D.** 2001. FT-infrared and ft-raman spectroscopy in biomedical research. *Appl Spectros Rev* **36**:239 - 298.
166. **Noone, P. G., W. D. Bennett, J. A. Regnis, K. L. Zeman, J. L. Carson, M. King, R. C. Boucher, and M. R. Knowles.** 1999. Effect of aerosolized uridine-5'-triphosphate on airway clearance with cough in patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* **160**:144-9.
167. **O'Carroll, M. R., T. J. Kidd, C. Coulter, H. V. Smith, B. R. Rose, C. Harbour, and S. C. Bell.** 2003. *Burkholderia pseudomallei*: another emerging pathogen in cystic fibrosis. *Thorax* **58**:1087-91.
168. **O'Donnell, J. A., and S. P. Gelone.** 2000. Fluoroquinolones. *Infect Dis Clin North Am* **14**:489-513, xi.
169. **O'Sullivan, L. A., and E. Mahenthiralingam.** 2005. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Lett Appl Microbiol* **41**:8-11.
170. **O'Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79.
171. **O'Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
172. **Oie, S., and A. Kamiya.** 1996. Bacterial contamination of commercially available ethacridine lactate (acrinol) products. *J Hospital Infect* **34**:51-58.
173. **Olivier, K. N., D. J. Weber, J. H. Lee, A. Handler, G. Tudor, P. L. Molina, J. Tomaszefski, and M. R. Knowles.** 2003. Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **167**:835-40.
174. **Olivier, K. N., D. J. Weber, R. J. Wallace, Jr., A. R. Faiz, J. H. Lee, Y. Zhang, B. A. Brown-Elliot, A. Handler, R. W. Wilson, M. S. Schechter, L. J. Edwards, S. Chakraborti, and M. R. Knowles.** 2003. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**:828-34.

175. **Parke, J. L., and D. Gurian-Sherman.** 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* **39**:225-58.
176. **Payne, G. W., P. Vandamme, S. H. Morgan, J. J. Lipuma, T. Coenye, A. J. Weightman, T. H. Jones, and E. Mahenthiralingam.** 2005. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* **71**:3917-27.
177. **Perry, B.** 2001. Cosmetic microbiology. *Microbiol Today* **28**:185-187.
178. **Pickering, L. K.** 2003. Red book (Report of the committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics): *Burkholderia cepacia*. 25th ed. Elk Grove Village, IL: APP. 224-5.
179. **Pimentel, J. D., S. M. Dubedat, N. D. EL, and R. A. Benn.** 2007. Identification of isolates within the *Burkholderia cepacia* complex by a multiplex *recA* and 16S rRNA gene real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* **45**:3853-4.
180. **Post, J. C., N. L. Hiller, L. Nistico, P. Stoodley, and G. D. Ehrlich.** 2007. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* **15**:347-351
10.1097/MOO.0b013e3282b97327.
181. **Quinteros, M., A. Famigletti, A. Limansky, J. Casellas, C. Vay, and cols.** 2005. Consenso sobre criterio de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad en los BNNF de importancia clínica. Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC, Asociación Argentina de Microbiología.
182. **Quinton, P. M.** 2007. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)* **22**:212-25.
183. **Quinton, P. M.** 1999. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev* **79**:S3-S22.
184. **Raad, I., W. Costerton, U. Sabharwal, M. Sacilowski, E. Anaissie, and G. P. Bodey.** 1993. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* **168**:400-7.
185. **Ramette, A., J. J. LiPuma, and J. M. Tiedje.** 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl Environ Microbiol* **71**:1193-201.
186. **Ramsey, B. W.** 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **335**:179-88.
187. **Ranieri, E., B. D. Lewis, R. L. Gerace, R. G. Ryall, C. P. Morris, P. V. Nelson, W. F. Carey, and E. F. Robertson.** 1994. Neonatal screening for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience. *BMJ* **308**:1469-72.
188. **Ratjen, F., and G. Doring.** 2003. Cystic fibrosis. *Lancet* **361**:681-9.
189. **Ratjen, F., E. Rietschel, D. Kasel, R. Schwiertz, K. Starke, H. Beier, S. van Koningsbruggen, and H. Grasemann.** 2006. Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* **57**:306-311.

190. **Reik, R., T. Spilker, and J. J. Lipuma.** 2005. Distribution of Burkholderia cepacia complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**:2926-8.
191. **Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, and et al.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**:1066-73.
192. **Rosenberg, M., and S. Kjelleberg.** 1986. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Adv Microb Ecol* **9**:353-93.
193. **Rosenfeld, M., B. W. Ramsey, and R. L. Gibson.** 2003. Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* **9**:492-7.
194. **Rosenstein, B. J., and G. R. Cutting.** 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* **132**:589-95.
195. **Sabbuba, N. A., E. Mahenthiralingam, and D. J. Stickler.** 2003. Molecular epidemiology of Proteus mirabilis infections of the catheterized urinary tract. *J Clin Microbiol* **41**:4961-5.
196. **Sader, H. S., and R. N. Jones.** 2005. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* **25**:95-109.
197. **Saiman, L., F. Mehar, W. W. Niu, H. C. Neu, K. J. Shaw, G. Miller, and A. Prince.** 1996. Antibiotic susceptibility of multiply resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with cystic fibrosis, including candidates for transplantation. *Clin Infect Dis* **23**:532-7.
198. **Saiman, L., and J. Siegel.** 2004. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **17**:57-71.
199. **Salo, J., J. J. Sevander, T. Tapiainen, I. Ikaheimo, T. Pokka, M. Koskela, and M. Uhari.** 2009. Biofilm formation by Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infections. *Clin Nephrol* **71**:501-7.
200. **Segal, E., A. Fernandez, and F. Rentería.** 2004. Fibrosis Quística. Ediciones Journal.
201. **Segonds, C., T. Heulin, N. Marty, and G. Chabanon.** 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**:2201-8.
202. **Sheppard, D. N., and M. J. Welsh.** 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **79**:S23-45.
203. **Sibley, C. D., H. Rabin, and M. G. Surette.** 2006. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiol* **1**:53-61.
204. **Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg.** 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**:762-764.

205. **Sist, P., P. Cescutti, S. Skerlavaj, R. Urbani, J. H. Leitão, I. Sá-Correia, and R. Rizzo.** 2003. Macromolecular and solution properties of Cepacian: the exopolysaccharide produced by a strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. *Carbohydr Res* **338**:1861-1867.
206. **Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh.** 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**:229-36.
207. **Soni, R., G. Marks, D. A. Henry, M. Robinson, C. Moriarty, S. Parsons, P. Taylor, E. Mahenthalingam, D. P. Speert, and P. T. Bye.** 2002. Effect of *Burkholderia cepacia* infection in the clinical course of patients with cystic fibrosis: a pilot study in a Sydney clinic. *Respirology* **7**:241-5.
208. **Speert, D. P., D. Henry, P. Vandamme, M. Corey, and E. Mahenthalingam.** 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* **8**:181-7.
209. **Stern, R. C.** 1997. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* **336**:487-91.
210. **Stevens, D. A., R. B. Moss, V. P. Kurup, A. P. Knutsen, P. Greenberger, M. A. Judson, D. W. Denning, R. Cramer, A. S. Brody, M. Light, M. Skov, W. Maish, and G. Mastella.** 2003. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* **37 Suppl 3**:S225-64.
211. **Stewart, P. S., and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135-8.
212. **Stewart, P. S., and M. J. Franklin.** 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**:199-210.
213. **Stewart, P. S., B. M. Peyton, W. J. Drury, and R. Murga.** 1993. Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **59**:327-9.
214. **Stickler, D., N. Morris, M. C. Moreno, and N. Sabbuba.** 1998. Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**:649-52.
215. **Stickler, D. J.** 2008. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* **5**:598-608.
216. **Stickler, D. J., N. S. Morris, R. J. C. McLean, and C. Fuqua.** 1998. Biofilms on Indwelling Urethral Catheters Produce Quorum-Sensing Signal Molecules In Situ and In Vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3486-3490.
217. **Strausbaugh, S. D., and P. B. Davis.** 2007. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med* **28**:279-88.
218. **Sun, L., R. Z. Jiang, S. Steinbach, A. Holmes, C. Campanelli, J. Forstner, U. Sajjan, Y. Tan, M. Riley, and R. Goldstein.** 1995. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain. *Nat Med* **1**:661-6.
219. **Sutherland, I. W.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**:3-9.

220. **Tablan, O. C., W. J. Martone, C. F. Doershuk, R. C. Stern, M. J. Thomassen, J. D. Klinger, J. W. White, L. A. Carson, and W. R. Jarvis.** 1987. Colonization of the respiratory tract with *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis. Risk factors and outcomes. *Chest* **91**:527-32.
221. **Taccetti, G., S. Campana, F. Festini, M. Mascherini, and G. Doring.** 2005. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* **26**:458-61.
222. **Tan, K., S. P. Conway, K. G. Brownlee, C. Etherington, and D. G. Peckham.** 2002. *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **34**:101-4.
223. **Therrell, B. L., M. A. Lloyd-Puryear, and M. Y. Mann.** 2005. Understanding newborn screening system issues with emphasis on cystic fibrosis screening. *J Pediatr* **147**:S6-10.
224. **Thomas, J. G., and L. A. Nakaishi.** 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc* **137**:10S-15.
225. **Toledo-Arana, A., J. Valle, C. Solano, M. J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penades, and I. Lasa.** 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **67**:4538-45.
226. **Tramper-Stranders, G. A., C. K. van der Ent, M. G. Slieker, S. W. Terheggen-Lagro, F. Teding van Berkhout, J. L. Kimpen, and T. F. Wolfs.** 2006. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax* **61**:689-93.
227. **Treggiari, M. M., M. Rosenfeld, G. Retsch-Bogart, R. Gibson, and B. Ramsey.** 2007. Approach to eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **42**:751-6.
228. **Tunkel, A. R., and G. L. Mandell.** 1992. Infecting microorganisms, p. 85-97. *In* D. Kaye (ed.), *Infective endocarditis*, 2nd ed. Raven Press New York, N.Y.
229. **Turner, K. M., and E. J. Feil.** 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *Int J Antimicrob Agents* **29**:129-35.
230. **Urwin, R., and M. C. Maiden.** 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**:479-87.
231. **van Baar, B. L. M.** 2000. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev* **24**:193-219.
232. **Van Daele, S., R. Verhelst, G. Claeys, G. Verschraegen, H. Franckx, L. Van Simaey, C. de Ganck, F. De Baets, and M. Vanechoutte.** 2005. Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients at a cystic fibrosis rehabilitation center. *J Clin Microbiol* **43**:2998-3002.
233. **Van Looveren, M., and H. Goossens.** 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* **10**:684-704.
234. **Vandamme, P., D. Henry, T. Coenye, S. Nzula, M. Vancanneyt, J. J. LiPuma, D. P. Speert, J. R. Govan, and E. Mahenthiralingam.** 2002. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional

- Burkholderia cepacia complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**:143-9.
235. **Vandamme, P., B. Holmes, T. Coenye, J. Goris, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, and J. R. Govan.** 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol* **154**:91-6.
236. **Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters, and J. R. Govan.** 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1188-200.
237. **Vandamme, P., E. Mahenthiralingam, B. Holmes, T. Coenye, B. Hoste, P. De Vos, D. Henry, and D. P. Speert.** 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol* **38**:1042-7.
238. **Vanlaere, E., A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E. De Brandt, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, D. P. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme.** 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:102-11.
239. **Vanlaere, E., J. J. Lipuma, A. Baldwin, D. Henry, E. De Brandt, E. Mahenthiralingam, D. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme.** 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1580-90.
240. **Vermis, K., T. Coenye, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, H. J. Nelis, and P. Vandamme.** 2004. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:689-91.
241. **Vermis, K., T. Coenye, E. Mahenthiralingam, H. J. Nelis, and P. Vandamme.** 2002. Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol* **51**:937-40.
242. **Vonberg, R. P., and P. Gastmeier.** 2005. Isolation of infectious cystic fibrosis patients: results of a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**:401-9.
243. **Ward, K. H., M. E. Olson, K. Lam, and J. W. Costerton.** 1992. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol* **36**:406-13.
244. **Waters, V., Y. Yau, S. Prasad, A. Lu, E. Atenafu, I. Crandall, S. Tom, E. Tullis, and F. Ratjen.** 2010. *Stenotrophomonas Maltophilia* in Cystic Fibrosis: Serologic Response and Effect on Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*.
245. **Waters, V. J., M. I. Gomez, G. Soong, S. Amin, R. Ernst, and A. Prince.** 2007. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect. Immun.:IAI*.01469-06.

246. **Wellinghausen, N., A. Essig, and O. Sommerburg.** 2005. *Inquilingus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emerg Infect Dis* **11**:457-9.
247. **Wellinghausen, N., J. Kothe, B. Wirths, A. Sigge, and S. Poppert.** 2005. Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**:4070-5.
248. **Wellinghausen, N., B. Wirths, and S. Poppert.** 2006. Fluorescence in situ hybridization for rapid identification of *Achromobacter xylosoxidans* and *Alcaligenes faecalis* recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **44**:3415-7.
249. **Whiteford, M. L., J. D. Wilkinson, J. H. McColl, F. M. Conlon, J. R. Michie, T. J. Evans, and J. Y. Paton.** 1995. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* **50**:1194-8.
250. **Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson, and G. P. Salmond.** 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**:365-404.
251. **Widdicombe, J. H.** 1999. Altered NaCl Concentration of Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis. *Physiology* **14**:126-127.
252. **Wilmott, R. W.** 1998. Making the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr* **132**:563-5.
253. **Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Doring.** 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**:317-25.
254. **Wright, J. M., C. A. Merlo, J. B. Reynolds, P. L. Zeitlin, J. G. Garcia, W. B. Guggino, and M. P. Boyle.** 2006. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**:327-36.
255. **Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi.** 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiol Immunol* **39**:897-904.
256. **Yankaskas, J. R., and G. B. Mallory, Jr.** 1998. Lung transplantation in cystic fibrosis: consensus conference statement. *Chest* **113**:217-26.
257. **Zaidi, S., O. Elidemir, J. S. Heinle, E. D. McKenzie, M. G. Schecter, S. L. Kaplan, M. K. Dishop, D. L. Kearney, and G. B. Mallory.** 2009. Mycobacterium abscessus in cystic fibrosis lung transplant recipients: report of 2 cases and risk for recurrence. *Transpl Infect Dis* **11**:243-8.
258. **Zbinden, A., E. C. Bottger, P. P. Bosshard, and R. Zbinden.** 2007. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* **45**:2270-3.

-
259. **Zielenski, J., R. Rozmahel, D. Bozon, B.-s. Kerem, Z. Grzelczak, J. R. Riordan, J. Rommens, and L.-C. Tsui.** 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **10**:214-228.
260. **Zughaier, S. M., H. C. Ryley, and S. K. Jackson.** 1999. Lipopolysaccharide (LPS) from *Burkholderia cepacia* Is More Active than LPS from *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in Stimulating Tumor Necrosis Factor Alpha from Human Monocytes. *Infect. Immun.* **67**:1505-1507.

**Discriminación e identificación de organismos
pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*,
en muestras de esputo de paciente fibroquísticos,
mediante espectroscopía infrarroja con
transformada de Fourier (FT-IR)**

2.1 INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER

Como se ha mencionado anteriormente, las infecciones bacterianas crónicas se asocian al deterioro pulmonar progresivo, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ. Por este motivo una identificación correcta y rápida de patógenos de tracto respiratorio es requerida para el adecuado manejo clínico de estos pacientes [36, 49, 64]. Las modernas técnicas de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) representan un enfoque radicalmente diferente para la rápida identificación de microorganismos de relevancia clínica [21, 40]. El fundamento de las mismas es que un espectro infrarrojo (IR) constituye un patrón altamente específico semejante a una “huella digital”, que representa la composición química global de la muestra analizada y que, por lo tanto, permite su caracterización. El espectro FT-IR de una célula es el resultado de la absorción de todos los modos vibracionales de los enlaces químicos de las moléculas que la constituyen, principalmente macromoléculas como ADN, ARN, proteínas, carbohidratos y lípidos. Debido a la complejidad inherente a la interpretación de los espectros se han desarrollado sistemas de reconocimiento de *patterns* basados en técnicas de análisis estadístico multivariado que permiten la caracterización e identificación microbiana así como la cuantificación de componentes celulares.

FT-IR combinada con técnicas de análisis multivariante ha sido propuesta en los últimos años como un método fisicoquímico alternativo para la identificación y caracterización molecular microbiana [40]. Mediante esta metodología es posible analizar directamente espectros de células enteras, sin ningún tipo de tratamiento ni uso de reactivos especiales, tiene bajos costos operativos y lo que es más importante permite obtener resultados en tiempos reducidos [39, 57]. La aplicación de metodologías basadas en FT-IR ha sido capaz de identificar microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Candida spp.* a nivel de género, especie y aun de cepa [28, 34, 51].

Los espectros FT-IR resultan altamente específicos y reproducibles bajo las mismas condiciones de operación. La composición de los microorganismos (proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA), depende de un gran número de variables tales como el sistema de cultivo utilizado, la composición del medio de crecimiento, los tiempos de

incubación, el pH, la temperatura, etc. De modo que pequeños cambios en estos parámetros así como, en la preparación de las muestras, o en la adquisición de los datos espectrales, producirán efectos significativos en los espectros resultantes. Por lo tanto los estudios de caracterización e identificación de muestras biológicas sólo son absolutamente confiables si la preparación y condiciones de medida se encuentran debidamente ajustadas.

Un aspecto de fundamental importancia para la identificación de microorganismos por FT-IR es el desarrollo de bases de datos constituidas por espectros de cepas de referencia. Los espectros contenidos en estas bases son obtenidos mediante protocolos estrictamente estandarizados, lo cual posibilita el intercambio de resultados entre laboratorios y la construcción de bases de datos de referencia mundial. Estas bases de datos al ser analizadas por diferentes métodos multivariantes, tal como el análisis de cluster jerárquico [2, 28], análisis discriminante lineal [34], o análisis con redes neuronales artificiales (RNAs) [53, 60], posibilitan la identificación de microorganismos. En particular, el método de reconocimiento de *patterns* basados en RNAs fue desarrollado para solucionar problemas relacionados a la identificación de microorganismos estrechamente relacionados [48].

2.1.1 Análisis de muestras biológicas por espectroscopía FT-IR

Para analizar el espectro IR de muestras biológicas, es fundamental conocer la composición celular. Un espectro FT-IR de una célula exhibirá contribuciones de todos los componentes celulares, principalmente macromoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN. Aunque los espectros de macromoléculas son complejos, éstos poseen bandas características que no se superponen totalmente en el espectro de IR. La Fig. 1 muestra un espectro microbiano típico el cual representa la composición bioquímica total de las células analizadas; se indican las ventanas espectrales y las absorciones de las principales macromoléculas y grupos funcionales [25, 40, 42].

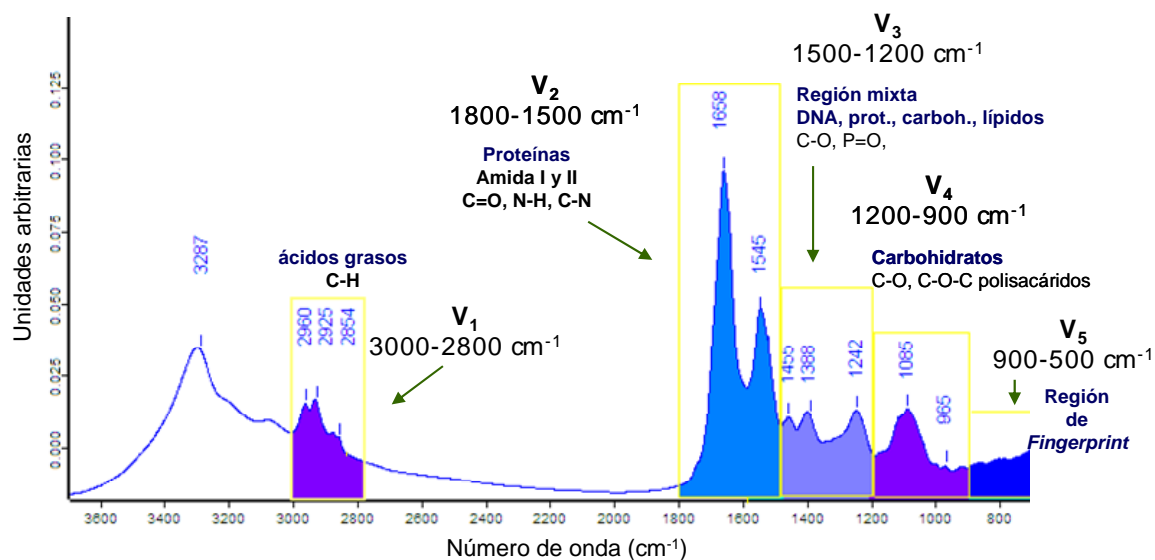


Fig. 1. Espectro FT-IR de absorción de una muestra de *Pseudomonas aeruginosa* depositada sobre una celda de ZnSe, obtenido por 64 escaneos a 6 cm^{-1} de resolución. Se muestran las distintas ventanas o regiones en que puede dividirse un espectro para facilitar su análisis y las absorciones correspondientes a los grupos funcionales presentes en las principales macromoléculas. Tomado del trabajo publicado por Miñán y cols [37].

Las bandas de absorción observadas en la región del infrarrojo medio (4000 a 700 cm^{-1}) corresponden a los modos vibracionales de los enlaces químicos de macromoléculas presentes en los microorganismos. En la región del espectro que comprende de $4000 - 1400\text{ cm}^{-1}$ se observan bandas de absorción que provienen principalmente de estados vibracionales fundamentales, y en general pueden ser asignados a estiramientos y balanceos de determinados grupos funcionales. A números de onda inferiores a 1400 cm^{-1} se pueden observar bandas originadas principalmente por el balanceo de enlaces químicos. Estas bandas no son producto de modos vibracionales localizados, sino del acoplamiento de bandas vibracionales o del movimiento de los “esqueletos” de las macromoléculas, que hace muy difícil asignarles frecuencias de vibración específicas.

La región entre $4000 - 3100\text{ cm}^{-1}$, comprende una banda muy ancha correspondiente a la absorción del grupo O-H (3400 cm^{-1}) y de dos modos vibracionales del estiramiento de N-H, denominados amida I y II, localizadas en 3200 y 3030 cm^{-1} respectivamente.

La región 3100 a 2800 cm^{-1} , designada **V1**, corresponde a las absorciones debidas a estiramientos y balanceos de uniones C-H de los grupos funcionales CH_3 y

$>\text{CH}_2$, presentes en cadenas de ácidos grasos y fosfolípidos. Asimismo, es posible extraer cierta información complementaria de estos grupos funcionales a partir de las vibraciones correspondientes al balanceo del enlace C-H que se encuentra entre 1470 y 1350 cm^{-1} .

En la región **V2**, entre 1800 y 1500 cm^{-1} , contiene las bandas denominadas Amida I y II asignadas a las absorciones de proteínas y péptidos (C=O, N-H, C-N). En Amida I se aprecia una banda propia del estiramiento del grupo C=O de ésteres ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$) presente en lípidos y otras moléculas. Además, bandas de menor intensidad debido a los estiramientos de los enlaces C=O, C=N, C=C presentes en los nucleótidos de los ácidos nucleicos, ADN y ARN [30, 45]. Otra característica destacable en esta región, es la presencia de las vibraciones correspondientes a las cadenas laterales de los aminoácidos fenilalanina (1498 cm^{-1}) y tirosina (1516 cm^{-1}), así como también las del aspartato y del glutamato (1585 y 1570 cm^{-1} , respectivamente).

La región **V3**, entre 1300 y 1500 cm^{-1} , es la llamada región mixta, ya que incluye la absorción de grupos funcionales de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. En la zona de mayor energía de esta ventana espectral, próxima a $1450\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ se encuentran, como se mencionó previamente, los estados vibracionales de balanceo del C-H correspondientes al CH_2 y CH_3 . En 1400 cm^{-1} se observa una banda característica del estiramiento simétrico del COO^- . Este grupo funcional puede ser indicativo de la presencia de carbohidratos ácidos, así como también a ácidos grasos libres, o cadenas laterales de aminoácidos. Por último en la zona de menor energía de esta ventana, cercana a 1240 cm^{-1} , se encuentra una banda ancha debido al estiramiento asimétrico del enlace P=O, que constituye una superposición de bandas típicas que podrían provenir de fosfodiésteres, monoésteres, y fosfatos libres. Dependiendo del material biológico considerado, aplicando técnicas de aumento de resolución en esta región pueden discriminarse entre dos y cuatro bandas débiles provenientes de: a) grupo funcional fosfodiéster del ácidos nucleicos b) estiramientos P=O debidas a la presencia de estos grupos en fosfolípidos, c) las debidas a carbohidratos que contienen P, d) en bacterias Gram-positivas las debidas a ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

La región espectral **V4**, entre 1200 y 900 cm^{-1} , es asociada a bandas de absorción de carbohidratos presentes en las células microbianas y en componentes de reserva. Esta ventana se encuentra dominada por el estiramiento simétrico del grupo

PO_2^- correspondiente a ácidos nucleicos (1080 cm^{-1}) y por un fuerte acoplamiento de picos correspondientes a los estiramientos C-C y C-O, y de las deformaciones C-O-C y C-O-H de diversos oligo y polisacáridos [38].

La región **V5**, $900\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, se conoce como "región de huella dactilar" (fingerprint) y contiene absorbancias débiles, pero muy singulares que son características de los distintos microorganismos. En esta ventana difícilmente se logre la asignación de determinados grupos funcionales a frecuencias de vibración, ya que se encuentran las bandas correspondientes a movimientos de las macromoléculas. Solo se puede asignar con certeza el pico correspondiente a 720 cm^{-1} por tratarse de una frecuencia de vibración característica de los modos vibracionales de torsión del CH_2 de ácidos grasos.

2.1.2 Caracterización, discriminación e identificación de microorganismos por espectroscopia FT-IR

Un problema crítico a la hora de realizar estudios de caracterización, discriminación e identificación de microorganismos, es la variabilidad de los datos espectrales producto de las variaciones en la obtención de los cultivos, la preparación de la muestra y/o cambios en los parámetros de medida [35, 39]. El fenotipo de un microorganismo depende fuertemente de variables como tiempo de incubación, medio de cultivo, pH, temperatura, etc. Los cambios en estas variables, conduce a cambios en la composición del microorganismo y por ende en el espectro resultante. Por esta razón es de suma importancia contar con un procedimiento estandarizado a fin de obtener espectros reproducibles, con los cuales se puedan compartir resultados entre distintos laboratorios y construir bases de datos de referencia internacional. Para ello se deberá contar con protocolos estandarizados y respetar estrictamente las siguientes etapas:

- Cultivo de microorganismos
- Preparación de la muestra
- Adquisición de espectros
- Requisitos de calidad de los espectros
- Tratamiento y análisis de los espectros

2.1.2.1 Cultivo de microorganismos

Los microorganismos son cultivados respetando las condiciones necesarias para su óptimo desarrollo, como medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de cultivo, etc. Debido a que el espectro representa el fenotipo del microorganismo, es de suma importancia respetar las condiciones de cultivo establecidas para que el espectro sea reproducible.

2.1.2.2 Preparación de la muestra

Esta etapa consiste en realizar una suspensión en agua destilada del cultivo [21]. En general se extraen cuidadosamente pequeñas cantidades de microorganismos con un ansa de platino calibrada (1-mm) que son suspendidas en agua destilada estéril. La concentración de la suspensión bacteriana deberá ser tal que permita obtener un espectro FT-IR con una absorción máxima en la región de Amida I entre 0,345 y 1,355 unidades de absorbancia (Ley de Lambert-Beer). Posteriormente, esta suspensión se deposita sobre una celda o ventana de ZnSe y se seca de manera de obtener un film homogéneo. Este último paso requerirá de optimizar el tipo de secado, ya sea al vacío o en estufa y el tiempo necesario para el mismo.

2.1.2.3 Adquisición de espectros FT-IR

Los espectros se registran en el intervalo de lectura de 650 y 4000 cm^{-1} , la velocidad a la cual se realiza las medidas es 1 cm/s y cada espectro resulta del promedio de 64 escaneos. La resolución espectral empleada en la medición es 6 cm^{-1} [22, 39]. Para evitar las interferencias debidas a las bandas rotacionales del vapor de agua en el espectro IR, las medidas fueron realizadas bajo corriente de aire seco. Esto fue posible gracias a una modificación en la cámara de lectura del espectrómetro FT-IR, en nuestro caso Spectrum One de Perkin. Dicha modificación consistió en la incorporación de una rueda de acero inoxidable que permite medir consecutivamente 14 muestras (celdas de ZnSe), mediante desplazamiento manual sin abrir el sistema como se ilustra en la Fig. 2.



Fig. 2. Espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer con modificaciones en la cámara de lectura. En el interior se puede apreciar montada la rueda de acero inoxidable para la lectura múltiples celdas de ZnSe bajo corriente de aire seco.

2.1.2.4 Requisitos de calidad de los espectros FT-IR

Los espectros FT-IR registrados deben superar ciertas exigencias para considerarse válidos, entre los parámetros más destacados podemos mencionar: (a) la intensidad de la absorción del espectro que debe encontrarse en el rango de 0,345 a 1,355, (b) una relación señal/ruido alta que permita aplicar las técnicas de aumento de resolución, y (c) la formación de un film homogéneo que evite la dispersión de la luz sobre la superficie de la muestra, provocando desviaciones en la línea de base. Estos y otros parámetros se son considerados en el test de calidad desarrollado por el Dr. Dieter Naumann en conjunto con la empresa Bruker Optics.

a. Variación de absorbancia máxima y mínima entre 1800 y 1600 cm^{-1} (ΔA)

La mayoría de las muestras biológicas presentan el máximo de absorbancia en la región correspondiente a Amida I. Esta banda debe comprender el rango de 0,345 a 1,355 unidades de absorbancia ya que en este intervalo la señal obtenida es lineal con la

cantidad de biomasa utilizada y no satura el detector. Para evaluar este parámetro el software calcula la diferencia entre el máximo y el mínimo de absorbancia registrados en el espectro (Δ absorbancia), y esta diferencia no debe ser menor a 0,35 ni mayor a 1,25.

b. Cálculo del ruido (r)

Para este cálculo se emplea la diferencia entre el máximo y mínimo valor de la derivada primera de los espectros en la región 2100 a 2000 cm^{-1} . Se elige este intervalo para calcular el ruido porque en él no se registran absorbancias asociadas a componentes del microorganismo o macromoléculas. Dicha diferencia no deberá superar el valor de $1,5 \times 10^{-4}$.

c. Relación señal/ruido (S/r)

El cálculo de este parámetro requiere del registro del espectro, para luego obtener la derivada primera del mismo y medir:

Señal S_1 : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1800 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} (C=O del enlace peptídico).

Señal S_2 : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1200 cm^{-1} y 960 cm^{-1} (C-C, C-O, C-H de carbohidratos).

La relación señal/ruido se calculará haciendo el cociente entre los respectivos valores de S_1 y S_2 y el valor del ruido (r) obtenido según el punto (b). Estas relaciones deben ser mayores que 200 y 40 respectivamente, aunque esto debe ajustarse para cada microorganismo.

d. Vapor de agua (va)

El agua presenta bandas rotacionales a lo largo de todo el espectro IR medio, sin embargo su contribución en el espectro se evalúa en el intervalo de 1847 y 1837 cm^{-1} donde se puede estimar la absorbancia de uno de los picos más característicos de los estados rotacionales del vapor de agua (1844 cm^{-1}). Para el cálculo se mide la diferencia entre el máximo y el mínimo de la derivada primera de los espectros en ese intervalo y el valor deberá ser menor a 3×10^{-4} .

e. Relación señal / vapor de agua (S/va)

Esta relación permite comparar las señales correspondientes a proteínas (S1) y carbohidratos (S2) respecto de la señal del vapor de agua (va). Estas relaciones S_1/va y S_2/va deben superar el valor de 100 y 20 respectivamente.

f. Fringing

Este parámetro se asocia a la desviación sinusoidal de la línea de base, que en general es ocasionado por problemas eléctricos. El mismo se mide a través de la amplitud de la derivada primera en el intervalo 2200-2000 cm^{-1} y debe ser menor que 5×10^{-5} .

Solo aquellos espectros que superen la totalidad de los parámetros correspondientes al test de calidad, recibirán un valor de $TC=1$, podrán ser sometidos a un pre-procesamiento y posterior análisis espectral. Todo espectro que no supere al menos uno los parámetros establecidos en el test de calidad recibirá un valor de $TC=0$, lo cual indica que ese espectro no cumple con los requisitos de calidad estipulados y por tanto es descartado.

2.1.2.5 Tratamiento y análisis de espectros FT-IR**a) Aumento de la resolución del espectro FT-IR**

Los espectros FT-IR de microorganismos poseen información de la composición química total de la célula. El gran número de componentes celulares da lugar a bandas anchas producto de la superposición de bandas más angostas, lo cual dificulta el análisis de la información contenida en ellas. Para conseguir un aumento en la resolución de las bandas al menos parcialmente, se realizará el cálculo de las derivadas primera y segunda del espectro usando el algoritmo de Savitzky-Golay con nueve puntos de suavizado (smoothing) (Fig. 3) [52]. Esta función esta disponible en el software OPUS (versión 4.0; Bruker Optics GmbH).

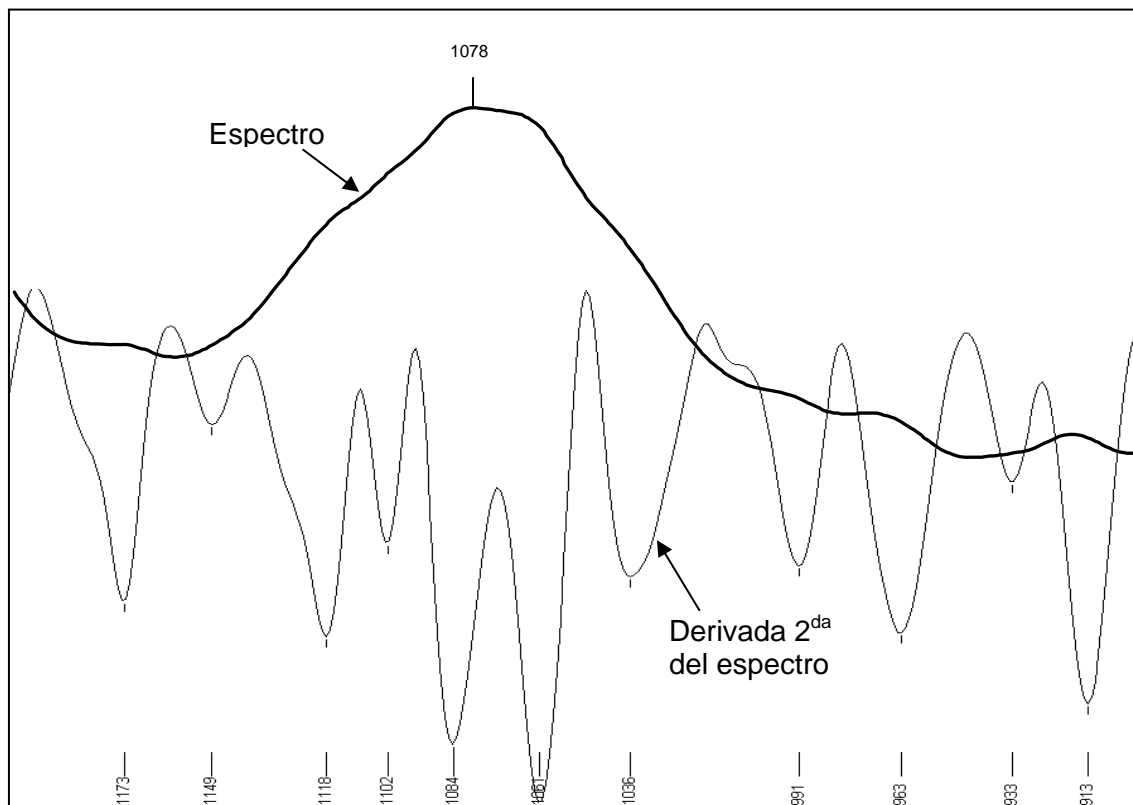


Fig. 3. Aumento de resolución aplicado sobre bandas en la región $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ del espectro de un microorganismo. En negro se indica el espectro original en la región y en gris se indica la derivada segunda. En el eje x las unidades se expresan en cm^{-1} , mientras que en el eje y en unidades arbitrarias

b) Normalización

Si bien la cantidad de muestra ha sido cuidadosamente estandarizada, al momento de realizar un estudio comparativo será necesario que cada uno de los espectros contenga la misma biomasa. Para este fin se emplea una técnica denominada normalización vectorial, la cual puede ser aplicada en todo el rango espectral ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$) ó en un intervalo de interés. En el procedimiento de normalización vectorial, primero se calcula el valor-y promedio del espectro. Luego al espectro se le resta este valor promedio de manera que la mitad del espectro se encuentra en $y=0$. Se calcula la suma de todos los valores "y". Finalmente el espectro se divide por la raíz cuadrada de esta suma. Así el módulo del vector del espectro resultante es 1. Este procedimiento puede ser realizado empleando el software OPUS (versión 4.0; Bruker Optics GmbH).

c) Reproducibilidad

Una vez que los espectros registrados hayan superado el test de calidad, se procederá a analizar la reproducibilidad de los espectros antes de someterlos a cualquier análisis de discriminación y/o clasificación. El nivel de reproducibilidad se asocia cuantitativamente a la distancia espectral máxima (NR) [20, 28, 41].[22, 39]

NR₁ define la reproducibilidad dentro de distintas alícuotas de una misma muestra de un aislamiento determinado: $NR_1 < 10$.

NR₂ describe la reproducibilidad dentro de muestras independientes de un determinado aislamiento crecidas en las mismas condiciones y obtenidas en un período de tiempo entre 6 meses y 1 año: $NR_2 < 25$.

Los valores de NR se obtienen calculando el coeficiente de Pearson entre cada conjunto de espectros analizados. Posteriormente se representan estos datos a través de un dendrograma utilizando el método de Average Linkage mediante el empleo del software Opus (versión 4.0; Bruker Optics GmbH).

2.1.2.6 Herramientas de análisis empleadas en la caracterización, discriminación y/o identificación de microorganismos

El análisis de espectros FT-IR puede dividirse en dos grandes grupos:

(a) **Análisis de ventanas espectrales.** Este análisis consiste en identificar dentro del espectro picos característicos o variaciones en el área de alguna banda característica que puedan asociarse a componentes celulares particulares, como materiales de reserva (polihidroxibutirato, glucógeno), apéndices (pili), ó endosporas.

(b) **Análisis de reconocimiento de patterns** (patrones). Los espectros de los microorganismos se consideran como complejas *huellas digitales* que pueden ser estudiadas por comparación completa de sus diferencias y similitudes mediante diversas técnicas de análisis multivariante. A diferencia del análisis univariante que considera solo una propiedad de un objeto particular, el análisis multivariante evalúa varias propiedades del objeto al mismo tiempo, en nuestro caso emplea las intensidades correspondientes a los números de onda contenidos en el espectro FT-IR.

Los métodos estadísticos usados para el análisis de espectros FT-IR de muestras biológicas se clasifican en dos grupos principales, **métodos no supervisados** donde se destacan el análisis jerárquico de cluster (AJC) y el análisis de componente principal

(ACP), y en **métodos supervisados** del cual sobresale los sistemas basados en redes neuronales artificiales (RNAs).

La diferencia entre los métodos no supervisados mencionados es que el ACP tiene por objeto la extracción de la información relevante del vasto conjunto de datos contenidos en los espectros FT-IR, logrando de esta manera la reducción de datos y facilitando el análisis de patrones. En cambio el AJC muestra las características intrínsecas (heterogeneidad propia) del conjunto de datos sin conocimiento previo del mismo, ni asignación de clases o división de los datos en conjuntos de entrenamiento o testeo.

Los sistemas supervisados basados en RNAs por el contrario requieren como paso inicial la asignación de cada dato (ej. espectro FT-IR) a su correspondiente clase y la división del conjunto global de datos en conjuntos de entrenamiento, validación y testeo para asegurar la confiabilidad de los resultados. A continuación se describen cada uno de los métodos mencionados.

El **análisis jerárquico de cluster** (AJC) es una herramienta diseñada principalmente para revelar las agrupaciones naturales (conglomerados o clusters) dentro de un conjunto de datos que de otra manera no sería evidente. El análisis consiste en agrupar un conjunto de datos multidimensionales (ej. espectro FT-IR) en un conjunto de grupos homogéneos mediante funciones (algoritmos) de similitud entre ellos. En el caso de los métodos jerárquicos los datos se ordenan en niveles de manera que los niveles superiores contengan a los inferiores. La jerarquía construida permite obtener también una división de los datos en grupos. El criterio básico para cualquier agrupación es la distancia o similitud donde los objetos que estén cerca uno del otro pertenecerían al mismo conglomerado o cluster, y los objetos que estén lejos uno del otro pertenecerán a distintos clusters. El resultado de este procedimiento se representa mediante un dendrograma, cuya escala vertical representa la distancia espectral ó la heterogeneidad, y la horizontal los objetos analizados (Fig. 4) [20, 28, 41]. La distancia entre dos conglomerados se calcula según un algoritmo predeterminado donde se destacan “single-link” (enlace individual), “complete-link” (enlace completo) y el “ward-link” (enlace de Ward). Si cortamos el dendrograma a un nivel de distancia espectral o heterogeneidad dado, obtenemos una clasificación del número de grupos existentes a ese nivel y los elementos que los forman.

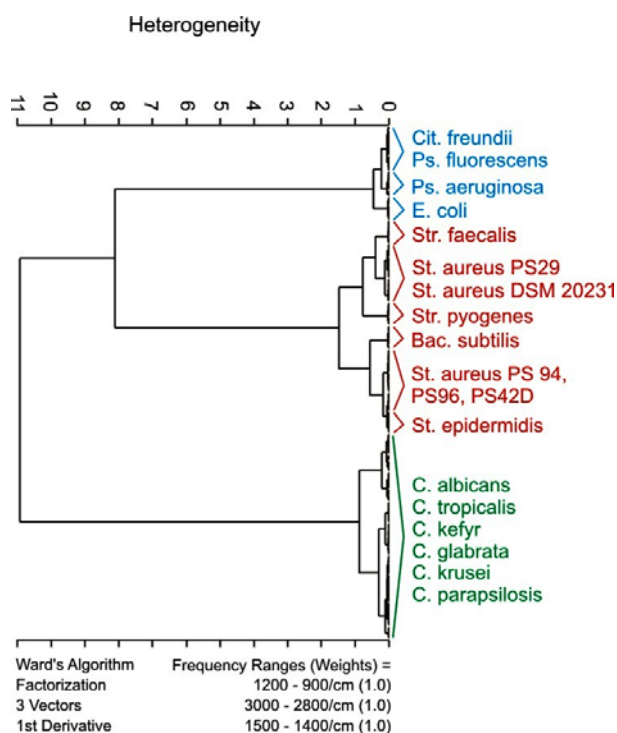


Fig. 4. Dendrograma resultante del empleo del análisis jerárquico de cluster (AJC) de espectros provenientes de 240 cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y levaduras pertenecientes al género *Candida*. El AJC fue realizado usando la primera derivada, considerando los rangos espectrales de 2800-3000, 1400-1500, y 900-1200 cm^{-1} . Tomado de Helm y cols [21].

Análisis de componente principal (ACP) es un método estadístico multivariado utilizado para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Mediante un procedimiento matemático se transforma un determinado número de posibles variables correlacionadas en un número más pequeño de variables no correlacionadas denominadas componente principal. Al reducir la dimensionalidad el ACP de un grupo de datos, retiene aquellas características del conjunto de datos que contribuyen en mayor medida a su varianza, manteniendo un orden de bajo nivel de los componentes principales e ignorando los de alto nivel [26]. El objetivo es que esos componentes de bajo orden a veces contienen el aspecto más importante de esa información. De esta forma, la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (denominado Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente. Finalmente, mediante el ACP se busca una proyección que represente de la mejor manera el conjunto de datos analizados. En la Fig. 5 se ilustra la discriminación de espectros FT-IR de diversos microorganismos

mediante ACP, donde la segunda y tercera componente principal (PC2 y PC3) permiten agrupar los espectros en tres grupos principales, Gram-positivos, Gram-negativos y levaduras [20].

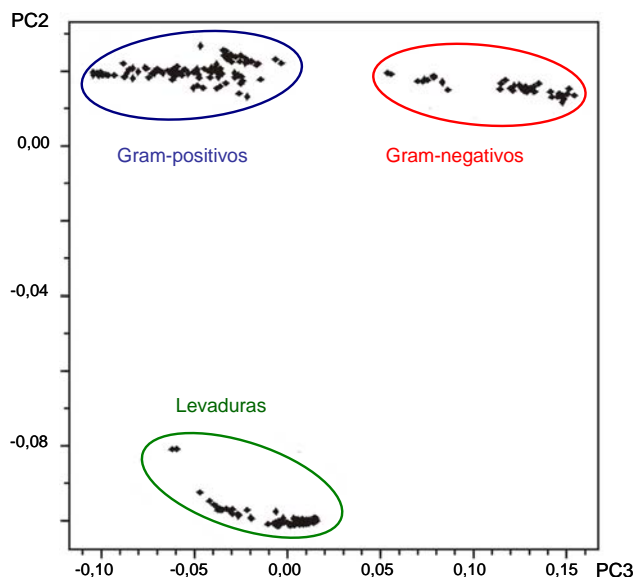


Fig. 5. Representación por análisis de componente principal (PC2 y PC3) de espectros FT-IR provenientes de 240 cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y levaduras pertenecientes al género *Candida*. Tomado de Helm y cols [20].

Las **redes neuronales artificiales (RNAs)** son modelos matemáticos no lineales inspirados en los procesos observados en redes naturales como las neuronas del cerebro. Las RNAs están constituidas por unidades de procesamiento adaptativos, denominadas neuronas, densamente interconectadas. De acuerdo a la topología de la red estas pueden clasificarse en dos grupos, redes monocapa o multicapa.

Las redes monocapa sólo poseen una capa de neuronas, en la cual se establecen conexiones laterales, cruzadas o autorecurrentes. Esta capa intercambia señales con el exterior y constituyen a un tiempo la entrada y salida del sistema.

En una red multicapa, la distribución de neuronas se realiza de manera jerárquica formando niveles o capas que contienen un número determinado de neuronas cada una, con al menos una capa de entrada, otra de salida, y, eventualmente una o varias capas intermedias (ocultas). Normalmente todas las neuronas de una capa reciben señales procedentes de otra capa anterior y envían señales a la capa posterior, en el sentido

entrada-salida. A estas conexiones se las conoce como conexiones hacia delante o feed-forward. En la Fig. 6 se aprecia la topología de una RNA multicapa.

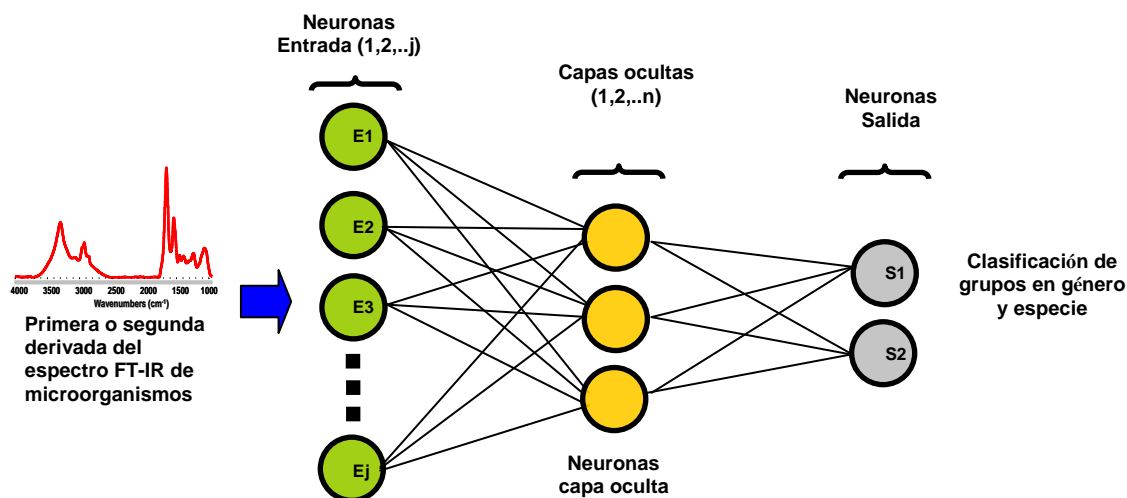


Fig. 6. Esquema de red neuronal artificial donde se detallan las neuronas de entrada, de la capa oculta y las neuronas de salida aplicada a la identificación de bacterias por espectroscopía FT-IR.

La característica más destacada de estas redes es su naturaleza adaptativa, donde “el aprendizaje mediante ejemplos” reemplaza a “la programación” en la resolución de problemas. Luego del entrenamiento, las RNAs pueden ser usadas para predecir los resultados frente a un nuevo conjunto de datos independientes. En este contexto un sistema de RNAs puede ser empleado en la identificación o clasificación de espectros de microorganismos a nivel de género, especie y subespecie [53, 60]. Su aplicación puede hacerse mediante diferentes software comerciales, siendo uno de los más destacados NeuroDeveloper (Synthon Analytics, Alemania). Este software de RNAs ha sido usado con gran éxito en la identificación y discriminación de cepas de *Listeria monocytogenes* [47-48].

El diseño de una RNA aplicada a la identificación y clasificación de microorganismos comprende de una serie de etapas las cuales son descritas en la Fig. 7.

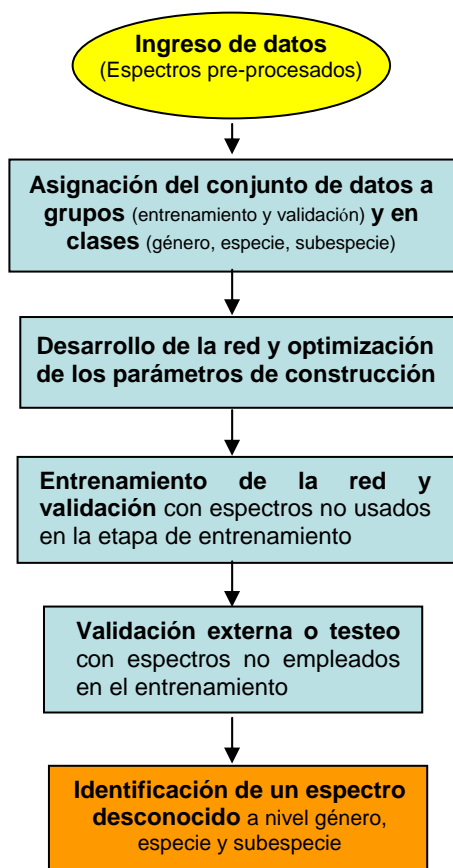


Fig. 7. Esquema de desarrollo, entrenamiento y validación de una red neuronal artificial.

Datos de ingreso: Los datos de ingreso están constituidos por los espectros que superan el TC y sus respectivas derivadas primeras y segundas. Estos espectros corresponden a microorganismos que se encuentran perfectamente identificados por algún método de referencia, que por lo general se basa en técnicas de biología molecular que aseguren su correcta identificación. Los espectros son normalizados globalmente y conforman la librería espectral.

Asignación del conjunto de datos a grupos y clases: Los espectros que constituyen la base de datos se dividen en grupos:

1) Conjunto de entrenamiento: El 60-75% de los espectros serán empleados por el sistema computacional para aprender el comportamiento de cada clase (género, especie y subespecie).

2) Conjunto de validación interna: El 25-40% de los espectros restantes se emplearán como primer paso de evaluación del desempeño de la red desarrollada.

Desarrollo y optimización de parámetros de la RNA: En esta etapa se seleccionan los parámetros que definen la topología de la red en particular el número de capas, y el número de neuronas por capa. Asimismo se establece el intervalo del espectro que empleará el software para obtener los números de onda que mejor discriminan a los microorganismos. Una vez entrenada la red, esta será evaluada usando el conjunto de datos de validación interna. Si esta validación no resultada satisfactoria se desarrollará una nueva red con una arquitectura diferente que permita obtener el nivel de certeza deseado.

Validación externa o testeo de las RNAs: El segundo paso de evaluación consiste en desafiar a la RNA desarrollada con otros espectros vibracionales de cepas o poblaciones identificadas por otras metodologías, los cuales no fueron utilizados en la construcción y validación interna de la red.

La clasificación y/o identificación de diversos microorganismos por espectroscopia FT-IR puede volverse un problema complejo de resolver a través del empleo de una única RNA. Por este motivo una estrategia de clasificación más adecuada es el desarrollo de una RNA jerárquica y modular, constituida por una red de nivel superior y por varios niveles de subclasificación [54]. Así, una RNA organizada en forma jerárquica puede entenderse como una red principal con múltiples salidas que la vinculan a varias sub-redes simples. Bajo este enfoque jerárquico, este sistema modular provee información a diferentes niveles, abarcando desde características generales a otras más específicas. En paralelo esta organización jerárquica crea una dependencia de las subredes inferiores respecto del rendimiento de la red inmediatamente superior a ellas.

La Fig. 8 muestra un esquema de un sistema de clasificación jerárquico constituido por varias RNAs, las cuales fueron desarrolladas como módulos independientes y entrenados específicamente para la diferenciación de diversas especies bacterianas. En este modelo de red jerárquica basada en módulos, se puede apreciar una red de nivel superior (nivel 1), y varias subredes posteriores que constituyen 3 subniveles de clasificación (nivel 2-4). La identificación del microorganismo bajo este modelo ocurre al ingresar el espectro FT-IR en la red de nivel superior, cuya función es clasificar dicho espectro en uno de los dos grupos principales, Gram-positivos y Gram-

negativos. De acuerdo al resultado de esta primer red superior, el análisis proseguirá a una de las dos RNA específicas que se encuentran en el segundo nivel. En caso que el espectro sea asignado al grupo de Gram-negativos, la RNA del segundo nivel lo identificará como *P. aeruginosa* o como perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (*E. coli*, *E. cloacae* y *E. aerogenes*). De lo contrario, si fuera asignado como Gram-positivo, la RNA específica del segundo nivel clasificará al espectro como perteneciente a *Staphylococcus spp.* (*S. aureus* y *S. coagulasa negativo*) o al grupo *Enterobacter spp./Streptococcus spp.* Posteriormente en el nivel 3 prácticamente la totalidad de las especies bacterianas se encuentran clasificadas por el sistema de RNA jerárquico, y donde la red correspondiente al nivel 4 se empleará para la clasificación especializada de *E. cloacae* y *E. aerogenes*.

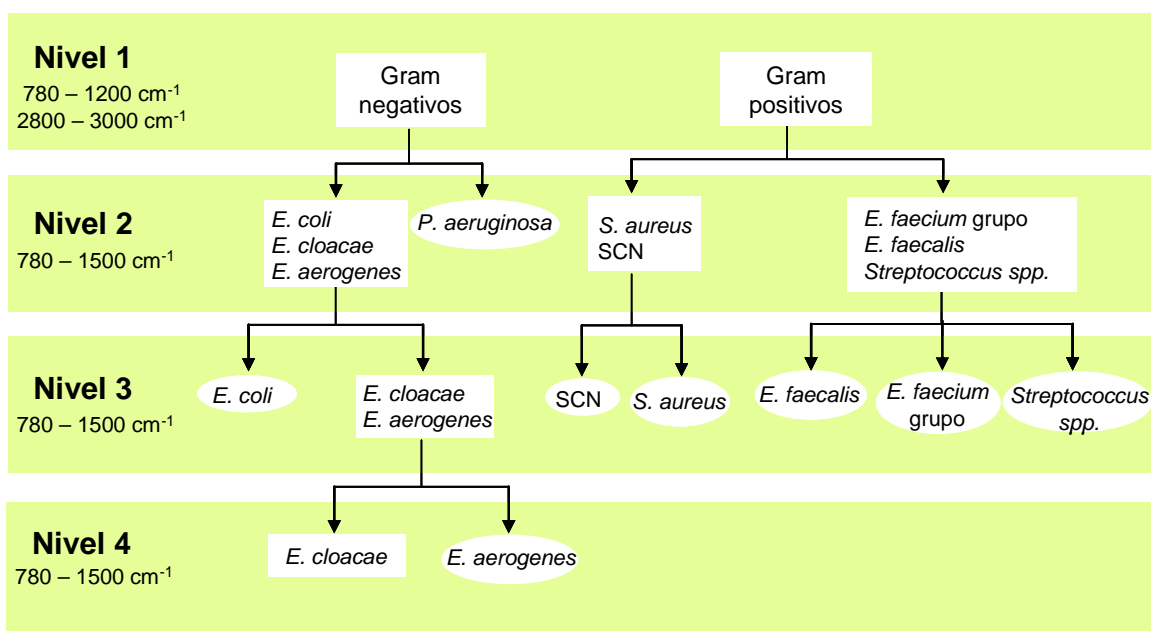


Fig. 8. Esquema de una RNA modular empleada en la identificación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas basada en espectros de FT-IR. Abreviatura: SCN, *Staphylococcus coagulasa negativo*. Tomado de Maquelin y cols [34].

2.2 OBJETIVOS

Los objetivos de esta parte experimental del trabajo fueron:

- 1.- Teniendo en cuenta que en muestras de esputo de pacientes FQ pueden aislarse, además de organismos pertenecientes al cBc, bacterias no fermentadoras estrechamente relacionadas a los mismos, tales como *P. aeruginosa*, *R. pickettii*, *A. xylooxidans*, *S. maltophilia*, *Acinetobacter spp.*, se buscó establecer si mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) sería posible discriminar a nivel de género todo este conjunto de organismos.
- 2.- Analizar el potencial de la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier para discriminar organismos pertenecientes al cBc aislados de muestras de esputo de pacientes FQ a nivel de especie. En particular se estudió la discriminación entre las bacterias del cBc de mayor incidencia en pacientes FQ: *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. cepacia* y *B. stabilis*.
- 3.- Estudiar comparativamente la capacidad de distintos sistemas de análisis de datos para procesar la información obtenida de los espectros IR, a fin de lograr una significativa discriminación e identificación a nivel de especie.

Para realizar estos trabajos debió optimizarse previamente las metodologías y estrategias para lograr alcanzar los niveles de reproducibilidad adecuados que permitieran la discriminación de dichos organismos a nivel de género y especie.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Microorganismos

En este estudio se emplearon un total de 15 cepas de referencia y 169 aislados clínicos de bacilos no fermentadores (BNF) recolectados de muestras de esputo de 150 pacientes FQ atendidos en tres centros de referencia de Argentina entre los años 2004 y 2006 (Tabla 2). Estos centros se encuentran localizados en la Provincia de Buenos Aires (Hospital de Niños de La Plata “Sor María Ludovica” y Hospital de Clínicas de la Ciudad de Buenos Aires) y en Córdoba (Hospital de Niños “Santísima Trinidad”). Información sobre los orígenes de las cepas y los métodos de identificación aplicados en cada cepa están detallados en la Tabla 2 [3].

Los aislados clínicos y las cepas de referencia fueron almacenados a -70°C en caldo cerebro corazón conteniendo 10% de glicerol. Para el análisis de FT-IR, estos fueron descongelados y subcultivados durante 24 h a 37°C en medio agar de eosina azul de metileno (EMB).

2.3.2 Aislamiento e identificación fenotípica

El aislamiento y la identificación fenotípica de microorganismos aislados de pacientes FQ fue realizado por el personal del Servicio de Microbiología de los siguientes centros nosocomiales: Hospital de Niños de La Plata “Sor María Ludovica”, Hospital de Clínicas de la Ciudad de Buenos Aires y Hospital de Niños “Santísima Trinidad” de Córdoba. Este aislamiento fue llevado a cabo de acuerdo a las recomendaciones de práctica de microbiología clínica para especímenes de tracto respiratorio de pacientes FQ [10, 23-24, 29, 55, 66]. Los aislados fueron inicialmente identificados por el uso de métodos bioquímicos convencionales (sistema API20NE o Vitek 2, bioMerieux). Posteriormente, se emplearon test fenotípicos adicionales los cuales permitieron la discriminación de bacterias del cBc y similares a *B. cepacia* para obtener el fenotipo definitivo [10, 23, 66].

La susceptibilidad antibiótica fue determinada por el método de difusión en disco en medio Mueller Hinton (MH) (Difco Laboratories), de acuerdo al protocolo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (formalmente National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1999) [43]. Las cepas identificadas como

miembros formales del cBc mediante los ensayos anteriormente descritos, fueron confirmadas posteriormente por técnicas de identificación molecular.

Tabla 1. Cepas de bacterias Gram-negativas no fermentadoras usadas en este estudio.

Especies (genomovar)	Nº de aislados	Origen / Cultivos de colección ^a	Método de identificación ^b
<i>P. aeruginosa</i> ^c	2	ATCC 9027, ATCC 27853	
	15	HNLP	
Complejo <i>B. cepacia</i>	1	HST 8684	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
	1	HC BC05	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
<i>B. cepacia</i> (I)	1	ATCC 25416	RFLP HaeIII
	3	HST	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
	6	HC	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
<i>B. multivorans</i> (II)	2	LMG 13010, ATCC 17616	RFLP HaeIII
	1	HST	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
<i>B. cenocepacia</i> (III) sub A	1	LMG 18863	RFLP HaeIII
	37 ^d	HNLP	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
	11 ^d	HC	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
	31 ^d	HST	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
<i>B. cenocepacia</i> (III) sub B	1	LMG 16654	RFLP HaeIII
	2	HC	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
<i>B. stabilis</i> (IV)	1	LMG 18870	RFLP HaeIII
	3	HC	RFLP HaeIII / PCR- <i>recA</i> primers EE
<i>B. vietnamiensis</i> (V)	1	LMG 10929	RFLP HaeIII
<i>B. dolosa</i> (VI)	1	LMG 21820	RFLP HaeIII
<i>B. ambifaria</i> (VII)	1	LMG 19467	RFLP HaeIII
<i>B. anthina</i> (VIII)	1	LMG 20983	RFLP HaeIII
<i>B. pyrrocinia</i> (IX)	1	LMG 14191	RFLP HaeIII
<i>S. maltophilia</i>	2	HC Sm 20/06, HC Sm 66/06	PCR 16S rRNA
	11	HC	
	13	HNLP	
<i>A. xylosoxidans</i>	2	HC Ax 247/06, HC Ax 335/06	PCR 16S rRNA
	9	HC	
	10	HNLP	
<i>A. baumannii</i>	1	ATCC 19606	
	1	HC Ab 54/06	PCR 16S rRNA
<i>Acinetobacter</i> spp.	9	HNLP	
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	ATCC 27511	
	1	HC Rp 127	PCR 16S rRNA

^a ATCC, American Type Culture Collection, Maryland, USA; LMG: Laboratorium Microbiologie Gent Culture Collection, Gent, Belgium. HNLP, Hospital de Niños La Plata, Argentina; HST, Hospital Santa Trinidad, Córdoba, Argentina; HC, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina. ^b Todos los aislados clínicos fueron identificados por API/VITEK y nueve test fenotípicos adicionales indicados en métodos [16]. Los aislados clínicos de cBc fueron posteriormente identificados por PCR *recA*-RFLP con primers BCR 1 y BCR 2, usando la enzima de restricción HaeIII; seguidos por PCR-*recA* con primers EE [55]. Algunos aislados clínicos pertenecientes a otros géneros diferentes a cBc fueron elegidos al azar para confirmar su identificación por la metodología secuenciación del gen 16S rRNA. ^c Solo se incluyeron cepas no mucoides de *P. aeruginosa*. ^d Una cepa fue identificada como perteneciente a *B. cenocepacia* subtipo A patrón D usando la metodología HaeIII-*recA* PCR-RFLP y el resto de los aislados fueron cepas atípicas identificadas como *B. cenocepacia* subtipo A pero tienen un perfil de HaeIII-*recA* PCR-RFLP no compatible con aquellos previamente descritos para *B. cenocepacia*.

2.3.3 Identificación molecular de bacilos no fermentadores de la glucosa

Si bien en la actualidad la identificación genotípica de los aislados clínicos tanto los Gram–negativos no fermentadores como los pertenecientes al cBc actualmente se llevan a cabo en el CINDEFI, en el momento de realizarse este trabajo las identificaciones moleculares de BNF (excluido el cBc) fue realizada por el Servicio de Microbiología del Hospital de Clínicas de la Ciudad de Buenos Aires y las correspondientes al cBc en la cátedra de Higiene de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UBA, A continuación se detalla la metodología empleada en la identificación genética de miembros del cBc y BNF.

2.3.4 Identificación molecular de aislados del cBc

El DNA cromosomal total de cada aislado, los cuales fueron previamente cultivados en agar tripticasa soya (ATS) a 37°C entre 24 y 48 h, fue extraído por el método de bowling-lysis (lisis por hervido) descrito por Seo y Tsuchiya [56]. La identificación de los aislados clínicos y la confirmación de las identidades de las cepas de referencia fueron realizadas por PCR del gen *recA* con primers BCR1 y BCR2 seguido por análisis de RFLP mediante la enzima de restricción HaeIII según Mahenthiralingam y cols [33]. Se empleó PCR-*recA* primers EE que en aquel momento se consideraba como la más apropiada para confirmar la identificación de los aislados clínicos a nivel de especie [33]. Los patrones de RFLP específicos obtenidos para las diferentes especies del cBc fueron comparados con aquellos previamente descritos [14, 33, 56, 61, 64].

2.3.5 Identificación por análisis de secuencia del gen 16S rRNA

El DNA total fue preparado como describió Sambrook y cols [50]. Se emplearon primers FD2 y RP2 [65], los cuales son específicos para el gen 16S rRNA. El análisis de secuencia fue realizado según lo descrito por Bosshard y cols [4]. Los amplicones fueron purificados y secuenciados, los fragmentos fueron analizados con un secuenciador automático de DNA (ABI Prism 3100 genetic analyzer; Applied Biosystems). Estas secuencias fueron analizadas con el programa BLASTN del

Genetics Computer Group (Grupo de Genética Computacional). Se empleó como criterio de identificación a nivel de especie, un valor de similitud del 99% respecto a la secuencia de referencia de una especie clasificada. Si el valor de similitud se encontrará entre el 98 y 95%, el aislado clínico sería asignado solamente al género correspondiente.

2.3.6 FT-IR, preparación de la muestra, medición y pre-procesamiento de datos.

Para la obtención de espectros mediante FT-IR, tanto los aislados clínicos recibidos de hospitales como las bacterias obtenidas de stocks, fueron subcultivadas por 24 h en medio ATS. Posteriormente se cultivaron en medio ATS durante 5 h a 37°C. Estas bacterias fueron recolectadas mediante el empleo de un ansa de platino de 1-mm de diámetro y el contenido de la misma fue suspendido en 120 μl de agua destilada. Las suspensiones fueron agitadas a alta velocidad (2000 rpm) por 15 min en un minishaker MS2 (IKA Works, Inc., Wilmington, NC) y centrifugadas a 8000 x g por 5 min. El sobrenadante fue desechado y las células precipitadas fueron resuspendidas en 100 μl de agua destilada. Una alícuota de 80 μl fue transferida a celdas de ZnSe y secadas bajo vacío moderado (0.1 bar) por 45 min para obtener películas bacterianas transparentes (Fig. 9) [3, 20].

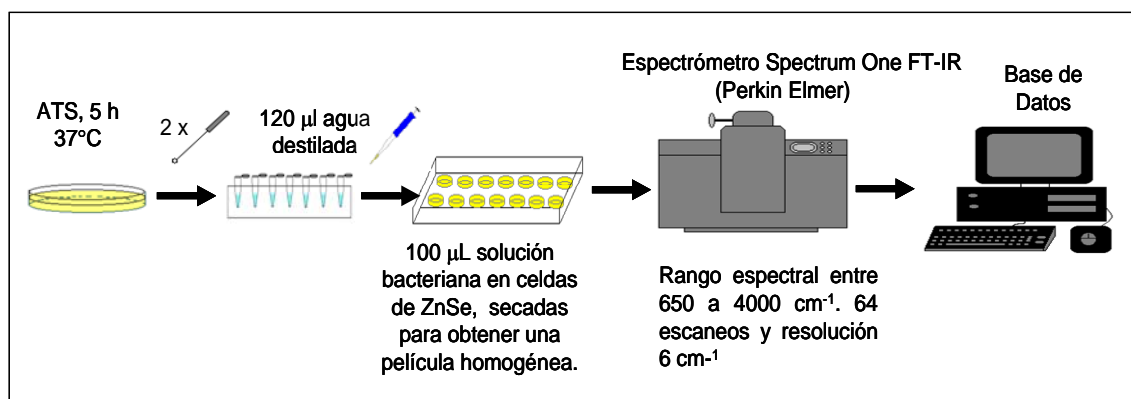


Fig. 9. Esquema del procesamiento de muestras bacterianas para ser analizadas por espectroscopia FT-IR.

Las celdas fueron leídas en un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (Perkin-Elmer Instruments, Spectrum One, EEUU). Los espectros de absorción FT-IR fueron registrados en el rango de 4000 a 650 cm^{-1} con una resolución espectral de 6 cm^{-1} y 64 escaneos. Para evitar interferencias debidas a las bandas de rotación del

vapor de agua, las medidas se realizaron bajo corriente de aire seco. Los espectros fueron sometidos al pre-procesamiento de datos utilizando el software Opus (versión 4.2; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania), el cual consistió en la obtención de la derivada primera y segunda de cada espectro. Las derivadas primeras fueron calculadas usando el algoritmo de Savitzky-Golay con nueve puntos de suavizado para incrementar las características distintivas presentes en el espectro y disminuir los problemas de desplazamiento de la línea de base. Para evitar interferencias de la variación de biomasa entre las diferentes muestras, las derivadas primeras fueron normalizadas en todo el rango espectral [22, 39].

Un mínimo de 10 espectros de cada cepa, de cuatro cultivos bacterianos independientes fueron incluidos en el análisis para considerar las posibles fuentes de variación en el procedimiento de muestreo. Los niveles de reproducibilidad entre los replicados de cada cepa fueron calculados con promedios ± 2 DS de la denominada distancia espectral (D), la cual es la medida de disimilitud, donde D es igual a $(1-r) * 1000$, y r es el coeficiente de correlación de Pearson [21, 39]. Se empleó el software OPUS (versión 4.0; Bruker Optics GmbH) para calcular los valores D promedio y la desviaciones estándar para los diferentes rangos espectrales.

Se construyó una base de datos con los espectros derivados y normalizados de los aislados clínicos y de las cepas de referencia mostrados en la Tabla 1. Antes que los espectros fueran introducidos en la base de datos espectral, los espectros originales fueron sometidos al Test de calidad (TC) utilizando el software OPUS [39]. Adicionalmente, un denominado factor “ α ”, el cual fue calculado de la relación entre la intensidad de los números de onda de 1738 cm^{-1} (I_{1738}) y 1540 cm^{-1} (I_{1540}) (ej. $\alpha = I_{1738}/I_{1540}$) con valores menores que 0.25, fue incluido en el TC (Tabla 2), tal como será explicado más adelante [3].

Tabla 2. Test de calidad espectral

Parámetros	Número de onda (cm ⁻¹)						
	1800 - 1600	1200 - 960	2100 - 2000	1847-1837	2200-2000	1738	1540
A máxima	1,10						
A mínima	0,35						
Ruido máximo			0,00015				
Señal/Ruido	200	40					
Vapor de agua				0,0003			
Señal/Vapor de agua	100	20					
Fringes					0,00005		
Factor α (I1738/I1540)							0,25

Para llevar a cabo el análisis espectral, la base de datos (la cual contenía alrededor de 2000 espectros derivados y normalizados) fue dividida en dos subconjuntos: (i) el subconjunto de datos empleados para el entrenamiento, constituido por las derivadas primeras de los espectros obtenidos de las cepas de referencia, de los aislados clínicos identificados por secuenciación del gen 16S rRNA y de alrededor del 70% de los aislados remanentes seleccionados al azar de las especies estudiadas (alrededor de 131 aislados), normalizadas vectorialmente en todo el rango espectral, y (ii) el subconjunto de datos de testeo, el cual contiene las derivadas primeras, normalizadas vectorialmente en todo el rango espectral, correspondientes a los espectros obtenidos de los aislados clínicos que no fueron incluidos en el conjunto de datos de entrenamiento (53 aislados) los cuales fueron usados exclusivamente para realizar la validación externa.

2.3.7 Determinación semicuantitativa de polihidroxitirato (PHB)

Con el objeto de ajustar las condiciones de cultivo de manera que el PHB no interfiera con el análisis discriminativo por FT-IR, el contenido de PHB fue evaluado a través de la absorbancia del espectro como fue reportado anteriormente [22].

Brevemente, la absorción a 1738 cm^{-1} correspondiente al grupo funcional carbonilo se usó como marcador para estimar el contenido de PHB, y la absorción a 1540 cm^{-1} correspondiente a la amida II, se empleó como estándar interno del contenido de biomasa total, los cuales fueron calculados a través de los espectros normalizados vectorialmente en todo el rango espectral. La estimación semicuantitativa de PHB fue calculada de acuerdo a la ecuación I_{1738}/I_{1540} con el software OPUS (versión 4.0; Bruker Optics GmbH).

2.3.8 Análisis jerárquico de cluster (AJC)

El análisis para la discriminación de los diferentes grupos de bacterias se realizó por AJC utilizando la derivada primera de los espectros pertenecientes al conjunto de datos de entrenamiento. Los dendrogramas se obtuvieron mediante el uso del algoritmo de Ward, y los valores de D definidos anteriormente, fueron calculados como una medida de la distancia entre los espectros [20, 28, 41].

2.3.9 Análisis de redes neuronales artificiales (RNAs)

La base de datos completa, la cual contiene casi 2000 espectros derivados y normalizados de los 169 aislados clínicos y las 15 cepas de referencia, fue usada para el desarrollo de la RNA. El software NeuroDeveloper (versión 2.3; Synthon GmbH, Heidelberg, Alemania) se empleó para desarrollar y optimizar un sistema de clasificación modular. La derivada primera del espectro incluido en el conjunto de entrenamiento fue usada para (i) pre-procesar, (ii) entrenar, y (iii) validar internamente la red. En la etapa de pre-procesamiento, la selección de las mejores longitudes de onda se realizó en ventanas espectrales predefinidas de 2800 a 3100 cm^{-1} y 1650 a 900 cm^{-1} por el algoritmo de COVAR [53]. Durante el procedimiento de entrenamiento, el número de neuronas de entrada y ocultas fue optimizado en la topología de la red de manera de obtener el mejor rendimiento. La validación interna de la red se usó para monitorear el proceso de entrenamiento y para optimizar el desempeño de la misma durante el proceso de entrenamiento [53]. Con este fin, el software seleccionó al azar el 10% de los espectros de cada especie del conjunto de entrenamiento. Como criterio de evaluación de la RNA, una validación externa se realizó con el conjunto de datos de

testeo. Esta validación fue usada para establecer el porcentaje de identificaciones correctas como una estimación del desempeño del modelo de identificación.

2.3.10 Microscopia electrónica de transmisión

La remoción del pili y/u otras fibras adheridas a la bacteria se evaluó por microscopia electrónica de transmisión (MET). Las bacterias crecidas en medio ATS por 5 h fueron suspendidas en agua destilada y agitadas en distintos periodos de tiempo (5 a 30 min) a diferentes intensidades de agitación (lento, medio y alto) con un minishaker MS2 (IKA). Una gota de la suspensión original y una gota de la suspensión agitada fueron transferidas a grillas recubiertas de Formvar. Cinco minutos después, el fluido fue removido por absorción del mismo mediante un papel de filtro. Las grillas fueron luego teñidas negativamente con ácido túngstico al 2% (pH 5,2) por 40 s. Estas últimas fueron observadas bajo un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX JEOL (Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina) a 80 KV.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Preparación de la muestra para FT-IR

Al inicio de este estudio, fue evidente que a pesar de que las condiciones de trabajo experimental, donde el cultivo microbiano, el procedimiento de preparación de muestra y los parámetros de adquisición de datos espectrales, se habían estandarizado, la variación entre espectros replicados de los diferentes aislados clínicos era demasiado alta para permitir un adecuado análisis. Con el objeto de entender las razones de la baja reproducibilidad, se decidió estudiar la presencia de componentes celulares cuyos niveles de expresión podrían ser variables y en este caso contribuir de manera diferente al espectro final. Previamente se había reportado que aislados bacterianos recuperados de pacientes FQ podrían expresar polihidroxicanoatos o butirato [27, 31]. Estos componentes intracelulares muestran una intensa banda de absorción atribuida al enlace carbonilo del grupo funcional ester a 1738 cm^{-1} , acompañada por un número de bandas adicionales a 1383 , 1304 , 1187 , 1135 , 1101 , 1059 y 976 cm^{-1} (38, 41). Se había establecido que estas bandas de absorción dominantes, distribuidas a lo largo del espectro de IR medio interferían con la discriminación de otras bacterias por FT-IR [22]. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la presencia de PHB podría ser una de las fuentes de variación entre espectros de una misma población. En experimentos en los cuales se buscaron las bandas características de PHB en el espectro de cepas de referencia y aislados locales, se observó que *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, y *R. pickettii* pueden ser considerados productores de PHB. Mientras que este polímero no fue detectado en espectros de otras especies bajo nuestras condiciones de trabajo (crecimiento en medio ATS a 37°C por 24 h). La Fig. 10 A muestra el espectro de absorción FT-IR obtenido de tres aislados clínicos de bacterias productoras de PHB luego de 24 h de crecimiento. En dicha figura se indican las bandas de absorción de PHB, y se muestra la variación entre espectros de una misma población dada por la presencia de este polímero. La Fig. 10 B muestra los espectros de cinco aislados clínicos de bacterias no productoras de PHB (*P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *Acinetobacter spp.*, *B. multivorans*, y *S. maltophilia*).

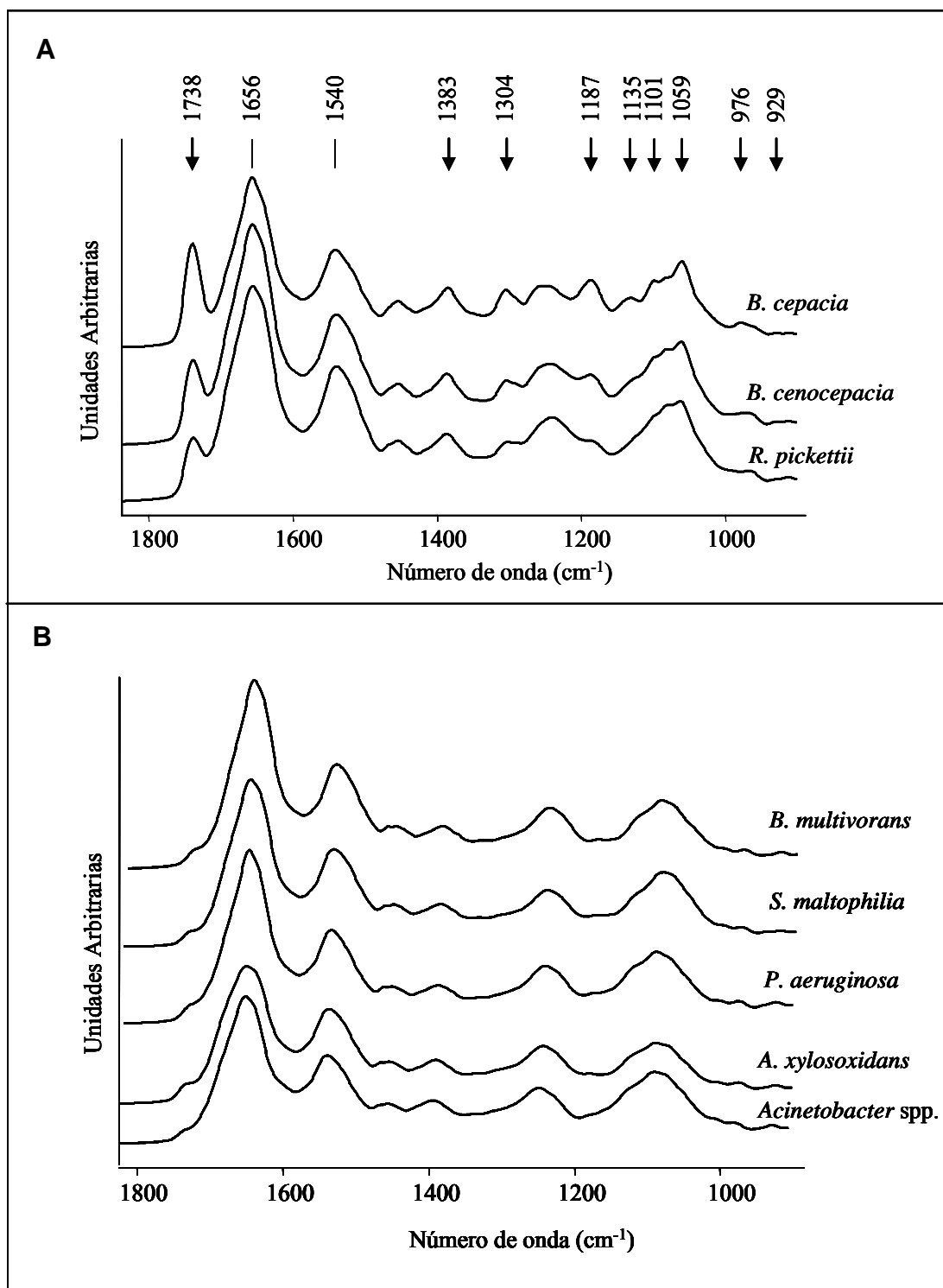


Fig. 10. Espectro de absorbancia FT-IR en la región 1800 - 900 cm⁻¹ de bacilos no fermentadores Gram-negativos, crecidos en medio a ATS 37°C, durante 24 h. (A) Bacterias productoras de ácido poli-β-hidroxibutírico (PHB). Las bandas indicadas con fechas corresponden a las principales bandas de absorción asignadas al PHB. (B) Bacterias no productoras de PHB.

Con el objeto de determinar las condiciones bajo las cuales la acumulación de PHB pudiese ser reducida a niveles que permitieran obtener espectros reproducibles de estas bacterias, se evaluaron diferentes condiciones de crecimiento y tiempos de incubación. La Fig. 11 muestra la cinética de producción de PHB para un aislado clínico de *B. cenocepacia* y los correspondientes valores de α calculados del espectro de FT-IR obtenidos de células crecidas a diferentes tiempos en el medio ATS a 37 °C. Para este aislado clínico, no se detectaron señales IR significativas durante las primeras 5 h de incubación, donde los correspondientes valores α resultaron menores a $0,17 \pm 0,03$. En la fase exponencial temprana, las señales espectroscópicas de PHB comienzan a incrementarse, desde un valor α de $0,67 \pm 0,04$ a las 6 h de incubación al valor máximo de $1,87 \pm 0,15$ a las 24 h de cultivo.

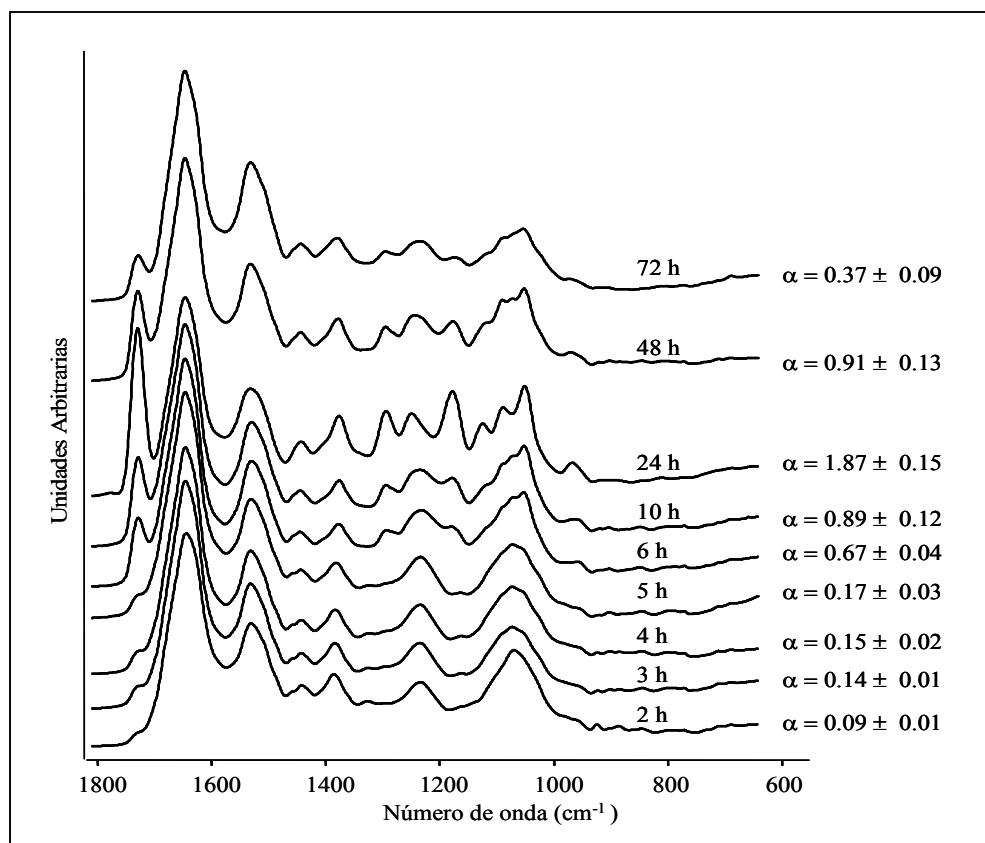


Fig.11. Espectro FT-IR (en la región 1800 – 600 cm^{-1}) obtenido durante el crecimiento de un aislado clínico de *B. cenocepacia*, como un ejemplo de la cinética de la producción de PHB de una bacilo no fermentador crecido en medio ATS a 37°C. La estimación semi-cuantitativa del contenido de PHB, calculado por medio de valores $\alpha = I_{1738}/I_{1540}$, está indicado en cada tiempo de crecimiento. Los valores α fueron calculados como la relación entre la intensidad del pico asignado al carbonilo del grupo éster a 1738 cm^{-1} , usado como banda marcadora de PHB, y la intensidad de la banda de Amida II a 1540 cm^{-1} usada como estándar interno de la biomasa total [22] del contenido de biomasa total.

Luego de este tiempo la bacteria degradó el PHB y su señal disminuyó nuevamente en las siguientes horas, con un valor α de $0,37 \pm 0,09$ alcanzado al cabo de 72 h de crecimiento. El mismo análisis se realizó con otras cepas de *B. cenocepacia* y se encontró que la cinética y las cantidades relativas de PHB acumuladas por las células no fueron las mismas para todas las cepas evaluadas. Algunos de los aislados mostraron una máxima acumulación de PHB a las 48 h de crecimiento; otros aislados clínicos comenzaron a producir PHB luego de 10 h de incubación. Además, el valor α más alto calculado para los diferentes aislados variaron de $0,52 \pm 0,15$ a $2,10 \pm 0,17$, independientemente del género o la especie considerada (*B. cenocepacia*, *B. cepacia*, y *R. pickettii*). Sin embargo para todos los aislados testeados (Fig. 11), no se observó la producción de PHB antes de las 6 h de crecimiento en medio ATS a 37°C. De estos resultados se concluyó que el tiempo de cultivo debería ser menor a 6 h de crecimiento en medio ATS a 37°C. Por un lado, una suficiente cantidad de biomasa debería estar disponible luego del tiempo de incubación elegido para obtener un espectro con una adecuada relación señal-ruido que supere el TC descrito anteriormente. Teniendo en cuenta estos requerimientos, se eligió un tiempo de incubación de 5 h para alcanzar una biomasa suficiente, y un valor de α inferior a 0,25 que asegure la ausencia de señales de PHB interferentes. Es importante destacar que debido a la variabilidad biológica no se puede asegurar que la cinética de crecimiento y el nivel de producción de PHB se repita en todos los aislados bajo las mismas condiciones experimentales. En función de esto se estableció que todos los espectros que no superarán el TC debido a que la relación señal-ruido resultase demasiado baja y/o tuviesen valores de $\alpha \geq 0,25$ serían rechazados y las medidas repetidas.

Una vez que se eliminó la interferencia del PHB, el nivel de reproducibilidad para los replicados de diferentes aislados clínicos se estudió empleando bacterias crecidas bajo las condiciones previamente seleccionadas (crecimiento en medio ATS a 37°C por 5 h). La Fig. 12 muestra la derivada primera del espectro normalizada vectorialmente en el rango de 1500 a 800 cm^{-1} para dos aislados clínicos (NF 57 y NF69) obtenidos de cuatro cultivos independientes (3 replicados cada uno), los dendrogramas correspondientes a dichos espectros y las imágenes de microscopía de las células de los aislados obtenidas por MET.

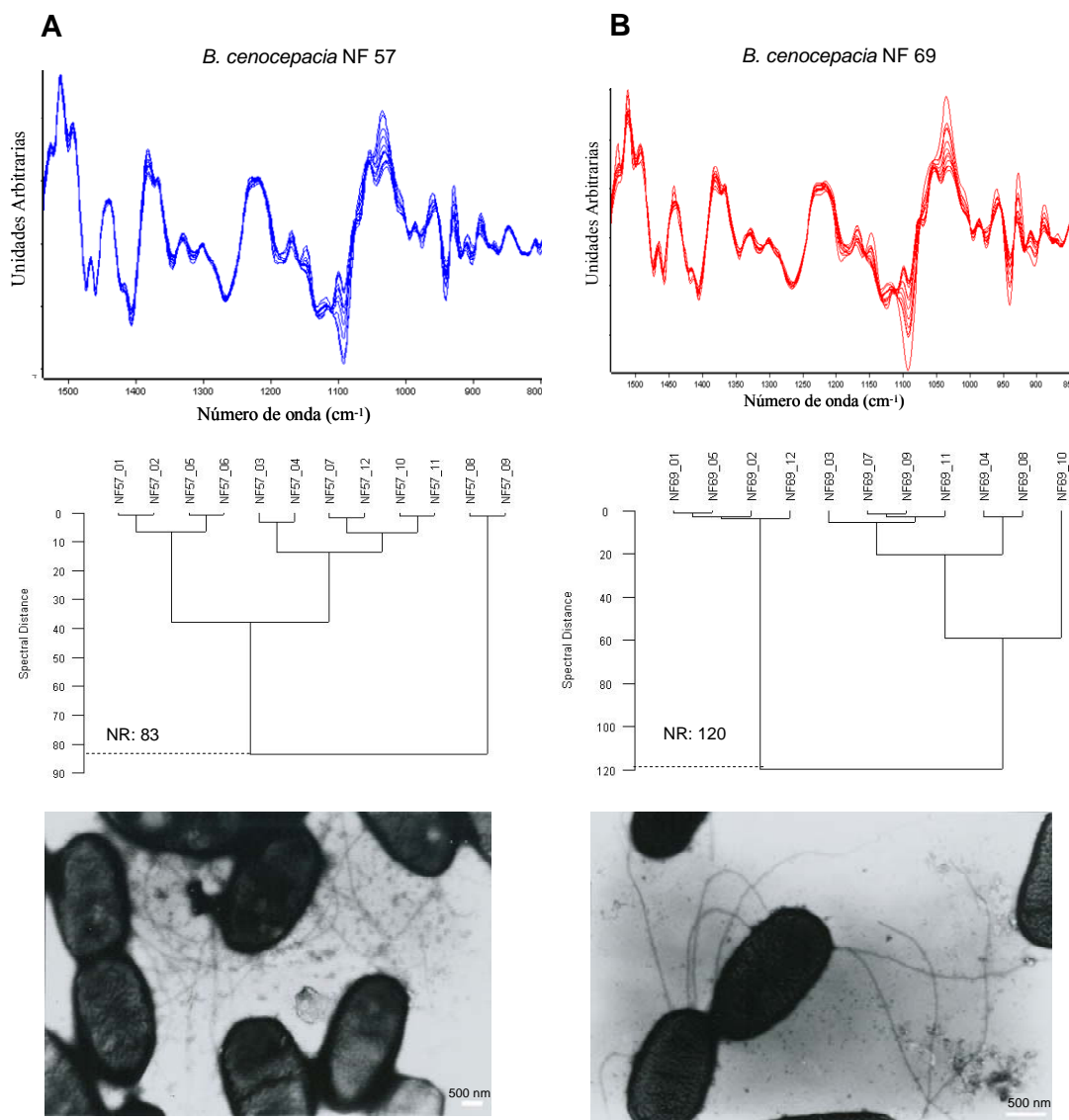


Fig. 12. Dendrograma mostrando los niveles de reproducibilidad de la derivada primera normalizada vectorialmente de espectros de dos aislados clínicos de *B. cenocepacia* NF 57 (A) y NF 69 (B) en el rango 1500 - 800 cm^{-1} . Los resultados provienen de 4 experiencias independientes con 3 replicados cada una registradas en el lapso de 6 meses. Para la construcción del dendrograma se utilizaron las funciones “Normal to replevel” para el cálculo de la distancia espectral y Average Linkage para mostrar la distribución de las distancias obtenidas (OPUS 4.0, Bruker, Optics, Alemania). El nivel de reproducibilidad (NR) alcanzado por cada cepa se indica con línea de punteadas. Se muestran las micrográficas obtenidas por MET para cada aislado analizado.

Como puede verse en la figura, se encontró heterogeneidad entre los replicados de espectros de cada cepa (valores de NR: 83-120) particularmente en la región de 1200 a 900 cm^{-1} , la cual está asociada a bandas vibracionales de carbohidratos, y en la región espectral de 1500 a 1300 cm^{-1} , conocida como la región “mixta” [21, 38]. Por lo tanto se

dedujo que otros componentes celulares diferentes al PHB que también son expresados en diferentes niveles y su composición química podría exhibir bandas de absorción IR en esas regiones del espectro, podrían constituir una posible fuente de variación entre los replicados. Estos componentes resultaron ser apéndices superficiales como pili y flagelos. Se ha reportado que estas fibras son expresadas y coexpresadas por muchos de las bacterias Gram-negativas presentes en los pulmones de los pacientes FQ (*P. aeruginosa*, *Burkholderia spp.*, *S. maltophilia*, y *Acinetobacter spp.*) [13, 16-17]. Un pili es un polímero formado por una asociación ordenada de miles de subunidades proteicas idénticas (pilina), las cuales podrían estar glicosiladas [5, 7, 44]. Se estudió entonces la heterogeneidad espectral obtenida luego de remover esas fibras de pili o flagelos de las células bacterianas por agitación y posterior centrifugación [17, 46]. La variación entre los replicados fue medida cuantitativamente y se calculó los llamados valores D de las diferentes regiones del espectro IR. Por definición, el valor más bajo de D indica la reproducibilidad más alta entre los replicados [21]. Los ensayos de heterogeneidad espectral se realizaron bajo diferentes intervalos de tiempo (5 a 30 min) e intensidades de agitación (baja, media y alta) con un minishaker (MS2; IKA). De esta manera se observó una reducción significativa en la varianza de los replicados por agitación de las células a alta intensidad por 15 min, centrifugación, y separación de las células de pilis como se aprecia en la Fig. 13.

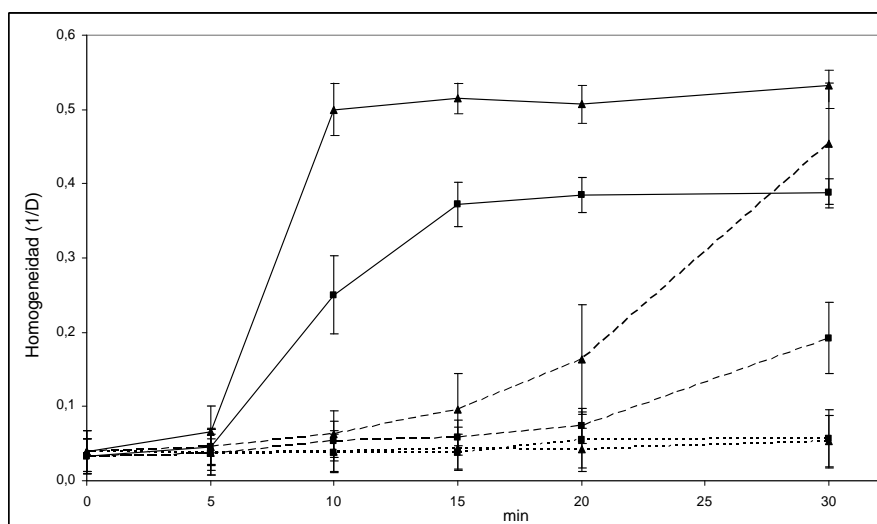


Fig. 13. Homogeneidad espectral de 15 replicados de *B. cenocepacia* NF59 (■) y NF69 (▲) en el rango $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ en función del tiempo de agitación. La homogeneidad se expresa como $1/D$, y la agitación aplicada en cada cepa corresponde a baja (línea de puntos), media (línea de trazo) y alta (línea continua) intensidad.

La Fig. 14 muestra la derivada primera del espectro de aislados clínicos de *B. cenocepacia* NF 57 y NF 69 medidos luego de la aplicación del protocolo descrito anteriormente, los dendrogramas correspondientes a dichos espectros y las microscopias obtenidas por MET luego de la agitación de las células. Aquí se puede apreciar claramente una disminución en la heterogeneidad espectral de cada cepa, exhibiendo valores de NR que varían entre 4,3 y 5,2 los cuales cumplen satisfactoriamente con los requisitos de reproducibilidad ($NR < 25$).

La Tabla 3 resume las variaciones espectrales calculadas para las ventanas espectrales de 3000 a 2800, 1500 a 1300, y 1200 a 900 cm^{-1} antes y después de aplicar una fuerza de corte (agitación) a las células. Los valores de D calculados para aislados clínicos de *B. cenocepacia* NF 57 y NF 69 antes de la agitación fue relativamente alta para ambas cepas en la región espectral asignada a carbohidratos comparado con aquellos obtenidos para la ventana espectral de 3000 a 2800 cm^{-1} . La Tabla 3 también indica los valores de D máximos y mínimos ($30,1 \pm 28,7$ y $13,2 \pm 10,9$ respectivamente) obtenidos en la región de carbohidratos entre todos los aislados clínicos ensayados y el valor D característico para especies de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*. En todos los casos analizados, los valores de D calculados luego de la remoción de los apéndices superficiales decrecieron en un valor cercano a 10 para la región de carbohidratos y más de 5 veces para la región entre 1500 y 1300 cm^{-1} , mientras que los valores de D obtenidos en el rango espectral de 3000 a 2800 cm^{-1} luego de remover los apéndices de las células por agitación y centrifugación decrecieron solamente en un factor de 2.

El nivel de reproducibilidad obtenido luego de agitar las células por 15 min a intensidad máxima demostró ser adecuado para la discriminación de bacterias a nivel de especie. Además, para evitar la interferencia de señales espectrales dado la variación en la cantidad de PHB y la expresión de apéndices superficiales en la discriminación de todas las cepas de BNF aisladas de muestras de esputo de pacientes FQ, las bacterias tuvieron que ser incubadas por $5 \pm 0,5$ h en medio ATS a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, suspendidas en agua destilada, agitadas a alta velocidad por 15 min, y centrifugadas. El espectro de las bacterias suspendidas fue entonces medido por FT-IR, como fue descrito en la sección de materiales y métodos.

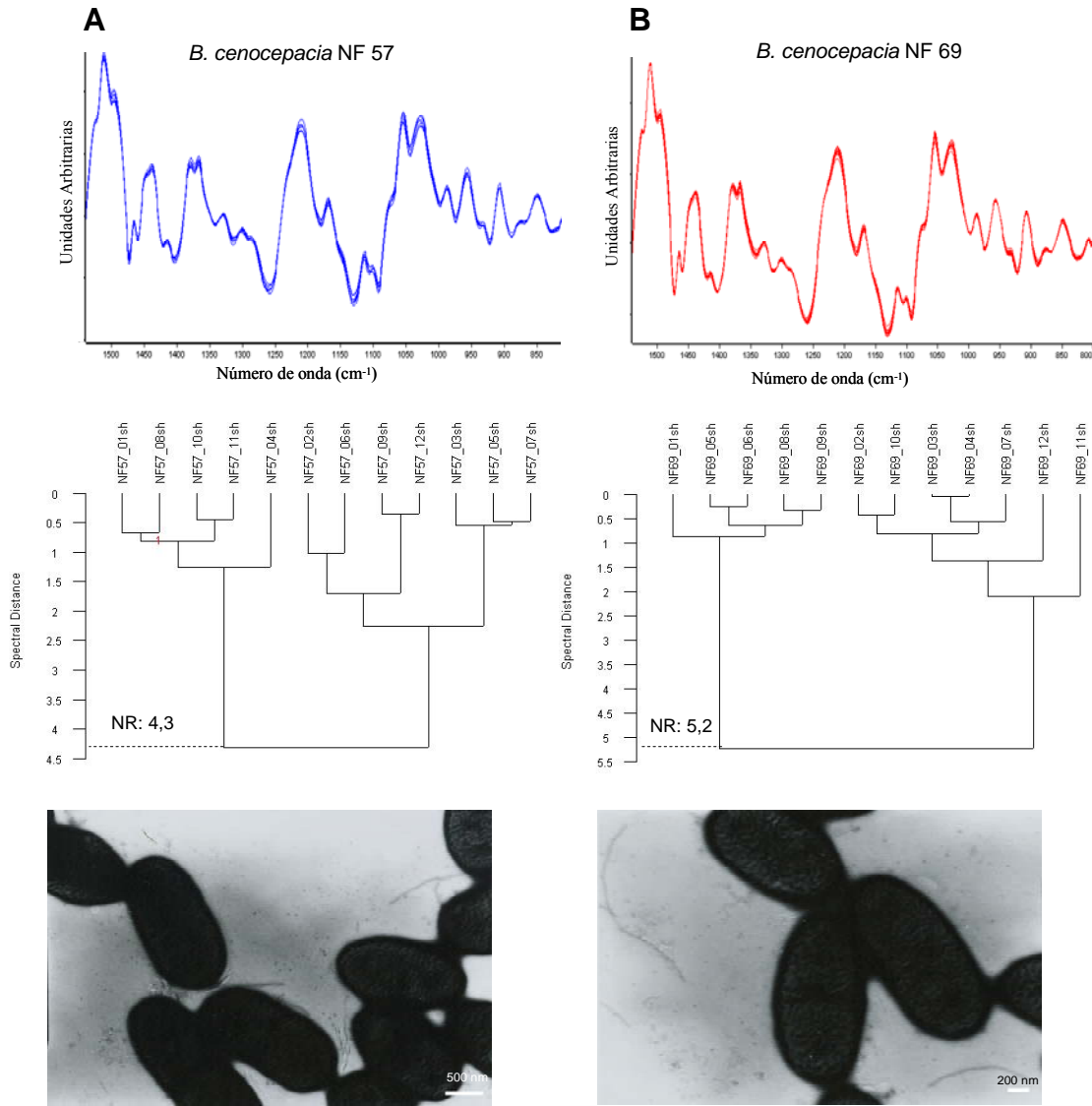


Fig. 14. Derivada primera normalizada vectorialmente de espectros de dos aislados clínicos de *B. cenocepacia* NF 57 (A) y NF 69 (B) en el rango 1500 a 800 cm^{-1} , luego de agitar energicamente a las mismas células por 15 min y posterior centrifugación a 8000 x g por 5 min para separar las células de los pilus libres en el sobrenadante. Los resultados provienen de 4 experiencias independientes con 3 replicados cada una registradas en el lapso de 6 meses. Los dendrogramas muestran los niveles de reproducibilidad de la derivada primera de ambos aislados de *B. cenocepacia* en el rango 1500 - 800 cm^{-1} . Para la construcción del dendrograma se utilizaron las funciones “Normal to replevel” y Average Linkage (OPUS 4.0, Bruker, Optics, Alemania). El nivel de reproducibilidad alcanzado por cada cepa se indica con línea de punteadas. Las micrografías de las células obtenidas por MET después de ser agitadas sin centrifugación mostraban pequeños fragmentos de pili o fibras suspendidas en el sobrenadante.

Tabla 3. Niveles de reproducibilidad obtenidos en células antes y después de remover los apéndices estructurales calculados como valores D para diferentes rangos espectrales

Especie	Cepa	Rangos espectrales (cm ⁻¹)					
		3000-2800	1500-1300	1200-900	3000-2800	1500-1300	1200-900
		Antes de la agitación			Después de la agitación y centrifugación		
<i>B. cenocepacia</i>	57 (HNLP)	2,13 ± 1,62	6,19 ± 5,30	25,0 ± 23,2	0,75 ± 0,43	0,93 ± 0,66	1,94 ± 1,07
	69 (HNLP)	2,71 ± 1,03	6,35 ± 5,29	30,1 ± 28,7	1,11 ± 1,07	1,82 ± 1,55	2,75 ± 0,66
	15 (HST)	1,94 ± 1,29	7,62 ± 6,64	13,2 ± 10,9	0,89 ± 0,68	0,95 ± 1,06	1,70 ± 0,88
<i>P. aeruginosa</i>	R2 (HST)	2,73 ± 1,96	8,36 ± 7,19	35,9 ± 40,2	1,20 ± 0,95	2,19 ± 1,07	3,43 ± 1,95
<i>S. maltophilia</i>	50428 (HST)	1,82 ± 1,69	10,12 ± 9,6	20,3 ± 23,2	0,31 ± 0,90	1,85 ± 1,34	2,99 ± 1,98
	35668 (HST)	1,90 ± 1,83	9,73 ± 8,25	15,3 ± 12,9	0,60 ± 0,40	0,96 ± 0,57	2,8 ± 2,10

Valores D calculados para aislados clínicos de *B. cenocepacia* antes y después de la agitación, en las regiones espectrales de 1200-900 (asignadas a carbohidratos), 1500-1300 (región mixta) y 3000-2800 cm⁻¹ (C-H). Valores D correspondientes a aislados clínicos de una *P. aeruginosa* (R2) y dos *S. maltophilia* (50428 y 35668) se muestran como ejemplo de valores D típicos obtenidos por otros géneros diferentes a *Burkholderia*. Abreviaturas: HNLP, Hospital de Niños “Sor María Ludovica” La Plata; HST, Hospital de Niños “Santísima Trinidad” Córdoba.

Finalmente se evaluó la influencia de dos medios ATS comerciales (Oxoid y Britania) en el espectro bacteriano final. Para esto, se realizaron tres cultivos independientes (3 replicados de cada uno) de los aislados de *B. cenocepacia* NF 57 y NF 69 tanto en medio ATS de marca Oxoid como Britania y se obtuvieron los correspondientes espectros FT-IR siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos con las modificaciones indicadas en cuanto a tiempo de incubación y agitación de las muestras. La Fig. 15 muestra un dendrograma creado a partir de los espectros obtenidos de ambos aislados clínicos de *B. cenocepacia*, en el cual no se observan agrupamientos asociados al origen comercial del medio ATS.

Es importante resaltar que este simple protocolo de procesamiento de muestras garantizó un alto nivel de reproducibilidad en un corto tiempo de trabajo. Asimismo mediante esta metodología es posible realizar una adecuada identificación microbiológica de BNF en el tiempo correspondiente a una jornada de trabajo, requiriendo de esta manera 24 h de incubación en agar EMB para el cultivo del microorganismo, 5 h de crecimiento en medio ATS, 1 h para la preparación de la muestra, 15 min para el registro de replicados de los espectros y unos pocos minutos para el análisis de datos.

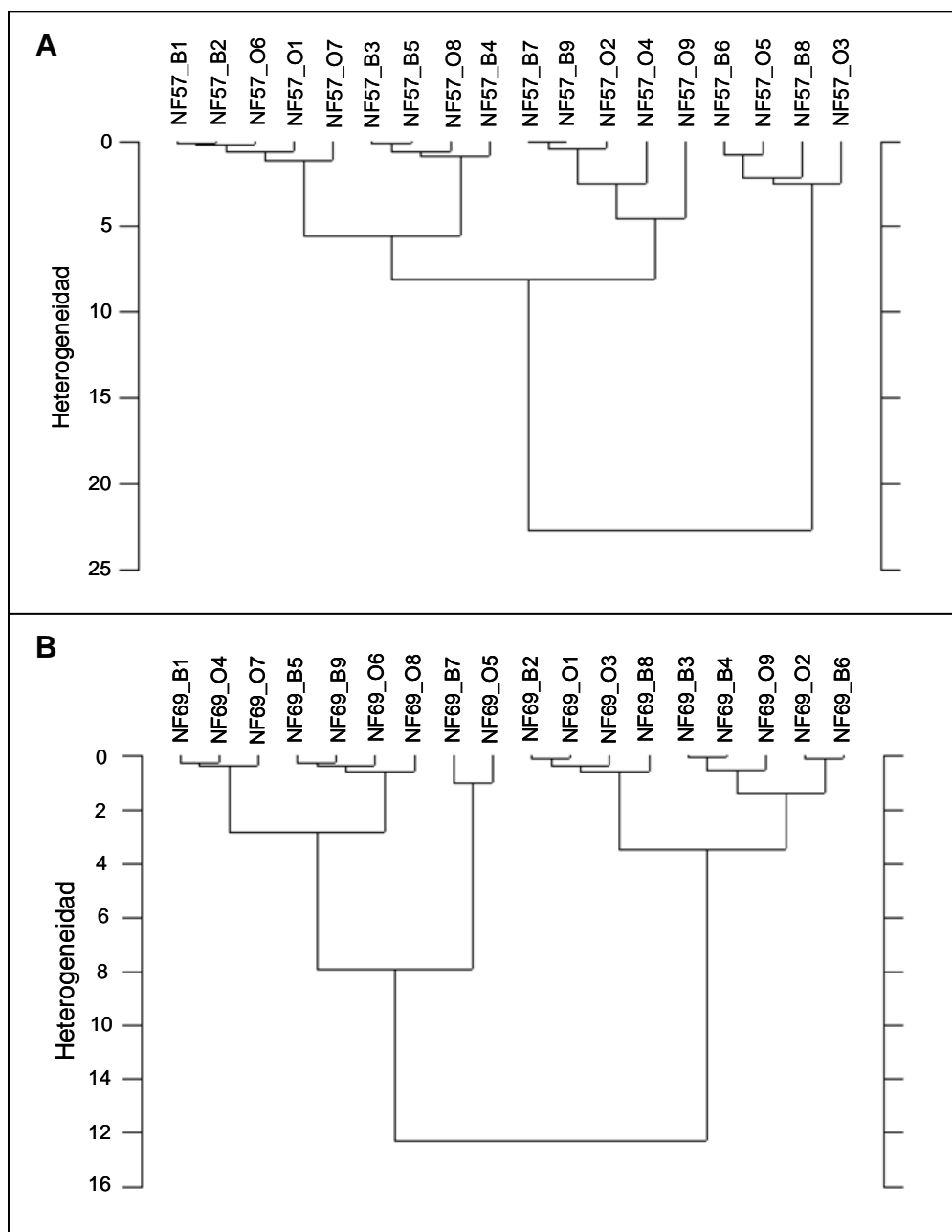


Fig. 15. Dendrograma basado en el análisis jerárquico de cluster de las derivadas primeras normalizadas vectorialmente de los espectros de aislados de *B. cenocepacia* NF 57 (A) y NF 69 (B) cultivados en el medio ATS de marca Britania y Oxoid. Los resultados provienen de 3 experiencias independientes con 3 replicados para cada marca, y los espectros nombrados de B1 a B9 y O1 a O9 corresponden al medio ATS Britania y Oxoid respectivamente. El cálculo fue realizado basado en las distancias espectrales y el algoritmo de Ward, usando la derivada primera normalizada en las ventanas espectrales de 3000-2840, 1200-900 y 1400-1250 cm^{-1} .

2.4.2 Discriminación de bacilos Gram-negativos no fermentadores aislados de muestras de esputo de pacientes FQ

En un intento por desarrollar un modelo de discriminación capaz de diferenciar 6 grupos de BNF aislados de pacientes FQ (*P. aeruginosa*, *R. pickettii*, *A. xylosoxidans*, *Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia*, y miembros del cBc) se empleó una herramienta de análisis basada en el AJC. La selección de la mejor combinación de las ventanas espectrales que producen la diferenciación deseada se realizó utilizando el conjunto de datos de entrenamiento indicado en la sección de materiales y métodos. Así, se encontró que las ventanas espectrales de 3000 a 2840, 1400 a 1250, y 1200 a 900 cm^{-1} contribuyen a la maximización de la discriminación de los grupos de bacterias anteriormente mencionados (Fig. 16). Utilizando la información codificada en estos rangos espectrales como datos de entrada para el cálculo de distancias espectrales y análisis de cluster, se obtuvo el dendrograma indicado en la Fig. 17 aplicando el algoritmo de Ward mediante el software OPUS. Este dendrograma muestra una clara discriminación entre los seis diferentes grupos de bacterias analizados. Aunque bacterias del cBc no fueron discriminados a nivel de especie, dos cluster principales (cluster a y b) fueron obtenidos. Sugestivamente, el cluster “a” contenía principalmente cepas de referencia pertenecientes a las especies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* (genomovar I al III), *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* (genomovar V al VII), y *B. pyrrocinia* (genomovar IX), mientras que el cluster “b” contenía los aislados clínicos y las cepas de referencia pertenecientes a *B. stabilis* y *B. anthina* (genomovar IV y VIII). Estas observaciones podrían ser debidas al hecho que las bacterias del cBc, las cuales están generalmente vinculadas a la infección crónica de los pulmones de pacientes FQ, donde existen como biofilms, tienen una evolución fenotípica diferente comparada a la de las cepas de referencia.

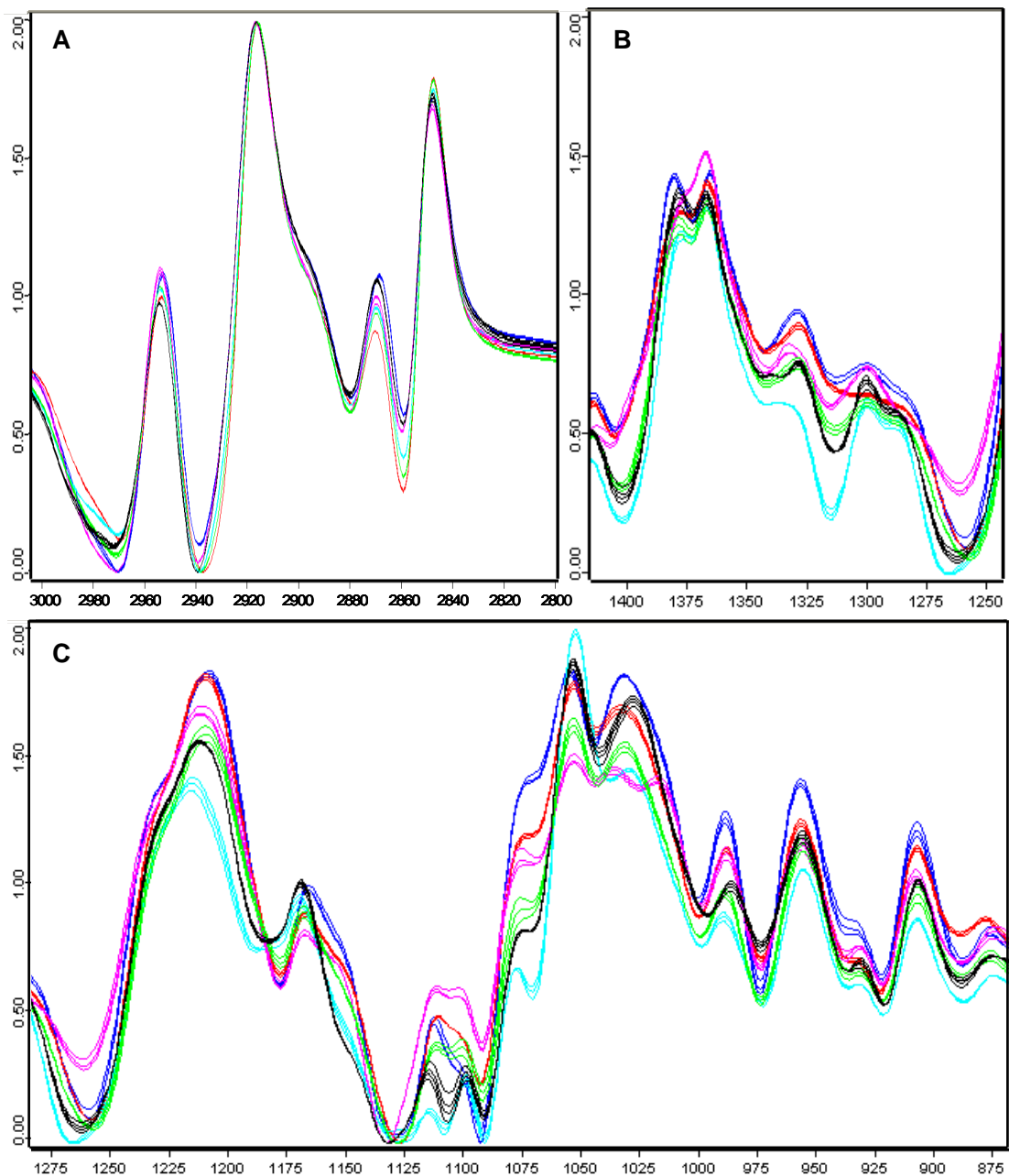


Fig. 16. Derivada primera de espectros obtenidos de seis géneros de BNF en las principales ventanas espectrales: (A) 3000-2000 cm^{-1} , (B) 1400-1250 cm^{-1} , (C) 1200-900 cm^{-1} . En colores se representan los BNF, *A. baumannii* (fucsia), *A. xylosoxidans* (verde), *B. cenocepacia* (negro), *P. aeruginosa* (rojo), *S. maltophilia* (azul) y *R. pickettii* (turquesa). En el eje x las unidades se expresan en cm^{-1} , mientras que en el eje y en unidades arbitrarias.

Desafortunadamente aplicando este análisis se observó que un total de cinco aislados clínicos pertenecientes al cBc y BNF (un aislado de *A. xylosoxidans*, un aislado de *S. maltophilia* y tres aislados de *B. cenocepacia*) fallaron en agrupar con el grupo correspondiente y fueron de esta manera identificados erróneamente. En todos los casos

de *A. xylosoxidans* y *S. maltophilia*, este resultado podría ser dado al hecho que el número de cepas usado no fuera suficiente para cubrir las variaciones fenotípicas dentro del grupo de bacterias. Resultados similares para optimización del sistema de clasificación fue mostrado previamente por Rebuffo y cols [48]. El primer paso en el procedimiento de identificación fue testear si otra combinación específica de ventanas espectrales para el análisis de cluster diferente de la que fue usada para la diferenciación a nivel de género, sería más apropiada para la discriminación de las bacterias del cBc a nivel de especie. Con este objeto, las 11 cepas de referencia del cBc listadas en la Tabla 2 fueron usadas en el AJC basado en la información espectral contenida en cuatro ventanas espectrales diferentes (1200 a 900, 1450 a 1350, 1330 a 1250 y 3000 a 2800 cm^{-1}) para discriminar entre las nueve especies del cBc y los dos subtipos de *B. cenocepacia*.

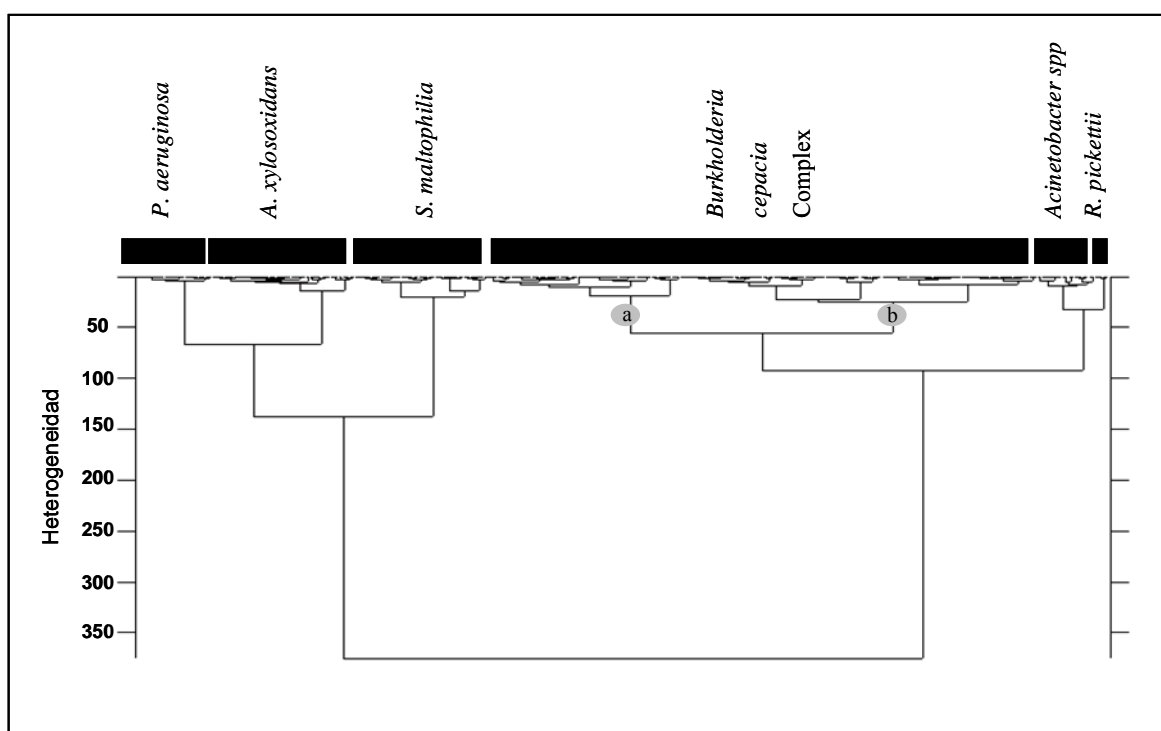


Fig. 17. Dendrograma basado en análisis jerárquico de cluster de bacilos no fermentadores Gram-negativos usando la derivada primera normalizada vectorialmente de los espectros en las ventanas espectrales de 3000-2840, 1200-900 y 1400-1250 cm^{-1} . El dendrograma fue construido basado en las distancias espectrales y en el algoritmo de Ward. Las bacterias del cBc se encuentran agrupadas en dos cluster: cluster “a” contiene principalmente las cepas de referencia pertenecientes a las especies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* (genomovar I al III), *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria* (genomovar V al VII), y *B. pyrrocinia* (genomovar IX) mientras que el cluster “b” contiene los aislados clínicos y cepas de referencia pertenecientes a *B. stabilis* y *B. anthina* (genomovar IV y VIII).

El dendrograma mostrado en la Fig. 18 exhibe una clara discriminación de las nueve especies del cBc y de los dos subtipos de *B. cenocepacia*, los cuales pertenecen a los subtipos A y B. Sin embargo, cuando este análisis de cluster fue desafiado mediante el uso de aislados clínicos correctamente identificados, se obtuvieron dos grupos distintos, uno constituido por aislados clínicos y el otro por cepas de referencia. Asimismo, se evaluaron otras combinaciones de las ventanas espectrales, pero en todos nuestros ensayos el principal resultado fue la discriminación de los aislados clínicos de las cepas de referencia (datos no mostrados). Así, como fue previamente informado para bacterias estrechamente relacionadas en otros géneros [48], el AJC no parece considerar de manera óptima la información espectral codificada en el espectro para la correcta discriminación.

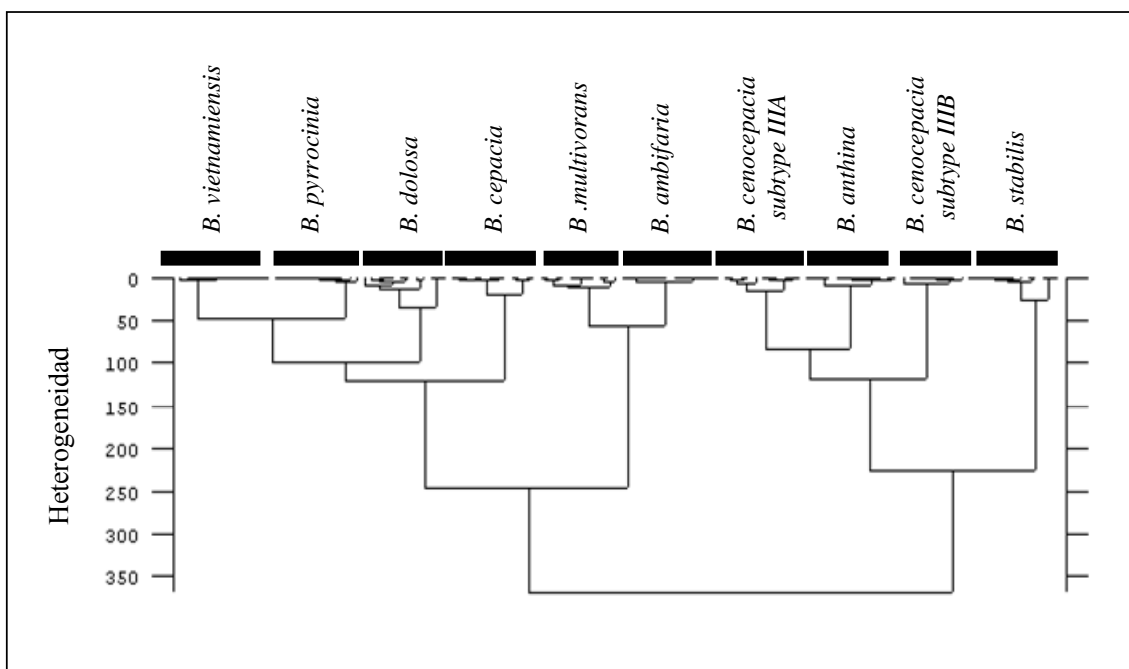


Fig. 18. El análisis jerárquico de cluster (AJC) muestra la discriminación de los nueve genotipos del complejo *Burkholderia cepacia* (cBc) y dos subtipos de *B. cenocepacia* (subtipos IIIA y IIIB). El dendrograma fue obtenido usando el algoritmo de Ward, la derivada primera normalizada vectorialmente de los espectros y la información espectral contenida en las ventanas 1200-900, 1450-1350, 1330-1250 y 3000-2800 cm^{-1} . El AJC exhibe una clara discriminación entre las 9 especies del cBc y los 2 subtipos de *B. cenocepacia* (A y B). El análisis fue realizado empleando 3 espectros replicados obtenidos de 4 experimentos independientes (un total de 12 espectros) para cada cepa de referencia.

2.4.3 Identificación por análisis de RNA

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, se aplicó un análisis de RNA, un método avanzado perteneciente a las denominadas técnicas supervisadas. Con el objeto de obtener un sistema de identificación clínicamente relevante, se desarrolló un modelo multivariado considerando la epidemiología del cBc. De la ocurrencia de diferentes especies del cBc en pacientes con FQ, es evidente que todas las especies de este complejo son potencialmente capaces de colonizar los pulmones de pacientes FQ [10, 62]. Sin embargo, estudios de la distribución de especies del cBc en pacientes FQ en más de 10 países diferentes, incluyendo los EEUU, Canadá, Francia, Italia y el Reino Unido, revelaron que la mayoría de los aislados recuperados de pacientes FQ pertenecen a las especies de *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. cepacia* y *B. stabilis* [6, 9, 11, 14, 19, 59]. La distribución de los miembros del cBc en pacientes FQ también muestra frecuentemente una alta desproporción de las especies [11, 32]. En este estudio, 84,3% de los aislados resultaron ser *B. cenocepacia*, 9,4% fueron *B. cepacia*, 3,1 % fue *B. stabilis*, y 1,1 % fue *B. multivorans* (por identificación mediante PCR-*recA* primers EE; Tabla 1). Es importante aclarar que la identificación mencionada arriba correspondió a la obtenida con los métodos que en ese momento se consideraban como gold standards (actualmente el 85% de los aislados asignados a *B. cenocepacia* son identificados como *B. contaminans*, una nueva especie del cBc).

Considerando los datos epidemiológicos del cBc mencionados anteriormente, se desarrolló un modelo basado en RNA. Debido a la complejidad de la identificación de 6 grupos de BNF y 4 especies de cBc (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia* y *B. stabilis*, genomovar I al IV, respectivamente) se recurrió a la implementación de un sistema RNA jerárquico basado en dos módulos, uno para la identificación de géneros y otro para la identificación a nivel de especies tal como ha sido descrito por Maquelin y cols [34]. El uso de un modelo modular, compuesto por dos RNA, permitió la optimización de cada red con los datos individuales preprocesados, selección de parámetros y topología de la red. Estos dos módulos independientemente desarrollados fueron integrados en un único sistema de clasificación basados en RNA (Fig. 19 A) [53].

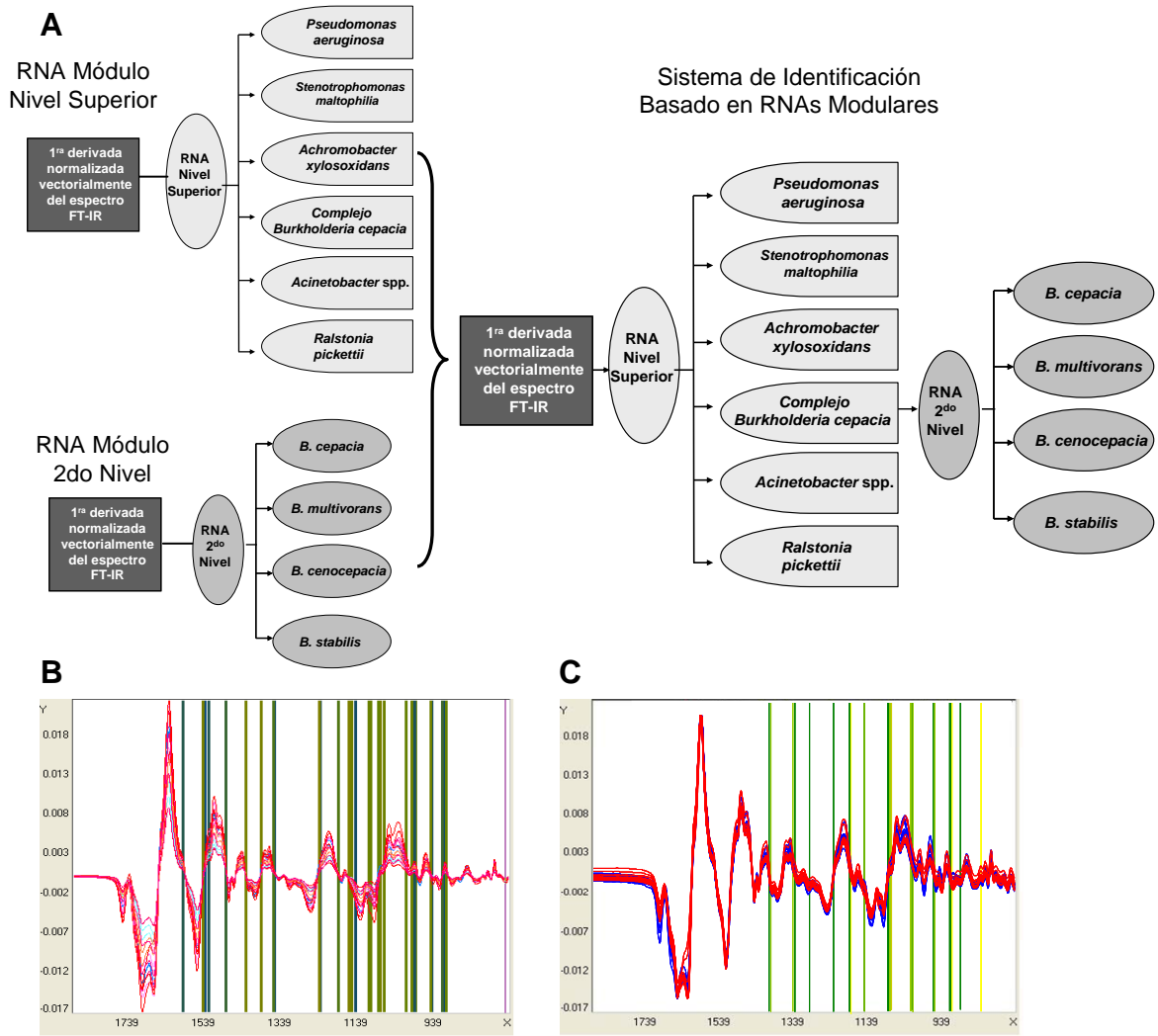


Fig. 19. Sistema de identificación basado en redes neuronales artificiales (RNAs) modulares. (A) Diagrama esquemático del sistema de clasificación basado en una red neuronal artificial modular para la identificación de bacilos no fermentadores (BNF) aislados de muestras de pacientes FQ basados en los espectros de FT-IR. Sobre la base de la arquitectura del primer nivel de la RNA es posible discriminar 6 grupos de BNF (*P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, cBc, *R. pickettii*, y *Acinetobacter spp.*). El segundo nivel del esquema de clasificación permite la discriminación de las 4 especies clínicamente relevantes del cBc: *B. cepacia* (GI), *B. multivorans* (GII), *B. cenocepacia* (GIII) o *B. stabilis* (GIV). Estos dos módulos desarrollados independientemente, fueron integrados en un sistema de clasificación basados en RNA. (B) Números de onda seleccionados por el software Neurodeveloper que mejor diferenciaron los BNF en la RNA de nivel superior. Las líneas verticales de de color verde intenso indican los números de onda más discriminativos. (C) Números de onda que mejor diferenciaron las 4 especies del cBc en la RNA de segundo nivel. (D) Validación de la librería espectral y representación de la forma en que el software Neurodeveloper presenta los resultados de identificación de especies del cBc y BNF relevantes.

D

Names	Classification
Bc_GI_27sh.0	GI
Bc_GI-18sh.0	GI
Bc_GI-20sh.0	GI
Bc_GI-22sh.0	GI
Bc_GIIIa_04sh.0	GIII
Bc_GIIIa_01sh.0	GIII
Bc_GIIIa_02sh.0	GIII
Bc_GIV_24sh.0	GIV
Bc_GIV_27sh.0	GIV
Bc_GIV_30sh.0	GIV
Bc_GIV_33sh.0	GIV
Bc_GIIIb_01sh.0	GIII
Bc_GIIIb_02sh.0	GIII
Bc_GIIIb_03sh.0	GIII
Bc_GIIIb_04sh.0	GIII
rki00041.0	<i>Pseudomonas auroginosa</i>
rki00003.0	<i>Pseudomonas auroginosa</i>

Como se describió en la sección materiales y métodos, la base de datos usada para desarrollar el sistema de RNA modular, la cual contenía cerca de 2000 espectros (y sus correspondientes derivadas primeras) para 169 aislados clínicos y 15 cepas de referencia, fue dividido en dos subconjuntos: (i) el subconjunto de datos de entrenamiento y (ii) el subconjunto de datos de testeo, los cuales contenían los espectros de las cepas clínicas que no fueron incluidos en el subconjunto de datos de entrenamiento y que fueron exclusivamente empleados para la validación externa. Los espectros de dos aislados (HST 8684 y BC05; Tabla 1) que fueron identificados por métodos de biología molecular sólo a nivel de género como pertenecientes al cBc no se emplearon para el entrenamiento pero fueron incluidos en el subconjunto de datos de testeo.

Para el diseño de la RNA de nivel superior, el software NeuroDeveloper seleccionó los mejores parámetros espectrales que permitieran la discriminación de los BNF, estos correspondieron a 60 números de onda de los espectros de microorganismos del conjunto de entrenamiento (Fig. 19 B). La topología que permitió su óptimo entrenamiento correspondió a 60 neuronas de entrada, 2 unidades ocultas y 6 neuronas de salida, la red esta completamente conectada en sentido feed-forward y fue entrenada usando el algoritmo Rprop [60]. Esta RNA de nivel superior fue entrenada con el 90% de los espectros contenidos en el subconjunto de datos de entrenamiento, mientras que el 10 % restante fue empleado para la validación interna de la misma la cual alcanzó el 100% de identificaciones correctas (Tabla 4). Posteriormente se construyó una RNA de segundo nivel para la identificación de las 4 especies relevantes del cBc. Para ello se seleccionaron 15 números de onda con el más alto potencial para discriminar las especies del cBc, y la topología de esta subred correspondió a 15 neuronas de entrada, dos neuronas ocultas y cuatro neuronas de salida (Fig. 19 C). El entrenamiento de la red de segundo nivel se realizó empleando el 90% de los espectros correspondientes a las especies del cBc contenidos en el subconjunto de datos de entrenamiento. En la validación interna de esta subred se empleó el 10 % de los espectros restantes, los cuales exhibieron un 100% de identificaciones correctas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de identificación de la RNA modular usando el “subconjunto de datos de entrenamiento” y el “subconjunto de datos de testeo” para validación externa.

Nivel de la red y Microorganismos	Número de aislados ^a					
	Total	Subconjunto de datos de entrenamiento (Entrenamiento / validación interna) ^b	Subconjunto de datos de testeo (Validación externa) ^c	Identificación correcta (%)	Identifi- cación incorrecta (%)	Sin identificación (%)
Red de nivel superior ^d						
<i>P. aeruginosa</i>	17	12	5	5 (100)	-	
cBc	107	78	29	29 (100)	-	
<i>S. maltophilia</i>	26	18	8	8 (100)	-	
<i>A. xylosoxidans</i>	21	15	6	5 (83.3)	-	1 (16.7)
<i>R. pickettii</i>	2	-	2	2 (100)	-	
<i>Acinetobacter spp.</i>	11	8	3	3 (100)	-	
Total	184	131	53	52 (98.1)	-	1 (1.9)
Red de segundo nivel ^e						
<i>B. cepacia</i>	10	7	3	3 (100)	-	
<i>B. multivorans</i>	3	2	1	1 (100)	-	
<i>B. cenocepacia</i>	83	58	25	23 (92)	-	2 (8)
<i>B. stabilis</i>	4	3	1	1 (100)	-	
cBc ^f	2	-	2	2 (100)	-	
Total	102	70	32	30 (93.8)	-	2 (6.2)

^a No se observaron identificaciones erróneas.

^b El conjunto de datos de entrenamiento contenía los espectros de 131 aislamientos (incluyendo cepas de referencia) y fue usado para el entrenamiento y validación interna. La validación interna, la cual se realizó con el 10% de los espectros de 131 aislados (incluidas cepas de referencia) del subconjunto de entrenamiento, alcanzó el 100% de identificaciones correctas para todas las especies.

^c El subconjunto de testeo contenía los espectros de 53 aislados clínicos y se empleó para la validación externa.

^d El software NeuroDeveloper (versión 2.3; Synthon KG) se usó para desarrollar y optimizar el sistema modular. La base de datos completa contenía las derivadas primeras de aproximadamente 2000 espectros obtenidos de 169 aislados clínicos y 15 cepas de referencia. La topología de la red de nivel superior correspondió a 60 números de onda, dos unidades ocultas y seis neuronas de salida.

^e La topología de la red de segundo nivel correspondió a 15 números de onda, dos unidades ocultas y cuatro neuronas de salida.

^f Se asignó a dos aislados clínicos (HST 8684 y HC BC05) que fueron identificados como pertenecientes al cBc por PCR del gen *recA* con primers BCR1 y BCR2 pero que no pudieron ser identificados por el método de PCR con primers EE.

Una vez obtenida cada red modular, estas fueron integradas de manera de formar una única RNA jerárquica basada en módulos y se procedió a realizar una validación interna del modelo de identificación desarrollado. Para esto, se seleccionó al azar un espectro individual de cada cepa del conjunto de datos de entrenamiento (131 aislados,

incluyendo cepas de referencia; Tabla 1), y se empleó para evaluar la exactitud de la identificación. El primer paso consiste en testear si el aislado puede ser asignado a alguna de las especies descritas (*P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, cBc, *R. pickettii*, o *Acinetobacter spp.*) en el primer módulo de la red neuronal para lo cual se emplea el módulo superior, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 19 A y D. Si la identificación de salida a este nivel resulta en un miembro del cBc, el segundo nivel de la RNA del sistema modular será usado para asignar el espectro a *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, o *B. stabilis*. En esta validación interna, se obtuvo un 100% de identificaciones correctas para todas las especies testeadas (datos no mostrados).

Para un examen objetivo de la eficacia del modelo, se llevo a cabo un testeo (validación externa) utilizando la derivada primera de los espectros de los 53 aislados clínicos contenidos en el subconjunto de datos de testeo; los espectros para estos aislados no fueron usados en el entrenamiento o la validación interna. Como se indicó en la Tabla 4, la red de nivel superior no identificó solo a un aislado de *A. xylosoxidans*. Interesantemente, dos cepas (cepas HST 8684 y HC BC05; Tabla 1) que pudieron ser identificadas solo por técnicas de biología molecular como cepas del cBc fueron discriminadas como pertenecientes al cBc por la red de nivel superior pero no pudieron ser asignadas a ninguna de las especies de cBc por la segunda RNA (Tabla 4). El excelente desempeño general del modelo modular de RNA fue caracterizado por el 98,1% de identificaciones correctas en el nivel de superior de la RNA y un 93,8% de correctas identificaciones en el segundo nivel de la RNA. Estos resultados demuestran que el modelo de RNA basado en FT-IR desarrollado en este trabajo representa un sistema que puede ser usado para la correcta identificación de *P. aeruginosa*, *R. pickettii*, *A. xylosoxidans*, *Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia*, y miembros del cBc.

Adicionalmente, esta red es capaz de discriminar los aislados de cBc a nivel de especie y en particular, puede discriminar las cuatro especies que causan la mayoría de las infecciones en pacientes FQ (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, y *B. stabilis*). Las infecciones pulmonares crónicas causadas por patógenos oportunistas que ocurren en pacientes FQ están asociadas con extensas adaptaciones genéticas y evolución de las bacterias infectivas. Es por ello que podrían evolucionar en respuesta a la presión de selección del ambiente del hospedador y, probablemente, por otros miembros presentes en la comunidad bacteriana [15, 18, 58]. Por tanto, nuestro sistema

de identificación, como otras metodologías fenotípicas y genotípicas, requiere una continua actualización. Sin embargo el sistema de RNA basado en FT-IR tiene la ventaja que permite una fácil incorporación de nuevos aislados de las especies del cBc para ser agregados a la base de datos. Para extender la identificación fenotípica de la mayoría de los BNF relevantes aislados de pacientes FQ, en la presente base de datos serán incluidos en el futuro especies relacionadas, particularmente aquellas pertenecientes al género *Achromobacter*, *Acinetobacter*, y *Ralstonia*, aunque ellos son aislados con baja frecuencia [8].

Es importante remarcar que nuestros resultados preliminares sugieren que el uso de FT-IR en combinación con RNAs es capaz de identificar diferentes fenotipos de aislados que son positivos por PCR-*recA* primers EE para *B. cenocepacia* y que presentan perfil de PCR RFLP atípico (patrón tipo K). Luego que este trabajo fue concretado y publicado, un estudio realizado en 2009 por Vanlaere y cols [63] reportó que bacterias que exhibían el patrón de RFLP tipo K, el cual no es asignado a ninguna de la especies del cBc, correspondía a nuevas especies del cBc. Estos autores a través de métodos genéticos basados en secuenciación del gen *recA* y MLST asignaron a estas bacterias a dos nuevas especies, *B. contaminans* y *B. lata*. Esto dio lugar a que en nuestro laboratorio se realice una nueva identificación de aislados atípicos del cBc por secuenciación del *recA*, cuyo resultado reveló que todos ellos pertenecían a la nueva especie *B. contaminans*. De esta manera se procedió a la actualización de la RNA modular durante el período 2009-2010 con el objeto de incluir esta nueva especie, así la red de segundo nivel fue entrenada para discriminar cinco especies del cBc, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis* y *B. contaminans*.

Por tanto se considera que el uso de la metodología basada en el desarrollo de FT-IR en el presente estudio, con la asistencia de la más poderosa técnica de identificación, tal como la metodología de secuenciación e identificación de multilocus (MLST) [1, 12], representaría una importante herramienta que podría ser usada para resolver resultados ambiguos cuando especies emergentes del cBc fueran detectadas en pacientes FQ.

2.5 CONCLUSIONES

La identificación adecuada de patógenos del tracto respiratorio de pacientes FQ es crucial para asegurar un apropiado tratamiento y control de la infección. Entre estos organismos la taxonomía y la identificación de los miembros del género *Burkholderia* ha sido siempre muy compleja. En el presente estudio, se muestra por vez primera el enorme potencial del FT-IR combinado con la metodología de RNA para la rápida y adecuada identificación de los seis BNF de relevancia clínica aislados de esputo de pacientes FQ (*P. aeruginosa*, *R. pickettii*, *A. xylosoxidans*, *Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia*, y bacterias pertenecientes al cBc) y la discriminación de la cuatro especies del cBc que son aisladas con alta frecuencia en pacientes FQ (*B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, y *B. stabilis*).

- Al inicio de este trabajo se propuso la identificación de microorganismos causantes de infecciones pulmonares en pacientes FQ mediante el análisis de espectros FT-IR de células enteras. Los resultados demostraron en primer lugar problemas de interferencia y reproducibilidad espectral derivados de la presencia de PHB y de diferentes tipos de apéndices como pili y/o flagelos producidos por bacilos Gram-negativos.
- Debido a las interferencias observadas en el espectro FT-IR de células enteras se estudió la expresión de PHB en función del tiempo de crecimiento en dichos microorganismos, a fin de encontrar las condiciones de cultivo en las cuales este polímero de reserva no represente una interferencia en el espectro FT-IR. Estas experiencias demostraron que bacterias capaces de producir PHB cuando son cultivadas por periodos de tiempo inferiores a 6 h, no presentan bandas de absorción características del PHB que impidan el posterior análisis espectral.
- La expresión variable de apéndices celulares (pili y/o flagelos) en BNF era responsable de la escasa reproducibilidad de los espectros, por tanto se empleó una simple estrategia de remoción de estos apéndices mediante agitación vigorosa (15 min) que permitió disminuir significativamente la heterogeneidad espectral y mejorar así la reproducibilidad.

- Estandarizadas las condiciones de crecimiento y remoción de apéndices, la reproducibilidad de los espectros se mantuvo en niveles aceptables en medidas realizadas durante un periodo no menor a los 6 meses.
- La evaluación del efecto del medio de cultivo ATS sobre la reproducibilidad espectral empleando dos marcas comerciales (Oxoid y Britania), no mostró diferencias en la calidad y homogeneidad de los espectros.
- Se evaluaron dos modelos de identificación basados en métodos multivariantes (AJC y RNAs) los cuales probaron que la información contenida en el espectro IR es suficiente para diferenciar fenotípicamente los organismos pertenecientes al cBc y distinguir a estos de otros BNF relevantes.
- Si bien ambos modelos mostraron una correcta identificación de los microorganismos aislados de pacientes FQ, el sistema basado en RNAs demostró ser más robusto y exacto al momento de identificar especies estrechamente relacionadas del cBc y BNF.
- La arquitectura modular de las RNAs otorga al sistema de identificación una gran versatilidad y posibilita la rápida actualización del mismo por incorporación de nuevas especies.
- El enfoque propuesto representa un avance significativo en la identificación de BNF en el análisis de rutina. A diferencia de otras técnicas, el método desarrollado en el presente estudio requiere pequeñas cantidades de células y una mínima preparación de muestra, es económico, y puede conducir a la identificación dentro de unas pocas horas.

Después de la concreción de este trabajo se amplió la base de datos disponible con información de un amplio rango de especies microbianas. Este nuevo sistema de identificación, inédito tanto en nuestro país como a nivel internacional, probó ser confiable, rápido, preciso para uso práctico para la diferenciación e identificación de BNF Gram-negativos aislados de muestras de esputo de pacientes FQ colectados para la detección clínica de rutina [3].

2.6 BIBLIOGRAFÍA

1. **Baldwin, A., E. Mahenthiralingam, K. M. Thickett, D. Honeybourne, M. C. Maiden, J. R. Govan, D. P. Speert, J. J. Lipuma, P. Vandamme, and C. G. Dowson.** 2005. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **43**:4665-73.
2. **Bosch, A., M. A. Golowczyc, A. G. Abraham, G. L. Garrote, G. L. De Antoni, and O. Yantorno.** 2006. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *Int J Food Microbiol* **111**:280-7.
3. **Bosch, A., A. Minan, C. Vescina, J. Degrossi, B. Gatti, P. Montanaro, M. Messina, M. Franco, C. Vay, J. Schmitt, D. Naumann, and O. Yantorno.** 2008. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2535-2546.
4. **Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Boddingtonhaus, M. Altwegg, and E. C. Bottger.** 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 Microbiol* **44**:1359-66.
5. **Brimer, C. D., and T. C. Montie.** 1998. Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* at-type strains. *J Bacteriol* **180**:3209-17.
6. **Brisse, S., C. Cordevant, P. Vandamme, P. Bidet, C. Loukil, G. Chabanon, M. Lange, and E. Bingen.** 2004. Species distribution and ribotype diversity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from French patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **42**:4824-7.
7. **Castric, P., F. J. Cassels, and R. W. Carlson.** 2001. Structural characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan. *J Biol Chem* **276**:26479-85.
8. **Coenye, T., T. Spilker, R. Reik, P. Vandamme, and J. J. Lipuma.** 2005. Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**:3463-6.
9. **Coenye, T., and P. Vandamme.** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**:719-29.
10. **Coenye, T., P. Vandamme, J. R. Govan, and J. J. LiPuma.** 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **39**:3427-36.
11. **Cunha, M. V., J. H. Leitao, E. Mahenthiralingam, P. Vandamme, L. Lito, C. Barreto, M. J. Salgado, and I. Sa-Correia.** 2003. Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. *J Clin Microbiol* **41**:4113-20.

12. **Dalmastri, C., A. Baldwin, S. Tabacchioni, A. Bevivino, E. Mahenthiralingam, L. Chiarini, and C. Dowson.** 2007. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol* **9**:1632-9.
13. **de Oliveira-Garcia, D., M. Dall'Agnol, M. Rosales, A. C. Azzuz, M. B. Martinez, and J. A. Giron.** 2002. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg Infect Dis* **8**:918-23.
14. **Detsika, M. G., J. E. Corkill, M. Magalhaes, K. J. Glendinning, C. A. Hart, and C. Winstanley.** 2003. Molecular typing of, and distribution of genetic markers among, *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. *J Clin Microbiol* **41**:4148-53.
15. **Fux, C. A., M. Shirliff, P. Stoodley, and J. W. Costerton.** 2005. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol* **13**:58-63.
16. **Gohl, O., A. Friedrich, M. Hoppert, and B. Averhoff.** 2006. The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Appl Environ Microbiol* **72**:1394-401.
17. **Goldstein, R., L. Sun, R. Z. Jiang, U. Sajjan, J. F. Forstner, and C. Campanelli.** 1995. Structurally variant classes of pilus appendage fibers coexpressed from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *J Bacteriol* **177**:1039-52.
18. **Harrison, F.** 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **153**:917-923.
19. **Heath, D. G., K. Hohneker, C. Carriker, K. Smith, J. Routh, J. J. LiPuma, R. M. Aris, D. Weber, and P. H. Gilligan.** 2002. Six-year molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates among cystic fibrosis patients at a referral center for lung transplantation. *J Clin Microbiol* **40**:1188-93.
20. **Helm, D., H. Labischinski, and D. Naumann.** 1991. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *Journal of Microbiological Methods* **14**:127-142.
21. **Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn, and D. Naumann.** 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* **137**:69-79.
22. **Helm, D., and D. Naumann.** 1995. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy *. *FEMS Microbiology Letters* **126**:75-79.
23. **Henry, D. A., E. Mahenthiralingam, P. Vandamme, T. Coenye, and D. P. Speert.** 2001. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **39**:1073-8.
24. **Isenberg, H. D.** 2003. *Clinical Microbiology: Past, Present, and Future.* *J. Clin. Microbiol.* **41**:917-918.
25. **Jiang, W., A. Saxena, B. Song, B. B. Ward, T. J. Beveridge, and S. C. B. Myneni.** 2004. Elucidation of Functional Groups on Gram-Positive and Gram-

- Negative Bacterial Surfaces Using Infrared Spectroscopy. *Langmuir* **20**:11433-11442.
26. **Jolliffe, I. T.** 1986. *Principal Component Analysis* Springer, New York.
 27. **Kessler, B., and N. J. Palleroni.** 2000. Taxonomic implications of synthesis of poly-beta-hydroxybutyrate and other poly-beta-hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**:711-3.
 28. **Kirschner, C., K. Maquelin, P. Pina, N. A. Ngo Thi, L.-P. Choo-Smith, G. D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S. M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G. J. Puppels, and D. Naumann.** 2001. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1763-1770.
 29. **Kiska, D., and P. H. Gilligan.** 2003. *Pseudomonas*, p. 719–728. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
 30. **Li-Vien, D., N. B. Colthup, W. G. Fateley, and J. G. Grasselli.** 1991. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, Boston.
 31. **Lima, T. C. S. d., B. M. Grisi, and M. C. M. Bonato.** 1999. Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. *Revista de Microbiologia* **30**:214-224.
 32. **LiPuma, J. J., T. Spilker, L. H. Gill, P. W. Campbell, 3rd, L. Liu, and E. Mahenthalingam.** 2001. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **164**:92-6.
 33. **Mahenthalingam, E., J. Bischof, S. K. Byrne, C. Radomski, J. E. Davies, Y. Av-Gay, and P. Vandamme.** 2000. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* **38**:3165-73.
 34. **Maquelin, K., C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stammler, H. P. Endtz, H. A. Bruining, D. Naumann, and G. J. Puppels.** 2003. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* **41**:324-9.
 35. **Mariey, L., J. P. Signolle, C. Amiel, and J. Travert.** 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* **26**:151-159.
 36. **Miller, M. B., and P. H. Gilligan.** 2003. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **41**:4009-15.
 37. **Miñán, A., A. Bosch, C. Vescina, J. Degrossi, B. Gatti, M. Franco, and O. Yantorno.** 2005. Identificación rápida de bacterias aisladas de pacientes fibroquísticos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariante *Ludovica pediátr* **4**:110-121.

38. **Naumann, D.** 2001. FT-IR and FT-RAMAN spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews* **36**:239 - 298.
39. **Naumann, D.** 2000. Infrared spectroscopy in microbiology, p. 102–131. *In* R. A. Myers (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, Chichester, U.K.
40. **Naumann, D., D. Helm, and H. Labischinski.** 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**:81-2.
41. **Naumann, D., D. Helm, H. Labischinski, and P. Giesbrecht.** 1991. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), p. 43-96. *In* W. H. Nelson (ed.), *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis* VCH, New York, NY.
42. **Naumann, D., S. Keller, D. Helm, C. Schultz, and B. Schrader.** 1995. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. *Journal of Molecular Structure* **347**:399-405.
43. **NCCLS.** 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Approved standard M31-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA.
44. **Parge, H. E., K. T. Forest, M. J. Hickey, D. A. Christensen, E. D. Getzoff, and J. A. Tainer.** 1995. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**:32-8.
45. **Parker, F. S.** 1983. *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Spectroscopy in Biochemistry*. Plenum Press, New York.
46. **Prieto, C. I., M. E. Rodriguez, A. Bosch, F. G. Chirido, and O. M. Yantorno.** 2003. Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili. *Vet Microbiol* **91**:157-68.
47. **Rebuffo-Scheer, C. A., J. Schmitt, and S. Scherer.** 2007. Differentiation of *Listeria monocytogenes* Serovars by Using Artificial Neural Network Analysis of Fourier-Transformed Infrared Spectra. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1036-1040.
48. **Rebuffo, C. A., J. Schmitt, M. Wenning, F. von Stetten, and S. Scherer.** 2006. Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* **72**:994-1000.
49. **Saiman, L., Y. Chen, S. Tabibi, P. San Gabriel, J. Zhou, Z. Liu, L. Lai, and S. Whittier.** 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **39**:3942-5.
50. **Sambrook, J., and D. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
51. **Sandt, C., G. D. Sockalingum, D. Aubert, H. Lapan, C. Lepouse, M. Jaussaud, A. Leon, J. M. Pinon, M. Manfait, and D. Toubas.** 2003. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol* **41**:954-9.

52. **Savitzky, A., and M. J. E. Golay.** 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* **36**:1627-1639.
53. **Schmitt, J., and T. Udelhoven.** 2001. Use of artificial neural networks in biomedical diagnosis. *In* B. Yan (ed.), *Infrared and Raman spectroscopy of biological materials*. Marcel Dekker, New York, NY.
54. **Schmitt, J., T. Udelhoven, D. Naumann, and H. C. Flemming.** 1998. Stacked spectral data processing and artificial neural networks applied to FT-IR and FT-Raman spectra in biomedical applications, p. 237-243. *In* H. H. Mantsch and M. Jackson (ed.), *Infrared Spectroscopy: A New Tool in Medicine*, vol. 3257. Proc SPIE.
55. **Schreckenberger, P. C., M. Daneshvar, W. R., and D. Hollis.** 2003. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and other nonfermentative gram-negative rods.* *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. M. Tenover, M. A. Tenover, M. A. Pfaller, and Y. R. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
56. **Seo, S.-T., and K. Tsuchiya.** 2005. Genotypic characterization of *Burkholderia cenocepacia* strains by rep-PCR and PCR RFLP of the *fliC* gene. *FEMS Microbiology Letters* **245**:19-24.
57. **Serra, D., A. Bosch, D. M. Russo, M. E. Rodriguez, A. Zorreguieta, J. Schmitt, D. Naumann, and O. Yantorno.** 2007. Continuous nondestructive monitoring of *Bordetella pertussis* biofilms by Fourier transform infrared spectroscopy and other corroborative techniques. *Anal Bioanal Chem* **387**:1759-67.
58. **Smith, B.** 1996. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press, Washington, DC.
59. **Speert, D. P., D. Henry, P. Vandamme, M. Corey, and E. Mahenthiralingam.** 2002. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* **8**:181-7.
60. **Udelhoven, T., D. Naumann, and J. Schmitt.** 2000. Development of a Hierarchical Classification System with Artificial Neural Networks and FT-IR Spectra for the Identification of Bacteria. *Appl. Spectrosc.* **54**:1471-1479.
61. **Vandamme, P., B. Holmes, T. Coenye, J. Goris, E. Mahenthiralingam, J. J. LiPuma, and J. R. Govan.** 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. *Res Microbiol* **154**:91-6.
62. **Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters, and J. R. Govan.** 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1188-200.
63. **Vanlaere, E., A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E. De Brandt, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, D. P. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme.** 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:102-11.

64. **Vermis, K., T. Coenye, E. Mahenthiralingam, H. J. Nelis, and P. Vandamme.** 2002. Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol* **51**:937-40.
65. **Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
66. **Zhou, J., E. Garber, M. Desai, and L. Saiman.** 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.

Discriminación e identificación de organismos pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*, en muestras de esputo de paciente fibroquísticos, mediante espectrometría de masa MALDI-TOF

3.1 INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROMETRÍA DE MASA

3.1.1 Historia y desarrollo de la espectrometría de masa MALDI-ToF

La identificación rápida y confiable de microorganismos patógenos se ha convertido en un desafío analítico importante debido a su fuerte impacto tanto en el área de salud, como de control de alimentos, diagnóstico clínico y la lucha contra el bioterrorismo. En la última década, la espectrometría de masa (EM) MALDI-ToF ha emergido como una técnica prometedora en la caracterización, discriminación e identificación de microorganismos, con resultados equivalentes a los métodos moleculares [5, 19, 36, 54, 65, 69, 72, 79].

Los primeros estudios que sugerían la aplicación de la EM en la caracterización de bacterias fueron publicados en 1975 [1]. Posteriormente, distintos grupos de investigación realizaron una serie de trabajos pioneros en el empleo de EM aplicado al análisis taxonómico bacteriano mediante bombardeo atómico rápido, pirolisis, desorción por laser/ionización, y desorción por plasma [14, 29-30, 60]. Sin embargo las técnicas de ionización empleadas por estos métodos proporcionaban información limitada sobre los microorganismos y algunas de ellas requerían de una tediosa preparación de muestras previo al análisis [10, 23, 29-30, 61, 85]. A fines de los 80's, el desarrollo de la técnica de ionización suave MALDI-ToF presentó algunas ventajas sobre las técnicas de ionización mencionadas anteriormente, que incluía mayor sensibilidad y la capacidad de analizar un amplio rango de masas [39, 55]. Este significativo avance dió lugar a la publicación de los primeros trabajos que demostraban el éxito de la EM MALDI-ToF aplicada a la identificación bacteriana [39, 71]. Posteriormente, se proponen los primeros protocolos de identificación empleando células enteras, los cuales se destacan por no requerir de un procesamiento previo al análisis por MALDI-ToF [11, 33, 41]. De esta manera son identificadas bacterias patógenas como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y *Brucella meliteusis* [33, 41]. Desde entonces, el número de publicaciones relacionadas no sólo a la identificación bacteriana, sino también a la de levaduras y hongos filamentosos ha aumentado en forma sostenida.

3.1.2 Principios de la espectroscopía de masa MALDI-ToF

El instrumento empleado en la EM MALDI-ToF es el espectrómetro de masas, el cual está constituido por 3 componentes principales: una fuente de iones (MALDI), un analizador de masa (ToF) y un detector como se muestra en la Fig. 1 A.

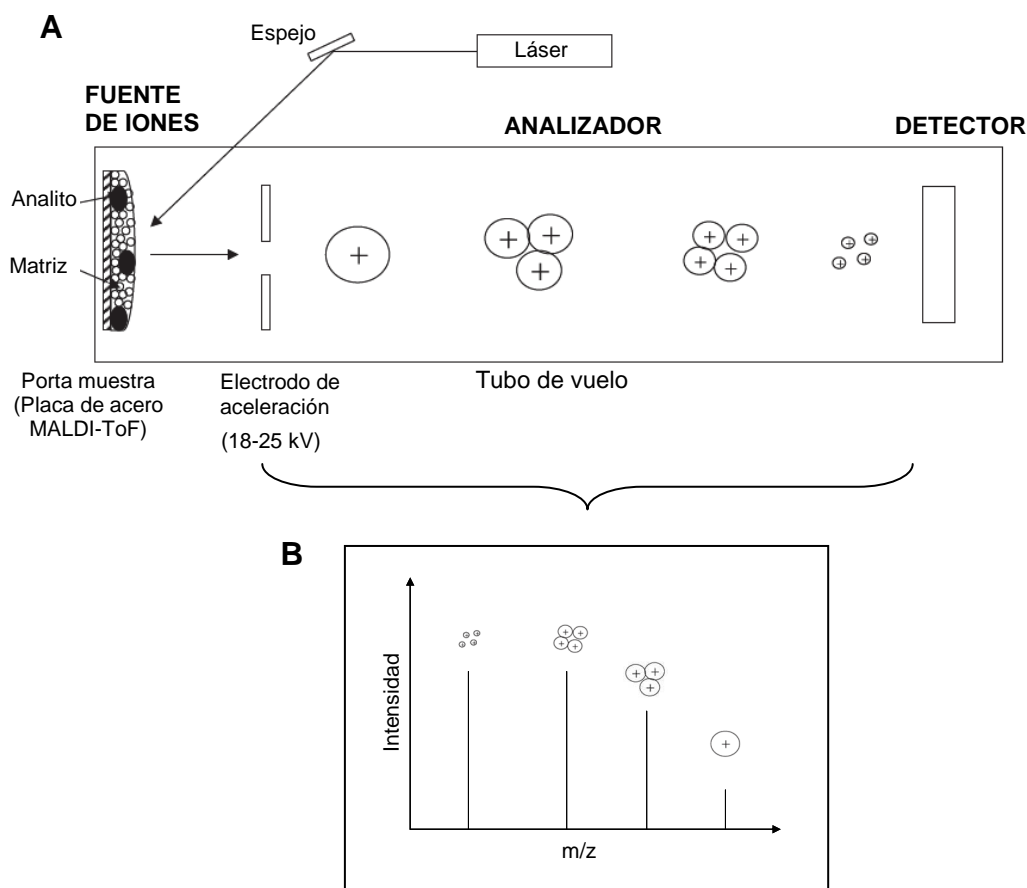


Fig. 1. Principio de la espectrometría de masa MALDI-ToF. (A) El analito mezclado con una solución saturada de la matriz forma cristales. La radiación láser sobre esta mezcla produce la ionización del analito. Los iones generados se aceleran en un campo eléctrico (Fuente de iones) y cruzan el tubo del vuelo para llegar finalmente al detector. Los iones con menor relación masa-carga (m/z) alcanzan primero el detector comparado con los de mayor peso. (B) Espectro de masa que representa la intensidad de los iones analizados en función de la relación m/z . Figura adaptada de Marvin y cols [55].

El principio de funcionamiento de este equipo se basa en la generación de iones por desorción e ionización mediante la inducción por láser, el cual habitualmente corresponde a UV de nitrógeno, 337 nm. Para el estudio, el analito (ej. cultivo bacteriano) se mezcla con una solución saturada de una matriz apropiada que al evaporarse el solvente co-cristalizan sobre la placa de acero MALDI-ToF. Esta

preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que las moléculas de la muestra sean desorbidas como moléculas gaseosas e ionizadas [38]. De esta manera, la matriz realiza dos tareas en forma simultánea, acoplar la energía del láser a la muestra y mediar una reacción de transferencia de protón (carga) al analito formando un ión. Los iones generados se aceleran en un campo eléctrico y se dirigen al analizador de masa el cual no posee campo eléctrico. Dentro tubo de vuelo del espectrómetro de masa, los iones poseen la misma energía cinética y serán separados por su relación masa-carga (m/z) (Fig. 1 A). Considerando que existe un predominio de iones con una sola carga, el ión mas liviano llegará antes al detector y luego los más pesados [82]. Así en función del tiempo del vuelo se pueden calcular las masas de manera simple y precisa, siendo el resultado final un espectro de masas relativamente fácil de interpretar (Fig. 1 B). Debido a que MALDI-ToF es una técnica de ionización suave genera iones de moléculas enteras sin fragmentación del analito. Es importante destacar, que la presencia de dos iones con el mismo valor m/z no corresponden necesariamente a la misma molécula [62].

3.1.3 EM MALDI-ToF, un nuevo enfoque en la identificación bacteriana

Las principales actividades del laboratorio de microbiología clínica se dirigen al aislamiento, identificación y posterior determinación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Como se ha mencionado anteriormente los métodos rutinarios de identificación bacteriana se basan principalmente en la determinación de actividades metabólicas (conjunto de ensayos químicos). Desafortunadamente estos ensayos al presentar limitaciones en la identificación final a nivel de especie, requieren en muchos casos del empleo de métodos genéticos de mayor costo y complejidad que aseguran certeza en la identificación. Por estos motivos en el ámbito clínico es prioritario contar con métodos de identificación microbiológica que sean lo suficientemente sensibles, rápidos, reproducibles, discriminativos y de ser posible de bajo costo. Una técnica que cumple ampliamente con estos requisitos es EM MALDI-ToF. Su utilidad y confiabilidad le ha permitido encontrar un lugar en el campo de la microbiología, en particular como una técnica adecuada para el análisis microbiológico [2, 33, 58]. Sin duda, uno de los aspectos más relevantes y atractivos de esta metodología, es la facilidad de la preparación de la muestra (Fig. 2) y la reproducibilidad de las medidas

[19, 40, 62, 76]. Así, esta técnica es capaz de obtener información de células bacterianas enteras sin necesidad de recurrir a procedimientos de lisis celular o extracción de péptidos y proteínas como requisito previo al análisis. La única condición necesaria para obtener espectros reproducibles es, como en el caso de la espectroscopía IR, la estandarización de la preparación de la muestra, lo cual permitirá una comparación de los resultados intra e inter-laboratorio.

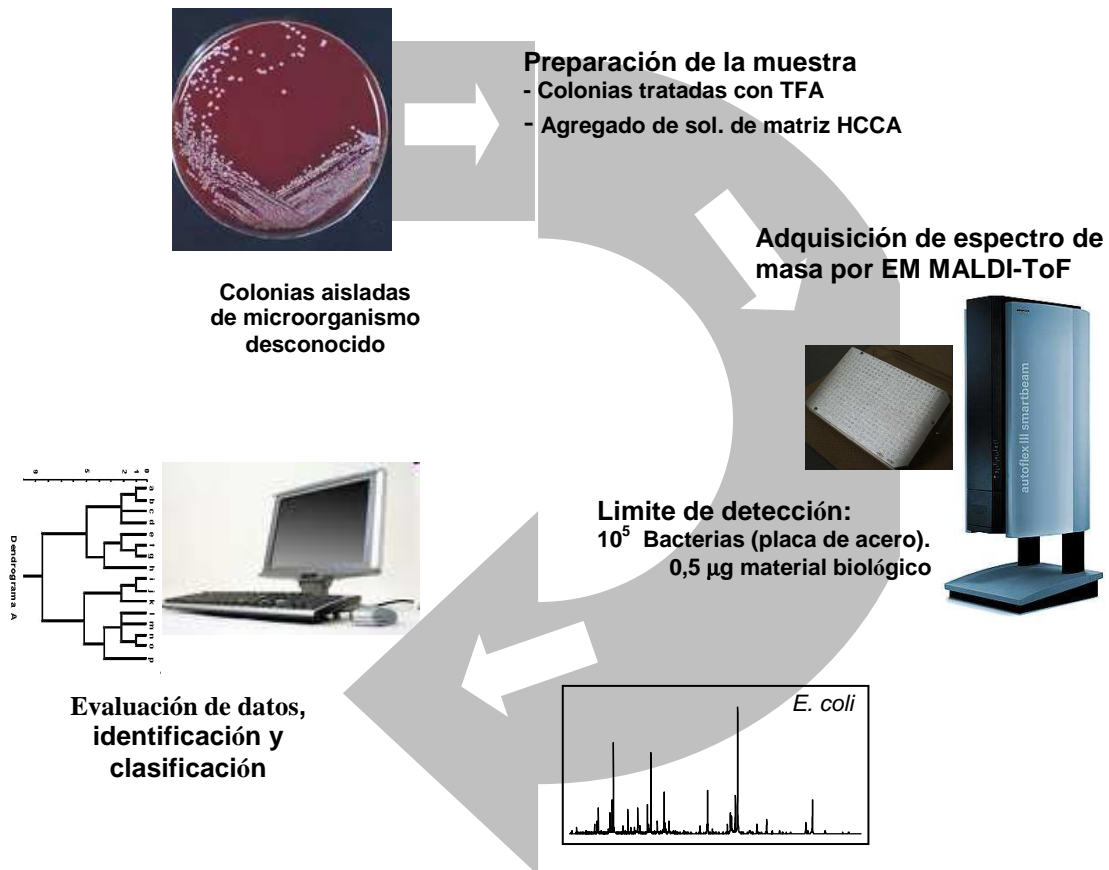


Fig. 2. Esquema de la aplicación de EM MALDI-ToF en microbiología. Etapas de preparación de la muestra, adquisición y análisis de datos.

Los espectros de masa bacterianos proveen información sobre la composición de proteínas específicas de una cepa microbiana individual y así son considerados como “huellas digitales” espectrales. En general, los iones formados por EM MALDI-ToF de células enteras (EMCE/MALDI-ToF) son oligopéptidos y proteínas pequeñas cuya masa molecular varía entre 2 - 20 kDa y que ionizan rápidamente [48, 83]. La Fig. 3 A muestra el perfil de picos de masa característico de bacterias Gram-negativas pertenecientes a diversos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Como se puede

apreciar en la figura algunos picos son comunes a todos los microorganismos mientras que otros pueden ser considerados como marcadores de género. En la Fig. 3 B se muestran dos espectros ampliados correspondientes a aislados de *Proteus mirabilis* y *Salmonella typhi* donde se detallan proteínas comunes y distintivas de ambos géneros.

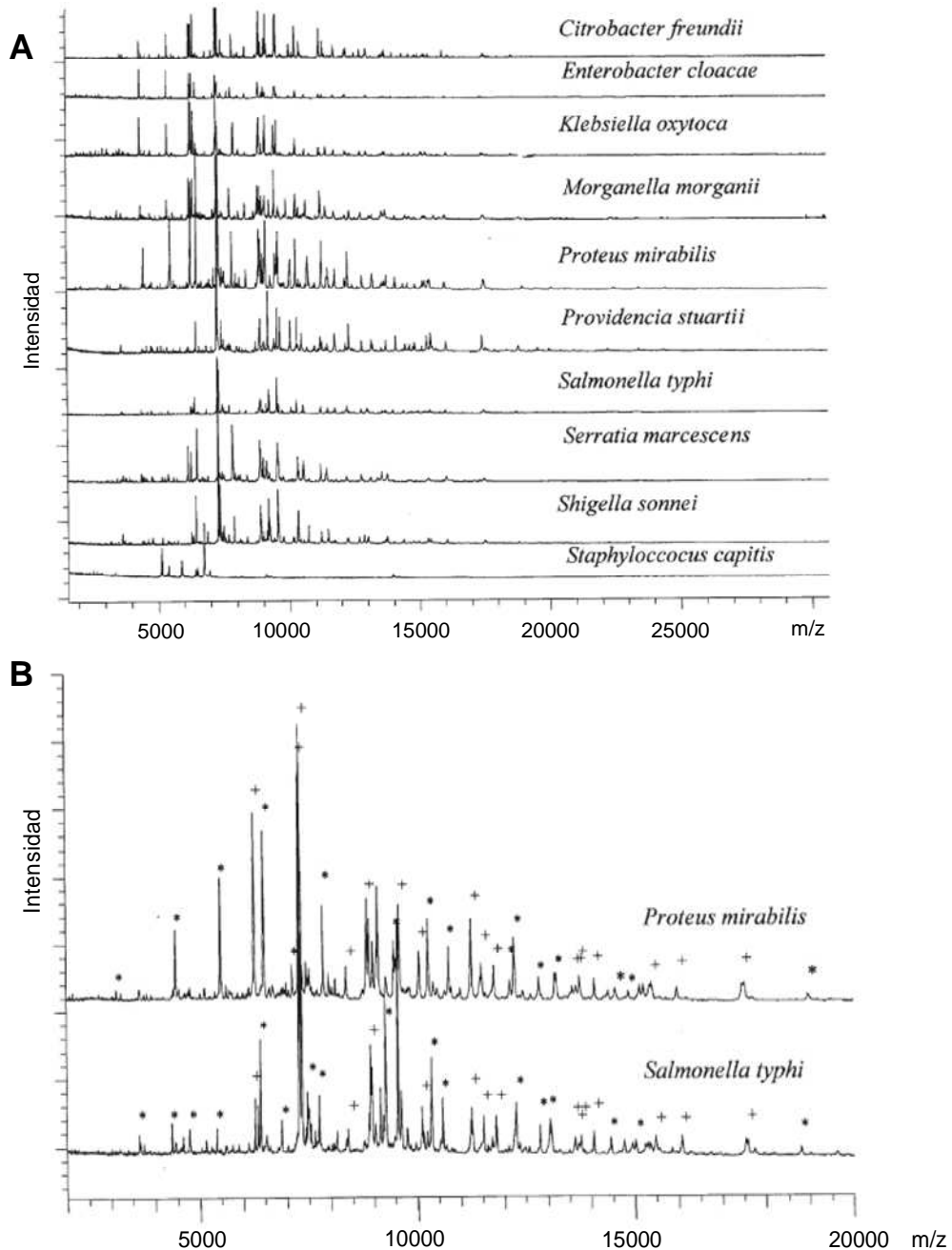


Fig. 3. Análisis de espectros de masa MALDI-ToF de aislados clínicos correspondientes a nueve géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. (A) Aunque algunos picos fueron comunes a la mayoría de los microorganismos, se detectó un gran número de marcadores específicos a nivel de género. (B) Espectros ampliados de aislados clínicos de *Proteus mirabilis* y *Salmonella typhi*. Para estos dos aislados, los símbolos (+ y *) indican los picos comunes y únicos respectivamente. Figura tomada de Conway y cols [12].

Los picos del espectro de masa de células enteras en el rango de 2 – 20 kDa fueron atribuidos tanto a proteínas que constituyen la pared bacteriana como a proteínas citoplasmáticas que se encuentran en alta proporción [31, 41]. En este sentido Mandrell y cols [54], reportaron que proteínas de expresión constitutiva como las que componen las subunidades ribosomales, proteínas chaperonas y homólogos de proteínas HU se encontraban presentes en espectros de bacterias del género *Campylobacter*. Posiblemente la robustez y reproducibilidad del espectro bacteriano se debe en gran medida a la presencia de estas proteínas citoplasmáticas cuya basicidad favorece la ionización y detección en el rango de 2-20 kDa.

La EM MALDI-ToF puede ser usada para discriminar bacterias a nivel de especie y subespecie mediante la identificación de un conjunto distintivo de picos proteicos, conocidos como proteína biomarcadoras específicas de identificación (Specific Identifying Biomarker Proteins, SIBPs) [31, 54, 66]. Asimismo, se ha reportado que la EM MALDI-ToF puede identificar bacterias desconocidas mediante una comparación del perfil de masas frente a una base de datos espectral validada con microorganismos de referencia aplicando algoritmos de software específicos [2, 7, 33].

3.1.4 Consideraciones experimentales en EM MALDI-ToF

La EM MALDI-ToF es una técnica sumamente sensible, razón por la cual, pequeños cambios en las condiciones de preparación de la muestra, o en la adquisición de los datos (parámetros instrumentales), afectan significativamente al espectro resultante y por ende la reproducibilidad espectral. La calidad de la información contenida en los espectros de masa, número de picos e intensidad, se encuentra fuertemente influenciada por una amplia variedad de parámetros. Entre los más relevantes se pueden mencionar las condiciones de cultivo de la bacteria (medio, temperatura y tiempo de cultivo), matriz empleada en MALDI, contenido de sales, concentración de ácido y el solvente en el cual la bacteria es suspendida. Por tanto es de vital importancia en la adquisición de espectros de masa MALDI-ToF contar con un procedimiento estandarizado a fin de obtener resultados reproducibles que permitan una precisa y certera identificación bacteriana.

Numerosos trabajos abocados a la identificación de bacterias por EM MALDI-ToF han sido publicados utilizando diferentes protocolos de preparación de muestra

logrando resultados exitosos [19, 26, 45, 54, 56], aún a nivel inter-laboratorio [57, 84]. Asimismo se ha propuesto el empleo de un protocolo universal para la identificación de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas y aun esporos [50]. La elevada homología existente entre varias especies bacterianas (ej. *Campylobacter spp.* y el complejo *Burkholderia cepacia*) representa en la actualidad un desafío, el cual podría demandar del empleo de protocolos de preparación de muestras específicos que puedan discriminar las diferencias existentes entre las mismas.

3.1.4.1 Preparación de los cultivos e influencia del medio de cultivo en el espectro bacteriano

A- Cultivos microbianos

Los microorganismos son cultivados respetando las condiciones necesarias para su óptimo desarrollo, como medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de cultivo, etc. Habitualmente el análisis por EM MALDI-ToF se realiza sobre cultivos bacterianos puros crecidos en medios sólidos. Este modo de cultivo permite obtener una cantidad de muestra suficiente que posibilita una manipulación simple y al mismo tiempo trabajar con sólo un tipo de microorganismo.

B- Influencia del medio de cultivo en el espectro bacteriano

Ciertamente el medio de cultivo es uno de los parámetros del cual se esperaría un profundo efecto en el espectro bacteriano, en particular los diferentes medios podrían alterar tanto el perfil de biomarcadores específicos bacterianos como así también los iones correspondientes a esos medios (background). Sin embargo se ha observado que este fenómeno no resulta significativo como se había postulado en un principio. Un ejemplo es el comportamiento de los espectros de masa de *Shigella flexneri* cultivada en tres medios de cultivos diferentes [47], donde se aprecian cambios mínimos en el número e intensidad de los picos específicos de identificación bacteriana. La presencia de estos picos comunes en todos los medios de cultivos se podría explicar por la expresión constitutiva de diversos genes que realizan en la célula funciones de mantenimiento (housekeeping). Estas funciones son requeridas a pesar de los cambios metabólicos que la célula pueda experimentar al crecer en los diferentes medios de

cultivos. Por este motivo no sería sorprendente encontrar un conjunto de proteínas de bajo peso molecular que se expresen en forma constitutiva y que de lugar a iones que se aprecien finalmente en el espectro MALDI-ToF [74].

Este comportamiento es sin duda importante al momento de construir una base de datos espectral, dado que no siempre un mismo medio de cultivo puede ser usado para el crecimiento de todos los microorganismos. Uno de los medios empleados en la EM MALDI-ToF es el agar tripticasa soja (ATS), el cual posibilita el crecimiento adecuado de un gran número de microorganismos, en particular Bacilos Gram-negativos no fermentadores de la glucosa [58]. En el caso de microorganismos con mayores requerimientos nutricionales pueden emplearse medios específicos. Los espectros de masa procedentes de bacterias crecidas en agar sangre pueden presentar señales por debajo de los 3 kDa y por encima de los 15 kDa, las cuales estarían asociadas a proteínas de la sangre empleada en la preparación del medio. Esta interferencia puede ser fácilmente resuelta por diferencia entre el espectro bacteriano y el espectro background del medio con sangre.

3.1.4.2 Efecto del tiempo de cultivo

La fase de crecimiento bacteriano es considerada uno de los parámetros que ejerce mayor influencia sobre el espectro bacteriano. Un estudio realizado por Arnold y cols [2] indicó que los espectros MALDI-ToF de cultivos de *E. coli* crecidos por períodos de tiempo de 6 a 84 h, presentan variaciones considerables en la intensidad y números de picos. En otros microorganismos tales como *Helicobacter pylori* y *Arthrobacter* se han observado alteraciones en el espectro de masa a raíz de los cambios morfológicos y en la composición de la pared celular que sufren estas especies durante su ciclo de crecimiento [13, 79]. Por tanto es fundamental, en todo protocolo de preparación de muestra, establecer y respetar estrictamente el tiempo de cultivo del microorganismo a efectos de obtener resultados reproducibles.

3.1.4.3 Procedimiento de preparación de muestra

Varios procedimientos de preparación de muestras basados en productos de lisis celular, extractos bacterianos crudos, o células enteras han sido aplicados para la identificación por EM MALDI-ToF de una gran variedad de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, cianobacterias, hongos y protozoarios [18-19, 34, 40, 45-46, 49, 56, 77]. De todos estos procedimientos, la EMCE/MALDI-ToF es la más simple. Esta metodología consiste en depositar una pequeña colonia del microorganismo directamente sobre la placa de acero de MALDI formando una película delgada, a la cual se le agrega una matriz apropiada (generalmente 1 μ l), y se deja secar a temperatura ambiente. Con el objeto de minimizar los riesgos de exposición del personal de laboratorio a los microorganismos en estudio, las células obtenidas de cultivos líquidos ó sólidos se suspenden en soluciones que deberán ser capaces de inactivar a estos microorganismos antes de ser transferidos al laboratorio de espectroscopía de masa. En este sentido Lasch y cols [45] desarrollaron un protocolo de inactivación de microorganismos altamente patogénicos, basado en el empleo de TFA concentrado como inactivante de células vegetativas y esporos. Así como puede observarse en la Fig. 4, los microorganismos reciben un pre-tratamiento mínimo el cual consiste en tres pasos:

- a) Preparación de la suspensión bacteriana: El contenido de 3 ansadas (diámetro 1-mm) se suspende en 20 μ l de agua grado HPLC.
- b) Agregado de TFA al 80% a la suspensión bacteriana por 30 min.
- c) Dilución 1:10 de la suspensión bacteriana.

Posteriormente se realiza una mezcla 1:1 entre la dilución 1:10 de la suspensión bacteriana y la solución saturada de la matriz, se deposita en la placa de acero MALDI-ToF, y se seca a temperatura ambiente. Como último paso se mide la muestra en el espectrómetro de masa MALDI-ToF.

Este simple procedimiento demostró que el tratamiento de la suspensión bacteriana con TFA al 80% por 30 min permite la inactivación total de células vegetativas correspondientes a 4 géneros bacterianos como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Escherichia*, y *Yersinia*. Asimismo los espectros obtenidos mediante este protocolo de inactivación mostraron un perfil de picos de masa consistentes con el observado en la técnica de EMCE/MALDI-ToF convencional. Es importante mencionar que en esta metodología el TFA no solo posee un efecto inactivador de los microorganismos sino

que también actúa como solvente orgánico pudiendo disolver efectivamente las proteínas microbianas ejerciendo una fuerte influencia en el espectro resultante (ver ítem 3.1.4.4). Asimismo el paso de dilución es crítico ya que permite prácticamente la precipitación completa de las proteínas microbianas disueltas. Finalmente, este procedimiento de inactivación demostró ser simple, rápido y particularmente efectivo en bacterias del género *Burkholderia*.

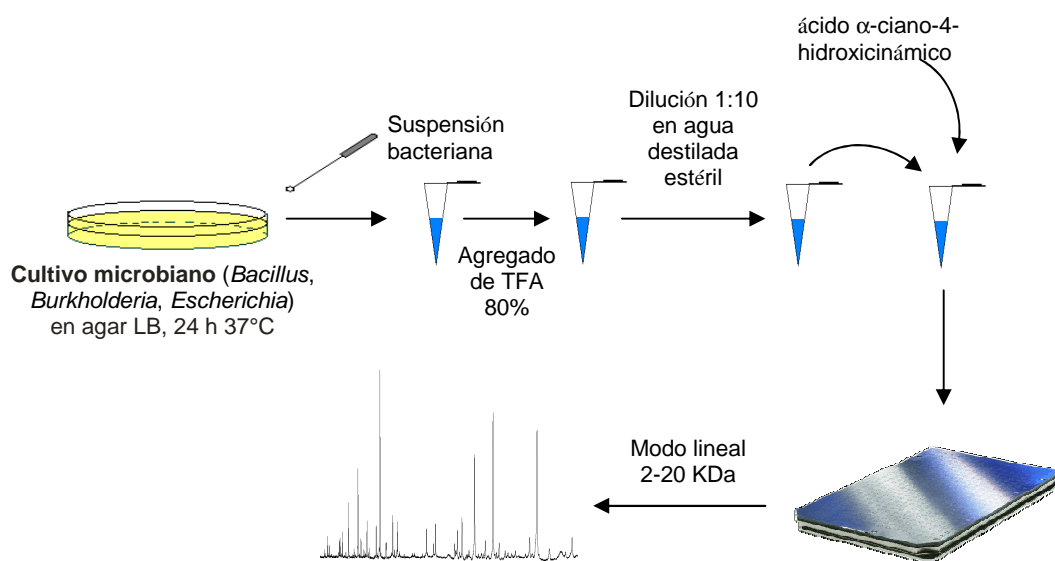


Fig. 4. Protocolo de inactivación por TFA de células vegetativas de microorganismos patógenos. Abreviatura: LB, Luria Bertani.

3.1.4.4 Efecto de la matriz y solventes en el análisis bacteriano

Como fue mencionado anteriormente, la matriz participa activamente en el proceso de ionización del analito ósea del cultivo bacteriano, teniendo así un efecto directo en la calidad del espectro obtenido. Por tanto, es de suma importancia la correcta elección de la matriz ya que ésta condiciona el rango de las moléculas que se ionizarán y la intensidad de los iones correspondientes a componentes específicos como proteínas, lípidos o nucleótidos [79]. De esta manera, una matriz adecuada puede mejorar el espectro, incrementando la sensibilidad, la relación señal-ruido y reducir las señales de fondo [12, 59]. Entre las matrices comúnmente empleadas en la identificación de bacterias por EM MALDI-ToF podemos mencionar al ácido α -ciano-4-hidroxi-

cinámico (ACHC), ácido sinápico (AS), y ácido 2,5 dihidroxibenzoico (Tabla 1) [55]. La matriz se disuelve en una mezcla de solventes, constituida en general por agua de elevado grado de pureza, un solvente orgánico (etanol o acetonitrilo), y un ácido como el ácido trifluoroacético (TFA), los cuales influyen significativamente en la calidad del espectro masa [46, 62, 75]. Este hecho podría explicarse por un lado a la acción de estos solventes sobre la superficie de la célula bacteriana. Algunos de ellos son capaces de formar “pequeños huecos” en la superficie de la célula permitiendo así la salida de componentes bacterianos que posteriormente serán analizados en el espectro de masa. Por el otro a la solubilidad de proteínas y péptidos en dichos solventes, la cual dependerá del grado de hidrofobicidad y punto isoeléctrico en un solvente determinado. Actualmente se piensa que la acidez ayuda a la extracción de proteínas de la pared e incrementa la eficiencia de la ionización. Al mismo tiempo, el ácido posibilita la ruptura celular lo cual es beneficioso porque libera los componentes celulares, simplificando así la preparación de la muestra evitando el paso de lisis celular [46].

Tabla 1. Matrices comúnmente empleadas en espectrometría de masa MALDI-ToF

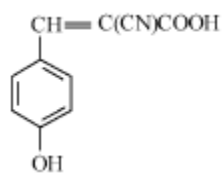
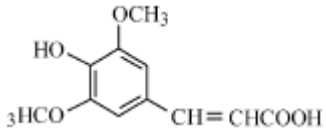
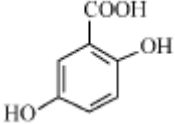
Matriz	Estructura	Moléculas
ACHC ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico		Péptidos
Ácido Sinápico (AS) ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico		Proteínas, polímeros
Ácido Gentísico (DHB) ácido 2,5-dihidroxibenzoico		Péptidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y sacáridos

Tabla adaptada del trabajo publicado por Marvin y cols [55]

La elección de una matriz adecuada para el análisis de bacterias es un tema que despierta cierta controversia. Si bien se han estudiado diversas matrices, la mayoría de los trabajos enfocados al análisis de proteínas emplean ACHC y AS [25]. Los resultados de los primeros trabajos de discriminación bacteriana indicaban que el empleo de ACHC proporcionaba espectros de masa de calidad superior comparados con los obtenidos con otras matrices. Posteriormente, algunos trabajos mencionaban que el AS

en determinadas condiciones podía proporcionar espectros equivalentes o mejores que los obtenidos con ACHC [12, 81]. Vargha y cols [79] también obtuvieron buenos resultados con ambas matrices aunque cada una exhibe ciertas ventajas. Así, el empleo de ACHC produjo espectros con mayor relación señal/ruido y sensibilidad mientras que AS presentó mejor resolución y permitió el reconocimiento de más biomoléculas, un hecho que puede tornarse relevante en la diferenciación de cepas por EM MALDI-ToF cuando el número de picos distinguibles es limitado.

Todos estos trabajos sugieren que probablemente el ACHC y AS son matrices que proporcionan espectros de calidad adecuada para el análisis de bacterias, sin embargo la elección final dependerá de los objetivos experimentales.

3.1.5 Discriminación e identificación de bacterias por EM MALDI-ToF

La aplicación de la EM MALDI-ToF permite obtener un perfil único de biomarcadores de bacterias enteras. La presencia de picos (iones) en el espectro se encuentra asociada a péptidos o proteínas enteras que pueden ser usadas como biomarcadores para la identificación de bacterias [75]. Como se ha mencionado anteriormente es de suma importancia en este tipo de análisis, emplear protocolos estandarizados que aseguren la reproducibilidad espectral. Asimismo una misma cepa bacteriana analizada bajo distintos protocolos de preparación produce diferentes perfiles espectrales aunque estos en general comparten picos en común [56]. Por este motivo, esta estrategia de identificación puede exhibir un mayor grado de robustez si se consideran los biomarcadores específicos conservados en diferentes protocolos de preparación.

El análisis de proteínas biomarcadoras específicas en el espectro MALDI-ToF de células enteras puede ser asistido por software mediante una aplicación denominada “gel view” ó “vista en gel” incluida en el software MASS desarrollado por el Dr. Peter Lasch del Instituto Robert Koch de Berlín. Esta herramienta permite la visualización global de los biomarcadores microbianos empleando rutinas de MATLAB, las cuales generan una vista simulada “tipo gel” (semejante a un gel de proteínas SDS PAGE) del espectro de masa microbiano, facilitando así la selección de picos de masa candidatos para la discriminación e identificación de microorganismos. En la Fig. 5 se muestra la vista en gel de dos cepas *E. coli* RKI A139 y *B. thuringiensis* DSM 350 donde se

aprecian proteínas biomarcadoras específicas correspondientes a dichas cepas. Asimismo este tipo de representación ilustra de manera clara y práctica el alto grado de reproducibilidad espectral en ambos microorganismos. Por tanto a través de la inspección visual de estas vistas en gel, se pueden seleccionar las proteínas biomarcadoras específicas que permitan la discriminación e identificación de diversas especies bacterianas.

Basados en el concepto de biomarcadores, la EM MALDI-ToF puede emplearse en la diferenciación de microorganismos a nivel de género, especie y aun de cepa [20, 46]. Estos biomarcadores específicos han sido ampliamente reportados y usados para la identificación de una gran variedad de microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos y hongos [9, 21, 32, 40, 54, 66-69].

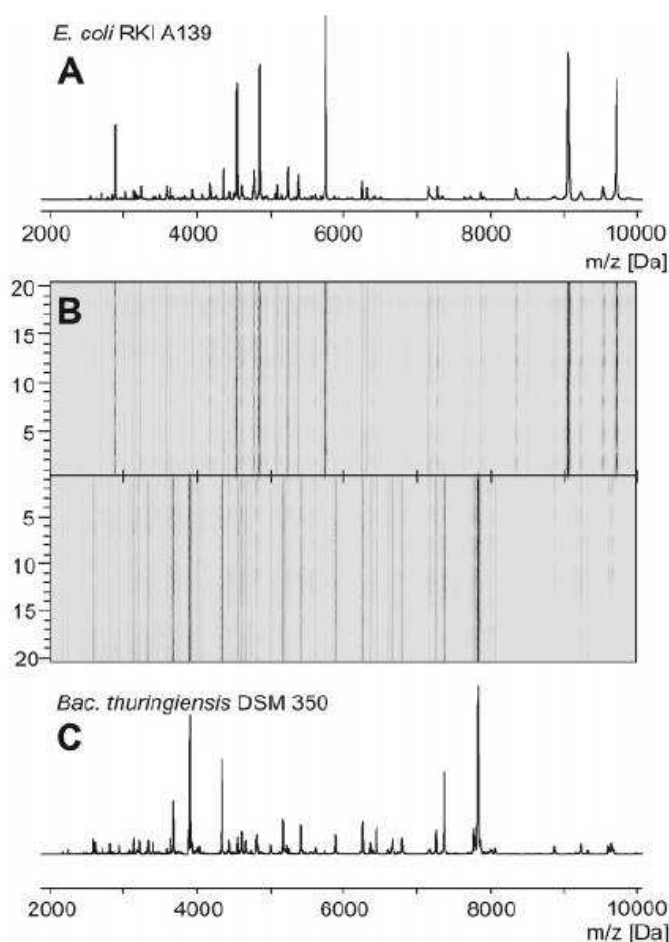


Fig. 5. Análisis de reproducibilidad de espectros de masa MALDI-ToF mediante la aplicación de “gel view” o “vista en gel”. El panel A muestra un espectro de masa representativo de *E. coli* RKI A139, y el panel C muestra un espectro de *B. thuringiensis* DSM 350. Para generar la vista en gel en el panel B, se emplearon 20 espectros individuales obtenidos de cuatro cultivos independientes de *E. coli* y *B. thuringiensis*, las intensidades de dichos espectros fueron representadas en escala de grises y en función de los valores de m/z . Figura tomada del trabajo publicado por Lasch y cols [45].

Aunque existe cierta controversia sobre el uso de EM MALDI-ToF en la diferenciación de cepas, se pueden apreciar sutiles diferencias entre los perfiles de masa de cepas, si el procedimiento se encuentra debidamente estandarizado. Diversos trabajos

han demostrado su aplicación como herramienta de identificación a nivel de cepa de patógenos hospitalarios como *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles a meticilina [4, 22, 24, 35, 53, 80], diferenciación de cepas de *Streptococci* [42, 63], *Haemophilus* [27] y *Pseudomonas putida* [72]. Asimismo Mandrell y cols [54] emplearon EM MALDI-ToF en la identificación y diferenciación de cepas pertenecientes a un grupo de especies estrechamente relacionadas del género *Campylobacter*. La EM MALDI-ToF probó también ser útil en la diferenciación de aislados de *E. coli* y *Arthrobacter* procedentes de diversas fuentes ambientales [67, 79].

Al momento de iniciar este trabajo, la identificación por EM MALDI-ToF de miembros del cBc y BNF se encontraba limitada a unas pocas especies [40, 44]. Posteriormente Mellmann y cols [58] desarrollaron un sistema de identificación de BNF basado en el empleo de una base de datos MALDI-ToF de referencia. Estos autores propusieron un protocolo de extracción de proteínas bacterianas con el cual crearon una base de datos MALDI-ToF que contenía espectros de masa de 248 cepas de referencia pertenecientes a 37 géneros de BNF. Este sistema de identificación obtuvo resultados satisfactorios al ser desafiado frente a 80 aislados correspondientes a BNF de relevancia clínica. Sin embargo no se utilizaron aislados clínicos pertenecientes al cBc, por lo cual no fue posible evaluar el poder discriminatorio y la robustez de esta metodología frente a especies estrechamente relacionadas del complejo. En paralelo Degand y cols [16] diseñaron una base de datos para la identificación de 58 especies de BNF de relevancia clínica por EMCE/MALDI-ToF. La estrategia empleada en este análisis se basó en la determinación de picos conservados en el espectro de masa de cepas de referencia correspondientes a una misma especie bacteriana, los cuales fueron empleados para la construcción de una base de datos de referencia. Posteriormente se evaluó esta base de datos comparando el perfil de picos correspondientes aislados clínicos correctamente identificados. El sistema de identificación desarrollado alcanzó correctas identificaciones en la mayoría de los BNF con excepción de especies del cBc y de género *Ralstonia*. Por este motivo estos autores recurrieron a la creación de bases de datos especializadas, usando un mayor número de cepas de referencia del cBc y especies del género *Ralstonia* con el objeto de mejorar la identificación de aislados clínicos. Esta estrategia permitió la correcta identificación de miembros formales del cBc aunque la diferenciación de *B. cepacia* y *B. cenocepacia* requirió de la asistencia

del operador, por verificación de la presencia de un pico de 7546 Da en el espectro de *B. cepacia* y de su ausencia en *B. cenocepacia*.

Aunque en ese entonces la EM MALDI-ToF emergía como una herramienta prometedora para la identificación de BNF, era aun necesario contar con una metodología simple, que permitiera el manejo en forma segura de microorganismos potencialmente peligrosos, y que posibilite tanto la identificación precisa de especies formales y de nuevas especies del cBc, como su diferenciación de otros BNF. Por este motivo en nuestro trabajo se propuso el empleo de un simple protocolo de inactivación de células vegetativas basado en TFA [45] y se evaluó la capacidad de la EMCE/MALDI-ToF en la discriminación e identificación de los miembros del cBc incluyendo la nueva especie *B. contaminans* perteneciente al Taxón K mediante enfoques basados tanto en la presencia de biomarcadores específicos como en análisis multivariante.

3.1.6 Quemometría

La identificación y discriminación bacteriana por EM MALDI-ToF puede ser optimizada a través del empleo de herramientas informáticas de análisis de perfiles de masa. Como hemos visto previamente en el capítulo anterior (ver ítem 2.1.2.6), los métodos de análisis multivariante no supervisados como el AJC permiten la comparación de perfiles o listas de picos de cepas bacterianas revelando agrupamientos de especies taxonómicamente relevantes y aún intraespecíficos [19, 26, 56].

La información contenida en el espectro MALDI-ToF deberá ser sometida a un pre-procesamiento de datos como paso previo al análisis multivariante. Los espectros de masa que no han sido procesados se denominan “espectros crudos” y son exportados por el espectrómetro de masa MALDI-ToF como una lista de picos que expresa la intensidad en función de los correspondientes valores m/z . Este pre-procesamiento del espectro crudo consistirá, al igual que en la espectroscopía FT-IR, en la corrección de la línea de base, normalización y suavizado (smoothing) mediante rutinas que se encuentran disponibles en el software MASS. A causa de la vasta información contenida en un espectro de masa crudo, alrededor de 2×10^5 valores de intensidad (1 valor de intensidad cada 0,1 Da) en un rango de hasta 20 kDa, el mismo no podrá ser usado directamente para el análisis multivariado ya que excede el límite de datos de

entrada aceptado por cualquier software. Por este motivo el espectro crudo deberá ser sujeto a un procedimiento de reducción de datos que mejore el manejo de los mismos y posibilite un rápido análisis. Para ello, una aplicación contenida en el software MASS permite la reducción de la información mediante la selección de los picos más intensos del espectro crudo. De esta manera el usuario puede establecer el número de picos del espectro con el cual realizará el análisis multivariante (generalmente 30 a 50 picos más intensos en el rango de 2 a 20 kDa), generando un perfil de picos reducido. Estos perfiles o lista de picos reducidos son característicos de cada microorganismo y podrán ser utilizados para el análisis multivariante (AJC ó ACP) de múltiples muestras. Asimismo se podrá considerar ó excluir del análisis la información relacionada a la intensidad de los picos que constituye la lista reducida, en este último caso el análisis multivariante se basará solamente en la presencia o ausencia de los picos que caracterizan al microorganismo en estudio. En el AJC la similitud entre dos espectros se expresa como distancia espectral o heterogeneidad luego de aplicar el algoritmo de Simple Linkage o Ward respectivamente. Si bien, este tipo de análisis no refleja relaciones filogenéticas como lo hace la secuenciación genética [19], se ha reportado cierto grado de correspondencia entre los dendrogramas de heterogeneidad basados en perfiles de EM MALDI-ToF y los árboles filogenéticos basados en la secuencia del gen 16S rRNA [69, 72, 79]. Las proteínas que fueron extraídas y detectadas durante la preparación y medida de las muestras respectivamente, pueden explicar esta correlación. Se ha mostrado que los perfiles de masa bacterianos en el rango de bajo peso molecular son originados a partir de proteínas intracelulares abundantes extraídas de la célula por el solvente en combinación con el agregado de un ácido orgánico fuerte (tal como TFA) que rompe la pared celular [17, 64]. La comparación de los picos de masas frente a los datos de secuencia bacteriana ha mostrado que una porción significativa de las señales son derivadas de ribosomas y de proteínas de mantenimiento (housekeeping).

3.2 OBJETIVOS

Al momento de empezar con este trabajo (principios del 2007), la taxonomía del cBc se encontraba en revisión, debido a la existencia de bacterias que se consideraban pertenecientes al cBc pero que no podían ser asignadas a ninguna de las nueve especies descritas. La implementación de nuevas técnicas de identificación molecular, entre ellas la secuenciación del gen *recA* y MLST permitió la discriminación de estas bacterias y la descripción de nuevas especies del cBc. El empleo de estas técnicas moleculares, en particular la secuenciación del *recA*, en aislados clínicos y ambientales que constituían el cepario del CINDEFI en esa época, demostraron que los aislados identificados hasta ese momento por PCR-*recA* primers EE como *B. cenocepacia*, pertenecían en realidad en su mayoría (aproximadamente 85%), a una de las nuevas especies descritas del cBc, denominada *B. contaminans*. Asimismo se pudo comprobar a través de la secuenciación del *recA* que en nuestro País esta especie poseía una alta tasa de prevalencia [37]. De modo que cuando comenzamos los trabajos relacionados con los estudios de discriminación a través del análisis de células enteras por EM MALDI-ToF, a diferencia de la situación al tiempo del estudio de FT-IR, debimos tener en cuenta que la metodología debía ahora permitir la discriminación no sólo de las 9 especies formales del cBc sino también las nuevas especies, por ese momento descritas.

Los principales objetivos de esta parte del trabajo fueron:

- 1.- Desarrollar una metodología basada en el empleo de EMCE/MALDI-ToF para lograr una rápida discriminación e identificación de especies pertenecientes al cBc y en particular de la especie *B. contaminans* perteneciente al Taxón K, en bacterias aisladas de muestras de esputo de pacientes con FQ. Asimismo se consideró la especie *B. gladioli* la cual si bien no pertenece al cBc es frecuentemente aislada en dichos pacientes.
- 2.- Dado que entre las bacterias comúnmente aisladas de muestras de esputo de pacientes FQ se encuentran algunas especies de BNF se buscó incluir este tipo de organismos, en el esquema de análisis y discriminarlas de las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* (9 especies formales, *B. contaminans* y *B. gladioli*). Se consideraron aquellos BNF relevantes como *P. aeruginosa*, *S.*

maltophilia y *A. xylooxidans*, y otros emergentes como *R. pickettii*, *Pandoraea* spp. (*P. apista*, *P. pulmonicola* y *P. pnomenusa*) e *I. limosus*.

- 3.- Poner a punto e implementar metodologías de inactivación celular que habían sido optimizadas previamente para en el análisis de células enteras por MALDI-ToF para otros organismos Gram-negativos. Se buscó determinar si resultaban efectivas para nuestros propósitos.
- 4.- Estudiar estrategias de análisis de datos alternativas con el objeto de seleccionar la metodología más conveniente. A estos fines nos propusimos estudiar la posibilidad de implementar una estrategia basada en la detección de proteínas biomarcadoras específicas (SIBPs), y otra basada en la reducción de datos, selección de características del espectro de masa y el posterior análisis por métodos multivariados.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Microorganismos

Un total de 26 cepas de referencia y 146 aislados clínicos de BNF aeróbicos recuperados de muestras de esputo de 140 pacientes FQ atendidos en tres centros de referencia en FQ y en Hospitales de nuestro País en el período de 2004 a 2007, fueron empleados en este estudio (Tabla 2). Los centros de tratamiento de pacientes FQ están localizados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Hospital de Clínicas), en La Plata, (Hospital de Niños “Sor María Ludovica” HNLP), y en la provincia de Córdoba, región Central de Argentina (Hospital de Niños “Santísima Trinidad”, HST). Fueron analizados aislados clínicos y cepas de referencia de 19 especies pertenecientes a 7 géneros (*Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Inquilinus*, y *Pandoraea*). Dentro del género *Burkholderia* se evaluaron 10 especies pertenecientes al cBc, bacterias pertenecientes al Taxón K del cBc y *B. gladioli* (Tabla 1). Las bacterias fueron mantenidas a -70°C en infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid, Wesel, Alemania) conteniendo 10% de glicerol. Para el análisis de bacterias por EMCE/MALDI-ToF las suspensiones fueron descongeladas y subcultivadas por 24h a 37°C en medio ATS (Oxoid). Para el estudio de reproducibilidad, cinco cepas fueron cultivadas en placas con agar Luria Bertani (LB) durante 24 h a 37°C.

3.3.2 Aislamiento e identificación fenotípica

El aislamiento y la identificación fenotípica de microorganismos aislados de pacientes FQ fue realizado por personal del Servicio de Microbiología de los hospitales indicados en el ítem anterior.

Tabla 2. Bacterias y cepas de referencia empleadas en este estudio

Especies	Nº de aislados	Cepa / Origen / Colección ^{a b}	PCR <i>recA</i>		Mejor correlación de secuencia GenBank
			RFLP tipo	Primers EE	
<i>B. cepacia</i>	3	ATCC 25416	D	<i>B. cepacia</i>	-
		DSMZ 9241, DSMZ 50181	-		-
	3		E	<i>B. cepacia</i>	-
<i>B. multivorans</i>	2	ATCC 17616, LMG 13010	F	<i>B. multivorans</i>	-
	1		-	<i>B. multivorans</i>	EF427834
<i>B. cenocepacia subA</i>	2	LMG 16656, LMG 18863	G	<i>B. cenocepacia</i> A	-
	8		G	<i>B. cenocepacia</i> A	-
<i>B. cenocepacia subB</i>	1	LMG 16654	J	<i>B. cenocepacia</i> B	-
	2		I	<i>B. cenocepacia</i> B	-
<i>B. contaminans</i>	38 ^c	BC25	K	<i>B. cenocepacia</i> A	AM905036
		G84, G89, G97, G103			AF456112
		BC01, BC03, BC04, BC05			EF602577
		BC11, BC15, BC20, BC21			
		BC32452, NF23, NF50, NF57			
		NF64, NF67, NF69, NF70			
		NF74, NF77, NF79, NF87			
		NF92, NF98, NF99, NF102			
		NF136, NF137, NF147			
		NF329, HST 18, HST31			
		HST35, HST 102, HST R1			
<i>Taxon K</i>	61		K	<i>B. cenocepacia</i> A	-
<i>B. stabilis</i>	2	LMG 14294, LMG 18870	J	<i>B. stabilis</i>	-
	2		-	<i>B. stabilis</i>	-
<i>B. vietnamiensis</i>	1	LMG 10929	B	-	-
<i>B. dolosa</i>	2	LMG 18943	Q	-	-
		LMG 21820			
<i>B. ambifaria</i>	2	LMG 19182, LMG 19467	N	-	-
	1	NF804		-	AY951912
<i>B. anthina</i>	2	LMG 20980, LMG 20983	T	-	-
<i>B. pyrrocinia</i>	2	ATCC 15958, LMG 14191	M	-	-
<i>B. gladioli</i>	1	ATCC 10248	NA	NA	NA
	1				

Tabla 2. Bacterias y cepas de referencia empleadas en este estudio (cont.)

Especies	Nº de aislados	Cepa / Origen / Colección ^{a b}	PCR <i>recA</i>		Mejor correlación de secuencia GenBank
			RFLP tipo	Primers EE	
<i>P. aeruginosa</i>	1	ATCC 27853	NA	NA	NA
	10				
<i>S. maltophilia</i>	2 ^d	Sm 33, Sm 36	NA	NA	NA
	3				
<i>A. xylosoxidans</i>	2 ^d	Axx 23, Axx 79	NA	NA	NA
	6				
<i>P. apista</i>	1	LMG 16407	NA	NA	NA
<i>P. pnomenusa</i>	1	LMG 18087	NA	NA	NA
<i>P. pulmonicola</i>	1	LMG 18106	NA	NA	NA
<i>R. pickettii</i>	1	ATCC 27511	NA	NA	NA
	2 ^d				
<i>I. limosus</i>	1	LMG 20952	NA	NA	NA

^a Todos los aislados clínicos fueron identificados mediante API/VITEK en los respectivos hospitales. Nueve pruebas fenotípicas adicionales fueron ensayadas para la identificación de especies de *Burkholderia*, como fue descrito en materiales y métodos. EE: Especie-específico. ^b ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; LMG: Laboratorium Microbiologie Gent Culture Collection, Gent, Belgium; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism; BC, HST y NF corresponden a aislados de fibroquísticos del Hospital de Clínicas de Buenos Aires, Hospital Santa Trinidad de Córdoba y Hospital de Niños de La Plata respectivamente; NA: no aplicable. ^c 17 de los 38 aislados de *B. contaminans* pertenecen a un brote epidémico ocurrido en el período de Enero – Abril, 2004. ^d Los bacilos no fermentadores (no pertenecientes al cBc) fueron identificados por análisis de secuencia del 16S rRNA.

Todos las cepas de referencia del cBc y aislados clínicos G84, G89, G97 y G103 fueron amablemente provistos Laura Galanternik, Hospital Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina.

3.3.3 Identificación molecular de bacilos no fermentadores de la glucosa

La identificación de bacterias pertenecientes al cBc por PCR *recA*-RFLP, PCR-*recA* primers EE (ver ítem 2.3.4) y secuenciación, fue realizada en parte en la Cátedra de Higiene de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UBA (Dr. José Degrossi) y en nuestro laboratorio del CINDEFI, donde las técnicas moleculares de identificación se pusieron en marcha en el año 2008. La identificación molecular de BNF (excluido el cBc) fue realizada por el Servicio de Microbiología del Hospital de Clínicas de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (ver ítem 2.3.5). A continuación se detalla la

metodología empleada en la identificación de miembros del cBc por análisis de secuencia del gen *recA*.

Análisis de secuencia del gen *recA*.

Entre el grupo de aislados clínicos que fueron identificados por PCR-*recA* primers EE como *B. cenocepacia* subtipo A y aquellos que mostraron un patrón *recA*-RFLP K (patrón incompatible con los descriptos para el gen *recA* de *B. cenocepacia* subtipo A), 38 aislados fueron seleccionados al azar y sometidos a un análisis filogenético basado en la secuenciación del gen *recA*. Los productos de PCR obtenidos usando los primers BCR1 Y BCR2, como se indicó anteriormente fueron purificados usando el Kit QUIAquick PCR (Qiagen Inc., CA, USA) [52], y secuenciados en Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Ambas cadenas de la muestra fueron secuenciadas usando primers forward (hacia adelante) y reverse (reverso) en una reacción de secuenciación cíclica con el kit de secuenciación cíclica Terminator BigDye (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Los productos de amplificación fueron analizados en un secuenciador automático 3730xl (Applied Biosystem, Foster City, CA., USA). Para lograr una correcta identificación genética de los aislados clínicos previamente mencionados, las secuencias obtenidas fueron analizadas por comparación con secuencias del cBc previamente depositadas en Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) usando la herramienta de búsqueda y alineamiento local de nucleótidos (BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov). La Tabla 2 muestra los números de ingreso de las secuencias listadas en GenBank las cuales fueron seleccionadas tomando en cuenta los valores de similitud más altos con las secuencias obtenidas en este estudio. Un valor de similitud con la secuencia de referencia del 99 - 100% fue usado para aceptar la identificación a nivel de especie. Estos resultados fueron confirmados por la construcción de un árbol filogenético (datos no mostrados). Para este propósito, la secuencia del gen *recA* de aislados clínicos y de las cepas de referencia tomadas del GenBank fueron llevadas a una longitud común y alineadas mediante el empleo de la aplicación Clustal X versión 1.83 [73]. Se construyó un árbol filogenético por el método de neighbour-joining (vecino próximo), usando el programa MEGA versión 3.1 [43]. La estabilidad del agrupamiento fue estimada por el análisis de bootstrap (1000 replicaciones) usando el mismo programa. Valores de bootstrap del 70% o superiores fueron aceptados para el análisis.

3.3.4 Preparación de la muestra y adquisición de los datos por EMCE/MALDI-ToF

Los aislados clínicos y las cepas de referencia fueron crecidos en ATS por 24 h a 37 °C y sometidas a EMCE/MALDI-ToF. La preparación de la muestra para EMCE se realizó de acuerdo al procedimiento de inactivación por TFA previamente descrito [45] (Fig. 6). Brevemente, 3 ansadas completas de bacterias fueron tomadas directamente de placas de ATS con un ansa de platino de 1-mm de diámetro y suspendidas en 20 μ l de agua destilada. Las suspensiones microbianas fueron cuidadosamente mezcladas con 80 μ l de TFA puro (Uvasol, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Luego de 30 min de incubación la mezcla fue diluida 1:10 en agua. Para la medición por EMCE/MALDI-ToF, 2 μ l de la solución diluida de la muestra se mezcló con 2 μ l de solución de matriz. La matriz fue preparada con 12 mg/ml de ACHC (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) disuelto en TA₂, de una mezcla 2:1 (v/v) de acetonitrilo al 100 % y 0,3% TFA. Un microlitro de mezcla de muestra con ACHC se colocó en una placa de acero (Bruker Daltonics, Alemania) y fue secada al aire. Los espectros de masa de células enteras fueron adquiridos con un espectrómetro de masa Autoflex de Bruker Daltonics.

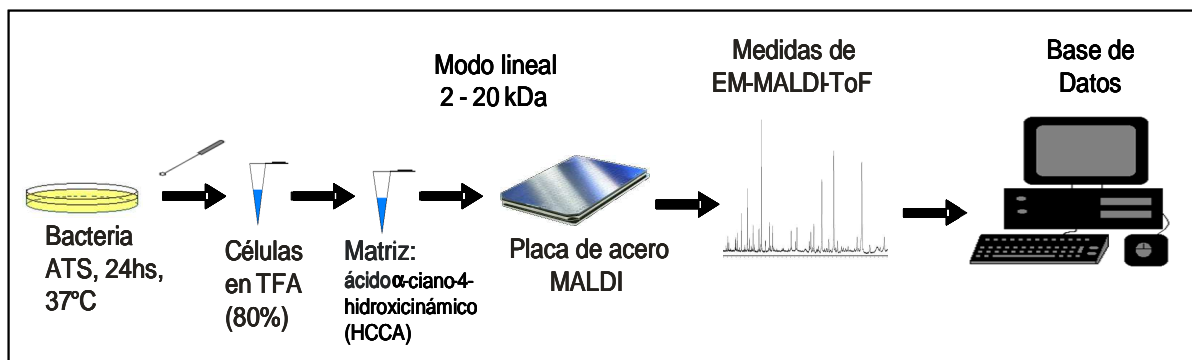


Fig. 6. Esquema de procesamiento de una muestra bacteriana empleando EMCE/MALDI-ToF.

El instrumento está equipado con un láser de nitrógeno UV ($\lambda = 337$ nm), el cual opera en pulsos de frecuencia superior a 20 Hz. El pulso fue configurado a 200 ns para la extracción de iones. Las medidas fueron llevadas a cabo en modo lineal usando un voltaje de aceleración de 20.00 (fuente iónica 1) o 18.45 (fuente iónica 2) kV. El voltaje en el objetivo fue 6.70 kV. Los espectros de masa fueron almacenados en el rango de m/z entre 2 a 20 kDa. Para la calibración externa del equipo se usaron las proteínas

insulina (5734.52 Da), ubiquitina I (8565.89 Da), citocromo C (12360.97 Da) y mioglobina (16952.31 Da) permitiendo una precisión en la masa de alrededor de 300 ppm. Al menos 600 disparos individuales del láser fueron co-añadidos a cada espectro. En este estudio se midieron los espectros de al menos dos cultivos bacterianos para cada cepa de referencia y cada aislado clínico.

3.3.5 Análisis de datos de EMCE/MALDI-ToF

Los espectros de masa de extractos microbianos obtenidos por acción del TFA fueron adquiridos utilizando el software Flexcontrol (versión 2.4, Bruker Daltonics). El análisis de los perfiles de masa fue llevado a cabo usando un software basado en Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA) denominado MASS versión 1.0 desarrollado en el Robert Koch Institute (Berlín, Alemania). El primer paso en el análisis de datos consistió en el pre-procesamiento de espectros como el suavizado, corrección de línea de base y normalización de la intensidad. Para el suavizado de la información espectral “cruda” se aplicó el algoritmo de Savitzky-Golay con 21 puntos de suavizado. La línea de base de los espectros fue posteriormente corregida por una rutina del programa Matlab, la cual divide al espectro en un número de intervalos definidos (en este caso 160 intervalos). Para el cálculo de la línea de base, los valores de intensidad mínimos para cada intervalo fueron determinados utilizando una función de interpolación cúbica. La corrección de línea de base se logró por sustracción de la línea de base espectral del espectro de masa suavizado. El último paso del pre-procesamiento requirió del denominado vector de normalización. El resultado de la normalización vectorial es un espectro en el cual la suma de todos los valores de intensidad al cuadrado es constante, en nuestro caso 1000.

La base de datos de espectros de masa de células enteras se construyó con al menos 400 espectros pre-procesados pertenecientes a 146 aislados clínicos y 26 cepas de referencia detalladas en la Tabla 2. La base de datos se dividió en dos conjuntos: un “conjunto de datos de referencia” el cual contiene los espectros de masa de células enteras de las cepas de referencia, los aislados clínicos identificados por secuenciación del gen 16S rRNA (Tabla 2), y 12 aislados clínicos de *B. contaminans* los cuales fueron seleccionados al azar entre aquellos aislados de *B. contaminans* que fueron analizados por secuenciación del gen *recA*, comprendiendo así, un total de 136 espectros de masa

pertenecientes a siete géneros y 19 especies. Además, un “conjunto de datos de aislados clínicos” constituido por 260 espectros pre-procesados de aislados correctamente identificados del cBc y BNF no incluidos en el “conjunto de datos espectrales de referencia”) fueron usados para evaluar la exactitud del sistema de discriminación desarrollado.

Basados en los espectros de masa pre-procesados, una lista de picos fue obtenida automáticamente los cuales se emplearon como datos de entrada del posterior análisis multivariante. El error de calibración relativo aceptado equivale a 1000 ppm (parámetros por defecto). Por tanto, picos de masa encontrados en una región de masa de $(x - 0,0005x) - (x + 0,0005x)$ fueron considerados como idénticos; Ej. En $x = 10$ kDa el intervalo es $10 \text{ kDa} \pm 5 \text{ Da}$, mientras que en $x = 1$ kDa el intervalo es $1 \text{ kDa} \pm 0,5 \text{ Da}$. Para una visualización global de los biomarcadores microbianos, las rutinas de Matlab permitieron la generación de una vista simulada “tipo gel” de espectros con la línea de base corregida y la intensidad normalizada. Estas rutinas de Matlab están disponibles a solicitud, en el laboratorio de espectroscopía biomédica del Robert Koch Institute.

El agrupamiento jerárquico de los espectros de masa de células enteras de aislados de *Burkholderia* y BNF se llevó a cabo sobre la base de los 50 picos de masa más intensos en el rango de masa de 2-12 kDa. La información de la presencia o ausencia de picos en una rango m/z definido, fue usada para construir un espectro de masa simplificado, el cual se asemeja a un “código por barras”. En este formato de datos, la información de la intensidad de los picos ha sido excluida para los posteriores análisis. A continuación, las distancias inter-espectrales fueron calculadas sobre la base de este código de barra espectral y los coeficientes de correlación normalizados del producto momento de Pearson. El algoritmo de Ward fue aplicado como técnica de agrupamiento.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años varios estudios han revelado la presencia de aislados clínicos pertenecientes al Taxón K (o grupo K) del cBc en diversos países del mundo [3, 6, 8, 15, 37, 51]. Particularmente en Argentina el Taxón K representa alrededor del 13% de las especies recuperadas de muestras de esputo de pacientes FQ y alrededor del 80% de los aislados identificados como pertenecientes al cBc [37]. Estos aislados fueron fenotípicamente caracterizados exhibiendo pigmentación amarilla y β -hemólisis, los mismos presentan un patrón K por análisis de PCR-RFLP del gen *recA* y fueron positivos en los ensayos de PCR-*recA* primers EE del gen *recA*. Solamente la secuenciación del gen *recA* proveyó una identificación adecuada de especies pertenecientes al Taxón K (Tabla 2). En este trabajo la idea fue desarrollar una estrategia alternativa a las conocidas basada en empleo de EMCE/MALDI-ToF para identificar organismos pertenecientes este grupo taxonómico.

3.4.1 Reproducibilidad de EMCE/MALDI-ToF

Se analizaron por EMCE/MALDI-ToF un total de 172 organismos (146 aislados clínicos y 26 cepas de referencia), los cuales comprendieron alrededor de 19 especies, 11 pertenecientes al género *Burkholderia* y 8 a BNF comúnmente aislados de muestras de esputo de pacientes FQ (Tabla 2).

Debido a que lograr un alto grado de reproducibilidad es esencial en cualquier técnica de identificación microbiológica, se evaluó en primer lugar la reproducibilidad espectral empleando la espectrometría de masas de células enteras (EMCE). Para ello se empleó el protocolo de inactivación por TFA descrito en la introducción de este capítulo, el cual había sido previamente implementado por el grupo del Dr. Lasch en Alemania para la identificación de otros organismos Gram-negativos [45]. Para este propósito, fueron obtenidos espectros de masa de células enteras de bacterias recuperadas de 5 cultivos independientes de 5 cepas diferentes, entre ellas dos especies de bacilos no pertenecientes al cBc (*P. aeuruginosa* ATCC 27653, y *R. pickettii* ATCC 27511) y 3 especies de organismos pertenecientes al cBc (*B. multivorans* ATCC 17616, *B. cenocepacia* LMG 16656, y *B. contaminans* NF 74). La Fig. 7 panel (A) muestra para cada una de esas cepas un espectro representativo de masa, mientras que en el

panel (B) se observa la representación visual “tipo gel” de los correspondientes 5 espectros replicados de MALDI-ToF de cada una de las cepas. Este esquema de intensidades de EMCE en escala de grises revela el alto grado de reproducibilidad y, al mismo tiempo demostró que a través del procedimiento de EMCE es posible obtener un patrón de proteínas específico para cada uno de las especies del cBc y de BNF.

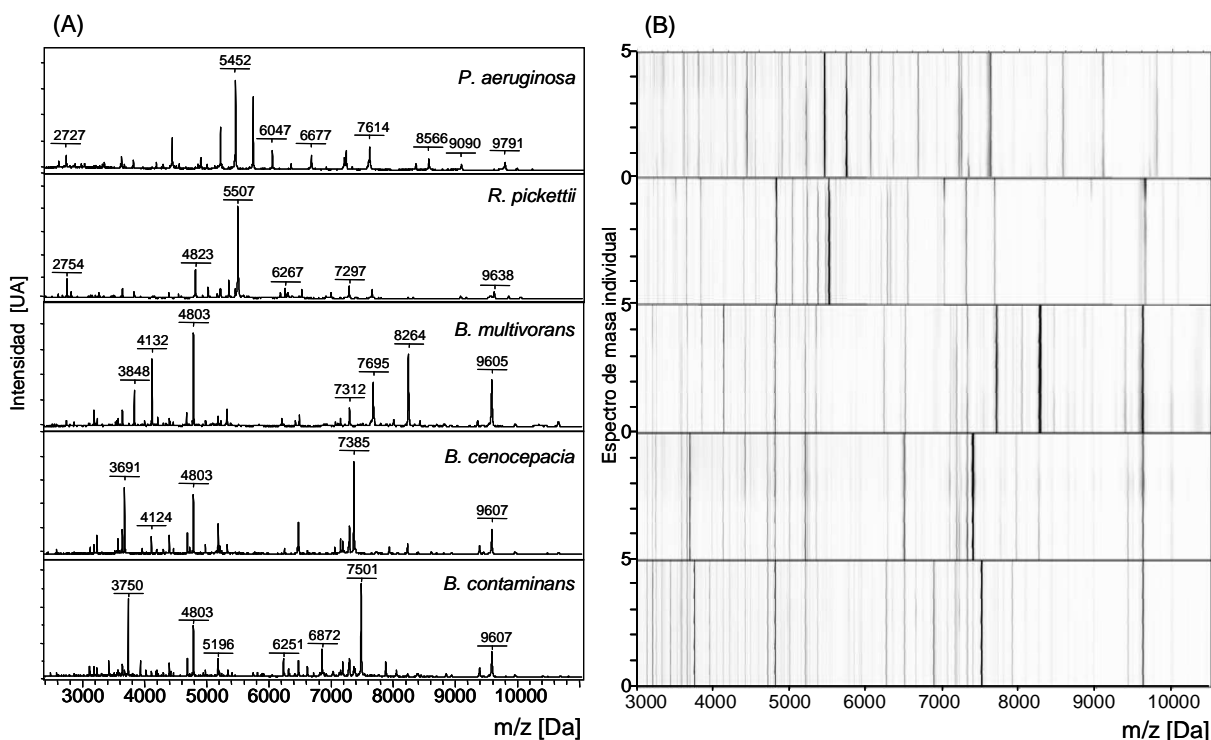


Fig. 7. Repetibilidad de espectros de masa MALDI-ToF. Los datos fueron obtenidos de células bacterianas luego del procedimiento de inactivación/extracción con TFA. El panel (A) muestra un espectro de masa representativo de células enteras de *P. aeruginosa*, *R. pickettii* y de tres especies de cBc (*B. multivorans*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*). El panel (B) muestra la representación de la “vista en gel” correspondiente a las especies anteriormente mencionadas. La “vista en gel” se generó por representación de las intensidades de los picos en una escala de grises en función de los valores m/z. En esta representación se emplearon los espectros de masa de células enteras provenientes de 5 cultivos independientes de cada cepa presentes en el panel (A).

Cuando el protocolo de inactivación de TFA fue aplicado a las mismas 5 cepas crecidas en placas de agar LB a 37 °C por 24 h, el espectro de masa de células enteras también mostró un alto grado de reproducibilidad espectral y los patrones de proteínas específicas fueron muy similares a aquellos obtenidos para las mismas cepas crecidas en medio ATS (Fig. 8). Este resultado muestra que estos microorganismos producen las mismas proteínas biomarcadoras independiente del medio de cultivo empleado, lo cual concuerda con lo reportado por Lay y cols [46].

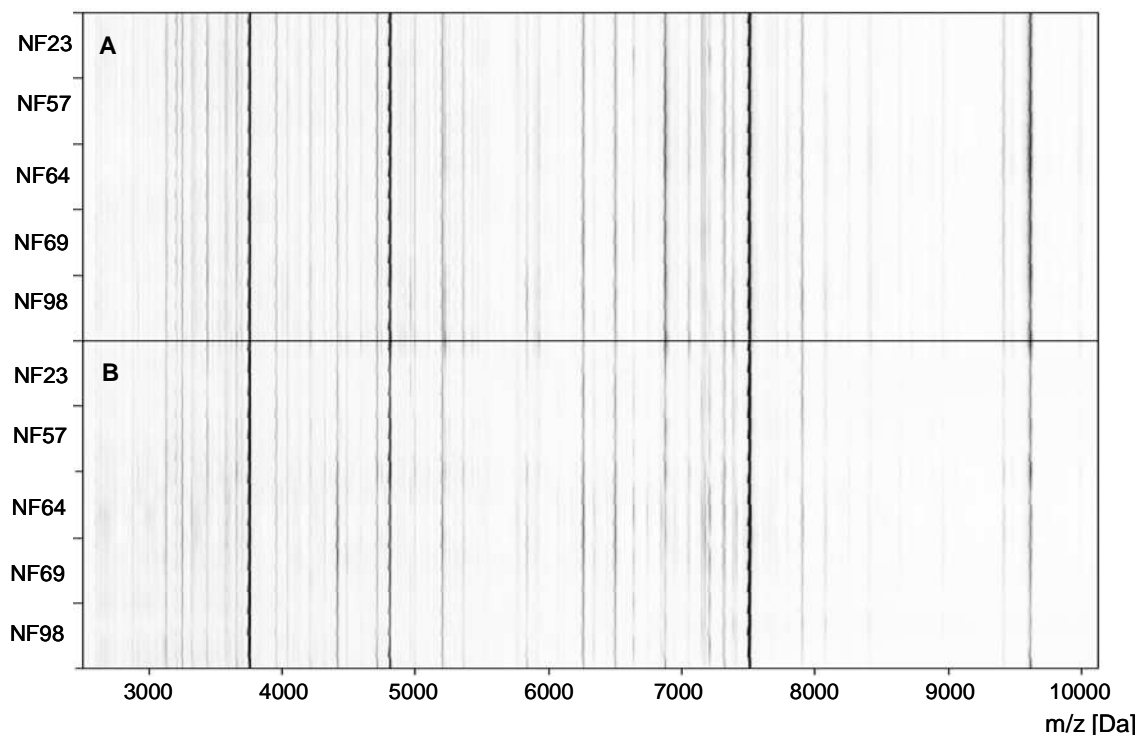


Fig. 8. Reproducibilidad en espectrometría de masa MALDI-ToF. Los datos fueron obtenidos de cinco aislados clínicos de *B. contaminans* luego del procedimiento de inactivación con TFA. El gráfico de intensidades en escala de grises en función de los valores de m/z se construyó con 15 espectros individuales obtenidos de tres cultivos independientes de cada cepa de *B. contaminans*. El panel A y B muestran los perfiles de masa de aislados clínicos de *B. contaminans* cultivados en agar tripticosa soya (ATS) y agar Luria Bertani (LB) respectivamente.

Por lo tanto el tratamiento de inactivación/extracción de células proveyó de una modalidad rápida, robusta y reproducible de extracción proteica compatible con los objetivos del trabajo. Se demostró buena reproducibilidad en condiciones de crecimiento y medios de cultivo diferentes [20, 58]. Estos hallazgos se basaron en el hecho que proteínas citosólicas tales como proteínas ribosomales y proteínas que cumplen funciones de mantenimiento (housekeeping) en la célula bacteriana son detectadas principalmente en el rango de 2 a 12 kDa [17, 70]. Estas proteínas son abundantes, conservadas y lo que es más importante, constantemente expresadas por la bacteria. Esta metodología podría entonces constituir una adecuada estrategia para la identificación microbiológica en corto tiempo de trabajo requiriendo un total de 24 h para la incubación en agar ATS para el cultivo del microorganismo, 1 h para la preparación de la muestra, 5 min para el registro de replicados de los espectros y unos pocos minutos para el análisis de datos.

Es importante notar que el uso de ácidos fuertes tales como TFA en altas concentraciones (80 % v/v) también asegura la completa inactivación de las células bacterianas y esporos [45]. Por tanto, este protocolo de extracción/inactivación por TFA, desarrollado por el Dr. Peter Lasch en el Robert Koch de Berlín para la identificación de microorganismos altamente patogénicos (Nivel de bioseguridad 3) tales como *Yersinia* (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*) y *Bacillus* spp. (*B. anthracis*) podría ser empleado en futuros experimentos como protocolo de inactivación para analizar especies patógenas de *Burkholderia* con potencial peligro biológico, como *B. pseudomallei* y *B. mallei*, para los cuales el diagnóstico temprano sería crucial para reducir el riesgo de mortalidad en personas infectadas.

3.4.2 Discriminación bacteriana basada en la selección de proteínas biomarcadoras de identificación específicas (SIBPs)

Las proteínas biomarcadoras específicas identificadas por EMCE/MALDI-ToF, han sido ampliamente usadas para diferenciar, clasificar, e identificar microorganismos a nivel de género, especie, sub-especie y aún de cepa [12, 20, 67]. Con el objeto de confirmar las SIBPs, espectros de masa de células enteras procedentes del “conjunto de espectros de referencia” (ver sección experimental) fueron sistemáticamente analizados (Fig. 9 A). La representación de los espectros de EMCE/MALDI-ToF mediante vista en gel resultó ser una herramienta útil para investigar específicamente el complejo conjunto de datos contenidos en el espectro de masa. La manera clara y práctica de mostrar los espectros, provee una forma gráfica de obtener una vista global de todo el conjunto de datos espectrales y seleccionar los picos de masa como potenciales candidatos para SIBPs.

A través de la inspección visual de estas vistas en gel, se pudieron seleccionar los SIBPs para la discriminación e identificación de las especies del cBc y otros BNF relacionados, como muestra la Fig. 9 A. Esta representación permite identificar rangos de masa m/z que exhiben patrones de picos similares o conservados los cuales se vuelven marcadores diagnósticos para el género *Burkholderia* (ver rangos m/z : 4000-6000 Da y 9000-10500 Da). Otros rangos espectrales también mostraron varios picos con valor diagnóstico para la identificación de especies. El rango espectral de 7000-8500 Da, mostró ser el más importante para la identificación de las nueve especies

formales del cBc y de *B. contaminans*. Para una más detallada inspección de los SIBPs en esta región, la Fig. 9 B muestra un zoom de la vista en gel que comprende el rango de 7000-8500 Da. El análisis asistido por software y la inspección visual de este rango por zoom, reveló la presencia de un SIBPs a 7501 Da y un SIBP de intensidad intermedia 7900 Da para el espectro de *B. contaminans*. Estos picos están ausentes en el espectro de las nueve especies formales del cBc. La Tabla 3 resume las identidades de los SIBPs para el género *Burkholderia* y da algunas asignaciones tentativas para proteínas discretas. La identificación de marcadores específicos fue posteriormente empleada como base para discriminar e identificar especies dentro del cBc, en particular *B. contaminans*, una nueva especie de *Burkholderia* perteneciente al Taxón K, la cual hasta ese momento sólo era posible de identificar por métodos moleculares (secuenciación *recA*, MLST). Como puede ser visto en la Fig. 9 B y Tabla 3, un número adicional de SIBPs pudo ser asignado para nueve especies del complejo.

En el contexto del presente estudio, un resultado destacable se obtuvo al realizar un análisis detallado y comparativo de los biomarcadores correspondientes a diferentes cepas de la misma especie. Sorprendentemente, fueron observadas diferencias en las masas de picos prominentes para diferentes cepas de referencia de *B. anthina*, *B. multivorans* y *B. dolosa* (Fig. 9 B y Tabla 3). Variaciones similares y reproducibles en las masas de los SIBPs han sido previamente reportadas para diferentes cepas bacterianas de *Campylobacter* [54] y *Salmonella* [20]. Al realizar un mapeo genético y de masa en dichas especies se detectaron variaciones en las masas de SIBPs las cuales fueron debidas a mutaciones no-sinónimas, polimorfismo de nucleótidos simples o múltiples, o modificación post-traducciona. Basados en estos resultados tanto Dieckmann como Mandrell sugirieron que este tipo de variación en la masa del SIBP podría ser usado para discriminar bacterias a nivel de cepa. En nuestro trabajo se observó un comportamiento semejante al descrito al comparar los corrimientos de los SIBPs existentes del aislado clínico de *B. multivorans* (HST 101) y el observado en cepas de referencia (ATCC 17616 y LMG 13010) de la misma especie (Fig. 10). En la figura se puede apreciar que el aislado clínico HST 101 posee un conjunto de SIBPs comunes a los hallados en la cepa de referencia ATCC 17616, mientras que otros son distintivos para este aislado clínico.

Tabla 3. SIBPs usados para la discriminación de especies de *Burkholderia*

<i>Especies</i>	Nivel de discriminación	SIBPs, Masas experimentales (Da) ^{a,b,c,e}	Masas Predichas	Identidad de la proteína candidata ^f
<i>Burkholderia</i>	Género	3203, 3251, 4802, 9605 4414 5196 7171 7312	Desconocida 4410 5195 7170 7310	- 50S ribosomal, L36 50S ribosomal, L34 50S ribosomal, L35 50S ribosomal, L29
<i>B. cepacia</i>	Especies	5936, 6494^d , 7535^d , 8560	Desconocida	-
<i>B. multivorans</i>	Especies	7816 8026 9380	7803 8049 9378	Lipoproteína putativa Ferredoxina putativa 30S ribosomal, S20
ATCC 17616	Cepa	7695^A 8264^B	7703 8273	Proteína hipotética Proteína hipotética conservada
LMG 13010	Cepa	7367^A , 7936^B	Desconocida	-
<i>B. cenocepacia</i>	Especies	3695 7078 7385 7955	Desconocida 7077 7388 7950	- Proteína simil de shock frío Proteína de membrana putativa Proteína de membrana putativa
subtipo A	Subespecies	6476	6479 6477	Proteína de membrana putativa Flp/Fap componente de pilina
subtipo B	Subespecies	7050	7049	Proteína de shock frío
<i>B. contaminans</i>	Especies	3752, 3949^d , 5833, 5907, 6873 7151, 7501, 7900	Desconocida Desconocida	- -
<i>B. stabilis</i>	Especies	2907, 3987, 7535^d , 7753, 8871	Desconocida	-
<i>B. vietnamiensis</i>	Especies	3949^d , 7444 7890	Desconocida 7890	- Proteína de función desconocida
<i>B. dolosa</i>	Especies	4984, 6228, 8945	Desconocida	-
LMG 18943	Cepa	7366^E , 7936^F	Desconocida	-
LMG 21820	Cepa	7387^E , 7957^F	Desconocida	-
<i>B. ambifaria</i>	Especies	7414 6522 7978	7410 6521 7978	Proteína hipotética 50S ribosomal, L32 Proteína hipotética conservada
<i>B. anthina</i>	Especies	4194	Desconocida	-
LMG 20980	Cepa	7560^C , 8133^D	Desconocida	-
LMG 20983	Cepa	7650^C , 8219^D	Desconocida	-
<i>B. pyrrocinia</i>	Especies	4052, 5455, 6790, 7535^d	Desconocida	-
<i>B. gladioli</i>	Especies	6294, 6585, 7778	Desconocida	-

^a Los números en negrita corresponden a los SIBPs más intensos identificados visualmente a través de la representación en vista de gel de datos de EMCE. ^b Los mismos (A, B, C o D) indican diferencias entre SIBPs probablemente asociados a modificaciones post-traduccionales. ^c El mismo superíndice (E o F) indican pequeños cambios en las masas de los SIBPs probablemente derivados de mutaciones no sinónimas. ^d SIBPs presentes en otras especies del complejo *B. cepacia*. ^e Las masas representan los valores promedio obtenidos de al menos dos replicados. La desviación estándar para las medidas de las masas fue ≤ 4 Da. ^f La identidad de la proteína candidata fue determinada usando un sistema de búsqueda de masas proteicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) al cual se accedió a través de la base de datos de la NCBI. Las proteínas de interés fueron positivamente identificadas si las masas de los SIBP coincidían con las masas de las proteínas predichas obtenidas de los genomas de *Burkholderia* contenidos en la base de datos.

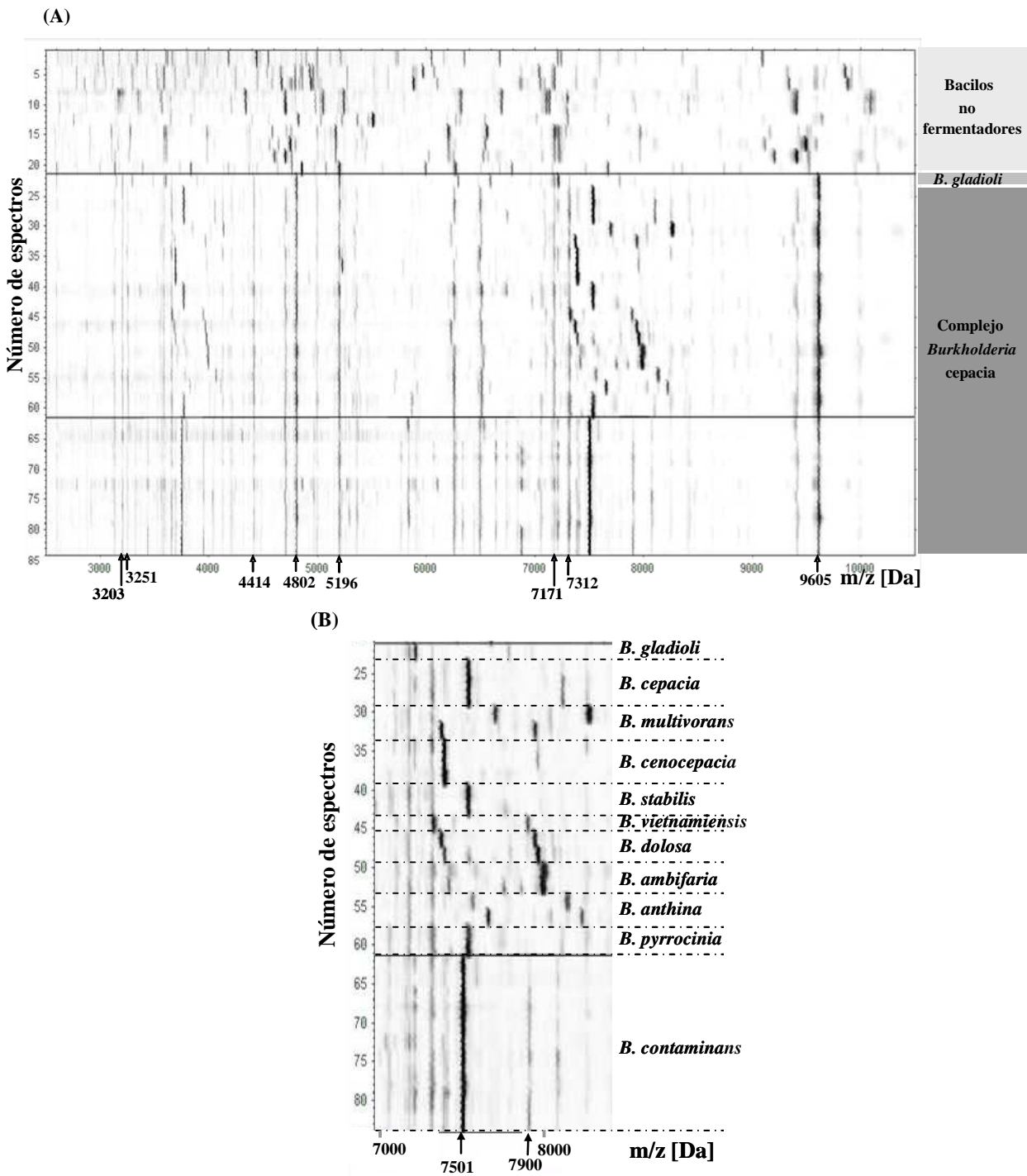


Fig. 9. (A) Representación de la vista en gel de los espectros de masa de células enteras correspondientes a especies de *Burkholderia* y BNF relacionados. Los picos de masas indicados por flechas en la parte inferior corresponden a SIBP candidatos para la discriminación de *Burkholderia* a nivel de género. (B) Zoom de la representación de la vista en gel del rango de masa entre 7000 - 8500 m/z, el cual muestra un número prominente de SIBP candidatos para la discriminación del cBc a nivel de especie. Los picos indicados por flechas corresponden a SIBPs candidatos adecuados para la discriminación a nivel de especie de *B. contaminans* del resto de los miembros del cBc. Dos espectros de masa de células enteras de cada cepa y un total de 84 espectros de masa fueron usados para construir la vista en gel.

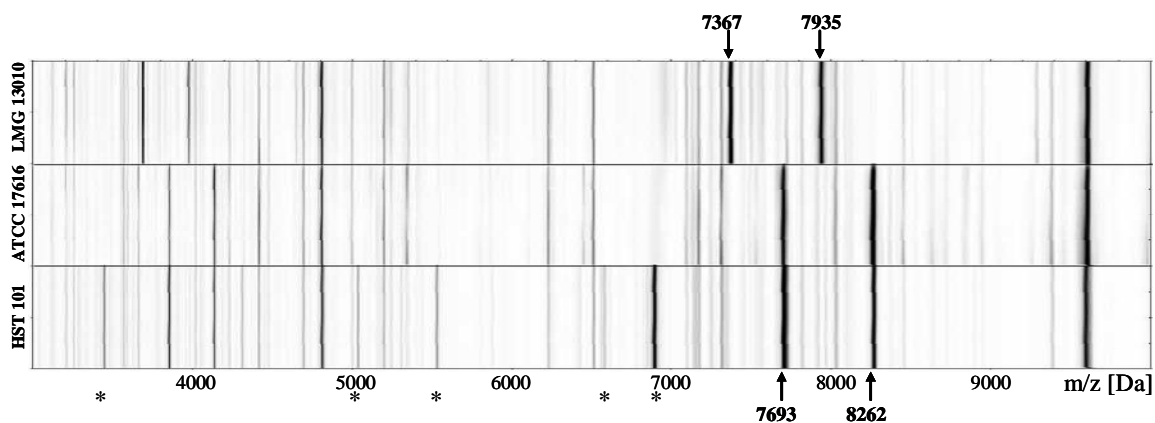


Fig. 10. Representación de la vista en gel de los espectros de masa de células enteras de cepas de *B. multivorans*. Los picos de masa señalados con flechas corresponden a los SIBPs asignados para la discriminación de *B. multivorans* a nivel de cepa (Tabla 3). Los picos de masa indicados con (*) corresponden a SIBPs distintivos del aislado clínico HST 101 que no se encuentran presentes en ninguna de las cepas de referencia de *B. multivorans*. La vista en gel se construyó con 3 espectros de masa correspondiente a cada cepa (ATCC 17616, LMG 13010, HST 101).

Futuras investigaciones permitirán descifrar la naturaleza de estas diferencias de masas observadas en cepas de *B. anthina*, *B. multivorans* y *B. dolosa* (Tabla 3), la cual podría ser la base para las discriminaciones a nivel de subespecie o aun de cepa. La información del genoma de *Burkholderia* se encuentra disponible en la base de datos del NCBI la cual fue usada para identificar algunos de esos SIBP para género, especie y subespecie (Tabla 3). De acuerdo a la Tabla 3, muchos de los SIBPs para género y especie identificados en este trabajo corresponden a proteínas intracelulares abundantes tales como proteínas ribosomales. Estas proteínas representan probablemente a los SIBPs más importantes, ya que las mismas se expresan de manera constitutiva. La posibilidad de identificar estas proteínas conservadas por EMCE/MALDI-ToF constituye uno de los aspectos más atractivos que sostienen la robustez y aceptación de la metodología para la discriminación bacteriana.

Finalmente con el propósito de mostrar el grado de discriminación a través de los SIBPs en aislados clínicos de *Burkholderia*, se analizaron los valores de SIBPs correspondientes a especie, subespecie y cepa empleando dos técnicas multivariantes, ACP y AJC. Para esto se construyó una matriz con la totalidad de SIBPs y se les asignó el valor de 1 a los picos existentes y 0 a los inexistentes en cada una de las cepas representadas (cepas de referencia y aislados clínicos identificados a nivel de especie del cBc). Posteriormente esta matriz fue evaluada por ACP, obteniendo dos componentes que discriminan en mayor medida las especies del cBc

analizadas (Fig. 11). Se observa claramente dos agrupamientos principales asociados a las especies *B. cenocepacia* y *B. contaminans*, el resto de las especies no logran ser correctamente resueltas mediante este análisis. Una explicación a este comportamiento puede ser dado a que las dos componentes principales, PC2 y PC3 representan dos masas espectrales ó SIBPs, las cuales no contienen la suficiente variabilidad para resolver el gran número de especies del cBc.

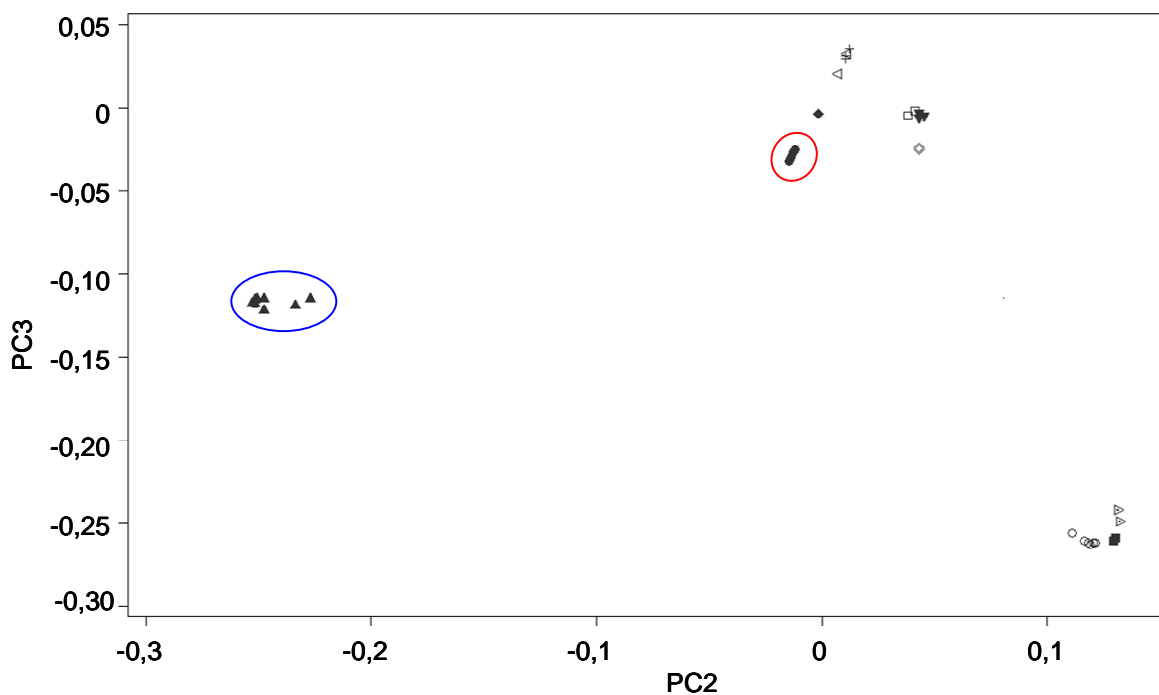


Fig. 11. Representación gráfica del análisis de componente principal (ACP) basado en los valores de SIBPs correspondiente a la discriminación a nivel de especie y cepa de *Burkholderia* descritos en la Tabla 3. Los símbolos indican las especies de *Burkholderia* analizados por ACP, ○ *Burkholderia cepacia*, ▼ *B. multivorans*, ▲ *B. cenocepacia*, ■ *B. stabilis*, ◆ *B. vietnamiensis*, □ *B. dolosa*, + *B. ambifaria*, ◇ *B. anthina*, ▷ *B. pyrrocinia*, ◁ *B. gladioli* y ● *B. contaminans*. PC2 y PC3 corresponden a la segunda y tercera componente principal respectivamente. La representación gráfica de ACP se realizó mediante el software SPSS (SPSS Inc. Chicago. IL).

Empleando AJC, como segunda herramienta de análisis de la matriz de SIBPs, se obtuvo el grado de disimilitud en términos de la “distancia espectral” de cada cepa mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La representación gráfica de la distancia espectral se hizo por medio de la construcción de un dendrograma (Fig. 12) empleando el algoritmo de “simple linkage” (unión simple) del software SPSS (SPSS Inc. Chicago. IL). Así todos los aislados clínicos identificados previamente a nivel de especie por métodos moleculares agruparon con la correspondiente especie en base a la presencia de los SIBPs correspondientes.

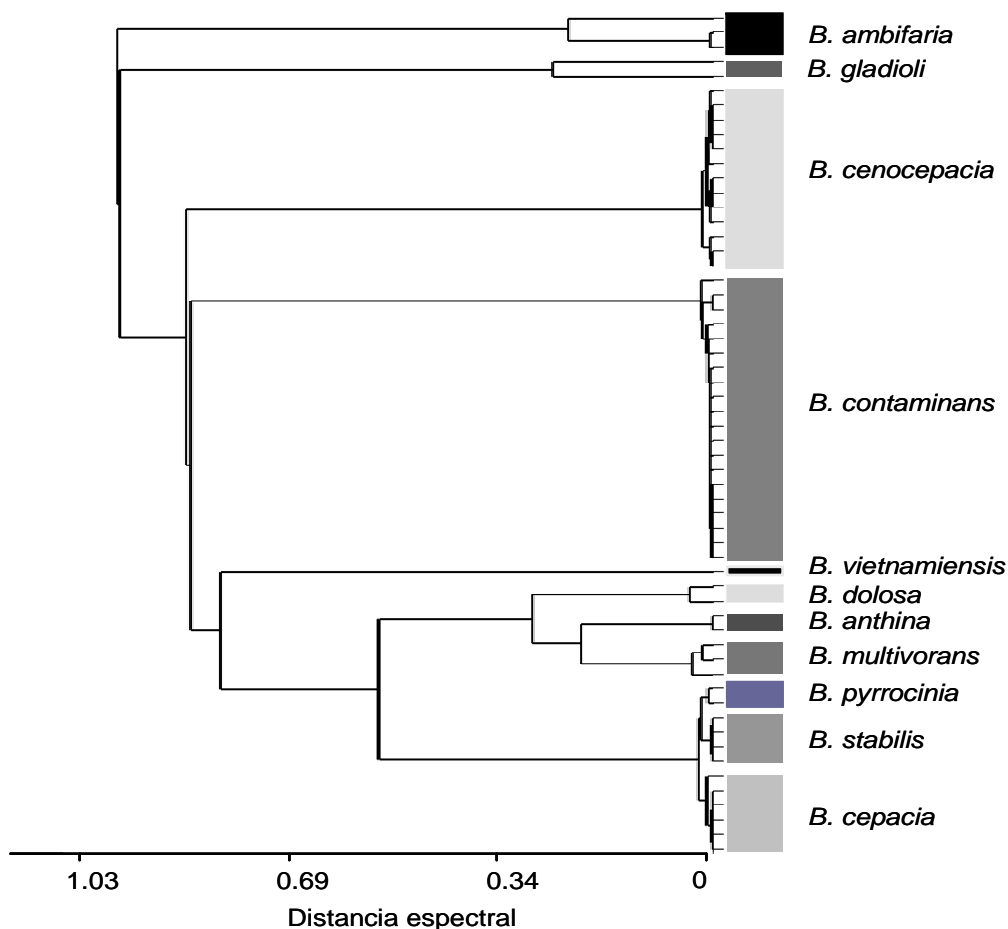


Fig. 12. Relación entre las especies de *Burkholderia* basados en la presencia de SIBPs de especie y cepa. El dendrograma fue generado usando el coeficiente de correlación de Pearson como una medida de la distancia espectral (disimilitud), y el algoritmo “simple linkage” (unión simple) para construir el dendrograma. Esta representación gráfica se realizó mediante el software SPSS (SPSS Inc. Chicago. IL).

3.4.3 Identificación bacteriana basada en reducción de datos, selección de características y análisis de cluster jerárquico

Un segundo enfoque empleado para identificar bacterias estrechamente relacionadas es por medio del análisis multivariado empleando un conjunto de datos reducidos por software, como si fuera un código de barras espectral (ver ítem 3.5.5). Esta estrategia posibilitaría la comparación de espectros sin requerimiento de la asistencia del operador como fue descrito en el inciso anterior. Al inicio del análisis, se emplearon los espectros de masa “crudos” de células enteras pertenecientes al conjunto de referencia los cuales no fueron corregidos en sus líneas de base, suavizados y

normalizados. Los espectros crudos fueron convertidos mediante el software MASS en espectros reducidos por selección de los 50 picos de mayor intensidad. Estos espectros reducidos fueron sometidos a un AJC, en el cual solo se analizó la presencia de los picos pero no su intensidad, este resultado esta representado en la Fig. 10. Se observa claramente que la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Burkholderia*, con

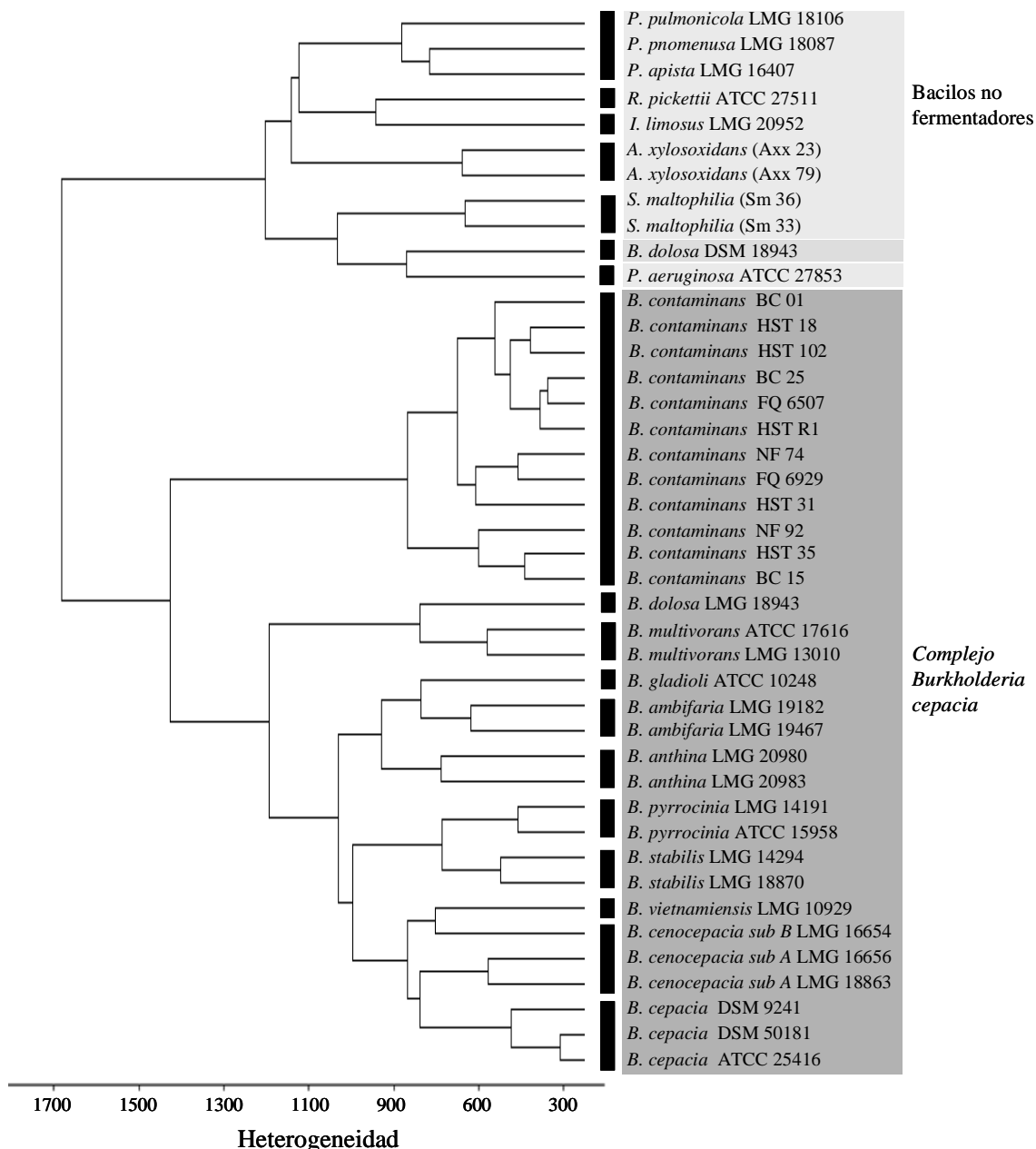


Fig. 10. Relaciones entre los espectros de masa “crudos” de células enteras de las especies de *Burkholderia* y los BNF incluidos en el “conjunto de datos de referencia” (ver ítem 3.3.5). El dendrograma fue generado usando el coeficiente de correlación de Pearson como medida de la distancia espectral, la cual fue definida por Helm y cols [28], y el algoritmo de Ward para calcular el dendrograma [72].

excepción de *B. dolosa* DSM 18943, forman un único agrupamiento logrando su diferenciación del resto de los BNF analizados. Aunque la mayoría de las especies del cBc agrupan de acuerdo a su respectivas especies, no fue posible alcanzar un grado de discriminación adecuada para *B. dolosa*, *B. vietnamiensis* y *B. cenocepacia*.

Con el propósito de mejorar el poder de discriminación, todos los espectros de masa crudos de células enteras contenidos en el conjunto de datos de referencia fueron sometidos a una corrección de línea de base, normalizados y suavizados mediante rutinas contenidas en el software MASS. Posteriormente a través de estos espectros pre-procesados se generó un nuevo conjunto de espectros reducidos los cuales fueron sujetos a análisis multivariante. La Fig. 11 muestra el dendrograma obtenido por AJC del “conjunto de datos espectrales de referencia” conteniendo los espectros de siete diferentes géneros y 19 especies como se describió en materiales y métodos. Aquí se aprecia que todos los espectros de los BNF (*P. aeruginosa*, *R. pickettii*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *Pandoraea spp.* y *I. limosus*) son claramente diferenciados del cluster correspondiente al género *Burkholderia*, mientras las tres especies del género *Pandoraea* y las 11 especies del género *Burkholderia*, están agrupadas en clusters de géneros separados. Interesantemente todos los espectros de masa pertenecientes a *B. contaminans* (Taxón K) en el “conjunto de datos espectrales de referencia” agruparon separados de los otros miembros del cBc. La razón detrás de este comportamiento podría estar dada en que los SIBPs seleccionados para las cepas de *B. contaminans* (Fig. 9 B, Tabla 3) tienen una fuerte influencia sobre el esquema de clasificación dado en el dendrograma de la Fig. 11. Asimismo, los procedimientos de corrección de línea de base, normalización y suavizado, proporcionan un espectro simplificado que contiene un conjunto de 50 picos más discriminatorios comparado con el obtenido del espectro crudo sin pre-procesar.

En un segundo paso, el “conjunto de datos espectrales de los aislados clínicos” que comprende los espectros de masa de células enteras de aislados clínicos correctamente caracterizados fueron sujetos a los mismos procedimientos de pre-procesamiento y analizados a la vez con el “conjunto de datos espectrales de referencia” mediante AJC. La Fig. 12 muestra una significativa heterogeneidad entre los aislados clínicos pertenecientes al Taxón K. Asimismo, fueron correctamente agrupados en especies separadas que difieren de las otras especies de *Burkholderia* incluidas en este estudio. Obviamente, nuestros resultados demuestran que los dos enfoques en la

evaluación de datos de complejos conjuntos de datos EMCE/MALDI-ToF permiten la discriminación de todas las especies de *Burkholderia* estrechamente relacionados, y otros BNF comúnmente presente en muestras de esputo de pacientes FQ.

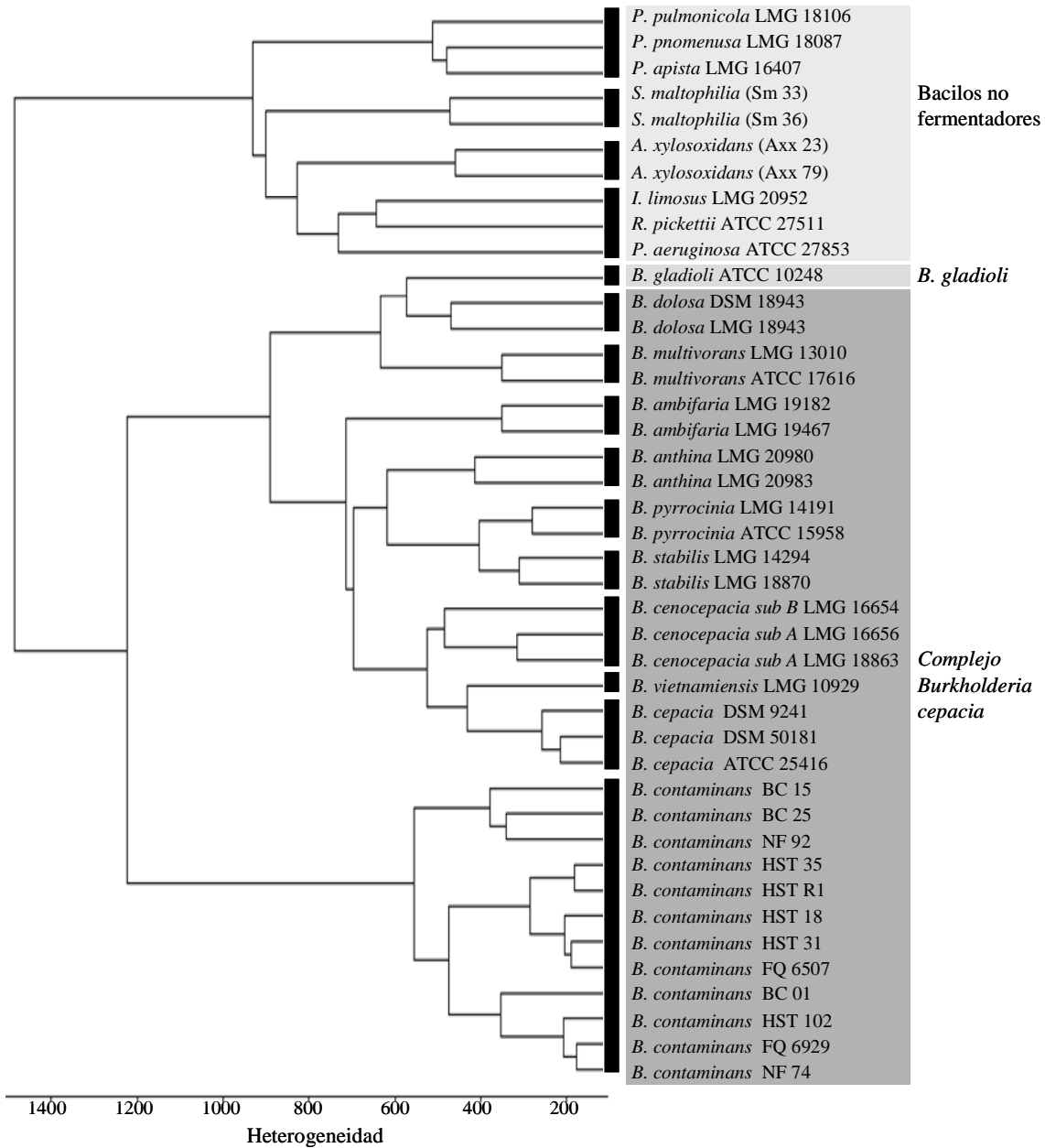


Fig. 11. Relaciones entre los espectros de masa de células enteras pre-procesados de las especies de *Burkholderia* y los BNF incluidos en el “conjunto de datos de referencia” (ver ítem 3.3.5). El dendrograma fue generado usando el coeficiente de correlación de Pearson como medida de la distancia espectral, la cual fue definida por Helm y cols [28], y el algoritmo de Ward para calcular el dendrograma [72].

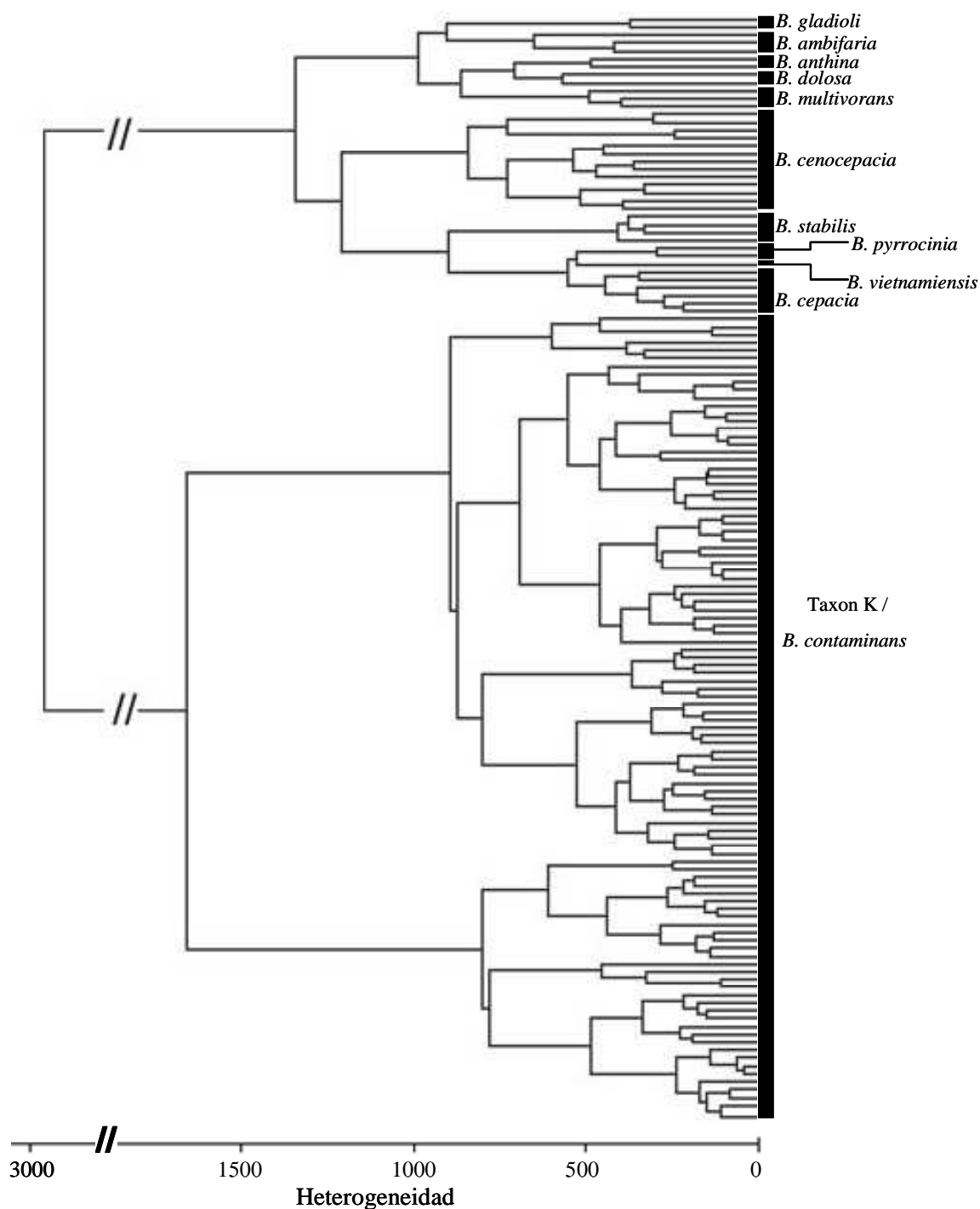


Fig. 12. Dendrograma mostrando las interrelaciones (similitud) entre los espectros de células enteras correspondientes a las cepas de referencia y los aislados clínicos de todas las especies de *Burkholderia* contenidas en ambos conjunto de datos de referencia y clínicos (ver materiales y métodos). Los dendrogramas generados usando los coeficientes de correlación de Pearson como medida de la distancia, la cual fue definida por Helm y cols [28], y el algoritmo de Ward para calcular el dendrograma [72].

Recientemente, Vanlaere y cols [78] emplearon la EMCE/MALDI-ToF en la discriminación de especies formales del cBc mediante análisis multivariante. Este grupo utilizó para el análisis de espectros de células enteras una herramienta informática denominada SARAMIS (Spectral Archiving And Microbial Identification System, AnagnosTec, Postdam-Golm, Alemania) la cual permitió la discriminación de siete de las nueve de formales del cBc. El análisis mediante este software se basó en espectros reducidos, a los cuales se les eliminaron todos los picos comunes a las especies del cBc y se retuvieron los variables. Pese a utilizar la información más discriminativa del espectro, la metodología propuesta no logró la resolución de todas las especies del cBc. En cambio en nuestro trabajo, la información contenida en el espectro de masa reducido no solo permitió la discriminación de todas las especies formales sino también de la nueva especie *B. contaminans*. Esto podría explicarse en el hecho que el protocolo de inactivación usado en nuestro trabajo, basado en TFA 80%, permite la solubilización de proteínas específicas obteniendo así un espectro discriminativo de todas las especies del cBc analizadas. Por tanto la aplicación de este protocolo de inactivación en la EMCE/MALDI-ToF constituye una metodología prometedora en el laboratorio microbiológico de rutina.

3.5 CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se muestra por primera vez en nuestro país el gran potencial de la metodología de EMCE/MALDI-ToF para la rápida y adecuada identificación BNF de relevancia clínica (*P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. xylooxidans*, *R. pickettii*, *I. limosus*) y miembros del cBc, incluyendo la nueva especie *B. contaminans*, aisladas de muestras de esputo de pacientes FQ. A partir del análisis y discusión de los resultados presentados es posible arribar a las siguientes conclusiones:

- El protocolo de inactivación originalmente propuesto para microorganismos altamente patógenos, demostró ser adecuado para el análisis de especies estrechamente relacionadas del cBc, obteniendo espectros de calidad (adecuada resolución, intensidad y numerosos picos) e información distintiva para cada de ellas. Asimismo resulta prometedor el empleo de este protocolo en la rápida identificación de especies de *Burkholderia* de alta patogenicidad (Nivel de bioseguridad 3) para el hombre como *B. pseudomallei* y *B. mallei*.
- El empleo de este protocolo pudo ser extendido a otros BNF relevantes (*P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *Achromobacter xylooxidans*) y emergentes (*R. pickettii*, *Pandoraea spp.* e *I. limosus*) aislados de pacientes FQ.
- La estrategia de análisis basada en la “vista tipo gel” o “gel view” mostró que el perfil de proteínas de los espectros de masa de células enteras es reproducible y contiene proteínas biomarcadoras específicas (SIBPs) las cuales permiten la discriminación e identificación de seis diferentes géneros de los BNF más relevantes y 11 especies del género *Burkholderia* que son conocidas como las principales causantes de infecciones en pacientes FQ.
- La inspección visual de las vistas en gel de espectros del género *Burkholderia*, reveló la presencia de SIBPs a 7501 y 7900 Da en el espectro de *B. contaminans*. Estos picos están ausentes en el espectro de las nueve especies formales del cBc y por tanto son biomarcadores distintivos de la nueva especie *B. contaminans*.
- La vista en gel demostró que la EMCE/MALDI-ToF posee cierto grado de discriminación a nivel de cepa, encontrando SIBPs correspondientes a distintas cepas de *B. multivorans*, *B. dolosa* y *B. anthina*.

- Diversos SIBPs comunes y distintivos de las especies del género *Burkholderia* fueron identificados como proteínas ribosomales y/o de expresión constitutiva, lo cual demuestra que la reproducibilidad, robustez y precisión de esta metodología se debe en gran manera a la presencia de estas proteínas en el espectro bacteriano.
- La estrategia de identificación de especies estrechamente relacionadas del cBc y BNF basada en el análisis multivariado (AJC) de espectros reducidos (análogo al código de barras), posibilitó la clara diferenciación de BNF (*P. aeruginosa*, *R. pickettii*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *Pandoraea spp.* y *I. limosus*) en clusters de géneros separados. Asimismo las 11 especies del género *Burkholderia* pudieron ser agrupadas correctamente incluyendo la nueva especie *B. contaminans* del Taxón K.
- La evaluación del poder de discriminación de EMCE/MALDI-ToF de aislados clínicos del cBc mediante AJC empleando espectros reducidos demostró una excelente discriminación a nivel de especie de todos los aislados clínicos evaluados, en particular de la especie *B. contaminans* y bacterias pertenecientes al Taxón K.
- La excelente discriminación e identificación de especies del cBc y BNF mediante el empleo de AJC demuestra que la información contenida en el espectro simplificado (análogo a un “código de barras”), no provoca una reducción en el poder de discriminación de EMCE/MALDI-ToF y al mismo tiempo constituye un formato adecuado para el análisis de microorganismos a través de esta metodología.

En resumen, las estrategias usadas en EMCE/MALDI-ToF, tales como la selección visual de SIBPs y el análisis de cluster jerárquico, demostró ser efectiva para identificaciones precisas de bacterias estrechamente relacionadas como las del cBc, incluyendo la nueva especie *B. contaminans* del Taxón K. EMCE/MALDI-ToF constituye una metodología prometedora en laboratorios microbiológicos de media-alta complejidad.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

1. **Anhalt, J. P., and C. Fenselau.** 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem* **47**:219-225.
2. **Arnold, R. J., and J. P. Reilly.** 1998. Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* **12**:630-6.
3. **Assaad, W., M. Magalhaes, M. Plesa, C. A. Hart, P. Cornelis, and C. Winstanley.** 2006. Identical *Burkholderia cepacia* complex strain types isolated from multiple patients attending a hospital in Brazil. *J Med Microbiol* **55**:247-9.
4. **Bernardo, K., N. Pakulat, M. Macht, O. Krut, H. Seifert, S. Fler, F. Hunger, and M. Kronke.** 2002. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **2**:747-53.
5. **Bittar, F., and J. M. Rolain.** 2010. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:809-820.
6. **Bosch, A., A. Minan, C. Vescina, J. Degrossi, B. Gatti, P. Montanaro, M. Messina, M. Franco, C. Vay, J. Schmitt, D. Naumann, and O. Yantorno.** 2008. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2535-2546.
7. **Bright, J. J., M. A. Claydon, M. Soufian, and D. B. Gordon.** 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J Microbiol Methods* **48**:127-38.
8. **Campana, S., G. Taccetti, N. Ravenni, F. Favari, L. Cariani, A. Sciacca, D. Savoia, A. Collura, E. Fiscarelli, G. De Intinis, M. Busetti, A. Cipolloni, A. d'Aprile, E. Provenzano, I. Collebrusco, P. Frontini, G. Stassi, M. Trancassini, D. Tovagliari, A. Lavitola, C. J. Doherty, T. Coenye, J. R. Govan, and P. Vandamme.** 2005. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol* **43**:5136-42.
9. **Carbonnelle, E., J. L. Beretti, S. Cottyn, G. Quesne, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.** 2007. Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **45**:2156-61.
10. **Caroff, M., C. Deprun, and D. Karibian.** 1993. ²⁵²Cf plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of underivatized rough-type endotoxin preparations. *J Biol Chem* **268**:12321-4.
11. **Claydon, M. A., S. N. Davey, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon.** 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **14**:1584-6.

12. **Conway, G. C., S. C. Smole, D. A. Sarracino, R. D. Arbeit, and P. E. Leopold.** 2001. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:103-12.
13. **Costa, K., G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, P. Falk, M. A. de Pedro, and F. Garcia-del Portillo.** 1999. The Morphological Transition of *Helicobacter pylori* Cells from Spiral to Coccoid Is Preceded by a Substantial Modification of the Cell Wall. *J. Bacteriol.* **181**:3710-3715.
14. **Cotter, J. R.** 1984. Pyrolysis and desorption mass spectrometry, p. 42-86. *In* K. J. Voorhees (ed.), *Analytical pyrolysis. Techniques and applications*, Butterworth & Co., London.
15. **Cunha, M. V., A. Pinto-de-Oliveira, L. Meirinhos-Soares, M. J. Salgado, J. Melo-Cristino, S. Correia, C. Barreto, and I. Sa-Correia.** 2007. Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major Portuguese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* **45**:1628-33.
16. **Degand, N., E. Carbonnelle, B. Dauphin, J. L. Beretti, M. Le Bourgeois, I. Sermet-Gaudelus, C. Segonds, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.** 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **46**:3361-7.
17. **Demirev, P. A., Y. P. Ho, V. Ryzhov, and C. Fenselau.** 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem* **71**:2732-8.
18. **Dickinson, D. N., M. T. La Duc, W. E. Haskins, I. Gornushkin, J. D. Winefordner, D. H. Powell, and K. Venkateswaran.** 2004. Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry-based protein profiling. *Appl Environ Microbiol* **70**:475-82.
19. **Dieckmann, R., I. Graeber, I. Kaesler, U. Szewzyk, and H. von Dohren.** 2005. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl Microbiol Biotechnol* **67**:539-48.
20. **Dieckmann, R., R. Helmuth, M. Erhard, and B. Malorny.** 2008. Rapid classification/identification of salmonellae at the species and subspecies level using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*:AEM.01402-08.
21. **Donohue, M. J., A. W. Smallwood, S. Pfaller, M. Rodgers, and J. A. Shoemaker.** 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J Microbiol Methods* **65**:380-9.
22. **Du, Z., R. Yang, Z. Guo, Y. Song, and J. Wang.** 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Its Methicillin Resistance by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**:5487-5491.

23. **Easterling, M. L., C. M. Colangelo, R. A. Scott, and I. J. Amster.** 1998. Monitoring protein expression in whole bacterial cells with MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **70**:2704-9.
24. **Edwards-Jones, V., M. A. Claydon, D. J. Evason, J. Walker, A. J. Fox, and D. B. Gordon.** 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* **49**:295-300.
25. **Fenselau, C., and P. A. Demirev.** 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **20**:157-71.
26. **Friedrichs, C., A. C. Rodloff, G. S. Chhatwal, W. Schellenberger, and K. Eschrich.** 2007. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol* **45**:2392-7.
27. **Haag, A. M., S. N. Taylor, K. H. Johnston, and R. B. Cole.** 1998. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **33**:750-756.
28. **Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn, and D. Naumann.** 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* **137**:69-79.
29. **Heller, D. N., R. J. Cotter, C. Fenselau, and O. M. Uy.** 1987. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem* **59**:2806-9.
30. **Heller, D. N., C. M. Murphy, R. J. Cotter, C. Fenselau, and O. M. Uy.** 1988. Constant neutral loss scanning for the characterization of bacterial phospholipids desorbed by fast atom bombardment. *Anal Chem* **60**:2787-91.
31. **Holland, R. D., C. R. Duffy, F. Rafii, J. B. Sutherland, T. M. Heinze, C. L. Holder, K. J. Voorhees, and J. O. Lay, Jr.** 1999. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Anal Chem* **71**:3226-30.
32. **Holland, R. D., F. Rafii, T. M. Heinze, J. B. Sutherland, K. J. Voorhees, and J. O. Lay, Jr.** 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric detection of bacterial biomarker proteins isolated from contaminated water, lettuce and cotton cloth. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**:911-7.
33. **Holland, R. D., J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, and J. O. Lay, Jr.** 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**:1227-32.
34. **Ishida, Y., O. Nakanishi, S. Hirao, S. Tsuge, J. Urabe, T. Sekino, M. Nakanishi, T. Kimoto, and H. Ohtani.** 2003. Direct Analysis of Lipids in Single Zooplankter Individuals by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **75**:4514-4518.
35. **Jackson, K. A., V. Edwards-Jones, C. W. Sutton, and A. J. Fox.** 2005. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* **62**:273-84.

36. **Jacquier, H., E. Carbonnelle, S. Corvec, M. Illiaquer, A. Le Monnier, E. Bille, J. Zahar, J. Beretti, F. Jauréguy, V. Fihman, J. Tankovic, and V. Cattoir.** 2011. Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*:1-8.
37. **Jorda-Vargas, L., J. Degrossi, N. C. Castaneda, M. D'Aquino, M. A. Valvano, A. Procopio, L. Galanternik, and D. Centron.** 2008. Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. *J Clin Microbiol* **46**:1151-2.
38. **Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp.** 1987. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **78**:53-68.
39. **Karas, M., and F. Hillenkamp.** 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* **60**:2299-2301.
40. **Keys, C. J., D. J. Dare, H. Sutton, G. Wells, M. Lunt, T. McKenna, M. McDowall, and H. N. Shah.** 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* **4**:221-42.
41. **Krishnamurthy, T., and P. L. Ross.** 1996. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* **10**:1992-6.
42. **Kumar, M. P., M. Vairamani, R. P. Raju, C. Lobo, N. Anbumani, C. P. Kumar, T. Menon, and S. Shanmugasundaram.** 2004. Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian J Med Res* **119**:283-288.
43. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**:150-63.
44. **Lasch, P., W. Beyer, H. Nattermann, M. Stammler, E. Siegbrecht, R. Grunow, and D. Naumann.** 2009. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:7229-7242.
45. **Lasch, P., H. Nattermann, M. Erhard, M. Stammler, R. Grunow, N. Bannert, B. Appel, and D. Naumann.** 2008. MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Anal Chem* **80**:2026-34.
46. **Lay, J. O.** 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**:507-516.
47. **Lay, J. O., and R. D. Holland.** 2000. Protein and Peptide Analysis. *In* J. R. Chapman (ed.), *New Mass Spectrometric Applications*. Humana Press, Totowa, NJ.
48. **Lay, J. O., and R. Liyanage.** 2006. *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Intact Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc.

49. **Li, T. Y., B. H. Liu, and Y. C. Chen.** 2000. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **14**:2393-2400.
50. **Liu, H., Z. Du, J. Wang, and R. Yang.** 2007. Universal Sample Preparation Method for Characterization of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:1899-1907.
51. **Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, P. Drevinek, E. Vanlaere, P. Vandamme, J. J. LiPuma, and C. G. Dowson.** 2006. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. *PLoS ONE* **1**:e17.
52. **Mahenthiralingam, E., J. Bischof, S. K. Byrne, C. Radomski, J. E. Davies, Y. Av-Gay, and P. Vandamme.** 2000. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* **38**:3165-73.
53. **Majcherczyk, P. A., T. McKenna, P. Moreillon, and P. Vaudaux.** 2006. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **255**:233-239.
54. **Mandrell, R. E., L. A. Harden, A. Bates, W. G. Miller, W. F. Haddon, and C. K. Fagerquist.** 2005. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* **71**:6292-307.
55. **Marvin, L. F., M. A. Roberts, and L. B. Fay.** 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* **337**:11-21.
56. **Mazzeo, M. F., A. Sorrentino, M. Gaita, G. Cacace, M. Di Stasio, A. Facchiano, G. Comi, A. Malorni, and R. A. Siciliano.** 2006. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **72**:1180-9.
57. **Mellmann, A., F. Bimet, C. Bizet, A. D. Borovskaya, R. R. Drake, U. Eigner, A. M. Fahr, Y. He, E. N. Ilina, M. Kostrzewa, T. Maier, L. Mancinelli, W. Moussaoui, G. Prevost, L. Putignani, C. L. Seachord, Y. W. Tang, and D. Harmsen.** 2009. High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **47**:3732-3734.
58. **Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa, and D. Harmsen.** 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* **46**:1946-54.

59. **Pan, C., S. Xu, H. Zhou, Y. Fu, M. Ye, and H. Zou.** 2007. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**:193-204.
60. **Platt, J. A., O. M. Uy, D. N. Heller, R. J. Cotter, and C. Fenselau.** 1988. Computer-based linear regression analysis of desorption mass spectra of microorganisms. *Anal Chem* **60**:1415-9.
61. **Ross, M. M., R. A. Neihof, and J. E. Campana.** 1986. Direct fatty acid profiling of complex lipids in intact algae by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **181**:149–157.
62. **Ruelle, V., B. El Moulaj, W. Zorzi, P. Ledent, and E. D. Pauw.** 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**:2013-9.
63. **Rupf, S., K. Breitung, W. Schellenberger, K. Merte, S. Kneist, and K. Eschrich.** 2005. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol* **20**:267-73.
64. **Ryzhov, V., and C. Fenselau.** 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* **73**:746-50.
65. **Sauer, S., A. Freiwald, T. Maier, M. Kube, R. Reinhardt, M. Kostrzewa, and K. Geider.** 2008. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLoS One* **3**:e2843.
66. **Shaw, E. I., H. Moura, A. R. Woolfitt, M. Ospina, H. A. Thompson, and J. R. Barr.** 2004. Identification of biomarkers of whole *Coxiella burnetii* phase I by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **76**:4017-22.
67. **Siegrist, T. J., P. D. Anderson, W. H. Huen, G. T. Kleinheinz, C. M. McDermott, and T. R. Sandrin.** 2007. Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J Microbiol Methods* **68**:554-62.
68. **Skultety, L., L. Hernychova, E. Bereghazyova, K. Slaba, and R. Toman.** 2007. Detection of specific spectral markers of *Coxiella burnetii* isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Acta Virol* **51**:55-8.
69. **Stackebrandt, E., O. Pauker, and M. Erhard.** 2005. Grouping myxococci (*Corallocooccus*) strains by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI TOF) mass spectrometry: comparison with gene sequence phylogenies. *Curr Microbiol* **50**:71-7.
70. **Suh, M. J., D. M. Hamburg, S. T. Gregory, A. E. Dahlberg, and P. A. Limbach.** 2005. Extending ribosomal protein identifications to unsequenced bacterial strains using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* **5**:4818-31.
71. **Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo.** 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser

- ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2**:151-153.
72. **Teramoto, K., H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda, and H. Tamura.** 2007. Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Anal Chem* **79**:8712-9.
 73. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876-82.
 74. **Valentine, N., S. Wunschel, D. Wunschel, C. Petersen, and K. Wahl.** 2005. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* **71**:58-64.
 75. **van Baar, B. L.** 2000. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev* **24**:193-219.
 76. **van Baar, B. L. M.** 2000. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:193-219.
 77. **van Veen, S. Q., E. C. J. Claas, and E. J. Kuijper.** 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in routine medical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.:*JCM.02071-09.
 78. **Vanlaere, E., K. Sergeant, P. Dawyndt, W. Kallow, M. Erhard, H. Sutton, D. Dare, B. Devreese, B. Samyn, and P. Vandamme.** 2008. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J Microbiol Methods* **75**:279-86.
 79. **Vargha, M., Z. Takáts, A. Konopka, and C. H. Nakatsu.** 2006. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **66**:399-409.
 80. **Walker, J., A. J. Fox, V. Edwards-Jones, and D. B. Gordon.** 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *Journal of Microbiological Methods* **48**:117-126.
 81. **Williams, T. L., D. Andrzejewski, J. O. Lay, and S. M. Musser.** 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**:342-51.
 82. **Wollnik, H.** 1993. Time-of-flight mass analyzers. *Mass Spectrometry Reviews* **12**:89-114.
 83. **Wunschel, D. S., E. A. Hill, J. S. McLean, K. Jarman, Y. A. Gorby, N. Valentine, and K. Wahl.** 2005. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on Matrix Assisted

- Laser Desorption/Ionization whole cell protein fingerprints. *Journal of Microbiological Methods* **62**:259-271.
84. **Wunschel, S. C., K. H. Jarman, C. E. Petersen, N. B. Valentine, K. L. Wahl, D. Schauki, J. Jackman, C. P. Nelson, and E. t. White.** 2005. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J Am Soc Mass Spectrom* **16**:456-62.
85. **Zarrouk, H., D. Karibian, S. Bodie, M. B. Perry, J. C. Richards, and M. Caroff.** 1997. Structural characterization of the lipids A of three *Bordetella bronchiseptica* strains: variability of fatty acid substitution. *J Bacteriol* **179**:3756-60.

**Estudio de susceptibilidad a agentes
antimicrobianos en células planctónicas y
sésiles del complejo *Burkholderia cepacia***

4.1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pertenecientes al cBc se caracterizan por su versatilidad y resistencia innata a una amplia variedad de agentes antimicrobianos [30, 68]. Estas propiedades le permiten a estas bacterias sobrevivir en diferentes nichos ecológicos y colonizar el tracto respiratorio de pacientes FQ. Diversos estudios han asociado la colonización pulmonar por miembros del cBc con el acelerado deterioro clínico y el aumento de riesgo de muerte de estos pacientes [25-26].

El cuadro clínico del paciente, una vez colonizado por bacterias del cBc, es en extremo variable. En algunos individuos la enfermedad puede cursar en forma asintomática, mientras que en otros puede desarrollarse durante años una infección pulmonar crónica que conducirá a la pérdida progresiva de la función del mismo. En ocasiones, las bacterias del cBc pueden ser responsables de un cuadro clínico conocido como “síndrome cepacia”, el cual está caracterizado por una neumonía necrotizante asociada a fiebre y bacteriemia [34]. En el paciente FQ, estas bacterias son capaces de desarrollar, una infección aguda, creciendo y propagándose rápidamente en el huésped así como de adoptar una estrategia de infección crónica. Por estos motivos el tratamiento de individuos FQ infectados, en forma aguda ó crónica, con bacterias del cBc requerirá de una terapia antibiótica sostenida y agresiva (ver ítem 1.6.1).

Lamentablemente a causa de la resistencia intrínseca de este grupo de patógenos a numerosos antibióticos, las opciones terapéuticas son limitadas [5, 25, 36, 41, 43]. Entre los fármacos más usados para el tratamiento de infecciones del cBc se encuentran meropenem, ceftazidima, minociclina, cotrimoxazol y ciprofloxacina. Asimismo combinaciones de agentes antimicrobianos tales como fluoroquinolonas junto a β -lactámicos (ej. ciprofloxacina + meropenem) han sido también recomendadas [1]. Si bien varios estudios han reportado que la erradicación de microorganismos del tracto respiratorio inferior de pacientes FQ es difícil de lograr, la disminución de la carga bacteriana y de la producción de factores de virulencia luego del tratamiento antimicrobiano conduce a la disminución de la inflamación y a la mejora de los parámetros de función pulmonar en estos pacientes [8, 29, 62].

La persistencia de las infecciones a nivel pulmonar en pacientes FQ está asociada al hecho que los miembros del cBc son capaces de crecer como biofilm en el mucus pulmonar [59], estrategia que confiere a las bacterias sésiles una notable

resistencia a los antibióticos y capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador [40, 61], haciendo su erradicación prácticamente imposible [21]. Generalmente, la terapia antimicrobiana suprime los síntomas asociados con la liberación intermitente de células planctónicas desde el biofilm durante la exacerbación de la enfermedad [29, 55]. Sin embargo los agentes antimicrobianos suelen fracasar en erradicar las células sésiles ya que éstas son más tolerantes a los antibióticos comparadas con sus contrapartes planctónicas [61]. Se ha postulado que la particular organización del biofilm actuaría como una barrera física que protege a las células sésiles de efectores externos, lo cual dificultaría la fagocitosis y los procesos de opsonización y lisis mediados por complemento [61]. Por este motivo, el tratamiento de pacientes FQ, que padecen de infección crónica por organismos del cBc, se vuelve muy problemático.

Debido a que parte de la resistencia que presenta un biofilm depende de su estructura, una estrategia para combatirlos es implementar una terapia antimicrobiana que rompa los agregados multicelulares de manera que las defensas del huésped sean capaces de resolver la infección. En este contexto se ha demostrado que algunos antibióticos (ej. macrólidos y fluoroquinolonas) tienen la propiedad de inhibir la síntesis de polisacáridos e interrumpir señales bacterianas vinculadas a la formación de biofilm [20, 52, 58]. Por lo tanto, se podría especular que agentes antimicrobianos que cuenten con la capacidad de inhibir la síntesis de la matriz, desestabilizar y/o destruir el biofilm producido por patógenos respiratorios, podrían ofrecer ventajas sobre otros antibióticos que carecen de esa habilidad.

En los últimos cinco años, *B. contaminans* ha sido uno de los patógenos respiratorios dominantes en los principales centros nosocomiales argentinos, seguido por *B. cenocepacia* y *B. cepacia* [37, 47]. Sin embargo, gracias a la implementación de estrictas medidas de control en cuanto a la permanencia de pacientes en hospitales, la transmisión de cepas del cBc entre los mismos se ha reducido significativamente. Desafortunadamente estas medidas no han logrado prevenir la emergencia de infecciones, originadas en la adquisición de bacterias ubicuas como *B. contaminans* provenientes de productos comerciales, industriales o del medio ambiente.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios de susceptibilidad antimicrobiana de miembros del cBc, enfocados especialmente en *B. cenocepacia* y *B. multivorans*, como base para proponer un tratamiento terapéutico efectivo [1, 7, 39, 50, 57, 69]. Sin embargo se conoce muy poco a nivel internacional sobre el perfil de

susceptibilidad antimicrobiana de la nueva especie *B. contaminans* descrita en 2009 [66]. Por tanto resulta esencial evaluar en aislados locales de *B. contaminans* la efectividad de los fármacos que habitualmente se emplean en el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por miembros del cBc a fin de establecer si dichos tratamientos son adecuados o deben ser modificados.

Antes de enunciar los objetivos de este capítulo se describen brevemente los fundamentos de los métodos comúnmente empleados en la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de cultivos planctónicos y biofilms.

4.1.1 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cultivos planctónicos

El ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM) ha sido usado como método “gold standard” para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de patógenos bacterianos. Mediante el ensayo de CIM se asume que si un antibiótico es inefectivo en inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo, también lo será en la práctica clínica. Sin embargo un microorganismo que es sensible a un antibiótico en condiciones *in vitro*, podría no serlo *in vivo*.

La CIM se define como la mínima concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo y se suele expresar en $\mu\text{g/ml}$ [6]. Por tanto, es una medida de la actividad antimicrobiana intrínseca (potencia) de un antibiótico. Asimismo, el valor de CIM establece que un microorganismo es sensible a un determinado antibiótico, cuando este valor es menor o equivalente al valor de corte de sensibilidad (breakpoint) del antibiótico ensayado. Por ejemplo, si una cepa de *B. cepacia* exhibe un valor de CIM para el antibiótico ciprofloxacina equivalente a $0,25 \mu\text{g/ml}$, y el valor de corte de sensibilidad a ciprofloxacina es $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, entonces esta cepa de *B. cepacia* se considera sensible a ciprofloxacina. En cambio, una cepa de *B. cepacia* con un valor de CIM igual a $16 \mu\text{g/ml}$, se considera resistente a ciprofloxacina. Los valores de CIM son reproducibles siempre que las condiciones experimentales se encuentren debidamente estandarizadas. Para ello, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) estableció un protocolo para la determinación de la CIM y los valores de cortes para antibióticos empleados en el tratamiento bacterias del cBc y BNF [12]. Esta determinación consiste en incorporar diferentes concentraciones del antibiótico al medio líquido (normalmente diluciones seriadas al

doble), agregarlas al recipiente (comúnmente placa multipocillo) de manera de formar un gradiente de concentración de antibiótico, inocular a continuación con suspensión bacteriana el recipiente, incubar y examinar el crecimiento [6]. Los principales parámetros de este protocolo son: la concentración de inoculo (10^4 a 10^5 UFC/ml), y el tiempo de incubación que debe encontrarse en el rango de 18 a 20 h. Si estas condiciones se respetan estrictamente los resultados serán reproducibles y comparables a los obtenidos por otros laboratorios. Asimismo se puede determinar la concentración bactericida mínima (CBM) a través del ensayo de CIM mediante el subcultivo, en agar que no contiene antibióticos, de la suspensión del pocillo que no presenta crecimiento visible, después de incubarlos durante 24 h. Así, la menor concentración del antibiótico que produce la reducción $\geq 99,9\%$ del inoculo inicial se define como la CBM [23]. Es importante señalar que la CIM no debe matar necesariamente al microorganismo en estudio. La acción del antibiótico puede implicar que las células bacterianas mueran o dejen de crecer motivo por el cual los agentes antimicrobianos se pueden clasificar en bactericidas o bacteriostáticos. Los antibióticos bactericidas matan a las bacterias, mientras que los antibióticos bacteriostáticos simplemente evitan que éstas se multipliquen y permiten que el sistema inmune elimine las bacterias restantes [3].

Diversas clases de antibióticos que comprenden desde β -lactámicos hasta fluoroquinolonas se emplean en el tratamiento de infecciones pulmonares en pacientes FQ. Lamentablemente la resistencia innata de las bacterias del cBc a numerosos antibióticos hace que las opciones terapéuticas se encuentren limitadas a unos pocos fármacos. Habitualmente la elección de los antibióticos para el tratamiento de pacientes FQ se basa en los ensayos de susceptibilidad *in vitro*. Para ello se puede emplear el ensayo de CIM de cultivos planctónicos de acuerdo al protocolo propuesto por el CLSI [12]. Los antibióticos recomendados para el ensayo de susceptibilidad de bacterias del cBc son los siguientes: ceftazidima, meropenem, minociclina, ciprofloxacina, levofloxacina y cotrimoxazol (trimetroprima + sulfametoxazol) (Tabla 1) [10, 69].

Tabla 1. Principales blancos y mecanismos de acción de los antibióticos

Antibiótico		Blanco de acción	Mecanismo de acción	Actividad	Administración
β-lactámicos	Ceftazidima	Transpeptidasas	Inhibe la síntesis de peptidoglucano de la pared celular	Bactericida	i. v
	Meropenem				
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Girasa y topoisomerasa IV	Inhibe la síntesis de ADN y ARNm	Bactericida	oral, i. v
	Levofloxacina				
Tetraciclinas	Minociclina	ARNr 16S (centro de decodificación)	Inhibe la síntesis proteica	Bacteriostático	oral
Sulfonamidas	Sulfametoxazol*	Sintetasa de dihidropteroato	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos	Bacteriostático	oral
	Trimetroprima*	Reductasa de dihidrofolato	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos	Bacteriostático	oral

* La combinación de los fármacos trimetroprima y sulfametoxazol se conoce como cotrimoxazol. Actúan inhibiendo la síntesis bacteriana del ácido tetrahidrofolínico, cofactor necesario en la síntesis del ADN bacteriano. Abreviaturas: i.v: intravenosa; ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; ARNm: ARN mensajero; ARNr: ARN ribosómico.

Tabla adaptada del trabajo publicado por Martínez y Sánchez [46].

4.1.2 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cultivos en biofilms

Aunque el ensayo de CIM ha sido el método estándar para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de células planctónicas, esta técnica ha sido objeto de críticas por no reflejar el comportamiento bacteriano *in vivo*. Un estudio realizado por Leitao y cols [39] en pacientes FQ infectados crónicamente por cepas del cBc reportaron que a pesar de aplicar una terapia antimicrobiana aparentemente adecuada, basada en los resultados del ensayo de CIM, el 60% de los pacientes manifestó una infección persistente con la misma cepa en un periodo de 4 a 6 meses. Esta observación refuerza la idea que los ensayos de susceptibilidad *in vitro* tradicionales pueden fallar en predecir la sensibilidad de las bacterias *in vivo*. Esto podría explicarse por el hecho que la prueba de CIM determina la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias cultivadas en forma planctónica lo cual podría no ser equivalente a la susceptibilidad de bacterias cuando crecen en biofilm en pulmones de pacientes FQ. Por esta razón, Caraher y cols [9] han sugerido que la determinación de susceptibilidad a agentes antimicrobianos en biofilms del cBc podría ser en la práctica clínica más adecuada que el método tradicional basado en cultivos planctónicos.

Se han desarrollado diversos ensayos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias crecidas en biofilms [9, 11, 18, 42, 49, 64-65], aunque hasta la fecha no existe un diseño estandarizado para este propósito. Si bien los protocolos propuestos son variados, estos comparten etapas en común (Fig. 1): a) formación del biofilm bacteriano (6 – 48 h) sobre un soporte de poliestireno (placa multipocillos), b) exposición del biofilm formado al agente antimicrobiano (18- 24 h), c) remoción del antimicrobiano e incubación en medio de cultivo fresco por un tiempo determinado (6 a 24 h) y d) determinación de la concentración inhibitoria mínima del biofilm (CIMB). El punto final del ensayo (valor de CIMB) es en general la mínima concentración de antibiótico donde no se observa recrecimiento del biofilm, es decir no se aprecia aparición de células planctónicas (turbidez), al cumplirse el tiempo de incubación establecido.

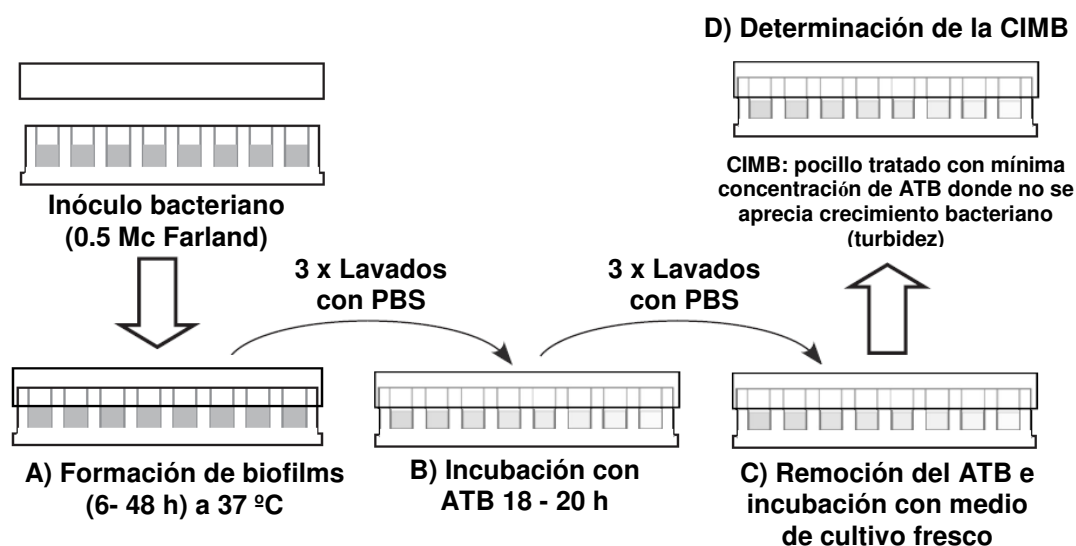


Fig. 1. Etapas generales del ensayo de determinación de la concentración inhibitoria mínima del biofilm (CIMB). Se ilustran 4 etapas comunes: (A) formación del biofilm, (B) incubación con ATB, (C) remoción del ATB e incubación con medio de cultivo fresco y (D) determinación de CIMB. Abreviaturas: ATB, antibiótico; PBS: buffer fosfato salino.

4.2 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto, en el presente trabajo nos avocamos a determinar la susceptibilidad a agentes antimicrobianos, de una colección de aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans*, crecidos en forma planctónica y en biofilms, a fin de establecer una terapia antibiótica efectiva en pacientes FQ. Asimismo en este estudio consideramos aislados clínicos de otras especies relevantes del cBc como *B. cepacia* y *B. cenocepacia*.

Los principales objetivos de esta parte del trabajo fueron:

- 1.- Estudiar la susceptibilidad *in vitro* de 99 aislados del cBc a los agentes antimicrobianos: ceftazidima, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, cotrimoxazol, y minociclina. Para ello se evaluaron 92 aislados clínicos correspondientes a tres especies clínicamente relevantes, *B. cepacia* (5), *B. cenocepacia* (12) y *B. contaminans* (75). Asimismo debido a la ubicuidad de *B. contaminans* se incluyeron en el este estudio 7 aislados procedentes del ambiente.
- 2.- Analizar el efecto de agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones del cBc en Argentina sobre las especies más relevantes del cBc, creciendo en forma planctónica y en biofilm.
 - Comparar la susceptibilidad antimicrobiana de células planctónicas y sésiles
 - El efecto bactericida de antibióticos individuales y dobles combinaciones de antibióticos sobre células sésiles en biofilms maduros
 - El efecto destructor de los antibióticos individuales y de las dobles combinaciones de antibióticos sobre biofilms maduros
- 3.- Seleccionar posibles terapias antimicrobianas para pacientes FQ en función de la cepa bacteriana aislada.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Microorganismos

En este estudio se emplearon un total de 99 aislados del cBc procedentes de centros nosocomiales (92 aislados) y de muestras del ambiente (7 aislados) (Tabla 2). Los aislados clínicos fueron obtenidos en el período 2003-2008 por los Servicios de Microbiología de los siguientes hospitales: Hospital de Niños “Sor María Ludovica” La Plata; Buenos Aires, Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”; Hospital de Clínicas, Buenos Aires y Hospital de Niños “Santísima Trinidad”, Córdoba. La mayoría de los aislados clínicos (87%) fueron recuperados de muestras de esputo de pacientes FQ con la excepción de 5 (13%) que fueron recuperados de hemocultivos. Las cepas ambientales fueron aisladas e identificadas por Dr. José Degrossi de la cátedra de Higiene de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la UBA. Todas las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas tradicionales y confirmadas mediante técnicas de biología molecular [14, 44]. Los stocks de cada aislado fueron mantenidos a -70°C en caldo tripticasa soya (Laboratorio Britania, Buenos Aires, Argentina) conteniendo 10% de glicerol, tal como se indicó en los capítulos anteriores.

4.3.2 Antibióticos

Los antibióticos empleados en este estudio fueron los siguientes: ceftazidima (CAZ; FortumTM, GlaxoSmithKline), ciprofloxacina (CIP; ICN, UK), levofloxacina (LEV; Tavanic; Aventis Pharma, Alemania, Italia), cotrimoxazol (COX, Sigma-Aldrich, UK), meropenem (MEM; Merozem, AstraZeneca), minociclina (MIN; Sigma-Aldrich, UK). Para cultivos en biofilm se ensayaron además dos combinaciones de antibióticos, ciprofloxacina + cotrimoxazol (CIP/COX) y levofloxacina + meropenem (LEV/MEM). La combinación CIP/COX fue preparada como una mezcla de diluciones de ciprofloxacina y cotrimoxazol en el rango de 2 a 16 $\mu\text{g/ml}$ y 4 a 32 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que LEV/MEM fue preparada como una mezcla de diluciones de levofloxacina y meropenem en concentraciones de 1 a 16 $\mu\text{g/ml}$ y 2 a 32 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Tabla 2. Aislados del complejo *Burkholderia cepacia* usados en este estudio

Especies	Cepa	Origen	Similitud con secuencia del Genbank
<i>B. cepacia</i> (aislados clínicos; n = 5)	BC13	no FQ	DQ989509
	GIH	no FQ	DQ989510
	GZ240	FQ	DQ90120
	G5	FQ	DQ90120
	GZ 805237	Hemocultivo	DQ90120
<i>B. cenocepacia</i> (aislados clínicos; n = 12)	GZ MSE	FQ	-
	GZ 323	FQ	AM747720
	GZ 147	Hemocultivo	GU951940
	HST 51393	Hemocultivo	AM747720
	HST103	FQ	AM747720
	NF 171	FQ	GU951940
	NF 172	FQ	GU951940
	FQ 6403	FQ	AY598028
	FQ 6593	FQ	FJ555043
	FQ 6717	FQ	GU951940
	J190	FQ	FJ555029
	GZ 400	FQ	GU951940
	<i>B. contaminans</i> (aislados clínicos; n = 75)	BC11	no FQ
BC15		no FQ	EF602577
BC24		no FQ	GU938636
BC25		no FQ	GU938636
BC26		no FQ	GU938636
G1		FQ	GU951969
G2		FQ	GU938664
G4		FQ	GU938636
GZ 295		FQ	AM905037
GZ 307		FQ	GU951938
HST 09		FQ	GU938664
HST 10		FQ	GU938664
HST 11		FQ	GU938664
HST 12		FQ	GU938664
HST 13		FQ	GU938664
HST 14		FQ	GU938664
HST 15		FQ	GU938664
HST 16		FQ	GU938664
HST 17		FQ	GU938664
HST 18		FQ	GU938664
HST 25		FQ	GU938664
HST 26		FQ	GU938664
HST 27		FQ	GU938664
HST 28		FQ	GU938664
HST 29		FQ	GU938664
HST 31		FQ	AM905036
HST 32		FQ	GU938664
HST 33		FQ	GU938664
HST 34		FQ	GU938664
HST 35		FQ	AM905036
HST 43		FQ	GU938664
HST 44		FQ	GU938664
HST 45		FQ	GU938664

Tabla 2. continuación

Especies	Cepa	Origen	Similitud con secuencia del Genbank
<i>B. contaminans</i> (aislados clínicos; $n = 75$)	HST 46	FQ	GU938664
	HST 64	FQ	GU938664
	HST 73	FQ	GU938664
	HST 77	FQ	GU938664
	HST 78	FQ	GU938664
	HST 81	FQ	GU938664
	HST 88	FQ	GU938664
	HST 89	FQ	GU938664
	HST 91	FQ	GU938664
	HST 95	FQ	GU938664
	HST 99	FQ	GU938664
	HST 102	FQ	GU938664
	HST 105	FQ	GU938664
	HST 106	FQ	GU938664
	HST 108	FQ	GU938664
	HST 116	FQ	GU938664
	HST R1	FQ	AM905036
	HST R2	FQ	AM905036
	HST V1	FQ	AM905036
	FQ 6406	FQ	GU938664
	FQ 6507	FQ	AM905036
	FQ 6556	FQ	GU938664
	FQ 6929	FQ	AM905036
	FQ 6930	FQ	GU938664
	FQ 6931	FQ	GU938664
	FQ 7013	FQ	GU938664
	FQ 7740	FQ	GU144403
	FQ 7764	FQ	GU938664
	FQ 7823	FQ	GU938664
	FQ 7850	FQ	GU938664
	FQ 7905	FQ	GU938664
	FQ 7960	FQ	GU938664
	FQ 7967	FQ	GU938664
	J142a	FQ	GU938664
	NF 67	FQ	GU938664
	NF 70	FQ	GU938664
NF 71	FQ	GU938664	
NF 74	FQ	AM905036	
NF 75	FQ	GU938664	
NF 96	FQ	GU938664	
NF229	Hemocultivo	EF602577	
NF289	Hemocultivo	EF602577	
<i>B. contaminans</i> (aislados ambientales; $n = 7$)	A1	Equipo de destilación	AF905037
	AMB98	Desinfectante	EF602577
	MS14	Gel de uso hospitalario	AF456066
	S3	Agua de calidad farmacéutica	AM922303
	T1	Agua destilada	AM922303
	T3	Agua destilada	AM922303
	T5	Agua destilada	AM922303

4.3.3 Formación de biofilm. Cuantificación de biomasa

Para cuantificar la biomasa adherida a soportes se realizó un ensayo tal como fue descrito por O'Toole y cols [51] con modificaciones menores (Fig. 2). Brevemente, aislados del cBc fueron repicados dos veces en agar tripticasa soja (ATS; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) y luego crecidos durante la noche en caldo Mueller Hinton (Laboratorio Britania, Argentina) ajustado en cationes (CMHAC; suplementado con 25 $\mu\text{g/l}$ de calcio y 12,5 $\mu\text{g/l}$ de magnesio). Luego de diluir cada cultivo empleando CMHAC hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 en la escala MacFarland, se agregó 100 μl de inóculo sobre cada uno de los pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Kartell, Italia). Posteriormente las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. 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) en agua por 30 minutos. Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS y finalmente el CV asociado a la células fue solubilizado con etanol al 95% (v/v). La biomasa fue cuantificada indirectamente midiendo la densidad óptica a 570 nm (DO_{570}) del CV disuelto usando un lector de placas multipocillo (Benchmark Plus, Biorad). Se realizaron para cada cepa al menos 3 experimentos independientes. En cada ensayo se incluyeron controles del medio no inoculado (DOc). El valor de corte fue definido como tres desviaciones estándar sobre la media del DOc.

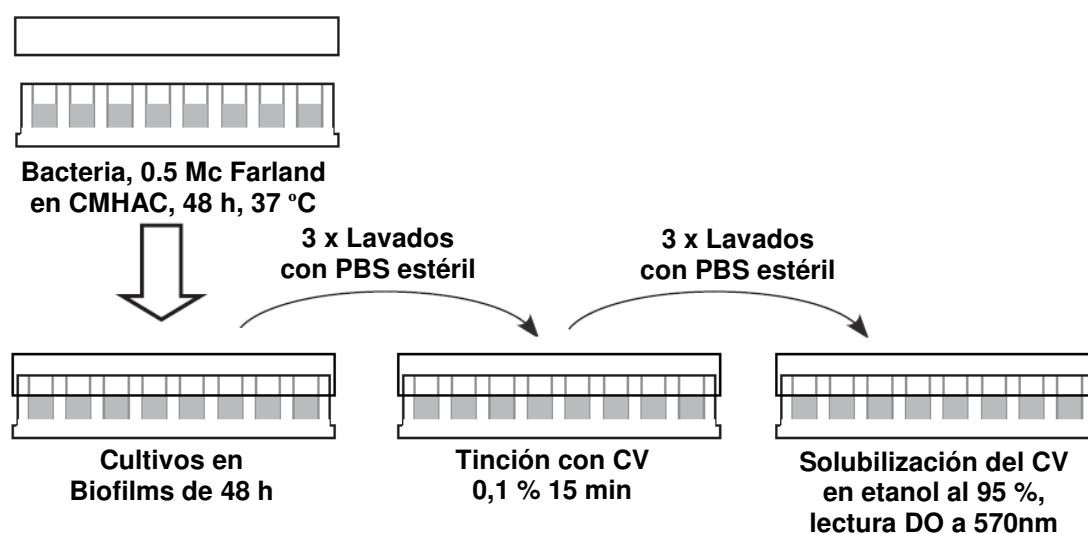


Fig. 2. Esquema del ensayo de formación de biofilm y evaluación de biomasa. Abreviaturas: CMHAC, caldo Mueller Hinton ajustado en cationes; CV, cristal violeta; PBS, buffer fosfato salino.

4.3.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima en células planctónicas

La concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada antibiótico y cepa fue obtenida usando CMHAC, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI para ensayos de susceptibilidad por microdilución en caldo [12]. La CIM fue definida como la concentración más baja de antibiótico donde no se detectó crecimiento bacteriano (turbidez). La determinación de los valores de CIM fue llevada a cabo por triplicado en suspensiones bacterianas independientes. La cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* fue usada como control en todos los ensayos. La concentración bactericida mínima (CBM) de antibiótico para las cepas seleccionadas fue determinada de la siguiente manera: 100 μ l de suspensión procedente de aquellos pocillos que no exhiben turbidez fueron subcultivados en placas de ATS a 37°C por 24 h. La menor concentración de antibiótico que permitió una reducción $\geq 99,9\%$ del inóculo inicial fue considerada como la CBM.

4.3.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima en biofilms

En este estudio, el protocolo empleado para la determinación de la concentración inhibitoria mínima en biofilms (CIMB) reúne características y parámetros de otros métodos propuestos previamente, en especial aquéllos considerados por Lipuma y cols [42], y Moskowitz y cols [49], los cuales fueron ajustados para el presente trabajo de manera de reunir las condiciones más adecuadas para nuestro estudio (Fig. 3). Brevemente, alícuotas (120 μ l) del inóculo estandarizado como se describió anteriormente, fueron agregadas a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos e incubados en condición estática a 37°C por 48 h. Los biofilms formados sobre la superficie de los pocillos fueron lavados cuidadosamente tres veces con PBS previo al agregado de diluciones seriadas de los antibióticos en CMHAC. Luego de 18 h de incubación a 37°C, los pocillos fueron nuevamente lavados tres veces con PBS. Posteriormente se agregó a cada pocillo CMHAC que contenía el indicador cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (CTT) al 0,1%. Este indicador es soluble e incoloro en su estado original pero forma una sal roja insoluble cuando es reducido por el complejo de enzimas de la cadena respiratoria bacteriana. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 6 h a 37°C. Las CIMBs fueron registradas por inspección visual y

espectrofotométricamente a 490 nm (Benchmark Plus, Biorad). Se definió la CIMB como la mínima concentración de antibiótico bajo la cual el pocillo permaneció incoloro al término de 6 h de reecrecimiento.

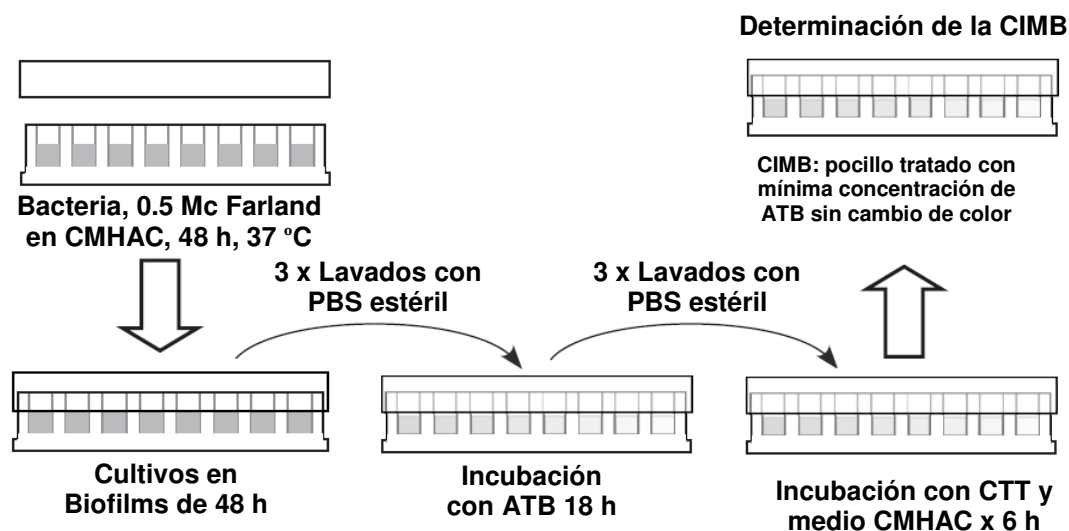


Fig. 3. Esquema del ensayo de determinación de la concentración inhibitoria mínima de biofilm (CIMB). Abreviaturas: ATB, antibiótico; CTT, cloruro de trifentiltetrazolio; CMHAC, caldo Mueller Hinton ajustado en cationes; PBS, buffer fosfato salino.

Como se aprecia en la Fig. 3, los parámetros que se seleccionaron para nuestro protocolo corresponden a la formación de biofilms maduros durante 48 h, exposición al antibiótico por 18 h, y un tiempo de reecrecimiento de 6 h posterior a la remoción del antibiótico y renovación del medio fresco. El reecrecimiento del biofilm se visualiza a través del cambio de color del indicador de viabilidad cloruro de 2,3,5 trifentiltetrazolio (CTT), el cual es soluble e incoloro en su estado original pero forma una sal roja insoluble cuando es oxidado por el complejo de enzimas oxidativas de la cadena respiratoria bacteriana [56]. Por tanto las bacterias viables crecen y reducen al indicador CTT produciendo la aparición de un precipitado rojo en el pocillo. De acuerdo a las condiciones de nuestro ensayo, en la Fig. 4 se ilustra la determinación de la CIMB en cepas del cBc.

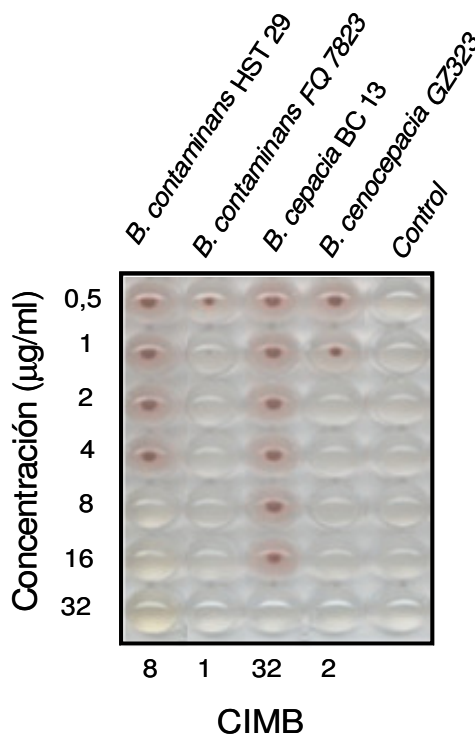


Fig. 4. Representación del ensayo de concentración inhibitoria mínima del biofilm (CIMB) en placa multipocillos. Los números en el lateral izquierdo de la placa indican la concentración (µg/ml) del antibiótico cotrimoxazol para cada fila de pocillos. En la parte superior de la figura se indican las especies bacterianas testeadas en cada columna. Las CIMB para las cepas HST29, FQ7823, BC13 y GZ323 se muestran en la parte inferior y corresponden a 8 µg/ml, 1 µg/ml, 32 µg/ml y 2 µg/ml respectivamente. En la columna control (sin bacterias) no se observan cambios de color del indicador dado que no se produce la reducción.

4.3.6 Actividad bactericida de agentes antimicrobianos frente a biofilms

La viabilidad de los cultivos en biofilm frente a los agentes antimicrobianos ensayados fue determinada mediante el recuento en placa (Fig. 5). Los aislados fueron crecidos en biofilm empleando placas multipocillos y expuestos durante 18 h a agentes antimicrobianos como se describió previamente. El rango de concentraciones de antibióticos empleados en este ensayo se estableció de la siguiente manera: la concentración mínima de antibiótico correspondió a su valor de CIMB medio (CIMBm), mientras que la concentración máxima dependió del antibiótico, en fluoroquinolonas fue 16 µg/ml, minociclina, cotrimoxazol y meropenem 32 µg/ml, ceftazidima 64 µg/ml. En el caso de las dobles combinaciones de antibióticos, el rango de concentraciones empleadas en la determinación de la viabilidad de cultivos en biofilms comprendió de 2/4 a 16/32 µg/ml para CIP/COX y de 1/2 a 16/32 µg/ml para

LEV/MEM. Luego los antibióticos fueron removidos y el biofilm lavado tres veces con PBS. Mediante el empleo de un tip, el biofilm fue separado y resuspendido determinándose el número de bacterias viables por plaqueo seriado de esas diluciones en ATS. Este mismo procedimiento fue usado para determinar el número de células viables en el pocillo control, el cual no fue tratado con antibiótico sino con CMHAC. La viabilidad de los cultivos antes y después del tratamiento antibiótico permite determinar la concentración del agente antimicrobiano que resulte en la reducción $\geq 99,9\%$ de la población de células sésiles del biofilm inicial.

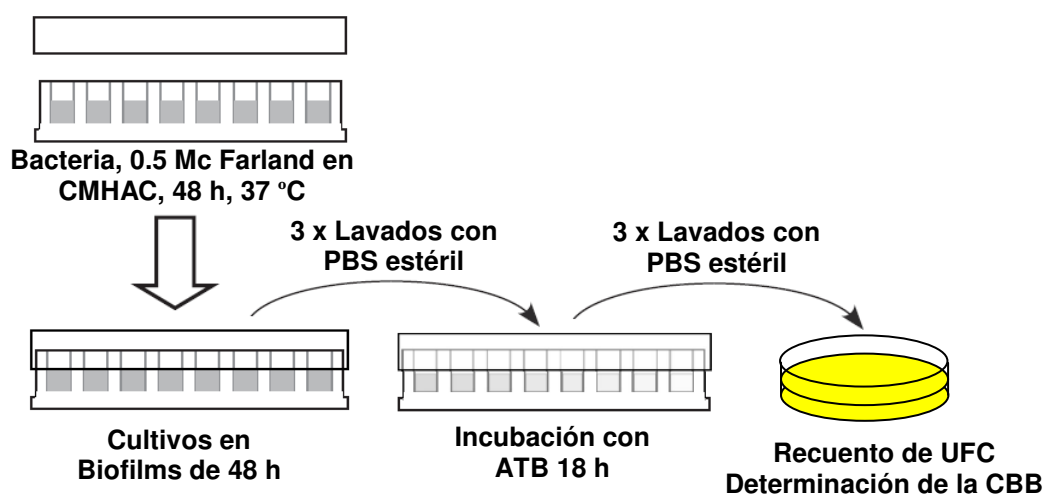


Fig. 5. Esquema del ensayo de determinación de la concentración bactericida sobre un biofilm (CBB). Abreviaturas: ATB, antibiótico; CMHAC, caldo Mueller Hinton ajustado en cationes; PBS, buffer fosfato salino.

4.3.7 Efecto de antimicrobianos en la biomasa del biofilm

Los biofilms formados por aislados pertenecientes al cBc, tratados con fluoroquinolonas, meropenem y las combinaciones CIP/COX y LEV/MEN, fueron teñidos con CV como describió Roveta y cols [58] (Fig. 6). Los porcentajes de biomasa remanente luego del tratamiento para concentraciones comprendidas entre la CIMBm y 16 x CIMBm (16 veces la CIMBm) fueron calculados por la relación entre los valores de DO_{570} con y sin antimicrobiano. En el caso de las dobles combinaciones de antibióticos, el rango de concentraciones empleadas en la determinación de la biomasa remanente de cultivos en biofilms abarcó de 2/4 a 16/32 $\mu\text{g/ml}$ para CIP/COX y de 1/2 a

16/32 $\mu\text{g/ml}$ para LEV/MEM. Se ensayó cada concentración del agente antimicrobiano por triplicado, en al menos tres experimentos independientes.

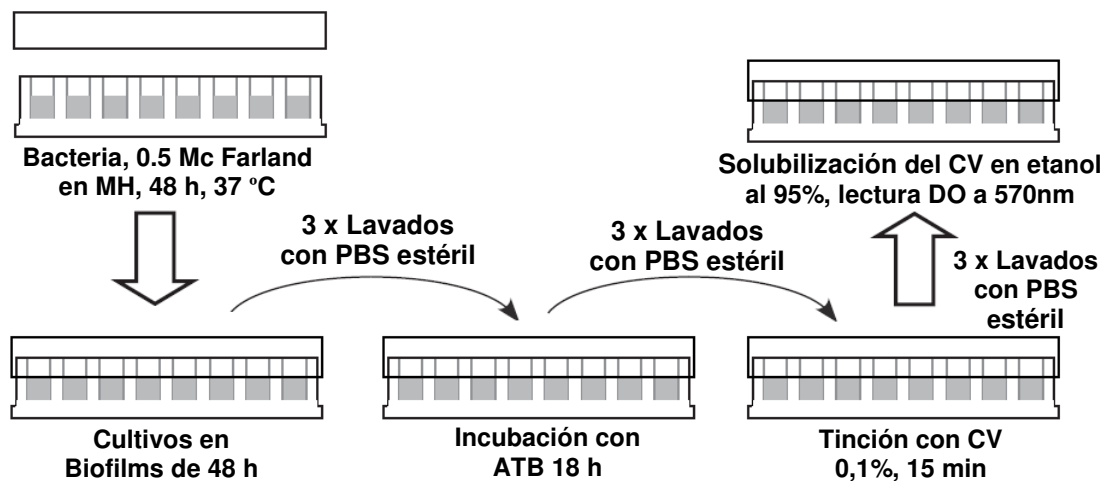


Fig. 6. Esquema del ensayo de destrucción de biofilm por uso de agentes antimicrobianos. Abreviaturas: ATB, antibiótico; CMHAC, caldo Mueller Hinton ajustado en cationes; CV, cristal violeta; PBS, buffer fosfato salino.

4.3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los valores de CIM se utilizó el test de χ^2 y se consideró como diferencia significativa un valor de $p < 0,05$ [50].

La resistencia a múltiples antibióticos de las especies del cBc fue evaluada a través del cálculo del score del perfil antibiótico de cada especie, como fue descrito por Rose y cols [57]. Este score fue calculado de la siguiente manera, primero se calculó para cada antibiótico, el valor medio de las CIMs correspondiente a los aislados de cada especie del cBc. El segundo paso consistió en promediar los valores medios de las CIMs de los 6 antibióticos testeados en cada especie del cBc. Para el análisis estadístico del score del perfil antibiótico se empleó la prueba de Mann-Whitney donde se consideró como diferencia significativa un valor de $p < 0,05$. Por tanto, el score del perfil antibiótico representa una medida general de la resistencia a los antimicrobianos y no posee correlación con los valores de corte de los antibióticos ensayados.

En el análisis estadístico de destrucción de biofilms, se empleó la prueba del test-t de Student para evaluar la diferencia significativa entre los valores de DO_{570} obtenidos sin el agregado de antibióticos (control) y aquellos observados en la presencia

de diferentes concentraciones de antibióticos. Los datos fueron normalizados respecto del control, el cual fue considerado como 100%. Los valores del test-t fueron tomados de a pares para comparar el valor medio entre grupo control/tratamiento antimicrobiano. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Los análisis fueron hechos usando el software estadístico SPSS (SPSS Inc. Chicago. IL) [58].

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Susceptibilidad de células planctónicas del cBc frente a antimicrobianos

Se determinó en primer lugar el perfil de susceptibilidad de 99 aislados de las tres especies predominantes del cBc – *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans* – frente a los antibióticos comúnmente empleados en el tratamiento de la infección pulmonar en pacientes con FQ [13]: ceftazidima, ciprofloxacina, cotrimoxazol, levofloxacina, meropenem y minociclina (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de tres especies del cBc

Cepa	Especie	CIM (µg/ml)					
		CAZ	MEN	MIN	COX	CIP	LEV
BC 13	<i>B. cepacia</i>	0,5	0,25	0,5	4	0,25	0,25
G5	<i>B. cepacia</i>	8	0,5	2	4	32	32
GIH	<i>B. cepacia</i>	0,5	0,25	0,5	4	0,25	0,25
GZ 240	<i>B. cepacia</i>	4	1	4	1	1	2
GZ 805237	<i>B. cepacia</i>	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
BC 190	<i>B. cenocepacia</i>	0,5	1	4	0,25	0,25	0,25
FQ 6403	<i>B. cenocepacia</i>	8	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25
FQ 6593	<i>B. cenocepacia</i>	0,5	1	4	1	0,5	0,5
FQ 6717	<i>B. cenocepacia</i>	64	2	0,5	0,25	0,5	1
GZ 147	<i>B. cenocepacia</i>	32	2	16	8	2	4
GZ 323	<i>B. cenocepacia</i>	2	2	16	4	8	64
GZ 805	<i>B. cenocepacia</i>	32	2	16	4	2	4
HST 103	<i>B. cenocepacia</i>	4	4	2	0,5	2	2
HST 51393	<i>B. cenocepacia</i>	4	0,5	2	16	2	2
MSE	<i>B. cenocepacia</i>	2	2	8	8	64	32
NF171	<i>B. cenocepacia</i>	8	2	32	8	8	8
NF172	<i>B. cenocepacia</i>	8	2	32	8	8	8
BC11	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,25	2	0,25	0,25
BC15	<i>B. contaminans</i>	0,5	4	1	4	1	0,25
BC24	<i>B. contaminans</i>	0,5	0,5	1	0,25	0,5	0,25
BC25	<i>B. contaminans</i>	1	2	2	2	0,5	0,25
BC26	<i>B. contaminans</i>	1	1	2	2	0,5	0,25
BC142	<i>B. contaminans</i>	0,5	0,5	0,25	1	0,25	0,25
FQ 6406	<i>B. contaminans</i>	2	4	0,5	0,25	0,25	0,5
FQ 6507	<i>B. contaminans</i>	4	2	8	2	8	8
FQ 6556	<i>B. contaminans</i>	8	0,25	0,25	2	0,5	0,5
FQ 6929	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,5	1	0,25	0,5
FQ 6930	<i>B. contaminans</i>	4	2	0,25	0,5	0,25	0,5
FQ 6931	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,25	0,25	0,25	0,5
FQ 7013	<i>B. contaminans</i>	2	0,25	0,25	2	0,25	0,5
FQ 7740	<i>B. contaminans</i>	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
FQ 7764	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	0,5	0,25	1	1
FQ 7823	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,5	0,25	0,25	0,25
FQ 7850	<i>B. contaminans</i>	4	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
FQ 7905	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	0,5	0,25	0,25	0,25
FQ 7960	<i>B. contaminans</i>	4	2	0,5	0,25	0,25	0,25

Tabla 3. continuación

Cepa	Especie	CIM ($\mu\text{g/ml}$)					
		CAZ	MEN	MIN	COX	CIP	LEV
FQ 7967	<i>B. contaminans</i>	1	2	4	2	2	2
GZ 1	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,5	0,25	0,25	0,25
GZ 2	<i>B. contaminans</i>	4	4	0,5	0,5	0,25	0,25
GZ 4	<i>B. contaminans</i>	8	2	4	0,5	0,25	0,25
GZ 295	<i>B. contaminans</i>	1	1	0,25	1	0,5	0,25
GZ307	<i>B. contaminans</i>	1	2	2	2	0,5	0,25
HST 09	<i>B. contaminans</i>	2	4	0,5	0,5	0,5	0,5
HST 10	<i>B. contaminans</i>	0,5	4	0,5	0,5	0,5	0,5
HST 11	<i>B. contaminans</i>	0,5	4	0,5	0,5	0,5	0,5
HST 12	<i>B. contaminans</i>	4	4	2	0,5	0,5	1
HST 13	<i>B. contaminans</i>	0,5	4	0,5	0,5	1	1
HST 14	<i>B. contaminans</i>	2	4	1	0,5	1	0,5
HST 15	<i>B. contaminans</i>	2	4	0,5	0,25	1	1
HST 16	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	4	0,5	0,5	1
HST 17	<i>B. contaminans</i>	2	4	0,5	1	2	1
HST 18	<i>B. contaminans</i>	0,5	4	0,5	0,5	0,5	0,5
HST 25	<i>B. contaminans</i>	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5
HST 26	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	2	0,25	0,5	0,5
HST 27	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	4	0,5	0,5	0,5
HST 28	<i>B. contaminans</i>	2	1	1	0,5	0,5	0,5
HST 29	<i>B. contaminans</i>	2	4	2	2	8	4
HST 31	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5
HST 32	<i>B. contaminans</i>	2	4	2	0,5	0,5	1
HST 33	<i>B. contaminans</i>	2	4	0,5	0,25	0,5	0,5
HST 34	<i>B. contaminans</i>	4	0,5	2	0,25	0,5	0,5
HST 35	<i>B. contaminans</i>	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5
HST 43	<i>B. contaminans</i>	2	4	2	0,25	0,5	0,5
HST 44	<i>B. contaminans</i>	2	4	2	0,25	0,5	0,5
HST 45	<i>B. contaminans</i>	2	4	2	0,25	0,5	0,25
HST 46	<i>B. contaminans</i>	4	2	2	0,5	0,5	0,5
HST 64	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	2	0,25	0,5	0,5
HST 73	<i>B. contaminans</i>	0,5	0,25	0,5	8	0,25	0,25
HST 77	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	0,5	0,25	0,5	0,5
HST 78	<i>B. contaminans</i>	4	1	2	0,25	0,5	0,5
HST 81	<i>B. contaminans</i>	4	2	0,5	0,25	0,25	0,25
HST 88	<i>B. contaminans</i>	2	4	4	0,5	1	0,5
HST 89	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	0,25	0,5	0,5
HST 91	<i>B. contaminans</i>	4	2	0,5	0,25	0,25	0,25
HST 95	<i>B. contaminans</i>	2	2	0,5	0,5	0,5	0,5
HST 99	<i>B. contaminans</i>	2	4	4	0,5	1	1
HST 102	<i>B. contaminans</i>	2	1	2	0,25	0,5	0,5
HST 105	<i>B. contaminans</i>	2	1	2	0,25	0,5	0,5
HST 106	<i>B. contaminans</i>	0,5	1	1	0,25	0,5	0,25
HST 108	<i>B. contaminans</i>	4	2	2	0,5	0,5	0,5
HST 116	<i>B. contaminans</i>	0,5	0,5	2	0,5	2	4
HST R1	<i>B. contaminans</i>	16	2	8	1	4	4
HST R2	<i>B. contaminans</i>	2	2	8	1	1	1
HST V1	<i>B. contaminans</i>	0,5	1	8	0,5	0,5	2
NF 229	<i>B. contaminans</i>	2	1	4	4	1	2
NF 289	<i>B. contaminans</i>	0,5	2	0,5	2	0,25	0,25
NF 67	<i>B. contaminans</i>	0,5	1	0,25	2	0,25	0,25
NF 70	<i>B. contaminans</i>	0,5	1	0,25	2	0,25	0,25
NF 71	<i>B. contaminans</i>	0,5	1	0,25	2	0,25	0,25
NF 74	<i>B. contaminans</i>	4	4	0,5	0,5	0,25	0,25
NF 75	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	0,5	0,25	0,25
NF 96	<i>B. contaminans</i>	0,5	1	0,25	0,5	0,25	0,25

Tabla 3. *continuación*

Cepa	Especie	CIM (µg/ml)					
		CAZ	MEN	MIN	COX	CIP	LEV
A1	<i>B. contaminans</i>	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5
Amb 98	<i>B. contaminans</i>	4	1	0,5	0,5	0,25	0,25
MS 14	<i>B. contaminans</i>	4	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
S3	<i>B. contaminans</i>	4	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
T1	<i>B. contaminans</i>	2	0,5	1	0,5	0,25	0,25
T2	<i>B. contaminans</i>	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
T5	<i>B. contaminans</i>	1	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	2	0,5	-	16	0,5	0,5

Abreviaturas: CIM, concentración inhibitoria mínima; CAZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacina; COX, cotrimoxazol; LEV, levofloxacina; MEM, meropenem; MIN, minociclina.

El porcentaje de sensibilidad o susceptibilidad (% S) a un antibiótico en particular se define como el cociente entre el número de aislados sensibles a ese antibiótico y el número total de aislados (sensibles + resistentes) analizados, multiplicado por 100. En la Tabla 4 se detallan los porcentajes de susceptibilidad antimicrobiana de las tres especies del cBc, y los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀, los cuales corresponden a las concentraciones de antimicrobianos requeridas para inhibir al 50% y 90% de los aislados clínicos y ambientales. Entre todos los agentes antimicrobianos usados, meropenem mostró la mayor actividad (100%), con un valor de MIC_{50/90} 2/4 µg/ml. En general, los porcentajes de susceptibilidad de las cepas del cBc analizadas frente a ceftazidima, minociclina, cotrimoxazol, ciprofloxacina y levofloxacina variaron entre el 84,9 al 96% (Tabla 4), sin embargo estos porcentajes fueron marcadamente desiguales entre las 3 especies evaluadas. En particular, *B. cenocepacia* exhibió el porcentaje de susceptibilidad más bajo frente a la mayoría de los agentes antimicrobianos empleados. Ceftazidima presentó una potente actividad inhibitoria (96%) en los aislados testeados, donde solamente 3 aislados clínicos de *B. cenocepacia* y uno de *B. contaminans* fueron resistentes a este antibiótico (Tabla 3 y Tabla 4). Mientras que el 50% de los aislados pertenecientes a *B. cenocepacia* fueron susceptibles a minociclina, los porcentajes de susceptibilidad de *B. contaminans* y *B. cepacia* variaron estrechamente del 94,7 al 100%. La mayoría de los aislados del cBc fueron susceptibles a ciprofloxacina (84,9%), aunque los porcentajes de susceptibilidad a este antibiótico se distribuyeron de manera desigual entre los aislados nosocomiales de cada especie del complejo testeados. Ciprofloxacina fue menos activa contra aislados de *B. cenocepacia* (33,3 %; CIM₅₀ = 2 µg/ml; CIM₉₀ = 8 µg/ml) comparado con *B. cepacia* (80%) y *B. contaminans* (93,3%). En cambio, levofloxacina mostró ser más

activa que ciprofloxacina frente a *B. contaminans* y *B. cenocepacia* pero no así frente a *B. cepacia*, la cual exhibió un porcentaje equivalente de resistencia a ambas fluoroquinolonas.

Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima (CIM) para especies relevantes del cBc

Microorganismo	Antibiótico	CIM				% S
		50	90	Min	Max	
Todas las cepas (n = 99)	Ceftazidima	2	16	0,5	64	96
	Ciprofloxacina	0,5	2	0,25	32	84,9
	Cotrimoxazol	0,5	2	0,25	16	86,9
	Levofloxacina	0,5	2	0,25	64	89,9
	Meropenem	2	4	0,25	4	100
	Minociclina	1	4	0,5	32	89,9
<i>B. cepacia</i> (n = 5)	Ceftazidima	0,5	8	0,5	8	100
	Ciprofloxacina	0,5	32	0,25	32	80
	Cotrimoxazol	4	4	0,5	4	40
	Levofloxacina	0,25	32	0,25	32	80
	Meropenem	0,5	0,5	0,25	1	100
	Minociclina	1	2	0,5	4	100
<i>B. cenocepacia</i> (n = 12)	Ceftazidima	4	32	0,5	64	75
	Ciprofloxacina	2	8	0,25	32	33,3
	Cotrimoxazol	1	8	0,5	8	33,3
	Levofloxacina	2	8	0,25	32	50
	Meropenem	2	2	0,5	4	100
	Minociclina	4	16	2	32	50
<i>B. contaminans</i> (aislados nosocomiales, n = 75)	Ceftazidima	2	4	0,5	16	100
	Ciprofloxacina	0,5	2	0,25	32	92
	Cotrimoxazol	0,5	2	0,25	16	96
	Levofloxacina	0,5	1	0,25	8	94,7
	Meropenem	2	4	0,25	4	100
	Minociclina	0,5	4	0,5	8	94,7
<i>B. contaminans</i> (aislados ambientales, n = 7)	Ceftazidima	2	4	1	4	100
	Ciprofloxacina	0,25	0,25	0,25	0,25	100
	Cotrimoxazol	0,25	0,5	0,25	1	100
	Levofloxacina	0,25	0,5	0,25	0,5	100
	Meropenem	0,25	0,5	0,25	1	100
	Minociclina	0,5	1	0,5	1	100

Valores de corte según el CLSI de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de susceptibilidad: ciprofloxacina ≤ 1 , levofloxacina ≤ 2 , minociclina ≤ 4 , meropenem ≤ 4 , ceftazidima ≤ 8 y cotrimoxazol ≤ 2 . CIM₅₀, CIM₉₀, CIM min, CIM max se encuentran expresados en $\mu\text{g/ml}$. S %: porcentaje de susceptibilidad.

Los aislados clínicos de *B. contaminans*, *B. cepacia* y *B. cenocepacia* presentaron resistencia al menos a un antibiótico en el 14,7% (11 de 75), 60% (3 de 5) y 75% (9 de 12) respectivamente (Tabla 3). Asimismo se observaron aislados clínicos multi-resistentes, en *B. cenocepacia* (58,3%; 7 de 12), *B. cepacia* (20%; 1 de 5) y *B. contaminans* (2,7%, 2 de 75). Con el propósito de comparar la multi-resistencia presente en estas especies del complejo se calculó un score del perfil antibiótico para

cada una de ellas, como una medida de la resistencia global a los antibióticos (Tabla 5). Este análisis indicó que la especie *B. cenocepacia* posee el score más alto de resistencia a múltiples antibióticos y fue significativamente más resistente que *B. contaminans* ($p < 0,05$). Desafortunadamente *B. cepacia* no fue incluida en este tipo de análisis debido que el tamaño de la muestra no fue estadísticamente significativo. Por el contrario todos los aislados ambientales (100%) de *B. contaminans* fueron susceptibles a los 6 antibióticos testeados. Los valores de CIM de ceftazidima, cotrimoxazol y minociclina correspondientes a los aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans* no difirieron significativamente ($p > 0,05$). Sin embargo, los aislados ambientales fueron particularmente susceptibles a meropenem ($p < 0,001$), ciprofloxacina ($p = 0,002$) y levofloxacina ($p = 0,02$) a diferencia de los aislados clínicos. Con excepción de minociclina y cotrimoxazol, todos los antibióticos exhibieron valores de CBM que oscilaron dentro de dos diluciones seriadas del valor de CIM para los aislados del cBc (datos no mostrados).

Tabla 5. Valores promedios de CIM de tres especies del cBc para los 6 antibióticos testeados

Especie	CIM (µg/ml)						Score
	CAZ	MEN	MIN	COX	CIP	LEV	
<i>B. cepacia</i> (n = 5)	2,7	0,45	1,5	2,65	6,75	6,95	3,5*
<i>B. cenocepacia</i> (n = 12)	13,75	1,75	11,08	4,85	8,13	10,50	8,34
<i>B. contaminans</i> (aislados clínicos; n = 75)	2,11	2,15	1,64	0,90	0,78	0,77	1,39
<i>B. contaminans</i> (aislados ambientales; n = 7)	2,43	0,39	0,57	0,36	0,25	0,29	0,71

* El tamaño de muestra de *B. cepacia* fue pequeño, por tanto no fue considerado como estadísticamente significativo.

4.4.2 Concentración inhibitoria mínima para células de *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans* creciendo en biofilm (CIMB)

Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de células sésiles de las tres especies prevalentes del cBc al cabo de 48 h de crecimiento en biofilm, se empleó el protocolo descrito en materiales y métodos, con el cual se evaluó la efectividad de los 6 antibióticos seleccionados. El ensayo de CIMB se realizó en 55 aislados del cBc elegidos al azar de un total de 99, de manera de obtener un conjunto representativo (Tabla 6). Los biofilms de las cepas seleccionadas crecidos durante 48 h en microplacas

de poliestireno fueron tratados con antibióticos durante 18 h. Transcurrido ese tiempo los pocillos fueron lavados con solución buffer y los biofilms incubados con medio CMHAC suplementado con CTT por 6 h. El punto final de este ensayo fue determinado por inspección visual y espectrofotométricamente a las 6 h. Ambas formas de lecturas no mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos. En la Tabla 6 se detallan los valores de CIMB correspondientes al subconjunto de aislados de *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*.

Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima de diferentes antibióticos para biofilms (CIMB) de aislados del cBc

Cepa	Especie	CIMB ($\mu\text{g/ml}$)					
		CAZ	MEN	MIN	COX	CIP	LEV
BC13	<i>B. cepacia</i>	32	8	16	8	2	1
G5	<i>B. cepacia</i>	4	2	4	16	8	8
G240	<i>B. cepacia</i>	8	2	8	8	4	2
GIH	<i>B. cepacia</i>	32	8	16	8	2	1
GZ 805237	<i>B. cepacia</i>	2	4	2	2	2	2
GZ 323	<i>B. cenocepacia</i>	16	4	32	16	8	2
FQ 6717	<i>B. cenocepacia</i>	64	2	2	2	2	1
NF 171	<i>B. cenocepacia</i>	8	4	4	8	2	2
NF 172	<i>B. cenocepacia</i>	4	8	2	8	4	2
HST 103	<i>B. cenocepacia</i>	32	16	16	32	4	2
FQ 6593	<i>B. cenocepacia</i>	8	2	2	64	4	4
BC 11	<i>B. contaminans</i>	4	8	64	4	8	1
BC 25	<i>B. contaminans</i>	16	4	4	2	2	1
FQ 6406	<i>B. contaminans</i>	4	8	16	2	2	1
FQ 6507	<i>B. contaminans</i>	4	8	64	4	16	4
FQ 6584	<i>B. contaminans</i>	2	4	2	2	2	1
FQ 6929	<i>B. contaminans</i>	2	4	4	32	2	1
FQ 6930	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	2	2	1
FQ 6931	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	2	2	1
FQ 7013	<i>B. contaminans</i>	8	4	4	2	2	1
FQ 7740	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	1	2	1
FQ 7764	<i>B. contaminans</i>	4	4	4	1	2	2
FQ 7823	<i>B. contaminans</i>	4	4	2	1	1	1
FQ 7850	<i>B. contaminans</i>	8	4	2	4	2	1
FQ 7967	<i>B. contaminans</i>	4	4	2	4	2	2
HST 09	<i>B. contaminans</i>	4	2	4	4	4	2
HST 11	<i>B. contaminans</i>	4	2	4	1	1	2
HST 14	<i>B. contaminans</i>	8	4	2	8	2	2
HST 16	<i>B. contaminans</i>	8	2	2	2	2	2
HST 28	<i>B. contaminans</i>	4	8	8	2	4	1
HST 29	<i>B. contaminans</i>	4	8	8	2	8	4
HST 32	<i>B. contaminans</i>	4	8	4	4	2	2
HST 43	<i>B. contaminans</i>	8	8	4	4	2	1
HST 44	<i>B. contaminans</i>	4	4	4	4	2	1
HST 45	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	1	2	1
HST 64	<i>B. contaminans</i>	2	8	8	4	4	1
HST 81	<i>B. contaminans</i>	2	2	4	2	2	1
HST 88	<i>B. contaminans</i>	4	8	4	8	2	2
HST 91	<i>B. contaminans</i>	4	8	4	8	2	1
HST 99	<i>B. contaminans</i>	4	8	4	8	4	2

Tabla 6. Continuación

Cepa	Especie	CIMB ($\mu\text{g/ml}$)					
		CAZ	MEN	MIN	COX	CIP	LEV
HST 105	<i>B. contaminans</i>	16	2	4	2	2	1
HST 106	<i>B. contaminans</i>	4	8	8	4	2	1
HST 108	<i>B. contaminans</i>	4	2	8	8	2	1
HST 116	<i>B. contaminans</i>	2	2	4	8	2	2
NF 229	<i>B. contaminans</i>	8	8	8	4	2	1
NF 70	<i>B. contaminans</i>	4	4	2	8	1	1
NF 75	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	1	2	1
NF 96	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	1	2	1
A1	<i>B. contaminans</i>	2	2	4	2	1	1
AMB98	<i>B. contaminans</i>	2	2	2	1	2	1
MS14	<i>B. contaminans</i>	8	2	8	2	2	1
S3	<i>B. contaminans</i>	4	4	4	2	4	1
T1	<i>B. contaminans</i>	4	2	4	2	1	1
T2	<i>B. contaminans</i>	2	2	4	2	2	1
T5	<i>B. contaminans</i>	2	2	4	2	2	1

Con el objeto de comparar los valores de CIM y CIMB correspondientes a los 55 aislados del cBc se empleó un diagrama en caja (Box plot) mediante el cual se pudo visualizar todo el conjunto de datos de susceptibilidad antimicrobiana de cultivos planctónicos y biofilms (Fig. 7 y Fig. 8). Este tipo de diagrama esta compuesto por un rectángulo (caja), que representa el 25, 50 y 75% de los datos, y dos brazos que limitan el valor mínimo y máximo.

La Fig. 7 muestra un diagrama en caja de las CIMs y CIMBs de los 6 antibióticos ensayados para el subconjunto de 44 aislados de *B. contaminans*, constituido por 37 aislados clínicos y 7 aislados ambientales. En general, los cultivos sésiles procedentes tanto de aislados clínicos como ambientales exhibieron valores de CIMBm equivalentes ó superiores (hasta 8 veces) comparados con los correspondientes valores medios de CIM (CIMm) de cultivos planctónicos. Sin embargo, al realizarse un análisis estadístico en la población de aislados clínicos de *B. contaminans*, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de CIM y CIMB. En cambio la población ambiental exhibió diferencias significativas cuando crecían en forma planctónica y en biofilms para 5 de 6 antibióticos ensayados, CIP ($p < 0,001$), LEV ($p < 0,001$), MEM ($p < 0,001$), COX ($p < 0,001$), y MIN ($p < 0,001$). Es interesante resaltar que cuando se compararon los valores de CIMB de aislados ambientales y clínicos no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones sésiles ($p > 0,05$).

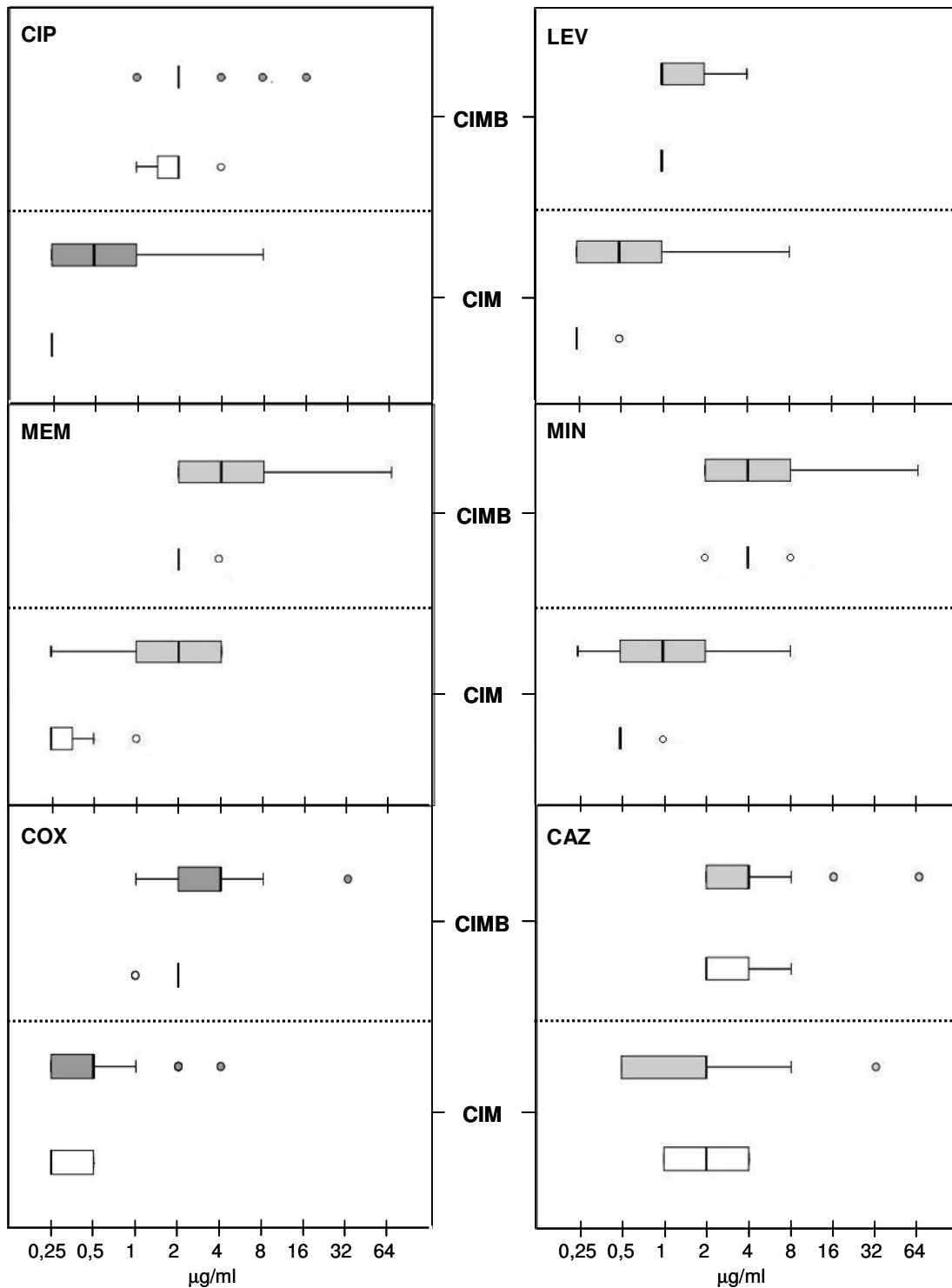


Fig. 7. Comparación de susceptibilidad a agentes antimicrobianos de aislados clínicos (rectángulo gris) y ambientales (rectángulo blanco) de *B. contaminans* a ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), meropenem (MEM), minociclina (MIN), cotrimoxazol (COX) y ceftazidima (CAZ) expresado como CIM para bacterias planctónicas y CIMB para bacterias sésiles. Los datos están representados como un diagrama en caja, donde los extremos derecho e izquierdo del rectángulo indican el 25 y 75% de la población respectivamente. La línea dentro del rectángulo indica el promedio, las líneas de los extremos (brazos) izquierdo y derecho del rectángulo indican el 10 y 90% respectivamente. Los puntos representan los valores atípicos. La representación fue obtenida mediante el empleo del software SPSS [64].

Los valores de CIMs y CIMBs hallados en aislados de *B. cepacia* y *B. cenocepacia* se ilustran en la Fig. 8. La relación entre los valores de CIMm y CIMBm para los antibióticos ensayados en *B. cepacia* osciló entre 2 a 16, mientras que en *B. cenocepacia*, varió entre 0,25 y 2. De estas dos especies del complejo, sólo los aislados de *B. cepacia* exhibieron diferencias significativas entre los valores de CIM y CIMB para los antibióticos minociclina ($p = 0,025$), meropenem ($p = 0,008$) y cotrimoxazol ($p = 0,042$).

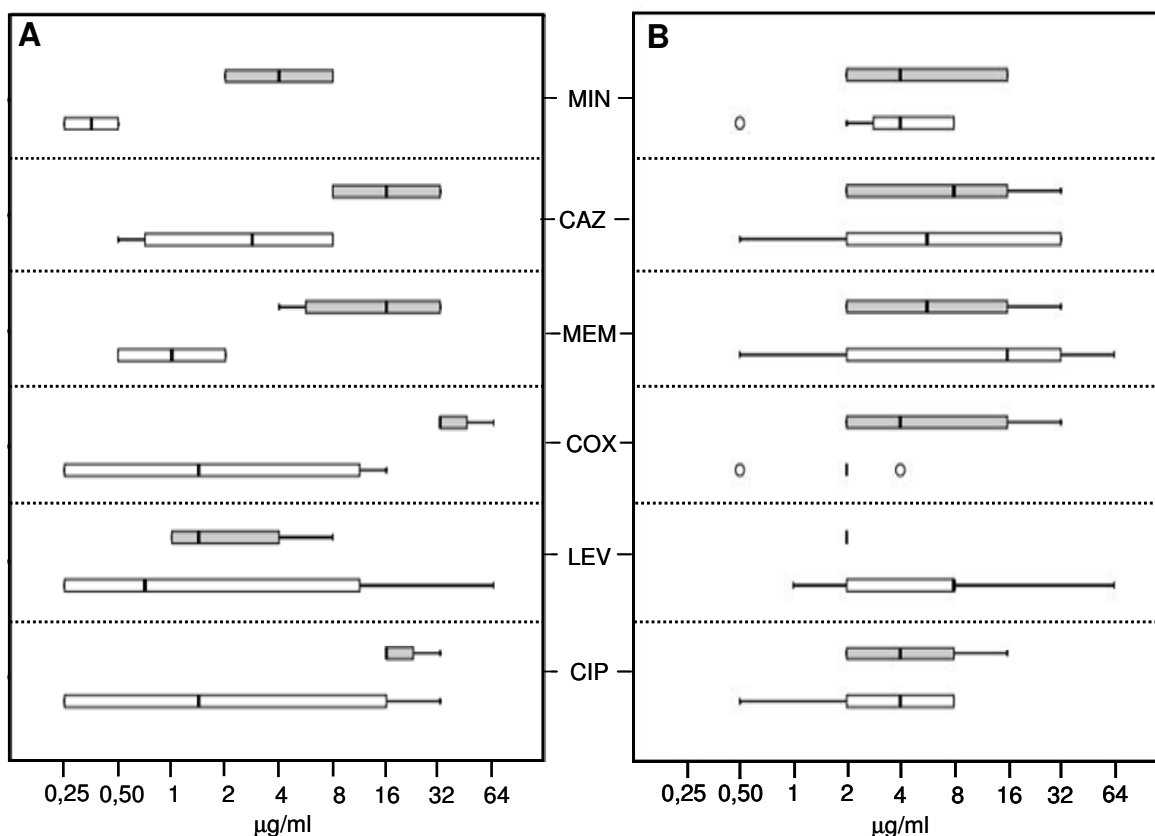


Fig. 8. Comparación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos de aislados clínicos de *B. cepacia* (A) y *B. cenocepacia* (B) a ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), meropenem (MEM), minociclina (MIN), cotrimoxazol (COX) y ceftazidima (CAZ) expresada como CIM (rectángulo blanco) para bacterias planctónicas y CIMB (rectángulos grises) para bacterias sésiles. Los datos fueron representados como en la Fig. 7.

4.4.3 Actividad bactericida de los agentes antimicrobianos contra biofilms formados por organismos del cBc

Con el objeto de analizar el efecto bactericida individual de agentes antimicrobianos y de dobles combinaciones de antibióticos, CIP/COX y LEV/MEM en poblaciones sésiles, se estudiaron un total de ocho aislados pertenecientes al cBc con capacidad de formar biofilms; 2 aislados de *B. cepacia* (G5, GZ240), 2 aislados de *B. cenocepacia* (GZ323, NF171) y 4 aislados de *B. contaminans* (FQ 6406, HST 9, NF 229, T5). La procedencia de los aislados del cBc se detalla en la Tabla 2. El recuento de células viables en organismos no tratados con antibióticos recuperados de 3 pocillos, resultó estar ubicado en el rango de 1×10^6 a 5×10^7 UFC/pocillo. En el estudio de la actividad bactericida se estableció el valor de CIMBm de cada especie como la concentración inferior del antibiótico ensayado, mientras que la concentración superior dependió del antibiótico empleado como se describe en materiales y métodos (ver ítem 4.3.6). En estos rangos se encuentran las concentraciones máximas que alcanzan los antibióticos en pulmones de pacientes tratados [17, 27, 32, 54, 63, 67]. La actividad bactericida de un determinado antibiótico no se ensayó en aquellos aislados que presentaron resistencia mediante la prueba de CIM. La Fig. 9 muestra el efecto bactericida de antibióticos individuales (ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem, minociclina, cotrimoxazol y ceftazidima), y combinaciones de dos antibióticos, ciprofloxacina/cotrimoxazol (CIP/COX) y levofloxacina/meropenem (LEV/MEM) en 4 aislados de *B. contaminans* con diferente perfil de susceptibilidad. En la Fig. 9 A, B y D se puede observar que se logró una reducción del número de células sésiles viables $\geq 99,9\%$ ($\leq 0,1\%$ de sobrevivientes) en los 4 aislados de *B. contaminans* cuando se utilizó meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina a concentraciones equivalentes a 1x o 2x CIMBm de cada agente antimicrobiano. Cuando se emplearon las combinaciones de dos antibióticos, CIP/COX y LEV/MEM (Fig. 9 G y H), a concentraciones $\geq 2/4 \mu\text{g/ml}$ también se observó un efecto similar. Minociclina (Fig. 9 C) a concentración $\geq 2\text{x CIMBm}$ ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$) mostró una acción bactericida en este grupo de aislados que oscila entre el 99 - 99,9% (0,1 - 1% de sobrevivientes).

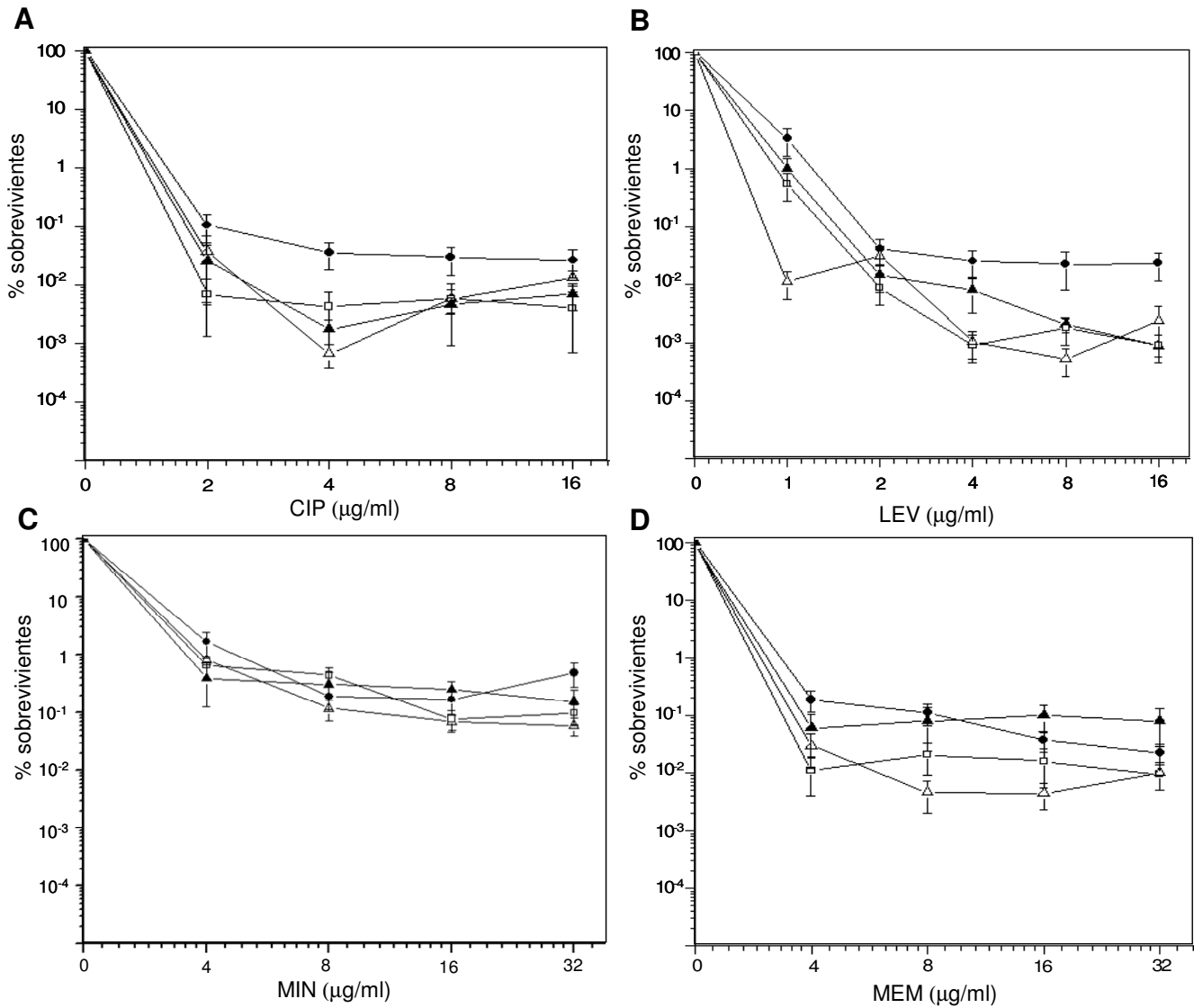


Fig. 9 A, B, C, D. Efecto de agentes antimicrobianos en la viabilidad de aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans* crecidos como biofilm. Los resultados están expresados como media \pm D.S. La concentración de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) está representada en el eje x, y la concentración inferior de antibiótico (distinta de cero) corresponde al valor de la concentración inhibitoria mínima del biofilm media (CIMBm). Aislados de *B. contaminans*: HST 9 (\blacktriangle), Fq 6406 (\triangle), NF 229 (\bullet) y T5 (\square). Abreviaturas: CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; MEM, meropenem; MIN, minociclina; COX, cotrimoxazol; CAZ, ceftazidima; CIP/COX, ciprofloxacina + cotrimoxazol; LEV/MEM, levofloxacina + meropenem. La figura continua en la próxima página (**Fig. 9 E, F, G, H**).

La actividad bactericida de cotrimoxazol (Fig. 9 E) y ceftazidima (Fig. 9 F) varió ampliamente entre los aislados de *B. contaminans* analizados. Así por ejemplo, de los 4 aislados seleccionados de *B. contaminans*, el NF229 fue resistente a cotrimoxazol por lo cual su actividad bactericida no fue evaluada. Por otra parte, el FQ6406 presentó una reducción de células viables $< 99\%$ en todo el rango de concentraciones testeadas mientras que el HST 9 y T5 lo hicieron en un $99,9\%$ a una concentración $\geq 2x$ CIMBm

($\geq 8 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 9 E). Con respecto al tratamiento con ceftazidima también se observó distinta respuesta a dicho antibiótico de los aislados de *B. contaminans* crecidos en biofilms. Tal como puede observarse en la Fig. 9 F el porcentaje de muerte para estos últimos varió entre el 0 - 99,9% a 2x CIMBm (16 $\mu\text{g/ml}$).

Los ensayos realizados con la combinación CIP/COX (Fig. 9 G) mostraron una acción bactericida semejante a la observada en ciprofloxacina (Fig. 9 A) en el mismo intervalo de concentraciones. Sin embargo, CIP/COX a concentración 2/4 $\mu\text{g/ml}$ redujo el número de células viables del aislado FQ6406 por debajo del límite de detección (< 10 UFC por pocillo). Es importante destacar que la reducción más significativa en el número de células sésiles ($> 99,99\%$) se logró empleando la combinación LEV/MEM (Fig. 9 H) a concentración $> 2/4 \mu\text{g/ml}$ en los 4 aislados de *B. contaminans*.

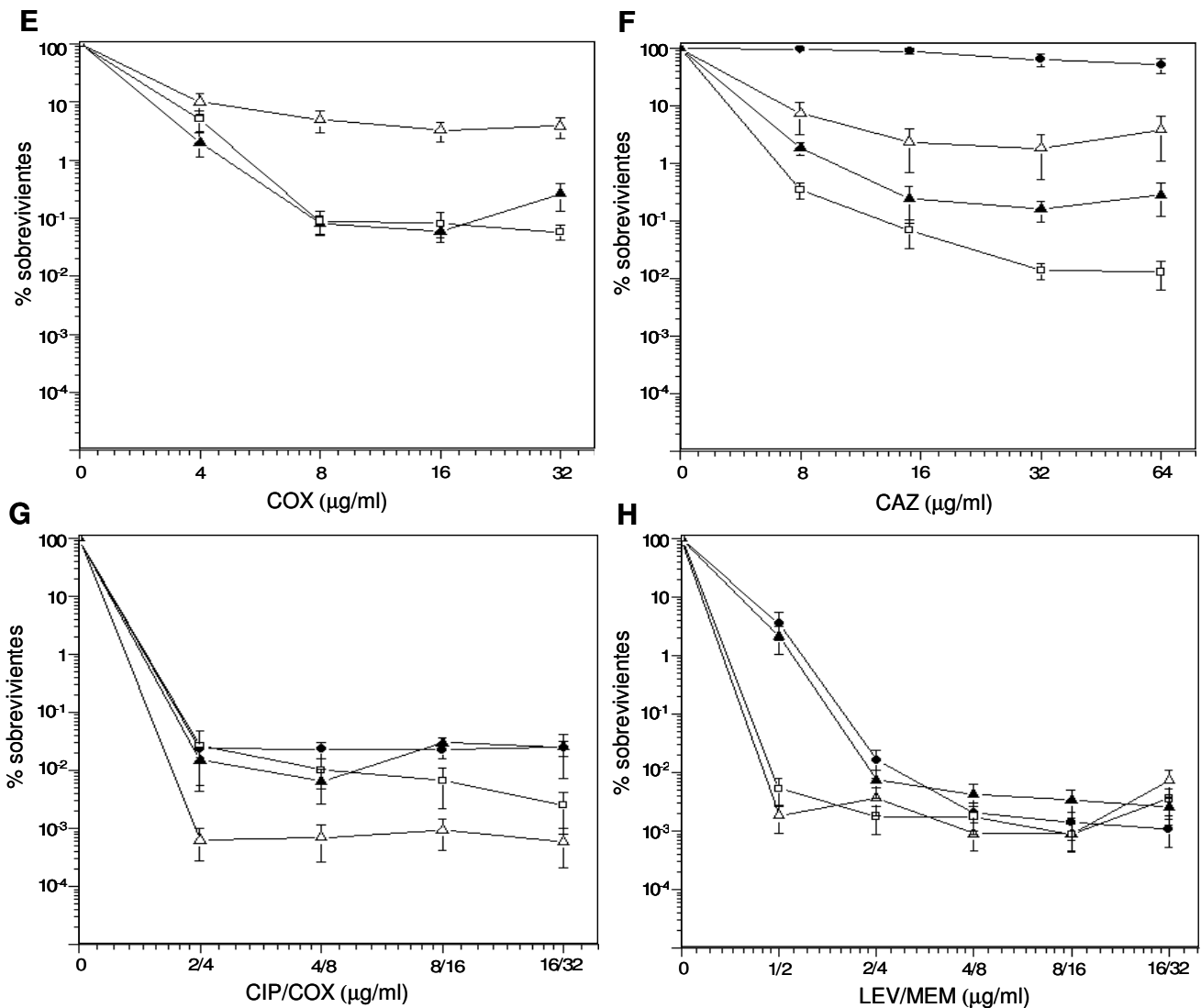


Fig. 9 E, F, G, H. (continuación)

El efecto bactericida de meropenem y LEV/MEM en biofilms de *B. cepacia* y *B. cenocepacia* se representa en la Fig. 10. Los cultivos sésiles de los aislados G5 y G240 de *B. cepacia* fueron susceptibles al tratamiento con meropenem reduciendo el número de células viables de los mismos entre un 99,99 y 99,999% (10^{-2} - 10^{-3} % de sobrevivientes) a concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 10 A). Se observó un efecto bactericida superior ($> 99,999\%$) cuando estos aislados fueron tratados con LEV/MEM a una concentración $\geq 2/4$ $\mu\text{g/ml}$, obteniendo recuentos por debajo del límite de detección del ensayo. El tratamiento de biofilms de *B. cenocepacia* con meropenem (8 $\mu\text{g/ml}$) produjo la reducción en el número de viables entre un 99,9 - 99,99% (Fig. 10 B). Asimismo, LEV/MEM a concentración $> 4/8$ $\mu\text{g/ml}$ mostró una reducción de la viabilidad de células sésiles de aislados de *B. cenocepacia* entre el 99,99 - 99,9999%.

En relación a ceftazidima, este fármaco exhibió una pobre acción bactericida ($< 90\%$) frente a aislados sésiles (datos no mostrados) de *B. cepacia* y *B. cenocepacia*. El poder bactericida de minociclina frente a células sésiles de *B. cepacia* varió entre el 90 al 99% en todo el rango de concentraciones (datos no mostrados).

En general, se observa que la reducción en el número de células viables alcanza una meseta a concentraciones $\geq 2x$ CIMBm de cada antibiótico.

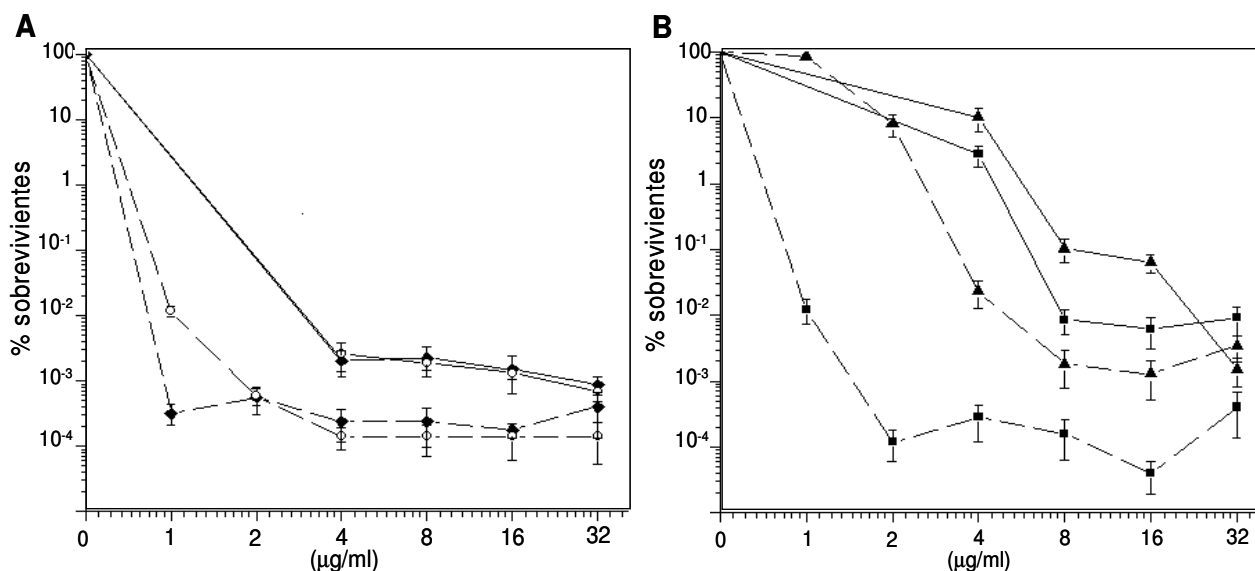


Fig. 10. Efecto de meropenem (línea entera) y meropenem + levofloxacina (línea de trazo) en la viabilidad de bacteria sésiles de *B. cenocepacia* (A) y *B. cepacia* (B). Los resultados están expresados como media \pm D.S. La concentración de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) se muestra en el eje x. La concentración correspondiente a la doble combinación de antibióticos está expresada en términos de fluoroquinolonas. Los aislados de *B. cepacia*: G5 (\blacklozenge), GZ 240 (\circ), y *B. cenocepacia*: GZ323 (\blacktriangle), NF 171 (\blacksquare).

4.4.4 Efecto de los agentes antimicrobianos sobre la biomasa de los biofilms de *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*

Para evaluar el efecto de los agentes antimicrobianos en la desagregación de biofilms se empleó la metodología descrita en materiales y métodos, que consistió en la tinción con CV de biofilms maduros (48 h) antes y después del respectivo tratamiento. De esta manera se cuantificó la “destrucción” del biofilm como la reducción de la biomasa inicial posterior al tratamiento antimicrobiano. El resultado de los ensayos reveló que las fluoroquinolonas al igual que meropenem y las dos combinaciones antimicrobianas (CIP/COX y LEV/MEM) promueven la destrucción de biofilms maduros. La Tabla 7 muestra el efecto de las fluoroquinolonas, meropenem, CIP/COX y LEV/MEM en la biomasa cuantificada espectroscópicamente de 8 aislados pertenecientes a especies prevalentes del cBc.

Cuando ciprofloxacina y levofloxacina alcanzaron una concentración equivalente a 2x CIMBm, redujeron la biomasa del biofilm en aislados de *B. contaminans* entre el 67-88% (4 µg/ml) y 46-87% (2 µg/ml) respectivamente. Asimismo el efecto de ambas fluoroquinolonas en la reducción del biofilm fue comparable a concentraciones ≥ 4 µg/ml en aislados de *B. contaminans*. De la misma manera meropenem a 2x CIMBm (8 µg/ml) mostró un efecto destructor del biofilm (54-87%) semejante al observado en fluoroquinolonas. Asimismo, las dos combinaciones de antibióticos basadas en fluoroquinolonas, CIP/COX y LEV/MEM, exhibieron una reducción equivalente o más alta del biofilm comparada con las correspondientes fluoroquinolonas individuales en un amplio rango de concentraciones.

En la mayoría de los aislados de *B. cepacia* y *B. cenocepacia*, levofloxacina exhibió efectos destructivos del biofilm a concentraciones ≥ 2 µg/ml. Meropenem a una concentración de 4 y 16 µg/ml destruyó los biofilms maduros (48 h) de aislados de *B. cepacia* en 30-70% y 69-78% respectivamente. En cambio, usando meropenem a una concentración ≥ 4 µg/ml, se logró una reducción de la biomasa $\geq 74\%$ en aislados de *B. cenocepacia*. En ambas especies la combinación LEV/MEM produjo una destrucción del biofilm significativa a concentración $\geq 1/2$ µg/ml. Del mismo modo, LEV/MEM frente aislados de *B. cepacia* y *B. cenocepacia* logró una reducción de la biomasa del biofilm $> 70\%$ a 4/8 µg/ml y 2/4 µg/ml respectivamente. Es interesante notar que a concentraciones crecientes de los antimicrobianos, la actividad destructora del biofilm

alcanzó una meseta en los diferentes aislados evaluados.

Tabla 7. Efecto de los agentes antimicrobianos en el % de reducción de biofilm maduros (48-h) de tres especies del cBc

Microorganismo	Cepa	Antibióticos	Biomasa DO ₅₇₀ ± D.S	Concentración de antibiótica* (µg/ml)						
				1	2	4	8	16	32	64
<i>B. cepacia</i>	G5	Levofloxacin	0,55 ± 0,05	11	45	47	32	35	40	NT
	GZ240	Levofloxacin	0,81 ± 0,07	34	60	73	76	64	72	NT
	G5	Meropenem	0,55 ± 0,05	NT	NT	31	74	79	80	80
	GZ240	Meropenem	0,81 ± 0,07	NT	NT	44	53	70	62	64
	G5	LEV/MEM	0,55 ± 0,05	27	48	72	88	83	85	NT
	GZ240	LEV/MEM	0,81 ± 0,07	52	65	75	70	63	70	NT
<i>B. cenocepacia</i>	GZ323	Levofloxacin	1,18 ± 0,09	58	55	65	82	82	85	NT
	NF171	Levofloxacin	0,95 ± 0,07	68	70	75	72	75	75	NT
	GZ323	Meropenem	1,18 ± 0,09	NT	NT	81	87	82	83	80
	NF171	Meropenem	0,95 ± 0,07	NT	NT	74	80	81	78	78
	GZ323	LEV/MEM	1,18 ± 0,09	67	75	84	83	83	84	NT
	NF171	LEV/MEM	0,95 ± 0,07	77	78	79	77	77	78	NT
<i>B. contaminans</i>	FQ 6406	Ciprofloxacina	0,76 ± 0,06	NT	76	82	80	83	90	NT
	T5	Ciprofloxacina	0,72 ± 0,08	NT	90	88	89	90	90	NT
	HST 9	Ciprofloxacina	0,52 ± 0,05	NT	10	67	79	79	72	NT
	NF229	Ciprofloxacina	0,55 ± 0,05	NT	3	72	76	73	68	NT
	FQ 6406	Levofloxacin	0,76 ± 0,06	63	74	80	81	79	74	NT
	T5	Levofloxacin	0,72 ± 0,08	82	87	90	88	90	86	NT
	HST 9	Levofloxacin	0,52 ± 0,05	7	71	80	76	75	73	NT
	NF229	Levofloxacin	0,55 ± 0,05	14	46	69	79	76	75	NT
	FQ 6406	CIP/COX	0,76 ± 0,06	NT	88	85	89	87	85	NT
	T5	CIP/COX	0,72 ± 0,08	NT	91	87	91	89	88	NT
	HST 9	CIP/COX	0,52 ± 0,05	NT	9	64	74	70	69	NT
	NF229	CIP/COX	0,55 ± 0,05	NT	5	67	75	71	74	NT
	FQ 6406	Meropenem	0,76 ± 0,06	NT	NT	73	87	90	90	90
	T5	Meropenem	0,72 ± 0,08	NT	NT	71	87	91	93	92
	HST 9	Meropenem	0,52 ± 0,05	NT	NT	49	64	85	81	83
	NF229	Meropenem	0,55 ± 0,05	NT	NT	37	54	64	83	81
	FQ 6406	LEV/MEM	0,76 ± 0,06	86	88	97	90	90	89	NT
	T5	LEV/MEM	0,72 ± 0,08	71	85	88	90	89	87	NT
	HST 9	LEV/MEM	0,52 ± 0,05	21	66	81	86	86	87	NT
	NF229	LEV/MEM	0,55 ± 0,05	31	72	82	85	83	86	NT

* La doble combinación antibiótica se expresa en términos de fluoroquinolonas. CIP/COX y LEV/MEM presentan una relación de concentración 1 a 2. Valores en negrita indican diferencias significativas (p < 0.05) entre las diferentes concentraciones de antibióticos usados. Abreviaturas: NT, no testada; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacin; COX, cotrimoxazol; MEM, meropenem.

4.5 DISCUSIÓN

Las infecciones pulmonares causadas por miembros del cBc han sido asociadas a periodos de hospitalización prolongados y a una reducción significativa en la expectativa de vida de los pacientes FQ [15, 48]. Por tanto es esencial, una vez identificadas las bacterias como pertenecientes al cBc, la implementación de una adecuada y temprana terapia antimicrobiana en dichos pacientes.

En esta parte del trabajo se analizó la susceptibilidad a antibióticos de las especies relevantes del cBc en nuestro país, con énfasis en *B. contaminans*, empleando tanto cultivos planctónicos como biofilms. Asimismo se evaluó la acción bactericida y destructora sobre biofilms maduros de antibióticos individuales y de combinaciones de dos agentes antimicrobianos.

4.5.1 Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cultivos planctónicos de *B. contaminans*, *B. cepacia* y *B. cenocepacia*

En la actualidad se considera el ensayo de CIM como el “método de referencia” para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de patógenos bacterianos. Lamentablemente, esta metodología presenta limitaciones al no poder garantizar una correlación entre la sensibilidad antibiótica *in vitro* y una respuesta equivalente *in vivo* [38]. Sin embargo el ensayo de CIM sigue vigente debido a su facilidad para seleccionar agentes antimicrobianos potencialmente efectivos.

Al analizar el efecto de antibióticos sobre bacterias planctónicas, basados en el protocolo y criterio de sensibilidad establecido por el CLSI para el ensayo de CIM, se comprobó que los antibióticos β -lactámicos: meropenem y ceftazidima, seguidos por minociclina y levofloxacina resultaban los agentes antimicrobianos más activos frente a cultivos planctónicos de *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*. Nuestros resultados sobre la actividad *in vitro* de estos β -lactámicos y minociclina son consistentes con los reportados por otros autores para aislados del cBc [1, 43, 50, 69]. En relación a las fluoroquinolonas, algunos autores han indicado que levofloxacina presenta una mayor efectividad frente a bacilos Gram-negativos no fermentadores (*P. aeruginosa* y *S. maltophilia*) comparada con ciprofloxacina [33, 52]. En concordancia con dichos autores, nuestros resultados muestran que las especies del

complejo *B. contaminans* y *B. cenocepacia* también muestran mayor susceptibilidad a la actividad de levofloxaxina que frente a ciprofloxacina (Tabla 4).

Cotrimoxazol ha sido uno de los antibióticos más ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por organismos del cBc en pacientes FQ [4]. En la última década, numerosos trabajos han descrito que aislados del cBc presentan un elevado porcentaje de resistencia a este fármaco [1, 7, 45]. En particular un amplio estudio realizado en EEUU donde se evaluaron aproximadamente 2500 aislados del cBc, reportó que el 95% de los mismos fueron resistentes a cotrimoxazol [69]. Si bien nuestros resultados muestran que los aislados del cBc analizados poseen una elevada susceptibilidad a cotrimoxazol (86,9%), se pueden observar diferencias notables en los porcentajes de susceptibilidad a este antibiótico entre las tres especies estudiadas. Mientras que *B. contaminans* fue altamente sensible a cotrimoxazol, *B. cepacia* y *B. cenocepacia* fueron las especies del complejo que exhibieron las más baja susceptibilidad a este antibiótico. Es importante resaltar que en nuestro estudio, 13 de los 99 (13,1%) aislados del cBc evaluados fueron resistentes a cotrimoxazol, y de estos la mayoría (11 de 13; 84,6%) permanecieron sensibles a ceftazidima, lo cual concuerda con los resultados de susceptibilidad antimicrobiana reportados por Nzula y cols [50]. En la actualidad, ceftazidima y meropenem son consideradas los fármacos más efectivos para el control de estas infecciones y representan una alternativa al cotrimoxazol [4], por lo tanto se recomienda un cuidadoso control del uso de estos fármacos en hospitales para evitar la emergencia de resistencia bacteriana.

Debe considerarse sin embargo que en el presente estudio, los resultados hallados sobre resistencia a los antibióticos en especies del cBc se asocian a un conjunto de cepas con un alto predominio de aislados de *B. contaminans* y menor número de los correspondientes a *B. cenocepacia* y en particular de *B. cepacia*. Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados indican que *B. contaminans* posee la mayor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos entre las 3 especies del cBc estudiadas, donde la mayoría de los aislados nosocomiales (85%) y todos los aislados ambientales (100%) fueron susceptibles a los 6 antibióticos testeados. Lamentablemente muy pocos trabajos han reportado la susceptibilidad a agentes antimicrobianos de *B. contaminans* [53, 57], y esta información se encuentra limitada a unas pocas cepas de referencia lo cual impide realizar una comparación adecuada con nuestros resultados. A pesar de este hecho podemos apreciar en el trabajo realizado por Peeters y cols [53] que las dos cepas

evaluadas exhiben resistencia en un caso a uno y en otro a tres de los antibióticos ensayados en nuestro estudio, lo cual abre el interrogante si esta elevada susceptibilidad presente en nuestros aislados se encuentra circunscripto sólo a nuestro país.

En contraste, *B. cenocepacia* exhibió los más altos niveles de resistencia a estos antibióticos (75%), lo cual concuerda con lo reportado en trabajos previos sobre esta especie [1, 39, 57]. Asimismo se observaron diferencias notorias en la resistencia a múltiples antibióticos entre las especies del cBc. De hecho *B. cenocepacia* exhibió el más alto score de multi-resistencia donde la mayoría de los aislados de esta especie (58,3%) fue resistente al menos a 3 clases de antibióticos que incluyen fluoroquinolonas, sulfonamidas, y tetraciclinas. Cabe resaltar que la multi-resistencia observada en *B. cenocepacia* está asociada principalmente con fármacos de administración oral (cotrimoxazol, ciprofloxacina y minociclina), los cuales son comúnmente empleados en el tratamiento de infecciones del cBc en pacientes FQ. Así, se podría sugerir una relación entre el empleo habitual de estos antibióticos orales y la adquisición de resistencia por estas bacterias del cBc.

El amplio uso y abuso de antibióticos en medicina ha contribuido significativamente al incremento en la resistencia bacteriana [31] y por esta razón se piensa habitualmente que los aislados clínicos son más resistentes a los antibióticos que las cepas ambientales. En el caso de *B. contaminans*, nuestros resultados al igual que los reportados por Nzula y cols [50] mostraron que los aislados clínicos y ambientales poseen perfiles de susceptibilidad a antibióticos similares, particularmente para ceftazidima y cotrimoxazol (trimetoprima y sulfametoxazol). Sin embargo se comprobó en los aislados ambientales de *B. contaminans* una alta sensibilidad a ciprofloxacina, levofloxacina y meropenem lo cual está de acuerdo con las observaciones de otros autores [7, 50]. Es importante destacar que en este estudio los aislados ambientales de *B. contaminans* fueron obtenidos de diferentes fuentes que incluyen desinfectantes, agua destilada comercial, agua purificada en instalaciones de industria farmacéutica y preparados magistrales hospitalarios, destacando que estos productos son particularmente propensos a la contaminación con esta especie del cBc. Esta observación sumada a la susceptibilidad a los antimicrobianos de *B. contaminans* refuerza la idea que las cepas ambientales representan un potencial riesgo para miembros vulnerables de la comunidad, en particular pacientes FQ.

4.5.2 Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de biofilms maduros de *B. contaminans*, *B. cepacia* y *B. cenocepacia*

Las infecciones pulmonares en pacientes FQ se caracterizan por la presencia de comunidades bacterianas adheridas a superficies, conocidas como biofilms. En este estado de crecimiento, las bacterias experimentan un cambio fenotípico que las hacen más resistentes a los agentes antimicrobianos y biocidas, y adquieren la capacidad de evadir al sistema inmune del hospedador [15, 57]. Aunque el ensayo de CIM ha sido el método estándar para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de células planctónicas, esta técnica ha sido objeto de críticas por no reflejar el comportamiento bacteriano *in vivo*. Por esta razón, diversos ensayos han sido desarrollados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias crecidas en biofilms, aunque hasta la fecha no existe un diseño estandarizado para este propósito. En este trabajo se empleó un protocolo simple para la determinación de la actividad de agentes antimicrobianos sobre biofilms, del cual se destaca la utilización del indicador redox CTT y placas multipocillos convencionales. Este protocolo reúne características y parámetros de otros métodos propuestos previamente, en especial aquellos considerados por Lipuma y cols [42], los cuales fueron ajustados de manera de reunir las condiciones más adecuadas para nuestro estudio. En el ensayo de CIMB que se indica en Materiales y Métodos (ver ítem 4.3.5), se establecieron dos parámetros relacionados al tiempo. El primero fue fijar el tiempo de crecimiento en 48 h como estándar para la formación de un biofilm maduro, de acuerdo al protocolo propuesto por Lipuma y cols. El segundo parámetro fue el tiempo de recrecimiento, el cual se estableció en 6 h, para determinar el valor de CIMB basándonos en el protocolo de Moscovitz y cols [49]. La primera consideración tiene su fundamento en estudios previos que indicaron una relación entre el estadio de maduración de un biofilm y la evolución de la resistencia a antibióticos por células sésiles [22, 35, 65]. De esta manera se seleccionó el tiempo de 48 h como un tiempo de crecimiento adecuado para obtener biofilms maduros. Asimismo, al no existir un protocolo estandarizado, la definición de la CIMB suele variar según la metodología empleada en su determinación. Para nuestro trabajo se definió la CIMB como la mínima concentración de antibiótico requerida para no detectar crecimiento bacteriano, a través del cambio de color (reducción) del indicador redox CTT, al cabo de un período de 6 h de incubación con medio de cultivo CMHAC fresco luego de remover el antibiótico correspondiente de la placa multipocillo. Este criterio fue adoptado previamente en

otros trabajos sobre susceptibilidad antimicrobiana en biofilms de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo especies del cBc [9, 48-49].

4.5.3 Comparación de la concentración inhibitoria mínima para cultivos planctónicos y biofilm de *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*

Diversos estudios han reportado el aumento en la resistencia a los agentes antimicrobianos en bacterias Gram-negativas no fermentadoras de glucosa cuando crecen en biofilm [18, 33, 49, 52]. A pesar de estos antecedentes, nuestra metodología mostró resultados de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias planctónicas y sésiles variables en función de la especie y del origen de los aislados estudiados.

En relación a las especies, *B. cenocepacia* y *B. contaminans* exhibieron susceptibilidades comparables a los 6 antibióticos testeados cuando crecieron tanto en forma planctónica como en biofilm. En cambio, los biofilms de *B. cepacia* presentaron una disminución en la susceptibilidad a meropenem, minociclina y cotrimoxazol comparado con su contraparte planctónica. Un comportamiento semejante al descrito en nuestro trabajo fue reportado por Caraher y cols [9], quienes observaron una disminución significativa de la susceptibilidad a meropenem en cepas de *B. multivorans* y *B. dolosa*, pero no así en cepas de *B. cenocepacia*. Asimismo esos autores indicaron que la susceptibilidad a ciprofloxacina y ceftazidima era comparable en las tres especies independientemente del modo de crecimiento. Por tanto esto podría sugerir la existencia de factores inherentes al biofilm maduro en cada especie del cBc que condicionarían la efectividad de ciertos antibióticos. Posteriormente un trabajo realizado por Peeters y cols [53] reportó que la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de especies del cBc, incluida *B. contaminans*, era similar tanto en cultivos planctónicos como en células sésiles recientemente adheridas. Las discrepancias observadas en estos trabajos podrían atribuirse a diferencias en las condiciones de cultivo, y en la estrategia experimental de la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en biofilms. En el primer estudio, al igual que en el nuestro, se compararon las CIMs de cultivos planctónicos con CIMBs obtenidas luego de tratar biofilms maduros. Por el contrario, en el segundo estudio se compararon las CIMs de cultivos planctónicos con las CIMBs correspondientes a poblaciones sésiles recientemente adheridas a la superficie (biofilm joven). Las diferencias en la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos podrían explicarse

principalmente en función de la fase de crecimiento de los cultivos planctónicos y biofilms [18]. De esta manera las células sésiles en biofilms maduros (crecimiento lento) presentarían una menor susceptibilidad a los antibióticos comparado con cultivos planctónicos en fase exponencial o biofilms jóvenes. Asimismo como se ha comentado en el capítulo introductorio la resistencia a agentes antimicrobianos en biofilms maduros tiene un carácter multifactorial (disminución en la difusión del antibiótico a través del biofilm, alteración en el microentorno e inducción del fenotipo “persistidor”, ver ítem 1.3.6), el cual no se encuentra presente en células recientemente adheridas (biofilm joven).

En relación al origen, los biofilms de aislados ambientales de *B. contaminans*, a diferencia de los clínicos, presentaron un marcado aumento de la resistencia a la mayoría (5 de 6) de los agentes antimicrobianos ensayados respecto de las bacterias planctónicas. Debido a que los cultivos planctónicos de estos aislados ambientales se mostraron susceptibles a todos los antibióticos testeados en este trabajo (Tabla 3 y Tabla 4), se podría inferir que es el biofilm el que provee a estos aislados ambientales la capacidad de tolerar a los agentes antimicrobianos, a tal punto que adquieren una resistencia comparable a la presente en aislados clínicos de la misma especie. Este hecho indicaría que los aislados ambientales cuando emplean la estrategia de formación de biofilm podrían ser tan difíciles de tratar como los aislados clínicos representando un potencial riesgo si estos logran colonizar el tracto respiratorio de pacientes FQ.

4.5.4 Efecto bactericida y destructor de biofilms maduros por empleo de antibióticos individuales

Una hipótesis válida en relación a la implementación de una terapia antimicrobiana efectiva sería la selección de un antibiótico que no sólo alcance una concentración inhibitoria sino también bactericida en el sitio de infección y al mismo tiempo que sea capaz de destruir el biofilm parcial o totalmente. Los antibióticos que satisfagan estas características podrían reducir la viabilidad y la biomasa del biofilm, lo cual posibilitaría a las defensas del hospedador (fagocitos, etc) erradicar la infección. De esta manera los resultados de nuestro trabajo indicaron que de los 6 antibióticos testeados, tanto las fluoroquinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina) como meropenem cumplen con los requisitos anteriormente mencionados.

Una serie de estudios previos demostraron la habilidad de las fluoroquinolonas en eliminar células que no se encuentran en crecimiento y su capacidad de reducir biofilms de bacterias Gram-negativas [2, 33, 35, 52, 58]. En nuestro estudio las fluoroquinolonas analizadas a una concentración equivalente a 2x CIMBm (ciprofloxacina 4 µg/ml y levofloxacina 2 µg/ml) redujeron significativamente la viabilidad y la biomasa del biofilm de los aislados del cBc sensibles a estos fármacos. Es interesante destacar que nuestros resultados muestran que ciprofloxacina y levofloxacina producen una muerte significativa (99,9 – 99,999%) y reducción de biomasa de células sésiles a concentraciones de antibióticos clínicamente alcanzables en el tejido pulmonar (ciprofloxacina 4 µg/ml [17] y levofloxacina 8 µg/ml en tejido pulmonar [32]) para aislados nosocomiales y ambientales de *B. contaminans*. Asimismo cuando los aislados de *B. cepacia* y *B. cenocepacia* resistentes a ambas fluoroquinolonas fueron expuestos a levofloxacina, se produjo una reducción de la biomasa de los biofilms maduros (Tabla 7), pero no afectó la viabilidad celular de estos aislados. Un comportamiento semejante fue descrito por Dibonaventura y cols [19] empleando las fluoroquinolonas ofloxacina y rufloxacina, las cuales causaron la reducción de la biomasa de biofilms de *S. maltophilia* sin afectar la viabilidad celular. De esta manera los autores sugirieron que esas fluoroquinolonas ejercerían un rol activo en la supresión de la síntesis de matriz extracelular.

Ceftazidima, un antibiótico β-lactámico que mata células en rápido crecimiento presentó en general una acción bactericida pobre frente a células sésiles del cBc. Aunque este fármaco posee actividad inhibitoria sobre cultivos planctónicos y sésiles (Fig. 7 y Fig. 8), su acción bactericida en biofilms maduros de aislados clínicos varió entre 0 a 99% a bajas concentraciones, alcanzando una meseta a los 16 µg/ml (Fig. 9 F). Sólo el aislado ambiental (T5) fue más sensible a este antimicrobiano en todo el rango de concentración. Este comportamiento *in vitro* de los aislados clínicos tiene correlación con un trabajo realizado por Gold y cols [24] que informó sobre la pérdida de eficacia de ceftazidima en pacientes FQ con infección pulmonar crónica. Ceftazidima también exhibió un escaso poder bactericida en biofilms de *P. aeruginosa* y especies del cBc en un rango amplio de concentraciones [2, 33, 53]. Asimismo el efecto destructor del biofilm no fue observado en todo el rango de concentración empleado, lo cual coincide con las observaciones de Di Bonaventura y cols [20] en aislados de *S. maltophilia*. En cambio meropenem mostró una efectiva actividad bactericida frente a células sésiles de

B. cepacia, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*. Meropenem a bajas concentraciones, próximas a la CIMBm (4 - 8 µg/ml), redujo significativamente el número de células sésiles viables ($\geq 99,9\%$; Fig. 9 D) y exhibió una adecuada acción destructora del biofilm en todos los aislados del cBc testeado. Esta acción bactericida de meropenem ha sido observada previamente en células sésiles de *P. aeruginosa* [28]. Cabe destacar que a nuestro entender es la primera vez que se reporta la acción destructora del biofilm por meropenem, por tanto serán necesarios detallados estudios para revelar los mecanismos por los cuales este agente antimicrobiano es capaz de afectar la estabilidad del biofilm.

Aunque minociclina y cotrimoxazol son fármacos bacteriostáticos, estos son considerados antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por el cBc [4, 69]. En nuestro trabajo la viabilidad de biofilms de aislados de *B. contaminans* disminuyó entre 90-99,9% (Fig. 9 D y E) al ser expuestos a concentraciones de minociclina y cotrimoxazol con valores próximos a los alcanzados en el tejido pulmonar durante la terapia antimicrobiana (minociclina 3 µg/ml [67] y cotrimoxazol 9 µg/ml [27]). Concentraciones superiores de estos fármacos mostraron su carácter bacteriostático siendo incapaces de erradicar el biofilm formado por el cBc. Estas observaciones están de acuerdo a lo reportado por Peeters y cols [53] en relación a la actividad bactericida de minociclina y cotrimoxazol en biofilms de bacterias pertenecientes al cBc.

4.5.5 Efecto bactericida y destructor del biofilm por combinación de dos antibióticos

Una práctica habitual en el tratamiento de exacerbaciones en pacientes FQ es la utilización de combinaciones de antibióticos, en especial cuando la misma está asociada a infecciones de las vías aéreas por bacterias multi-resistentes. Sin embargo, la selección de una adecuada combinación de antibióticos suele representar un desafío para los especialistas. Aunque es común en la práctica médica el uso de un tratamiento empírico, un criterio válido debería ser la selección de antibióticos en función de su efectividad *in vitro*. En este estudio, nuestros resultados mostraron que tanto las fluoroquinolonas como meropenem muestran ser fármacos adecuados por su poder bactericida contra células sésiles y también por poseer acción destructora de biofilms. Así estas drogas fueron elegidas como una combinación potencial contra microorganismos del cBc.

Levofloxacin mostr6 una acci6n bactericida y destructora del biofilm comparable a la observada en ciprofloxacina, pero cuenta con mejores par6metros farmacodin6micos y farmacocin6ticas que esta 6ltima. Por este motivo se eligi6 a la fluoroquinolona levofloxacin como un f6rmaco atractivo para el ensayo de una doble combinaci6n antibi6tica junto a meropenem. Asimismo se evalu6 una segunda combinaci6n basada en ciprofloxacina y cotrimoxazol que constituye una combinaci6n de primera elecci6n en el tratamiento de infecciones del cBc en centros nosocomiales argentinos.

En general, las combinaciones de dos antimicrobianos CIP/COX y LEV/MEM mostraron un efecto bactericida sobre c6lulas s6siles de *B. contaminans* equivalente o superior comparado con los antibi6ticos individuales. Por un lado, la combinaci6n CIP/COX present6 un efecto bactericida y una actividad destructora del biofilm comparable al observado con ciprofloxacina en todo el rango de concentraciones ensayado. Excepcionalmente, el aislado Fq6406 fue m6s susceptible a la acci6n bactericida de la combinaci6n CIP/COX comparado con ciprofloxacina a concentraci6n 2/4 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$), sin embargo el efecto destructor del biofilm fue equivalente en ambos tratamientos. Esta observaci6n podr6 justificarse en el hecho que en nuestro trabajo, cotrimoxazol no mostr6 un efecto destructor del biofilm, en coincidencia con lo reportado por Di Bonaventura y cols [19] en biofilms de *S. maltophilia*. Por otro lado, la combinaci6n LEV/MEM exhibi6 un aumento en la actividad bactericida y destructora del biofilm ($p < 0,01$) comparado con los respectivos antibi6ticos individuales a las mismas concentraciones en todos los aislados del cBc, aun en cepas de *B. cepacia* y *B. cenocepacia* resistentes a levofloxacin. Es interesante mencionar que un reciente trabajo de Dales y cols [16] se propone la combinaci6n ciprofloxacina/meropenem como una de las m6s efectivas en el tratamiento de *P. aeruginosa* y cBc. Sin embargo es habitual en estudios de sinergia *in vitro*, evaluar a cada antimicrobiano a la m6xima concentraci6n en suero, la cual no necesariamente es la misma que se alcanza en tejido pulmonar. Un ejemplo de ello es el β -lact6mico meropenem el cual alcanza en sangre una concentraci6n promedio de 47,3 $\mu\text{g/ml}$ mientras que en el tejido pulmonar este valor disminuye a 11,4 $\mu\text{g/ml}$ [63]. Por este motivo, en este trabajo la relaci6n de concentraciones para la doble combinaci6n de antibi6ticos se estableci6 basada en la concentraci6n m6xima que alcanza cada antimicrobiano en el fluido y par6nquima pulmonar donde se desarrolla la infecci6n.

En nuestro estudio no se observó correlación entre la formación de biomasa del biofilm en aislados del cBc y la resistencia a los antimicrobianos determinada a través de los valores de CIM de cultivos planctónicos, lo cual coincide con la observaciones de Rose y cols [57]. De hecho aunque los aislados FQ6406 y T5 produjeron la biomasa más elevada (DO_{570} 0,72-0,76) entre los aislados de *B. contaminans*, estos se mostraron más sensibles a los antibióticos con efecto destructor del biofilm comparado al resto de los aislados evaluados de la misma especie. Además, *B. cenocepacia* NF 171 y GZ323 fueron los mayores productores de biomasa y mostraron una buena reducción de la misma luego del tratamiento antibiótico con meropenem o LEV/MEM. Sin embargo las cepas capaces de producir grandes cantidades de biofilm representan un potencial riesgo dado que la biomasa remanente luego de la exposición al fármaco podría actuar como barrera para proteger el bajo número de células sésiles que sobreviven al tratamiento antimicrobiano.

Como se ha mencionado anteriormente, las características salientes de las bacterias en el biofilms son su tolerancia a los agentes antimicrobianos y a las defensas del hospedador, las cuales favorecen los episodios de infecciones recalcitrantes. Los mecanismos atribuidos a esta resistencia se asocian a fenómenos multifactoriales (ver ítem 1.3.5) donde se destacan la disminución en la difusión del antibiótico a través del biofilm (barrera física), alteración en el microentorno (ej. nutrientes, oxígeno), crecimiento lento o carencia de crecimiento en células del interior del biofilm e inducción del fenotipo “persistidor”. En la actualidad se considera que la subpoblación de células persistidoras en el biofilm sería responsable de la resistencia a la muerte por agentes antimicrobianos y el principal factor causante de infecciones recalcitrantes [40, 61]. En este sentido un estudio reciente indicó que el incremento en la resistencia a antibióticos en biofilms de *E. coli* pudo ser atribuido a la formación de subpoblaciones resistentes a antibióticos por inducción de un fenotipo específico (persistidores) en las capas más profundas del biofilm [35]. Nuestros resultados mostraron que la acción bactericida de los antibióticos más efectivos (fluoroquinolonas y meropenem) alcanza una meseta, lo cual podría asociarse a un reducido número de células persistidoras sobrevivientes en el biofilm.

Las manifestaciones clínicas de las exacerbaciones pulmonares agudas en FQ son producidas por olas de células planctónicas que son liberadas por el biofilm [58]. Los agentes antimicrobianos como fluoroquinolonas matan a la mayoría de las células

planctónicas y sésiles aunque las células persistidoras sobreviven [60]. El sistema inmune es el encargado de eliminar las células persistidoras correspondiente a la población planctónica (ver ítem 1.3.2). Sin embargo las células fagocíticas no logran matar las células persistidoras en el biofilm debido a que la matriz del biofilm actúa como una barrera física que impide la fagocitosis de estas células bacterianas remanentes [40, 61]. Finalmente, al desaparecer la presión antimicrobiana los persistidores crecen y generan un nuevo biofilm resistente, dando lugar a un nuevo ciclo de infección.

Basados en el modelo del persistidor mencionado, la estrategia aplicada a este trabajo fue seleccionar un agente antimicrobiano con un alto poder bactericida y capaz de destruir la biomasa con el propósito de facilitar la erradicación de las células persistidoras en el biofilm. En este contexto, antibióticos como las fluoroquinolonas, meropenem y las dobles combinaciones de antibióticos, CIP/COX y LEV/MEM fueron capaces de cumplir con los requerimientos antes mencionados. En coincidencia con la práctica clínica, nuestros resultados de actividad antimicrobiana *in vitro* sugieren que el empleo de dobles combinaciones de antibióticos presenta ventajas sobre los antibióticos individuales. En especial la combinación LEV/MEM se destacó por su alto poder bactericida y efecto destructor de biofilms en las tres especies del cBc a concentraciones clínicamente alcanzables en el tejido pulmonar durante el tratamiento terapéutico. En virtud de estos resultados se recomienda el uso de LEV/MEM en el tratamiento empírico de infecciones pulmonares agudas (exacerbaciones) causadas por *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*. En cambio, el empleo de la combinación CIP/COX debería limitarse al tratamiento de infecciones pulmonares asociadas a *B. contaminans*, dado que la resistencia a ciprofloxacina y/o cotrimoxazol es más frecuente en las especies del complejo *B. cepacia* y *B. cenocepacia*. Esta observación enfatiza la necesidad de contar con un método de identificación rápido y preciso de especies del cBc (ej. FT-IR ó MALDI-ToF) que ayude a la elección de la mejor terapia antibiótica para el paciente FQ.

4.6 CONCLUSIONES

Los resultados descriptos en el presente capítulo permiten concluir que:

- Mediante el ensayo de CIM es posible determinar qué antibióticos dentro del grupo analizado resultan más efectivos en la inhibición de cultivos planctónicos de aislados de tres especies relevantes del cBc (*B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*). Los mismos pueden ordenarse de mayor a menor efectividad de la siguiente forma: meropenem > ceftazidima > minociclina y levofloxacin > cotrimoxazol > ciprofloxacina.
- Las especies del cBc, *B. contaminans*, *B. cenocepacia* y *B. cepacia*, al crecer en forma planctónica mostraron diferentes perfiles de susceptibilidad a los antibióticos testeados a través del ensayo de CIM. *B. cenocepacia* no sólo fue la especie más resistente a los antibióticos ensayados sino que también presentó el mayor porcentaje de aislados multi-resistentes a por lo menos a 3 clases de antibióticos (fluoroquinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas). Por el contrario la especie más susceptible a los antimicrobianos fue *B. contaminans*.
- El estudio de biofilms mediante el ensayo de CIMB indicó que las especies *B. contaminans* y *B. cenocepacia* no exhibieron diferencias significativas con el ensayo de CIM. En cambio los biofilms de *B. cepacia* mostraron ser más tolerantes a minociclina, meropenem y cotrimoxazol. Estos resultados sugieren que las diferencias en la susceptibilidad a los antimicrobianos se deben a factores inherentes al biofilm formado por cada especie del cBc.
- Los aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans* cuando crecen en forma planctónica no exhibieron diferencias significativas en la susceptibilidad a ceftazidima, cotrimoxazol y minociclina. Asimismo estos aislados ambientales presentaron un aumento en la resistencia a los antimicrobianos cuando crecen en biofilms.
- Si bien antibióticos tales como ceftazidima y minociclina mostraron mediante el ensayo de CIM y CIMB su capacidad de inhibir el crecimiento de células planctónicas y biofilms maduros de *B. contaminans*, *B. cepacia* y *B. cenocepacia*, estos mismos antibióticos solo lograron reducir la población de células sésiles en un valor < 99,9% (> 0,1 % de sobrevivientes).

- Las fluoroquinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina), meropenem, y las combinaciones de dos antibióticos como CIP/COX y LEV/MEM destruyeron significativamente la biomasa de biofilm maduros y exhibieron una actividad bactericida $\geq 99,9\%$ a concentraciones fisiológicamente alcanzables de estos antimicrobianos. Por tanto estos antimicrobianos y en particular las combinaciones de dos antibióticos ofrecen ventajas sobre los demás fármacos analizados.
- Los resultados de este estudio sugieren que es posible establecer una terapia antimicrobiana adecuada para el paciente FQ en función de la especie del cBc aislada. La combinación de dos antibióticos orales, CIP/COX podría administrarse en infecciones causadas por *B. contaminans*. En cambio la combinación LEV/MEM, la cual demostró excelente actividad bactericida y destructora del biofilm en las tres especies del cBc, podría indicarse en pacientes que presentaran una infección pulmonar aguda (exacerbación) por *B. cepacia* y *B. cenocepacia* o bien cuando el microorganismo es identificado solo como miembro del cBc.
- En este trabajo se demostró la importancia de analizar la respuesta comparativa de células planctónicas y sésiles del cBc frente a antibióticos con el fin de proponer un tratamiento antimicrobiano efectivo en pacientes FQ.

Finalmente cabe destacar que a nuestro entender, este es el primer estudio que determina sensibilidad a agentes antimicrobianos tanto de cultivos planctónicos como en biofilm de aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans*, junto a dos especies relevantes del cBc: *B. cenocepacia* y *B. cepacia*.

4.7 BIBLIOGRAFÍA

1. **Aaron, S. D., W. Ferris, D. A. Henry, D. P. Speert, and N. E. Macdonald.** 2000. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* **161**:1206-12.
2. **Abdi-Ali, A., M. Mohammadi-Mehr, and Y. Agha Alaei.** 2006. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **27**:196-200.
3. **Aulton, M. E.** 2004. *Farmacía: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*, 2da ed. Elsevier España, Madrid.
4. **Avgeri, S. G., D. K. Matthaiou, G. Dimopoulos, A. P. Grammatikos, and M. E. Falagas.** 2009. Therapeutic options for *Burkholderia cepacia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review of the clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents* **33**:394-404.
5. **Baldwin, A., E. Mahenthalingam, P. Drevinek, P. Vandamme, J. R. Govan, D. J. Waine, J. J. LiPuma, L. Chiarini, C. Dalmastrì, D. A. Henry, D. P. Speert, D. Honeybourne, M. C. Maiden, and C. G. Dowson.** 2007. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis* **13**:458-61.
6. **Bennington, J. L.** 2000. *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico*, 1era ed. Ed. Médica Panamericana.
7. **Bevino, A., C. Dalmastrì, S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. L. Belli, S. Piana, A. Materazzo, P. Vandamme, and G. Manno.** 2002. *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources in Italy: genomovar status and distribution of traits related to virulence and transmissibility. *J Clin Microbiol* **40**:846-51.
8. **Cantin, A., and D. E. Woods.** 1993. Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *J Clin Invest* **91**:38-45.
9. **Caraher, E., G. Reynolds, P. Murphy, S. McClean, and M. Callaghan.** 2007. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**:213-6.
10. **Castaños, C., and F. Rentería.** 2008. Consenso Nacional de Fibrosis Quística, Sociedad Argentina de Pediatría. *Arch Argent Pediatr (Supl)* **106 (5)**:1-52.
11. **Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret.** 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* **37**:1771-6.
12. **CLSI.** 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M100-S13. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pa.

13. **CLSI.** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th International Supplement, vol. 26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
14. **Coenye, T., P. Vandamme, J. R. Govan, and J. J. LiPuma.** 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **39**:3427-36.
15. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**:711-745.
16. **Dales, L., W. Ferris, K. Vandemheen, and S. D. Aaron.** 2009. Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:1275-9.
17. **Dan, M., K. Torossian, D. Weissberg, and R. Kitzes.** 1993. The penetration of ciprofloxacin into bronchial mucosa, lung parenchyma, and pleural tissue after intravenous administration. *European Journal of Clinical Pharmacology* **44**:101-102.
18. **Desai, M., T. Buhler, P. H. Weller, and M. R. W. Brown.** 1998. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:153-160.
19. **Di Bonaventura, G., I. Spedicato, D. D'Antonio, I. Robuffo, and R. Piccolomini.** 2004. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:151-60.
20. **Di Bonaventura, G., I. Spedicato, D. D'Antonio, I. Robuffo, and R. Piccolomini.** 2004. Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:151-160.
21. **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
22. **Drenkard, E.** 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**:1213-9.
23. **Forbes, B., D. Sahn, and A. Weissfeld.** 2009. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana.
24. **Gold, R., E. Jin, H. Levison, A. Isles, and P. C. Fleming.** 1983. Ceftazidime alone and in combination in patients with cystic fibrosis: lack of efficacy in treatment of severe respiratory infections caused by *Pseudomonas cepacia*. *J Antimicrob Chemother* **12 Suppl A**:331-6.
25. **Govan, J. R., A. R. Brown, and A. M. Jones.** 2007. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* **2**:153-64.

26. **Govan, J. R., and V. Deretic.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**:539-74.
27. **Hansen, I., M. L. Nielsen, and S. Bertelsen.** 1973. Trimethoprim in Human Saliva, Bronchial Secretion and Lung Tissue. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **32**:337-344.
28. **Hill, D., B. Rose, A. Pajkos, M. Robinson, P. Bye, S. Bell, M. Elkins, B. Thompson, C. Macleod, S. D. Aaron, and C. Harbour.** 2005. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* **43**:5085-90.
29. **Høiby, N.** 2002. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**:235-238.
30. **Holmes, A., R. Nolan, R. Taylor, R. Finley, M. Riley, R. Z. Jiang, S. Steinbach, and R. Goldstein.** 1999. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis* **179**:1197-205.
31. **Hsueh, P. R., W. H. Chen, and K. T. Luh.** 2005. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* **26**:463-72.
32. **Hutschala, D., K. Skhirtladze, A. Zuckermann, W. Wisser, P. Jaksch, B. X. Mayer-Helm, H. Burgmann, E. Wolner, M. Muller, and E. M. Tschernko.** 2005. In Vivo Measurement of Levofloxacin Penetration into Lung Tissue after Cardiac Surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:5107-5111.
33. **Ishida, H., Y. Ishida, Y. Kurosaka, T. Otani, K. Sato, and H. Kobayashi.** 1998. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1641-5.
34. **Isles, A., I. Maclusky, M. Corey, R. Gold, C. Prober, P. Fleming, and H. Levison.** 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* **104**:206-10.
35. **Ito, A., A. Taniuchi, T. May, K. Kawata, and S. Okabe.** 2009. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl Environ Microbiol* **75**:4093-100.
36. **Jacobs, J. L., A. C. Fasi, A. Ramette, J. J. Smith, R. Hammerschmidt, and G. W. Sundin.** 2008. Identification and Onion Pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from the Onion Rhizosphere and Onion Field Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3121-3129.
37. **Jorda-Vargas, L., J. Degrossi, N. C. Castaneda, M. D'Aquino, M. A. Valvano, A. Procopio, L. Galanternik, and D. Centron.** 2008. Prevalence of indeterminate genetic species of *Burkholderia cepacia* complex in a cystic fibrosis center in Argentina. *J Clin Microbiol* **46**:1151-2.
38. **Langston, V. C.** 1999. Antimicrobial use in food animals, p. 17-32. *In* J. L. Howard and R. A. Smith (ed.), *Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice*. WB Saunders, Philadelphia.

39. **Leitao, J. H., S. A. Sousa, M. V. Cunha, M. J. Salgado, J. Melo-Cristino, M. C. Barreto, and I. Sa-Correia.** 2008. Variation of the antimicrobial susceptibility profiles of *Burkholderia cepacia* complex clonal isolates obtained from chronically infected cystic fibrosis patients: a five-year survey in the major Portuguese treatment center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**:1101-11.
40. **Lewis, K.** 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Micro* **5**:48-56.
41. **Lipuma, J. J.** 2002. Preventing *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis: is there a middle ground? *J Pediatr* **141**:467-9.
42. **LiPuma, J. J., S. Rathinavelu, B. K. Foster, J. C. Keoleian, P. E. Makidon, L. M. Kalikin, and J. R. Baker, Jr.** 2009. In vitro activities of a novel nanoemulsion against *Burkholderia* and other multidrug-resistant cystic fibrosis-associated bacterial species. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:249-55.
43. **Mahenthalingam, E., A. Baldwin, and C. G. Dowson.** 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* **104**:1539-51.
44. **Mahenthalingam, E., J. Bischof, S. K. Byrne, C. Radomski, J. E. Davies, Y. Av-Gay, and P. Vandamme.** 2000. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* **38**:3165-73.
45. **Manno, G., E. Ugolotti, M. L. Belli, M. L. Fenu, L. Romano, and M. Cruciani.** 2003. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia*-complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**:28-34.
46. **Martínez, J. A., and F. Sánchez.** 2007. Mecanismos de acción de los antibióticos. *JANO* **1660**:28-34.
47. **Minan, A., A. Bosch, P. Lasch, M. Stammler, D. O. Serra, J. Degrossi, B. Gatti, C. Vay, M. D'Aquino, O. Yantorno, and D. Naumann.** 2009. Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry. *Analyst* **134**:1138-48.
48. **Molina, A., R. Del Campo, L. Máiz, M.-I. Morosini, A. Lamas, F. Baquero, and R. Cantón.** 2008. High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmeI capable of biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62**:961-967.
49. **Moskowitz, S. M., J. M. Foster, J. Emerson, and J. L. Burns.** 2004. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **42**:1915-22.
50. **Nzula, S., P. Vandamme, and J. R. Govan.** 2002. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* **50**:265-9.

51. **O'Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
52. **Passerini de Rossi, B., C. Garcia, M. Calenda, C. Vay, and M. Franco.** 2009. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin on biofilms and planktonic cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections. *Int J Antimicrob Agents* **34**:260-4.
53. **Peeters, E., H. J. Nelis, and T. Coenye.** 2009. In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *J Antimicrob Chemother* **64**:801-9.
54. **Perea, E. J., J. Ayarra, M. C. Garcia Iglesias, I. García Luque, and J. Loscertales.** 1988. Penetration of Cefuroxime and Ceftazidime into Human Lungs. *Chemotherapy* **34**:1-7.
55. **Prince, A. S.** 2002. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med* **347**:1110-1.
56. **Rahman, M., I. Kuhn, M. Rahman, B. Olsson-Liljequist, and R. Mollby.** 2004. Evaluation of a Scanner-Assisted Colorimetric MIC Method for Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2398-2403.
57. **Rose, H., A. Baldwin, C. G. Dowson, and E. Mahenthiralingam.** 2009. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* **63**:502-10.
58. **Roveta, S., A. M. Schito, A. Marchese, and G. C. Schito.** 2007. Activity of moxifloxacin on biofilms produced in vitro by bacterial pathogens involved in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Int J Antimicrob Agents* **30**:415-21.
59. **Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg.** 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**:762-764.
60. **Spoering, A. L., and K. Lewis.** 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* **183**:6746-51.
61. **Stewart, P. S., and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**:135-8.
62. **Tateda, K., Y. Ishii, T. Matsumoto, T. Kobayashi, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi.** 2000. Potential of macrolide antibiotics to inhibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: suppression of virulence factors and stress response. *Journal of Infection and Chemotherapy* **6**:1-7.
63. **Tomaselli, F., A. Maier, V. Matzi, F. M. Smolle-Juttner, and P. Dittrich.** 2004. Penetration of meropenem into pneumonic human lung tissue as measured by in vivo microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2228-32.
64. **Trafny, E. A.** 1998. Susceptibility of adherent organisms from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wounds to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* **10**:223-8.

65. **Tre-Hardy, M., C. Mace, N. El Manssouri, F. Vanderbist, H. Traore, and M. J. Devleeschouwer.** 2009. Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model. *Int J Antimicrob Agents* **33**:40-5.
66. **Vanlaere, E., A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E. De Brandt, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, D. P. Speert, C. Dowson, and P. Vandamme.** 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:102-11.
67. **Watanabe, A., Y. Anzai, K. Niitsuma, M. Saito, K. Yanase, and M. Nakamura.** 2001. Penetration of Minocycline Hydrochloride into Lung Tissue and Sputum. *Chemotherapy* **47**:1-9.
68. **Whiteford, M. L., J. D. Wilkinson, J. H. McColl, F. M. Conlon, J. R. Michie, T. J. Evans, and J. Y. Paton.** 1995. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax* **50**:1194-8.
69. **Zhou, J., Y. Chen, S. Tabibi, L. Alba, E. Garber, and L. Saiman.** 2007. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1085-8.

5 DISCUSIÓN GENERAL

La identificación rápida y adecuada de patógenos respiratorios en individuos FQ tiene un fuerte impacto en el tratamiento antimicrobiano, control de infecciones, como así también en la calidad de vida de los pacientes. Entre los microorganismos que infectan a estos pacientes la taxonomía y la identificación de los miembros del género *Burkholderia* ha sido siempre muy compleja. Al momento de iniciar los estudios que dieron lugar a la presente Tesis Doctoral, la epidemiología del cBc en Argentina era prácticamente desconocida y los métodos de identificación empleados se basaban principalmente en un conjunto pruebas bioquímicas o kit comerciales cuyos resultados discriminaban sólo a nivel de género con un elevado porcentaje (40%) de identificaciones erróneas. Además los métodos de PCR utilizados en la identificación de especies del cBc eran limitados, empleándose sólo PCR-*recA* primers EE. Por ese entonces los principales centros de atención de FQ en el País registraban un aumento considerable de aislamientos de bacterias cuya tipificación era compatible con miembros de cBc. Esta situación era motivo de gran preocupación en los centros de salud debido a la dificultad y demoras en la identificación del cBc relacionadas a la naturaleza de las técnicas fenotípicas disponibles, lo cual conducía a un retraso en el inicio del tratamiento antimicrobiano y de las prácticas de segregación de pacientes infectados. En este contexto era de suma necesidad contar con un método de identificación rápido, económico y confiable que permitiera la identificación de los principales patógenos respiratorios en FQ y en especial del cBc. La presente tesis doctoral tiene por objeto avanzar en la resolución de esta problemática, y muestra por vez primera el enorme potencial de las modernas técnicas fenotípicas basadas en la espectroscopia FT-IR y en la espectrometría de masa MALDI-ToF para la rápida y adecuada identificación de patógenos respiratorios aislados de muestras de esputo de pacientes FQ.

En el capítulo 2 se informa el desarrolló de una novedosa estrategia que permitió la rápida identificación de miembros del cBc y BNF relevantes, basada en el uso de la espectroscopía FT-IR en combinación con redes neuronales artificiales (RNAs). Se estableció un protocolo experimental simple y estandarizado, el cual permitió la construcción de una base de datos conteniendo más de 2000 espectros infrarrojos correspondientes a 15 cepas de referencia y 169 aislados clínicos de BNF recuperados

de muestras de esputo de 150 pacientes FQ. El sistema de identificación basado en RNAs consistió en dos niveles. El nivel superior de la red permitió la identificación de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *Acinetobacter spp.*, *R. pickettii*, y bacterias del cBc con un porcentaje de identificaciones correctas del 98,1%. El segundo nivel de la red fue desarrollado para diferenciar las cuatro especies más relevantes del cBc: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, y *B. stabilis*, con un grado de certeza del 93,8%. Estos resultados demostraron la gran confiabilidad y capacidad de la metodología desarrollada para la rápida identificación de especies del cBc y BNF aislados de pacientes FQ. Contrario a otras técnicas, esta metodología requiere de pequeñas cantidades de células y una mínima preparación de muestra, es económica y puede conducir a la identificación dentro de 6 - 8 h, una vez aislado el microorganismo. Asimismo es un sistema de identificación versátil, la información contenida en la base de datos puede ser fácilmente actualizada, al igual que incorporar un gran número de cepas y aislados de cada especie. Las RNAs demostraron ser una herramienta poderosa para la discriminación de especies estrechamente relacionadas del cBc y representa un avance inédito a nivel nacional en la identificación rutinaria de patógenos respiratorios.

En el capítulo 3 se empleó una segunda metodología de discriminación e identificación rápida de bacterias de tracto respiratorio basada en la EMCE/MALDI-ToF. Los espectros de masa de células enteras fueron evaluados bajo dos enfoques analíticos con el objeto de discriminar e identificar las especies formales del cBc, la nueva especie *B. contaminans* perteneciente al Taxón K, *B. gladioli*, y los BNF más relevantes recuperados de esputo de pacientes FQ. Un total 146 aislados clínicos y 26 cepas de referencia fueron analizados en nuestro estudio. Los espectros de masa de células enteras de estos aislados exhibieron una alta reproducibilidad aplicando un protocolo de inactivación de células vegetativas recientemente desarrollado, el cual está basado en la extracción de proteínas microbianas mediante TFA. En el primer enfoque, el análisis espectral fue llevado a cabo mediante una representación del espectro de masa mediante una “vista en gel”, la cual demostró ser útil en el reconocimiento de proteínas biomarcadoras específicas de identificación (SIBPs). Una serie de picos de masa prominentes, principalmente asignados a proteínas expresadas constitutivamente (proteínas ribosomales y de mantenimiento), fueron seleccionados como SIBPs para la identificación a nivel de género, especie y aun de cepa en determinadas especies del cBc. Dos picos de masas distintivos presentes en el espectro de *B. contaminans* (7501 y

7900 Da) fueron propuestos como SIBPs para la identificación de esta nueva especie. Una segunda estrategia de análisis espectral basada en la reducción de datos y posterior análisis multivariante por AJC se empleó para obtener una discriminación objetiva de todas las especies analizadas. Este enfoque permitió la identificación satisfactoria de las especies formales del cBc, *B. contaminans* y *B. gladioli*, y su diferenciación de otros BNF relevantes en infecciones respiratorias de pacientes FQ. Ambas modalidades mostraron ser complementarias y permiten el análisis de datos complejos de EM MALDI-TOF. Al igual que la espectroscopía FT-IR, la EMCE/MALDI-ToF es una metodología económica, con un gasto ínfimo de consumibles y que permite la identificación de microorganismos en 1 hora, partiendo de un cultivo puro. De esta manera, por primera vez en nuestro País la EMCE/MALDI-ToF se posiciona como una herramienta rápida, precisa y adecuada para el análisis microbiológico rutinario de muestras de esputo de pacientes FQ.

En el laboratorio de microbiología, una vez que se identifica al patógeno bacteriano se procede a la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana con el fin de proporcionar al paciente un tratamiento adecuado. Los BNF y en particular el cBc se caracterizan por ser resistentes a un gran número de antibióticos, por tanto las opciones terapéuticas son limitadas. Este panorama se torna más complejo cuando microorganismos que se muestran sensibles a un determinado fármaco en ensayos *in vitro* no responden de la misma manera en condiciones *in vivo*. Esta situación que parece por momentos contradictoria, puede encontrar una explicación en los cambios fenotípicos que experimentan las bacterias al colonizar el pulmón del paciente FQ. En la naturaleza al igual que en el pulmón FQ, las bacterias crecen y sobreviven formando biofilms, así esta forma de crecimiento sería responsable de la persistencia bacteriana en pulmón pese al tratamiento antimicrobiano. Con el objeto de abordar este problema y analizar los antibióticos que podrían resultar más efectivos, se analizaron 99 aislados pertenecientes a las tres especies predominantes del cBc, *B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*. Si bien la mayoría de los aislados proceden de muestras de esputo de pacientes FQ atendidos en 4 centros nosocomiales de referencia, se incluyeron además aislados provenientes del ambiente por ser considerados una fuente de riesgo de nuevas infecciones en estos pacientes. En el capítulo 4 se reporta la susceptibilidad antimicrobiana de cultivos planctónicos y en biofilms de aislados del cBc.

Los resultados obtenidos a través del ensayo de CIM mostraron que los antibióticos más efectivos en la inhibición de cultivos planctónicos de aislados de tres especies del cBc (*B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. contaminans*) fueron en orden decreciente meropenem (100%), ceftazidima (96%), minociclina (89,9%) y levofloxacina (89,9%), cotrimoxazol (86,9%), y ciprofloxacina (84,9%). Asimismo, este ensayo indicó que las tres especies del cBc mostraron diferentes perfiles de susceptibilidad antimicrobiana donde los aislados clínicos de *B. cenocepacia* presentaron la mayor resistencia a los antibióticos (75%) y porcentaje de cepas multi-resistentes (58,3%), mientras que *B. contaminans* fue la especie que exhibió la menor resistencia (14,1%) y multi-resistencia (2,7%) a los fármacos testeados. Por otro lado, el análisis comparativo de cultivos planctónicos de aislados clínicos y ambientales de *B. contaminans* mostró perfiles de susceptibilidad comparables a determinados antibióticos (ceftazidima, cotrimoxazol y minociclina), oponiéndose a la tendencia habitual de considerar a los aislados ambientales como más susceptibles a los antibióticos a causa de su menor exposición a estos agentes.

Al evaluar la acción inhibitoria de los antibióticos en cultivos planctónicos y biofilms maduros, encontramos que la susceptibilidad antimicrobiana de aislados clínicos de *B. contaminans* y *B. cenocepacia* fue comparable en ambas formas de crecimiento, mientras que los cultivos en biofilms de *B. cepacia* presentaron mayor tolerancia a ciertos antibióticos como meropenem, minociclina y cotrimoxazol. Estas diferencias en la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos podrían atribuirse a factores inherentes al biofilm formado por cada especie del cBc.

Cuando se analizó el efecto de los antibióticos individuales sobre biofilms maduros, las fluoroquinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina) y meropenem presentaron una adecuada actividad bactericida (> 99,9%) y destructora del biofilm (54-88%) en aislados clínicos y ambientales del cBc a concentraciones clínicamente alcanzables de estos fármacos durante la terapia antimicrobiana. Así, el empleo de fluoroquinolonas y meropenem sobre biofilms del cBc mostró ventajas sobre los demás fármacos ensayados, siendo estos atractivos para su uso en terapias basadas en la combinación de dos antibióticos las cuales son habituales en el tratamiento de infecciones en pacientes FQ.

En este trabajo se evaluaron las dobles combinaciones de antibióticos, CIP/COX de uso habitual en pacientes FQ, y LEV/MEM propuesta en nuestro estudio, las cuales

mostraron ser efectivas en tratamiento de aislados de *B. contaminans*. En cambio, sólo la combinación LEV/MEM presentó una adecuada acción bactericida y destructora del biofilm sobre aislados de *B. cepacia* y *B. cenocepacia*. Por tanto los resultados de este estudio sugieren que es posible establecer una terapia antimicrobiana apropiada para el paciente FQ en función de la especie del cBc aislada. La combinación de dos antibióticos orales, CIP/COX podría administrarse en forma empírica en infecciones causadas por *B. contaminans*. En cambio la combinación LEV/MEM, la cual demostró excelente actividad bactericida y destructora del biofilm en las tres especies del cBc, podría indicarse en pacientes que presentaran una infección pulmonar aguda (exacerbación) por *B. cepacia* y *B. cenocepacia* o bien cuando el microorganismo es identificado solo como miembro del cBc.

Finalmente en el capítulo 4 se informa la susceptibilidad antimicrobiana de biofilms maduros de aislados ambientales de *B. contaminans*. Nuestras experiencias mostraron que dichos aislados exhiben un aumento en la tolerancia a los antibióticos cuando pasan del fenotipo planctónico a formar biofilms, con lo cual requerirán para su eliminación tratamientos similares a los usados en aislados clínicos de la misma especie. Si además consideramos su ubiquidad y capacidad de contaminar productos de uso cotidiano, podemos asumir que los aislados ambientales de *B. contaminans* representan un potencial riesgo para la salud de individuos vulnerables como los que padecen de FQ.

En resumen, los estudios presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han permitido contribuir en la resolución de problemas concretos que atañen a los Servicios de Microbiología de centros nosocomiales de referencia en FQ de nuestro País. Estos problemas se centran en dos aspectos relevantes en la práctica clínica, la identificación de microorganismos aislados de esputo de pacientes FQ y la determinación de la susceptibilidad a antibióticos de estas bacterias para dar lugar al establecimiento de una terapia antimicrobiana adecuada para dichos pacientes. En este trabajo se desarrollaron dos métodos novedosos, rápidos y precisos de identificación de miembros del cBc y BNF relevantes causantes de infecciones pulmonares en FQ. Posteriormente, la evaluación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos de aislados del cBc crecidos en biofilm, ha permitido sugerir un tratamiento antibiótico efectivo en función de la especie del cBc aislada en muestras esputo de pacientes FQ.