

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



DETECCION E IDENTIFICACION MOLECULAR  
DE GENOMOVARES DEL COMPLEJO *Burkholderia*  
*cepacia* EN PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA  
DEL NORESTE DE MEXICO

POR

JUAN CARLOS CANALE ZAMBRANO

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Enero, 2004

20004

c.1  
2004

C3  
C9

OR201

TM

JUAN CARLOS CAMERON  
ZAMBRANO



1080123145

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GENOMOVARES  
DEL COMPLEJO *Burkholderia cepacia* EN PACIENTES CON  
FIBROSIS QUÍSTICA DEL NORESTE DE MÉXICO.**

**POR:**

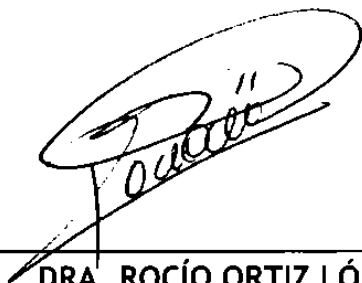
**JUAN CARLOS CANALE ZAMBRANO**

Como requisito parcial para obtener el grado  
de **MAESTRO EN CIENCIAS** con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética

**Enero, 2004**

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GENOMOVARES DEL COMPLEJO  
*Burkholderia cepacia* EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA DEL NORESTE DE  
MÉXICO**

Aprobación de Tesis:



---

**DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ**  
Director de Tesis



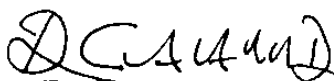
---

**DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector de Investigación y  
Estudios de Posgrado



Ustedes me dicen, entonces, que tengo que perecer  
como también las flores que cultivé perecerán.  
¿De mi nombre nada quedará,  
nadie mi fama recordará?  
Pero los jardines que planté, son jóvenes y crecerán...  
las canciones que canté, ¡cantándose seguirán!

HUEXOTZINCATZIN  
Príncipe de Texcoco, 1484

## DEDICATORIA

*A mi familia:*

*A mis padres y hermanos que por sobre todas las cosas me han apoyado (como siempre) y alentado a seguir adelante a pesar del largo tiempo que llevo lejos de ellos, esto es con todo mi cariño.*

*A mi novia Issa, por el enorme apoyo que me brindaste y que espero nos sigamos brindando en futuros proyectos. Te quiero mucho.*



## AGRADECIMIENTOS

Para lograr este proyecto fue necesaria la ayuda de muchas personas a las cuales agradezco enormemente:

Gracias **Dra. Rocío Ortiz López**, por su valiosa asesoría tanto en este proyecto como en otros proyectos anhelados en mi vida y porque a pesar de su ocupada agenda siempre estaba dispuesta a aclarar mis dudas, espero sinceramente sigamos en contacto.

Gracias **Dra. Adriana Bustamante**, por la paciencia, el tiempo y el entusiasmo que dedicó en enseñarme acerca de la fibrosis quística, pero más que nada, por su humana preocupación por estos pacientes y por su empeño en solucionar el problema descrito en esta tesis, la cual no hubiera podido realizar sin su valiosa ayuda. Gracias también al **Dr. Rodolfo Posadas** y a **Julián Torres**.

Gracias **Dra. Elvira Garza**, por su valiosa asesoría y por permitirme trabajar libremente en el área microbiológica, también por dedicar tiempo en estar al tanto de los contratiempos y resultados.

Gracias **Dr. Hugo A. Barrera**, por ser un modelo a seguir y por darme la oportunidad de ser parte del excelente grupo de investigadores que conforman la ULIEG.

Gracias **Dr. Augusto Rojas**, **Dra. Herminia G. Martínez** y **Dra. Agnes Revol** de quienes aprendí mucho sobre la Biología Molecular y bases de la Genética las cuales seguramente me van a ser muy útiles en un futuro, como ya lo han sido.

Gracias **M. C. Juan Carlos Gómez**, por enseñarme el trabajo práctico en el laboratorio y las técnicas moleculares y por alentarme a seguir preparándome.

Gracias Ivonn Samaniego, por el tiempo extra que dedicaste en el cultivo de las muestras y por tu paciencia en enseñarme el proceso de identificación microbiológica y por estar siempre pendiente de los resultados.

Gracias M.C. Belarmino Pérez, M.C. Ángel Lugo, T.L.C. Iram P. Rodríguez, por sacarme desinteresadamente de apuros en varias ocasiones, les debo una o muchas, nunca lo voy a olvidar, sinceramente GRACIAS!. Gracias a los demás compañeros de generación: Karina, Naika, Igor.

Gracias a todo el personal de UDM por facilitarme las cosas durante la realización de este proyecto: Lulú Garza, Víctor “Scrapy” Ortiz, Vicky Rincón, Carmen Garza, Carmen Villalobos.

Gracias a todo el personal de la ULIEG que seguramente necesité de su ayuda en algún momento de mi estancia. Iván Delgado, Irma, Rafa, Dra. Olivia, Irazema, Denisse, Maribel, y muchos más que faltan de mencionar.

Gracias a la Asociación Regiomontana de Fibrosis Quística, en especial a la Sra. Alicia Marroquín y a todos los pacientes y sus familiares por participar en este proyecto.

De todo corazón

**GRACIAS**

---

## TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Página
I LISTA DE FIGURAS	i
II LISTA DE TABLAS	ii
III NOMENCLATURA	iii
IV RESUMEN	v
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 ¿Qué es la Fibrosis Quística?	4
1.1.1 La Base Genética de la enfermedad	6
1.1.2 Resultados de la Mutación $\Delta F508$	7
1.2 <i>Burkholderia cepacia</i>	8
1.2.1 Generalidades	8
1.2.2 Epidemiología de <i>B. cepacia</i>	9
1.2.3 Importancia Clínica (patogénesis)	11
1.2.4 Cultivo y Aislamiento	13
1.2.5 Susceptibilidad Antimicrobiana	15
1.2.6 Taxonomía del Complejo <i>B. cepacia</i>	15
1.2.7 Identificación de Genomovares Basados en el Gen <i>recA</i>	19
1.2.8 Genomovares prevalentes en Infecciones de pacientes con fibrosis quística	20
II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	22
2.1 Justificación	22
2.2 Objetivo General	24
2.3 Objetivos Específicos	24

<b>III.- ESTRATEGIA GENERAL</b>	<b>25</b>
<b>IV.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo	28
4.1.1 Área de trabajo	28
4.1.2 Material Biológico	28
4.1.3 Reactivos químicos	28
4.1.4 Material consumible	29
4.1.5 Equipo	29
4.1.6 Apoyo computacional	30
4.2 Metodología	31
4.2.1 Población estudiada	31
4.2.2 Colección de muestras de esputo	31
4.2.3 Controles de cepas bacterianas	31
4.2.4 Cultivo e Identificación	32
4.2.5 Extracción de DNA de cultivo bacteriano	32
4.2.6 Extracción de DNA de muestras de esputo	33
4.2.7 Análisis molecular para <i>B. cepacia</i>	33
4.2.8 Electroforesis en gel de agarosa	35
4.2.9 Identificación de los genomovares	35
4.2.10 Límites de detección del sistema molecular	37
4.2.11 Especificidad del método molecular	38
<b>V.- RESULTADOS</b>	<b>39</b>
5.1 Análisis por cultivo de las muestras de esputo	39
5.2 Prevalencia del complejo <i>B. cepacia</i>	40
5.2.1 Análisis microbiológico	40
5.2.2 Análisis molecular	40
5.2.2.1 Extracción de DNA a partir de muestras de esputo	41
5.3 Determinación de Genomovares mediante iniciadores específicos	42
5.4 Determinación de Genomovares mediante PCR-RFLP	43
5.5 Límite de detección	45
5.6 Diseño de nuevo iniciadores	45
5.7 Especificidad del método	47
5.8 Evaluación del efecto de la infección por <i>B. cepacia</i> en el curso clínico de pacientes con FQ.	48

<b>VI.- DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>VII.- CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>VIII.- PERSPECTIVAS</b>	<b>56</b>
<b>IX.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.	Esquema del cromosoma 7 y la deleción que da como resultado la mutación $\Delta 508$ .	6
Figura 2.	Comparación de una cebolla infectada con una no-infectada por <i>B. cepacia</i>	16
Figura 3.	Árbol filogenético del gen <i>recA</i> del CBC	18
Figura 4.	Esquema de la estrategia general	25
Figura 5.	Esquema de la estrategia molecular	26
Figura 6.	Esquema de la estrategia microbiológica	27
Figura 7.	Amplificación con iniciadores universales para bacterias a partir de muestras de esputo de diferentes pacientes.	41
Figura 8.	Análisis mediante RFLP del gen 16S rDNA	43
Figura 9.	Análisis mediante RFLP del gen <i>recA</i>	44
Figura 10.	Amplificación de cepas control con dos pares de iniciadores (BCR1 y BCR2, Cep1 y Cep2) utilizando las mismas condiciones de PCR	46
Figura 11.	Límite de sensibilidad de los iniciadores utilizados para detectar <i>B. cepacia</i> .	47
Figura 12.	Especificidad de los iniciadores BCR1 y BCR2	48

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
Tabla 1.	Prevalencia de genomovares del CBC en tres poblaciones diferentes de pacientes con FQ.	21
Tabla 2.	Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>recA</i>	34
Tabla 3.	Iniciadores utilizados en este estudio	36
Tabla 4.	Variedad de patógenos encontrados en muestras de esputo de pacientes con FQ del noreste de México.	39
Tabla 5.	Resultados positivos obtenidos por ambos métodos de análisis de las muestras de esputo	41
Tabla 6.	Reacciones positivas y negativas de las diferentes cepas control y de la bacteria aislada del paciente con los 8 pares de iniciadores específicos para cada genomovar	42
Tabla 7.	Secuencia de 2 pares de iniciadores para la detección inicial de organismos del CBC reportados anteriormente y diseñados para este estudio	46
Tabla 8.	Comparación clínica entre pacientes infectados con <i>B. cepacia</i> y pacientes no-infectados	49

## NOMENCLATURA

DNA	Ácido desoxirribonucleico
CBC	Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>
FQ	Fibrosis Quística
g	Gramos
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
°C	Grados Celsius
pb	Pares de bases
x g	Gravedades
V	Voltios
Vol	Volumen
X	Veces la concentración
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Buffer compuesto de Trisma base, ácido bórico y EDTA
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermophylus aquaticus</i>



PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
dNTP's	Deoxinuclétidos Trifosfato
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
CEPREP	Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas
RFLP	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
CFTR	Regulador de Conductancia Transmembranal de FQ
EE. UU.	Estados Unidos de América
NALC	N-acetil-L-cisteína
NaOH	Hidróxido de sodio
UDM	Unidad de Diagnóstico Molecular
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
ATCC	American Type Culture Collection
N.L.	Nuevo León
IMC	Índice de Masa Corporal
VEF <sub>1</sub>	Volumen Expiratorio Forzado en un segundo
6MW	Caminata de 6 minutos
IV	Intravenoso
Nº	Número
DS	Desviación estándar
O <sub>2</sub>	Oxígeno
mts	Metros
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## RESUMEN

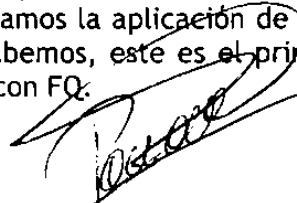
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Presenta: Juan Carlos Canale Zambrano

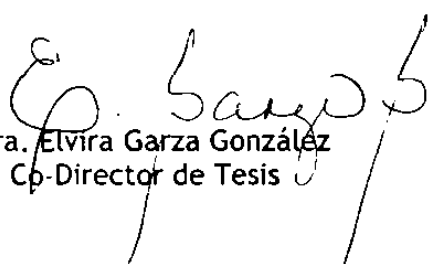
Titulo del estudio:

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GENOMOVARES DEL COMPLEJO BURKHOLDERIA CEPACIA EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA DEL NORESTE DE MÉXICO.**

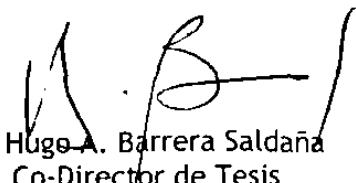
**Introducción:** El complejo *Burkholderia cepacia* (CBC) es un grupo de patógenos que frecuentemente colonizan a pacientes con fibrosis quística (FQ), debido a la severidad de las infecciones que causa y a la alta transmisibilidad de ciertas cepas. El CBC es un complejo de por lo menos nueve especies genéticamente diferentes, aunque fenotípicamente muy similares (denominado genomovares). Debido al gran problema sobre el notable aumento de la morbilidad (colonización por *B. cepacia* en pacientes con FQ) y especialmente a la dificultad del aislamiento e identificación de la bacteria por métodos de cultivo convencionales; se realizó este estudio (polifásico) que incluye metodologías tanto microbiológicas como moleculares, para la detección de BC directamente a partir de muestras de esputo. **Objetivo:** Establecer la prevalencia del CBC y la proporción de los diferentes genomovares en una población de pacientes con FQ. **Materiales y métodos:** Se recolectaron 40 muestras de esputo de 23 pacientes con FQ del noreste mexicano, y fueron analizadas independientemente por cultivo (medio selectivo BCSA y API 20NE) y métodos moleculares para la detección de *B. cepacia* (PCR-RFLP del gen *recA* e iniciadores específicos de especie). **Resultados:** Por medio de cultivo se observó una elevada prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa*, y solo se logró la detección de *B. cepacia* en la muestra de un paciente (4%). Al contrario de los hallazgos microbiológicos, mediante la detección molecular la bacteria se encontró en 11 pacientes (48%) pertenecientes en su totalidad al genomovar III, *recA* grupo III-A. **Conclusión:** Nuestros resultados confirman la dificultad previamente reportada sobre el aislamiento del CBC por métodos microbiológicos tradicionales. Comparando nuestros resultados con algunos datos previamente reportados en otros países, observamos que existe una alta prevalencia de pacientes con FQ colonizados por *B. cepacia* en la población estudiada y recomendamos la aplicación de estrictas normas de control sobre estos pacientes. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de prevalencia de *B. cepacia* en México en pacientes con FQ.



Dra. Rocío Ortiz López  
Director de Tesis



Dra. Elvira Garza González  
Co-Director de Tesis



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
Co-Director de Tesis

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

*“El entendimiento del defecto genético causante de la fibrosis quística (FQ) es sólo la mitad de la batalla. La identificación de las bacterias específicas que infectan a pacientes con FQ es igual de importante”*, J. E. Hearst, 1995 (1).

La bacteria *Burkholderia cepacia* es un organismo que frecuentemente causa infecciones devastadoras en pacientes con fibrosis quística (FQ) (2,3). Esta bacteria se asocia con un aumento significativo en la tasa de morbilidad y mortalidad en la población de pacientes con esta enfermedad (4-9). La diseminación de *B. cepacia* de persona a persona ha sido claramente documentada (10-13), por lo cual se deben aplicar guías muy estrictas de control de infecciones, a los pacientes portadores de *B. cepacia*; aunque algunas veces estas medidas tienen un impacto social y psicológico dramático en estos pacientes (14-17). Por lo tanto, la confirmación por parte del laboratorio microbiológico clínico sobre el aislamiento de *B. cepacia* en un paciente con FQ, frecuentemente causa un profundo efecto en los pacientes y en sus familias. Esto se debe también porque el diagnóstico es tomado por algunos como una “sentencia de muerte” (5). Por este motivo, es muy importante que el laboratorio clínico sea muy acertado en la identificación de *B. cepacia* en las muestras de los pacientes con FQ.

Además de la importancia de la identificación, es crítico reconocer que en los últimos años, se han logrado grandes avances con respecto a la taxonomía de *B. cepacia*. El nombre correcto es “complejo *B. cepacia*” (CBC), el cual implica que actualmente existen varias especies estrechamente relacionadas entre las bacterias identificadas como *B. cepacia* y que no pueden ser fácilmente distinguidas sin la ayuda de técnicas moleculares (18,19). Estudios taxonómicos han revelado que el CBC consiste en un grupo de por lo menos cinco especies genómicas fenotípicamente similares y estrechamente relacionadas (*B. cepacia* genomovar I-V) (20). Recientemente, cuatro especies más (*B. cepacia* genomovar VI-IX) han sido descritas como miembros del complejo (21-23).

El CBC es frecuentemente resistente a un amplio rango de agentes antimicrobianos y produce un aumento en los síntomas pulmonares (24-28). Además, aproximadamente el 20% de pacientes con FQ infectados con *B. cepacia* sucumben al “síndrome cepacia”, que se caracteriza por una neumonía necrotizante con bacteriemia que conlleva a un agudo y frecuentemente fatal deterioro clínico (29).

Debido a su complejidad taxonómica, la identificación de patógenos de *B. cepacia* ha demostrado ser un trabajo muy difícil para el microbiólogo clínico. Actualmente los sistemas comerciales de identificación fenotípica muestran variaciones significativas en su capacidad para identificar eficazmente aislados del complejo *B. cepacia* (30-34) y no son capaces de diferenciar entre genomovares individuales. Algunas investigaciones han demostrado que los centros de tratamiento de pacientes con FQ con frecuencia identifican

incorrectamente aislados del complejo *B. cepacia* de expectoraciones de los pacientes (35). A pesar de que se han descrito varias pruebas fenotípicas para el análisis del complejo *B. cepacia*, todavía no es posible diferenciar correctamente todos los genomovares basándose en estas pruebas (31).

*Burkholderia gladioli*, *Ralstonia picketti*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Commomonas acidovorans*, son ejemplos de organismos que han sido incorrectamente identificados como miembros del complejo *B. cepacia*.

Debido a ésto, se ha recurrido a las pruebas moleculares para la identificación del complejo, y recientemente se ha descubierto que existe suficiente variación en la secuencia nucleotídica del gen *recA* para permitir la discriminación de los genomovares descritos (36). El análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *recA* puede servir como un medio de identificación inicial de las diversidades taxonómicas entre los aislados. Los iniciadores diseñados originalmente para amplificar la totalidad del gen *recA* son altamente específicos para el complejo *B. cepacia* y no reaccionan con bacterias estrechamente relacionadas u otros patógenos comúnmente encontrados en pacientes con FQ como *P. aeruginosa* (36). Esta especificidad ha llevado a la exitosa amplificación del gen *recA* directamente de expectoraciones de pacientes con FQ (37,38). Esta prueba directa, para sospechas de infecciones por *B. cepacia*, puede ser muy útil en controles de infección hospitalarios y en el manejo clínico de pacientes con FQ.

## 1.1 ¿QUE ES LA FIBROSIS QUÍSTICA?

*“Lastima de aquel niño el cual al ser besado en la frente tenga sabor salado. Él esta embrujado y pronto deberá morir”*. Esta frase, del folklore europeo de la edad media, hace referencia a la enfermedad genética común reconocida hoy en día como fibrosis quística. Como dice la frase, la enfermedad alguna vez mataba niños en la infancia y se identificaba por exceso de sal en el sudor. Esta anomalía genética heredable puede también destruir los pulmones y causar serios daños en el páncreas, intestino e hígado. La fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica (39-41).

Los epitelios de los órganos afectados por FQ generalmente son obstruidos con secreciones inusualmente espesas. En el páncreas, por ejemplo, los conductos responsables de transportar las enzimas digestivas al intestino casi siempre se encuentran ocluidos, impidiendo la habilidad de degradar comida y extraer los nutrientes.

En los pulmones, los bronquios y los bronquiólos son los que permanecen obstruidos. Estos conductos están usualmente revestidos por una delgada capa de moco que atrapa partículas inhaladas y las transporta a la garganta para su desecho. Pero en pacientes con FQ, el moco es excesivamente grueso y resistente a ser removido. Este cambio por si solo puede estrechar los conductos respiratorios e impedir la respiración. Además, cuando las bacterias permanecen

en estos conductos, pueden establecer infecciones rápidamente. Estas infecciones, que tienden a recurrir, dañan el tejido pulmonar por la acumulación de células inmunes que secretan químicos y enzimas dañinas. Con el paso del tiempo, las infecciones crónicas progresivamente destruyen los conductos bronquiales y, *junto con la obstrucción de las vías respiratorias, conlleva al fallo respiratorio (42).*

El fallo pancreático rara vez pone en peligro la vida ya que los pacientes pueden reemplazar las enzimas digestivas perdidas con cápsulas tomadas al comer. Ahora que los problemas digestivos pueden ser generalmente controlados, el impedimento pulmonar causa más del 90% de las muertes en los pacientes con FQ (43).

La función deficiente del tejido epitelial está presente en todos los órganos de los pacientes con FQ, y en particular, se ha encontrado que el epitelio es relativamente impermeable al cloro. Este descubrimiento implica que algunos canales transportadores de cloro en el tejido epitelial no funcionan adecuadamente.

El investigador Paul M. Quinton encontró que el epitelio que reviste los conductos de las glándulas sudoríparas no lograba reabsorber el cloro eficientemente de la cavidad o lumen de las glándulas, lo cual explica porque las personas con FQ tienen inusualmente el sudor salado (44).

### 1.1.1 LA BASE GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD

Los esfuerzos para encontrar el gen responsable de la enfermedad culminaron en 1989, cuando un extenso grupo de colaboradores, dirigidos por Lap-Chee Tsui y John R. Riordan, anunciaron que habían aislado el gen (45,46). Concientes que la proteína producto del gen probablemente afectaba el movimiento del cloro directa o indirectamente, nombraron a la proteína el regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (referida en inglés como CFTR). Al estar buscando el gen, el equipo también identificó una anomalía en el DNA que aparentemente se encontraba en el 70% de los casos de FQ. Esa alteración, frecuentemente llamada como la mutación  $\Delta F508$  consiste en la deleción de tres nucleótidos del gen. Esa pérdida causa en la proteína (producto del gen CFTR) carecer de un solo aminoácido: fenilalanina en la posición 508 (Fig 1).

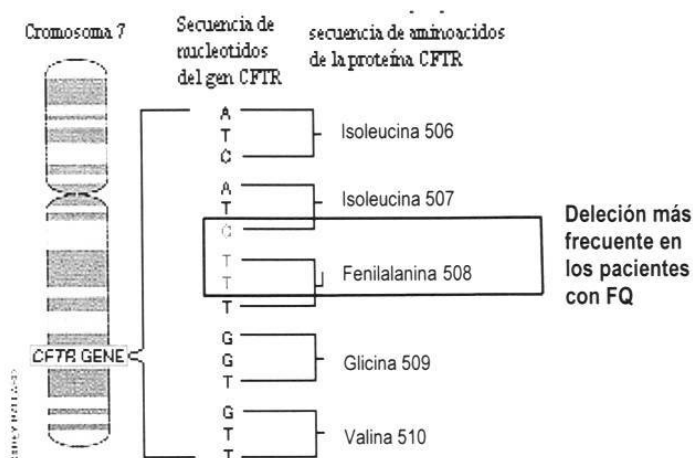


Figura 1. Esquema del cromosoma 7 y la posición de la deleción de los tres nucleótidos que dan como resultado la pérdida del residuo de fenilalanina en la posición correspondiente al codón 508 del gen CFTR.



### 1.1.2 RESULTADOS DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$

El efecto de la mutación más común, la delección que lleva a la pérdida del residuo de fenilalanina en la posición correspondiente al codón 508 de la proteína CFTR ( $\Delta F508$ ), ha sido la más estudiada. Esta delección causa un defecto en el tráfico intracelular. La proteína mutante no logra salir del retículo endoplásmico. Su transporte es detenido presuntamente porque el sistema de control de calidad del retículo endoplásmico identifica un mal plegamiento de la proteína. Estas proteínas se marcan para su degradación y no se les permite su procesamiento posterior (43).

A pesar de que la mutación  $\Delta F508$  es la más común, cientos de otras mutaciones han sido identificadas en los pacientes con FQ. Existe evidencia de que la proteína CFTR juega un papel en la ingestión de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* por las células epiteliales de los pulmones. Las células epiteliales de pacientes con FQ homocigotos para la mutación  $\Delta F508$  no fagocitan estas bacterias y estos pacientes son muy susceptibles a infecciones pulmonares crónicas.

## 1.2 *Burkholderia cepacia*

### 1.2.1 GENERALIDADES

Actualmente, *B. cepacia* esta atrayendo la atención por su extraordinaria versatilidad como patógeno de plantas, saprófito, agente biocontrol, agente bioremediador y como patógeno humano (47-49). Anteriormente conocida como *Pseudomonas cepacia*, esta bacteria fue descubierta en 1950 como la causante de piel amarga de las cebollas por el fitopatólogo Walter Burkholder (50). *P. cepacia* fue recientemente renombrada *Burkholderia cepacia* y trasferida a la subdivisión beta de las proteobacterias (51).

*Burkholderia spp* son organismos aeróbicos, no formadores de esporas, bacilos gram-negativos rectos o ligeramente curvados cuyas células varían de 1 a 5 µm de largo y de 0.5 a 1 µm de ancho. Con excepción de *B. mallei*, estos organismos son móviles por la presencia de uno o más flagelos polares. Son nutricionalmente muy versátiles, utilizan una variedad de carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuentes de carbón y energía (24,25). A pesar de que son capaces de sobrevivir y posiblemente crecer a temperaturas bajas (4° C), la temperatura óptima varía entre 30 y 37° C.

### 1.2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE *B. cepacia*

Los organismos pertenecientes a la especie *Burkholderia* son habitantes del medio ambiente y no son considerados parte de la flora humana normal. Tienen una distribución mundial y se encuentran naturalmente abundantes en suelo, agua y plantas (52).

La distribución natural de *B. cepacia* esta siendo intensamente estudiada, por su uso como agente de control biológico en la bioremediación de suelos contaminados con desechos tóxicos y herbicidas, y por su patogenicidad en pacientes con fibrosis quística.

*B. cepacia* es capaz de sobrevivir sobre o dentro de equipo médico y desinfectantes (53). Tienen una capacidad intrínseca que les confiere resistencia a una gran cantidad de agentes antimicrobianos, lo cual también contribuye a la supervivencia del organismo en hospitales. La adquisición humana de *B. cepacia* resultante en colonización o infección es debido normalmente al contacto directo con comida contaminada; soluciones médicas, incluyendo desinfectantes como el cloruro de benzalconio; y aparatos tales como equipos respiratorios, los cuales son ampliamente utilizados durante la terapia de pacientes con FQ (54).

La acumulación de nuevos casos de infección en algunos centros y la disminución de colonización en nuevos pacientes después de la segregación de pacientes

colonizados de los no-colonizados en otros centros, sugirió que *B. cepacia* podía ser transmitida entre pacientes con FQ (55). Esto fue comprobado por varios estudios (56-58) que demostraron que cepas de *B. cepacia* pueden transmitirse entre pacientes con FQ vía admisiones simultáneas a hospitales o por contacto social fuera de hospitales. Como resultado de estos descubrimientos, se establecieron nuevas guías muy estrictas para reducir el riesgo de adquisición de *B. cepacia*. Estas incluyeron la disminución de patrocinios y apoyo para campamentos de verano para pacientes con FQ y segregación de pacientes colonizados. La implementación de estas medidas severas para el control de infecciones ha tenido un enorme impacto en las vidas de pacientes con FQ, aunque no todos los pacientes aceptan tales medidas (59).

Otro factor importante es el hallazgo del aislamiento de *B. cepacia* del aire de habitaciones ocupadas por pacientes colonizados, sugiriendo que la diseminación puede ocurrir por aerosol al igual que por contacto directo con pacientes o ambientes contaminados (60,61). Adicionalmente a esto, se han reportado casos en los que personas que no padecen FQ han resultado infectadas y desarrollado neumonías graves debido a la transmisión de cepas altamente transmisibles a partir de pacientes con FQ (62).

### 1.2.3 IMPORTANCIA CLÍNICA (patogénesis)

Durante los años 1980s, *B. cepacia* emergió como un patógeno nosocomial multiresistente en pacientes inmunocomprometidos. Jarvis y cols. (63) analizaron la base de datos de infecciones nosocomiales en EE.UU. de 1980 a 1985 y encontraron que el rango de infección por *B. cepacia* era de 2.4/100,000 muestras de pacientes, con un significativo aumento de infección durante este periodo. Este estudio no identificó específicamente cultivos de pacientes con FQ; sin embargo, es interesante y preocupante observar que el sitio más frecuente de infección por *B. cepacia* fue el tracto respiratorio inferior (31%) y que tales infecciones eran con frecuencia asociadas a mortalidad.

El primer reporte de colonización pulmonar con *B. cepacia* en pacientes con FQ apareció a principios de 1970 (64), seguido de una década después por un reporte de complicaciones clínicas asociadas con neumonía y septicemia por *B. cepacia* en un paciente de 17 años (65). Es importante resaltar el reporte de septicemia, ya que la diseminación sistémica de otros patógenos (como *P. aeruginosa*) de vías aéreas infectadas es rara en pacientes con FQ.

A principio de los años 1980s, los estudios de Isles y cols. (29) y Tomasen y cols. (66) demostraron un elevado índice de cultivo de *B. cepacia* en dos centros de FQ en Norte América, lo cual acaparó la atención sobre la emergencia de este organismo como una amenaza importante para la comunidad con FQ.

La intranquilidad entre pacientes con FQ y familiares, clínicos, y servidores de salud con respecto a la colonización por *B. cepacia* se debe a tres grandes preocupaciones que previamente no se asociaban con *P. aeruginosa*.

Primero: aproximadamente el 20% de los pacientes colonizados sucumben al conocido “síndrome cepacia,” caracterizado por una neumonía con fiebre, bacteremia, elevación del índice de sedimentación de eritrocitos y leucocitosis, culmina en un rápido y fatal deterioro clínico (29).

Segundo: además de su potencial virulencia, la evidencia de su transmisión paciente-a-paciente ha llevado a la segregación de individuos positivos para *B. cepacia*. Esta segregación establece dificultades en el manejo de clínicas de FQ y rompimientos devastadores de contacto social (16,17,67).

Tercero: la resistencia característica de *B. cepacia* a múltiples drogas ha llevado a una carencia de terapias antimicrobianas efectivas (68).

La colonización por *B. cepacia* nunca ha alcanzado niveles de prevalencia del 80% como se encuentra para *P. aeruginosa* (69). En la mayoría de las clínicas, *B. cepacia* se aísla de menos del 10% de los pacientes; sin embargo, la prevalencia en algunos centros regionales puede alcanzar hasta el 40% (70). Una vez colonizados por *B. cepacia* los pacientes pueden sufrir varias evoluciones clínicas, mientras que algunos permanecen asintomáticos, otros sufren un acelerado deterioro de la función pulmonar y algunos sucumben al “síndrome cepacia”.

#### 1.2.4 CULTIVO Y AISLAMIENTO

Las consecuencias sociales y psicológicas de la segregación de pacientes positivos para *B. cepacia* conllevan a una gran responsabilidad por parte de los laboratorios microbiológicos hacia una precisa identificación de este organismo.

La especie *Burkholderia* crece en agar MacConkey, pero se prefieren para su aislamiento el uso de medios selectivos específicos con habilidad de inhibir *P. aeruginosa*. Son útiles tres medios, PC, OFPBL y BCSA para el aislamiento de *B. cepacia* de secreciones respiratorias de pacientes con FQ (24,25). Sin embargo, los tres medios tienen desventajas y pueden permitir el crecimiento de otras bacterias relacionadas. En un estudio reciente se indicó que menos de la mitad de los centros en E.U.A. encuestados emplean medios selectivos específicos para *B. cepacia*, o incuban los cultivos por períodos prolongados, conduciendo ambas prácticas a aumentar la aparición de este organismo (71).

Por su importancia en enfermedades pulmonares en paciente con FQ y el aislamiento de pacientes infectados, la taxonomía y métodos para la identificación de *B. cepacia* han sido el objetivo de intensas investigaciones en los últimos años. Algunas características bioquímicas clave de *B. cepacia* incluyen una reacción oxidasa positiva en el 86% de los aislados, actividad lisina descarboxilasa en el 80% de los aislados, y utilización de una amplia variedad de mono- y disacáridos incluyendo lactosa (24).

La diferenciación de ciertos aislados de *B. cepacia* de aislados de *R. pickettii* y *B. gladioli* logra ser bioquímicamente muy complicada.

La mayoría de los laboratorios utilizan sistemas comerciales en lugar de pruebas bioquímicas convencionales para la identificación de la especie *Burkholderia* y organismos fenotípicamente relacionados. Evaluaciones recientes (30-34) de varios sistemas comerciales han demostrado una pobre precisión en la identificación de *B. cepacia*, *B. gladioli* y *R. pickettii*.

Los aislados de *B. cepacia* son erróneamente clasificados como otras especies, y otras especies resultan erróneamente clasificadas como *B. cepacia*. No obstante, para pacientes con FQ, es esencial una precisión lo más cercanamente posible al 100%, ya que pacientes infectados o colonizados por esta bacteria frecuentemente son médica y socialmente rechazados debido a la preocupación sobre el esparcimiento del organismo a otros individuos con FQ (56).

Cuando *B. cepacia*, *B. gladioli*, *R. pickettii*, *S. maltophilia* y *Alcaligenes* spp. son identificadas por un sistema comercial en una muestra de esputo de un paciente con FQ, la identidad del aislado deberá ser confirmada por pruebas bioquímicas adicionales o técnicas moleculares.



### 1.2.5 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

*B. cepacia* es uno de los organismos más resistentes a agentes antimicrobianos encontrados en el laboratorio clínico. Este organismo es usualmente susceptible solo a piperacilina, azlocilina, cefoperazona, ceftazimida, cloramfenicol, y trimetoprim-sulfametoxazol. La susceptibilidad a imipenem y meropenem es variable, y un pequeño porcentaje de aislados puede ser susceptible a kanamicina (43).

Cepas aisladas de pacientes con FQ que han recibido tratamiento repetido de antimicrobianos serán frecuentemente resistentes a todos los agentes antimicrobianos conocidos (72).

### 1.2.6 TAXONOMÍA DEL COMPLEJO *B. CEPACIA*

*Pseudomonas cepacia* fue originalmente descrita por Walter Burkholder en 1950 como el agente causal de la descomposición de la cebolla (Figura 2) (50). En 1992, Yabuuchi y col. (51) se basaron en las secuencias del gen 16S rRNA, valores de similitud DNA-DNA, lípidos celulares, composición de ácidos grasos y características fenotípicas; y propusieron que *P. cepacia* y seis otras especies pertenecientes al grupo RNA II del género *Pseudomonas*, fueran transferidas al nuevo género *Burkholderia*.

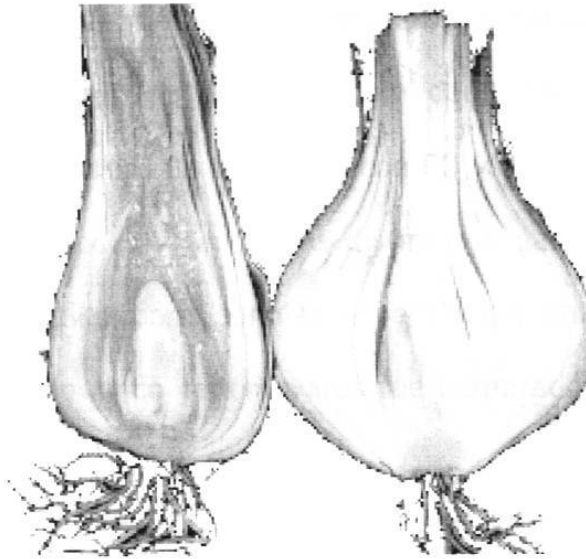


Figura 2. Comparación de una cebolla infectada por *B. cepacia* (izquierda) con una cebolla sana (derecha). Foto tomada en el Departamento de Patología de Plantas, Washington State University.

A partir de los años 1990 en adelante, varios investigadores observaron que había una marcada heterogeneidad entre cepas de “*B. cepacia*” aisladas de diferentes nichos ecológicos. Estas cepas fueron tentativamente clasificadas como “*B. cepacia*” utilizando diversas técnicas. Esta heterogeneidad entre cepas hizo problemática la correcta identificación, y las evaluaciones de las técnicas utilizadas mostraron que no eran lo suficientemente sensibles o específicas o ambas.

La marcada diversidad entre las presuntas cepas "*B. cepacia*" y la carencia de esquemas confiables de identificación, condujeron a Vandamme y cols. (20) a realizar un estudio taxonómico polifásico que demostró que estas presuntas cepas de "*B. cepacia*" aisladas de pacientes con FQ y otras fuentes, pertenecían por lo menos a cinco especies genómicas distintas o genomovares (el término genomovar fue introducido para denotar especies genómicas fenotípicamente similares). Este grupo de cinco genomovares fue nombrado como: el "complejo *B. cepacia*".

Estudios posteriores han identificado por lo menos nueve genomovares que constituyen el complejo (Fig. 3). Seis de los genomovares han recibido los siguientes nombres de especie: *B. cepacia* (se preserva para el genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II) (20), *B. stabilis* (genomovar IV) (73), *B. vietnamiensis* (genomovar V) (74) y *B. ambifaria* (genomovar VII) (22). *B. cepacia* genomovares III y VI esperan nombres de especie si se encuentran pruebas simples de diferenciación fenotípicas. El nombre *B. anthina* ha sido propuesto para cepas del genomovar VIII y la especie *B. pyrrocinia* (23) ha sido nombrada como el genomovar IX.

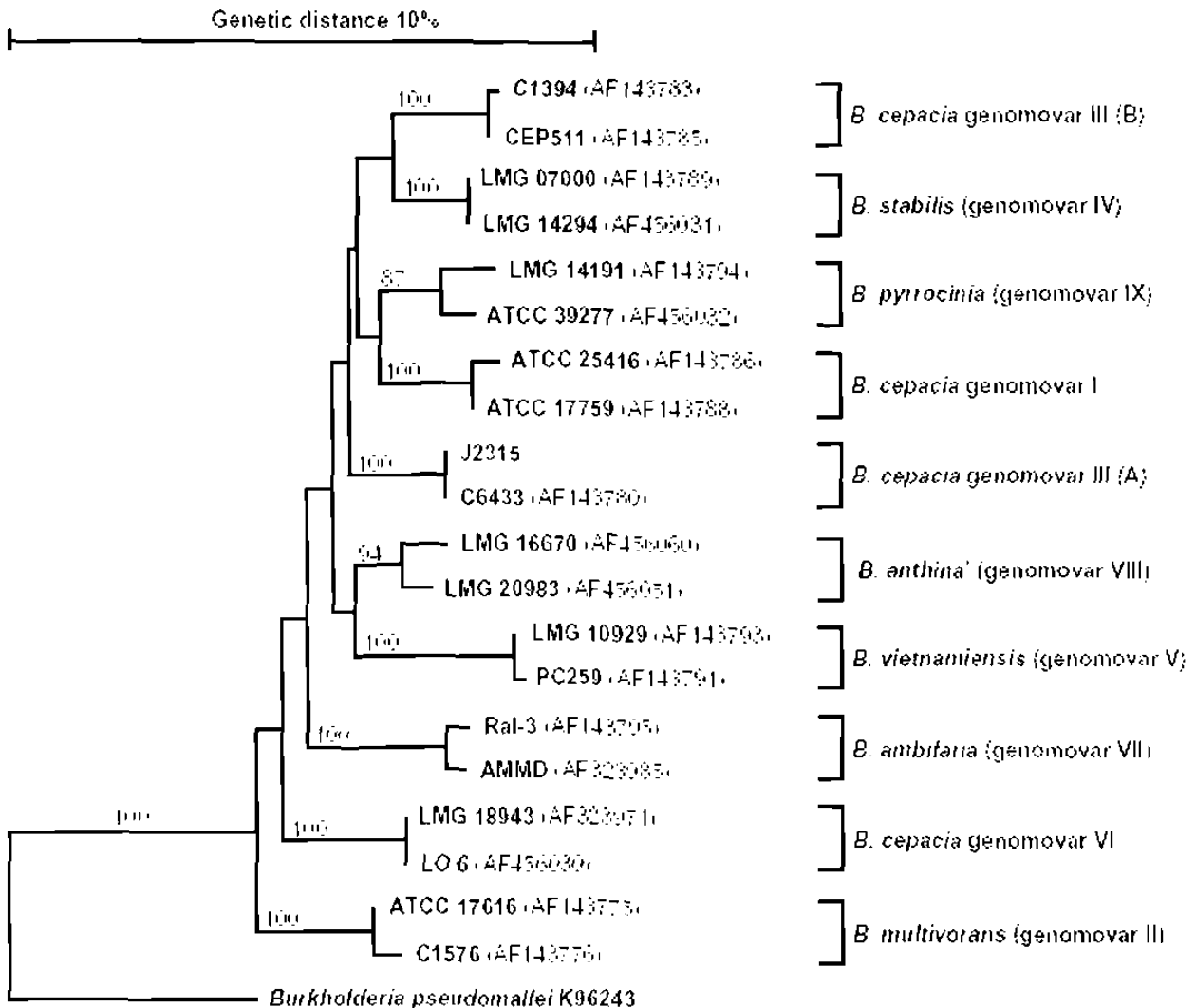


Figura 3. Árbol filogenético de la secuencia del gen *recA* indicando la presencia de los nueve genomovares del complejo *B. cepacia* (18).

### 1.2.7 IDENTIFICACIÓN DE GENOMOVARES BASADO EN EL GEN *recA*

Los genomovares del complejo *B. cepacia* están estrechamente relacionados, con muy pocas reacciones bioquímicas capaces de diferenciarlos y se requiere de múltiples pruebas para su identificación precisa (19).

Existe suficiente variación en la secuencia nucleotídica del gen *recA* para permitir la discriminación de los genomovares descritos (36). El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen *recA*, puede servir como un medio primario para identificar la diversidad taxonómica entre aislados (36), habiéndose encontrado más de 50 patrones de restricción del gen *recA* al ser digerido con la endonucleasa de restricción *HaeIII*. Los patrones de RFLP nuevos que no correlacionan con un genomovar conocido pueden ser sometidos a secuenciación para permitir una determinación del genomovar (19,36). La variación en la secuencia del gen *recA* divide cepas del genomovar III en dos subgrupos diferentes: III-A y III-B.

Hasta la fecha se han encontrado fragmentos del gen *recA* con suficiente variación nucleotídica en donde ha sido posible diseñar iniciadores específicos de especie para los genomovares I al VII.

Los iniciadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), BCR1 y BCR2, originalmente diseñados por Mahenthiralingam y col. (36) para amplificar la secuencia completa del gen *recA*, permanecen altamente específicos para las bacterias del complejo *B. cepacia* y no tienen reacción cruzada con otras especies de *Burkholderia* relacionadas u otros patógenos comunes en pacientes con FQ como *P. aeruginosa*. Esta especificidad ha llevado a la aplicación exitosa de la técnica de PCR para la amplificación del gen *recA* directamente de esputo de pacientes con FQ (37,38). Esta prueba directa para infecciones sospechosas por el complejo *B. cepacia* puede resultar muy útil en el control de infecciones hospitalarias, así como para el manejo clínico de cualquier paciente que se sospeche esté infectado con la bacteria.

#### 1.2.8 GENOMOVARES PREVALENTES EN INFECCIONES DE PACIENTES CON FQ.

A partir de la descripción inicial de los cinco genomovares dentro del complejo *B. cepacia*, fue claro que las cepas de cada genomovar pueden causar infección en pacientes con FQ (20). A causa del gran desarrollo de pruebas rápidas y ampliamente aplicables para la identificación de cada genomovar, se ha examinado la prevalencia de cada especie del complejo *B. cepacia* por medio de análisis sistemáticos en E.U.A. (75) y Canadá (76). Asimismo, se ha publicado un estudio más pequeño examinando la prevalencia y epidemiología del complejo *B. cepacia* entre pacientes con FQ que atienden cuatro centros de tratamiento en Italia (77).

Un resumen de los resultados de estos estudios se presenta en la Tabla 1. Estudios basados en el análisis de aislados del complejo *B. cepacia* han demostrado que el genomovar III y *B. multivorans* (genomovar II) son las especies predominantes y con mayor grado de virulencia en pacientes con FQ (20,36).

*B. cepacia* genomovar III es el genomovar más prevalente en FQ, causando >50% de las infecciones en todas las poblaciones de FQ examinadas (Tabla1). *B. multivorans* es la segunda especie más predominante en FQ (Tabla1). La prevalencia de todos los genomovares restantes del complejo *B. cepacia* es a lo máximo el 5% en las poblaciones examinadas. Con estas observaciones se concluye que *B. cepacia* genomovar III y *B. multivorans* causan el 95% de las infecciones.

Tabla 1. Prevalencia de genomovares del complejo *B. cepacia* en tres poblaciones de pacientes con FQ. (%)

Genomovar	EE.UU. (606 pacientes)	Canadá (475 pacientes)	Italia (59 pacientes)	Promedio
Genomovar I	2.6	0.2	4.8	2.5
<i>B. multivorans</i>	37.8	9.3	4.8	17.3
Genomovar III	50.0	80.0	72.6	67.5
<i>B. stabilis</i>	0.2	3.8	3.2	2.4
<i>B. vietnamiensis</i>	5.1	1.6	0	2.2
Genomovar VI	2.0	0	0	0.7
Genomovar VII	0.7	0	0	0.2
Indeterminado	1.6	1.8	14.5	5.9

## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

#### 2.1 Justificación.

Los pacientes con FQ son extremadamente susceptibles a infecciones pulmonares por una variedad de flora bacteriana. En los últimos 20 años, *Burkholderia cepacia* ha sobresalido como un patógeno oportunista en pacientes con FQ, así como también en pacientes inmunocomprometidos sin FQ. Esta bacteria implica un gran problema en esta población de pacientes aumentando la morbilidad y mortalidad drásticamente, resultando ésto en una mala prognosis para el infectado.

Debido a la gravedad del problema, la detección temprana del complejo *B. cepacia*, que está constituido de 9 especies o genomovares diferentes, es extremadamente importante para pacientes con FQ. Por su complejidad taxonómica, la identificación de dicho complejo de patógenos ha resultado un reto difícil para microbiólogos clínicos. Actualmente, los sistemas comerciales de identificación fenotípica tienen significantes variaciones en su capacidad de identificar adecuadamente el complejo *B. cepacia* y no diferencian entre genomovares individuales.



Con el propósito de resolver estos problemas, se implementó un método de diagnóstico molecular para facilitar la detección precisa e identificación del complejo *B. cepacia* y la diferenciación de sus genomovares para la determinación de la frecuencia en el grupo de pacientes estudiados.

A la fecha no existen reportes sobre la prevalencia de colonización por *B. cepacia* en pacientes con FQ en México. De hecho, la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística declaró libre al país de este patógeno.

El uso de novedosas técnicas de laboratorio para la adecuada detección de los organismos del complejo directamente de expectoraciones de pacientes, será de gran ayuda para pacientes y centros de FQ, para establecer registros nacionales de FQ, y proveer bases para futuros estudios. El mejoramiento del diagnóstico de infecciones causadas por miembros del complejo *B. cepacia* y otros organismos similares ayudarán enormemente al tratamiento rápido y específico de la infección.

## 2.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer el diagnóstico molecular y determinar la frecuencia de los genomovares del Complejo *Burkholderia cepacia* directamente de expectoraciones de pacientes con fibrosis quística.

## 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar el aislamiento e identificación microbiológica del CBC a partir de muestras de expectoración en paciente con FQ.
- II. Estandarizar la metodología de detección y diferenciación del CBC por métodos moleculares.
- III. Determinar la especificidad y sensibilidad del método molecular.
- IV. Comparar los resultados obtenidos en el diagnóstico molecular con con los del diagnóstico microbiológico.

### CAPÍTULO III

#### ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir los objetivos planteados, se diseñó la estrategia experimental abajo esquematizada (Fig 4). Se tomó la muestra, una porción se analizó en el laboratorio de microbiología y la otra en genética molecular.

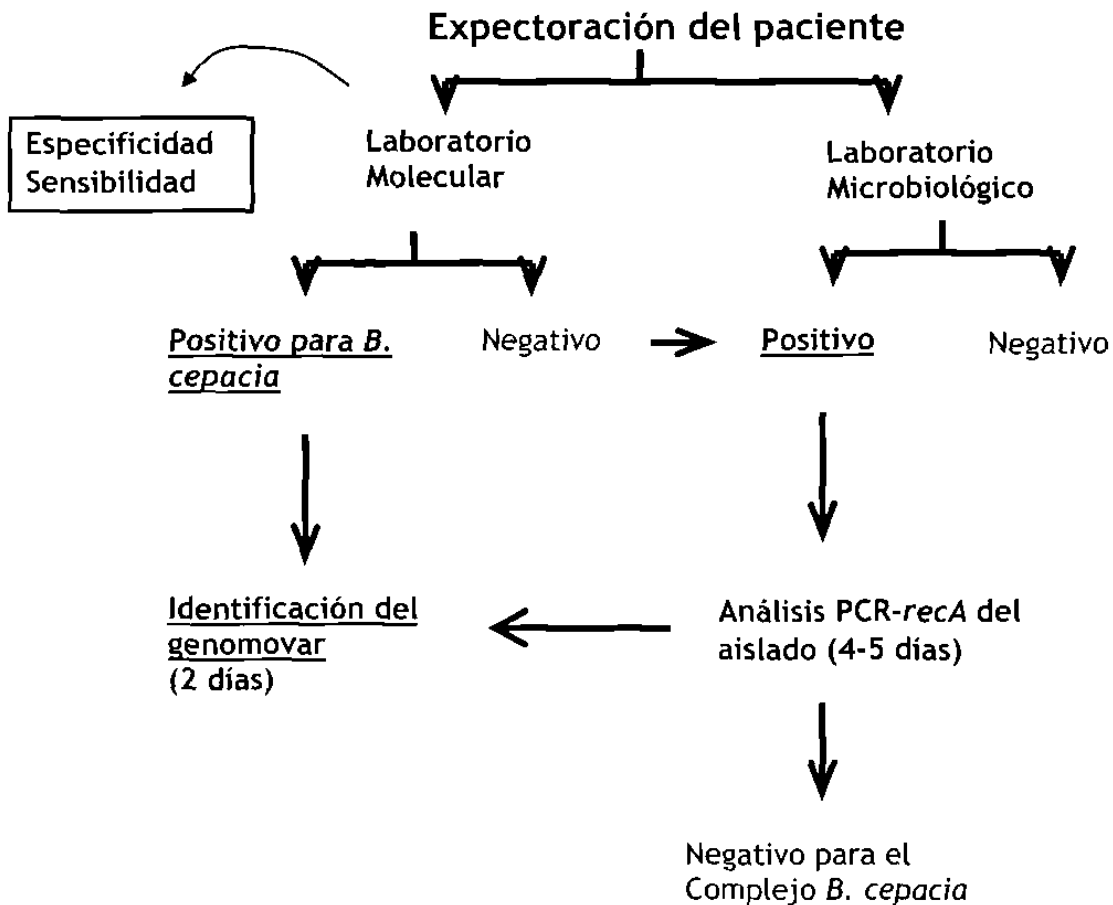


Figura 4.- Esquema de la estrategia general seguida durante el estudio para la detección del CBC. Porciones de la misma muestra se analizaron en los laboratorios de genética molecular y de microbiología. En el caso de obtener resultado positivo por genética molecular se identificó el genomovar y de resultar positivo por microbiología se corroboró por genética molecular.

1. Se recolectaron un total de 40 muestras de esputo de 23 pacientes con fibrosis quística.
2. De cada muestra se extrajo el DNA bacteriano utilizando la descontaminación y licuefacción de la muestra con N-acetil-L-cisteína-NaOH y lisis de pared bacteriana con cambios drásticos de temperatura.
3. Todas las muestras fueron verificadas para la exitosa extracción de DNA bacteriano mediante PCR con los iniciadores UNI2 y UNI5 universales para bacterias.
4. El DNA aislado se analizó para la presencia del CBC utilizando los iniciadores BCR1 y BCR2.
5. Las muestras positivas se analizaron para la determinación del genomovar con iniciadores específicos de especie y PCR-RFLP (Fig. 5).
6. El análisis microbiológico consistió en el cultivo de la muestra en medio selectivo y no selectivo e incubación a 37 °C.
7. A las colonias sospechosas se les realizó prueba de oxidasa y fueron identificadas por el sistema comercial API 20NE (Fig. 6).
8. Se compararon los resultados obtenidos por los dos métodos.

Detección e Identificación Molecular de Genomovares del Complejo *Burkholderia cepacia* en Pacientes con Fibrosis Quística del Noreste de México

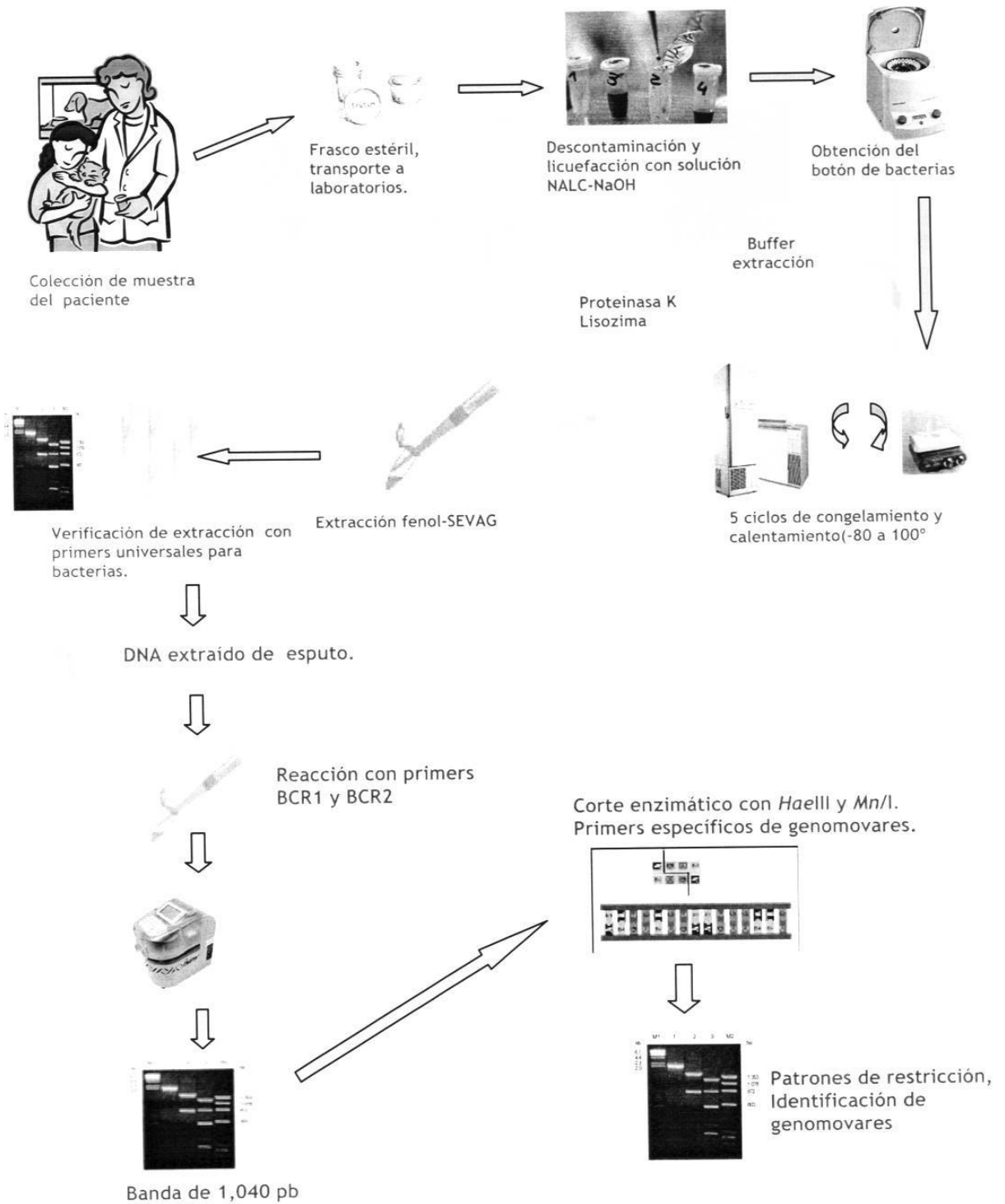


Figura 5. Esquema de la Estrategia Molecular para la detección del CBC. De una porción de la muestra descontaminada se extrajo el DNA mediante lisis celular por cambios drásticos de temperatura y extracción fenol:SEVAG. Éste DNA, fue utilizado como templado para reacciones de PCR posteriores.

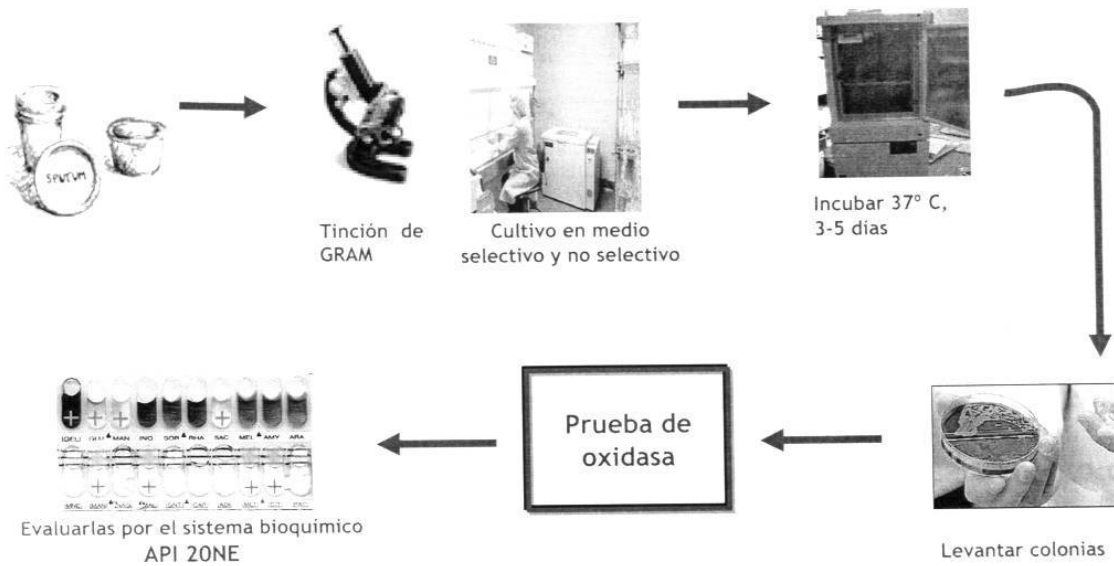


Figura 6. Esquema de la Estrategia Microbiológica para la detección del CBC. Una porción de la muestra se cultivó en medio selectivo y medios no-selectivos, seguidos de incubación a 37°C. Se levantaron colonias sospechosas para realizar la prueba de oxidasa y el sistema de identificación bioquímica.

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.**

##### **4.1.1 Área de trabajo.**

El trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

##### **4.1.2 Material Biológico.**

El material biológico utilizado consistió de 40 muestras de esputo de 23 pacientes con FQ que normalmente consultan el Centro de Prevención y Rehabilitación de Enfermedades Pulmonares Crónicas (CEPREP), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) e instituciones privadas.

##### **4.1.3 Reactivos químicos.**

Los reactivos utilizados para la extracción de DNA bacteriano a partir de las muestras de esputo fueron: N-acetil-L-cisteína, NaOH, Citrato trisódico, Triton X-100, Tween 20, Tris-HCl, EDTA, lisozima, proteinasa K y fenol, adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint Louis, MD, EUA), etanol, alcohol isoamílico y cloroformo de Merck (México, D. F.).

Para la realización de la PCR, los reactivos se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: los iniciadores se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), la Taq polimerasa de Promega (Madison, WI, EUA), al igual que el cloruro de magnesio, dNTPs y Buffer. Las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *Mn/I* y *DdeI* se adquirieron de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA).

Para la electroforesis en geles de agarosa se utilizó: agarosa, trizma base, EDTA, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio de Sigma-Aldrich Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA).

#### **4.1.4 Material consumible.**

Los tubos de microcentrífuga (0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml), las puntillas (0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de precisión y los guantes de látex fueron adquiridos de Cell Associates (Houston, TX, EUA). El medio selectivo *Burkholderia cepacia* selective media (BCSA) y los suplementos de antibiótico fueron adquiridos de Oxoid (Basingstoke, United Kingdom).

Los sistemas comerciales de identificación API 20NE de Biomerieux Viteck Inc. (Hazelwood, MO, EUA).

#### **4.1.5 Equipo.**

Se utilizó una microcentrífuga de mesa Eppendorf 5415 C (Westbury, NY, EUA), un vortex Maxi Mix II Thermoline tipo 37600 (Dubuque, IA, EUA), una balanzagrataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Alemania),



thermomixer eppendorf AG 22331 Hamburg (Westbury, NY, EUA) una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (NY, EUA).

Los termocicladores utilizados fueron: un termociclador PTC-100 de 96 pozos de 0.2 ml, MJ-Research (Watertown, MA, EUA) y un termociclador GeneAmp 2400, Perking Elmer Applied Biosystem.

Para el análisis de los productos amplificados por PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal Fotodyne (Hartland, WI, EUA) y una fuente de poder de Gibco-BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, EUA). Para analizar los geles de agarosa, se utilizó el equipo fotodocumentador UVP Gel Documentation, Image Analysis Software.

#### 4.1.5.1 Apoyo computacional.

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora portátil Toshiba y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora.

El procesador de texto utilizado fue Microsoft Word XP Home Edition (Microsoft Corporation), procesador gráfico Microsoft Photo Editor (Microsoft Corporation). Alineamiento de secuencias nucleotídicas con DNAMAN versión 5.2.2 Lynnon BioSoft. Los programas utilizados vía INTERNET fueron: Entrez NCBI (Nacional Centre for Biotechnology Information), BLAST Network Service (Blaster), Gene Bank (ICEBERG, Trieste, Italia), CLUSTALW, el programa utilizado para comunicación en la red fue Microsoft Internet Explorer 6.0.

## **4.2 Metodología**

### **4.2.1 Población estudiada.**

Para nuestro estudio clínico, se colectaron muestras de esputo de pacientes que padecen FQ y que consultan el CEPREP, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) e Instituciones privadas en Monterrey, N.L., durante un período de 10 meses entre 2002-2003. Este grupo lo conformaron 20 niños con edades entre 1 a 11 años y 3 Adultos entre 29 a 33 años (13 hombres, 10 mujeres).

### **4.2.2 Colección de muestras de esputo.**

Las expectoraciones fueron colectadas, y una porción de cada muestra se analizó para *B. cepacia* y otras bacterias por cultivo y el resto de la muestra se congeló a -70° C hasta su análisis por PCR.

### **4.2.3 Controles de cepas bacterianas.**

Los organismos controles (cepas J2315 y BC5) fueron amablemente proporcionados por el Dr. Jesús Caballero-Mellado del Centro de Investigación sobre fijación de Nitrógeno (UNAM) y la cepa ATCC 25416 directamente del American Type Culture Collection, como también de cepas almacenadas en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

#### 4.2.4 Cultivo e identificación.

Las muestras de esputo fueron cultivadas directamente en agar chocolate, agar sangre, ASAFE, EMB y en medio selectivo BCSA (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom)(78) a 37°C por 48 h y en el medio BCSA por 5 días. El análisis fenotípico se realizó por el sistema de identificación comercial API 20NE (Biomérieux Viteck Inc., Hazelwood, Mo.) siguiendo las instrucciones recomendadas. A las últimas 3 muestras analizadas se les realizó un proceso previo de descontaminación con solución 2% *N*-acetil-*L*-cisteína- 2% NaOH antes de su cultivo en placas.

#### 4.2.5 Extracción de DNA de cultivo bacteriano.

Varias colonias de un cultivo fresco se resuspendieron en 1 ml de Buffer TE 1X y se centrifugaron a 10,000 x g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante, el sedimento de bacterias se resuspendió en 0.2 ml de Buffer de extracción (1% Triton X-100, 0.5% Tween 20, 10mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1mM EDTA), se agregaron 150 µg de lisozima se incubó a 37°C por 30 min seguido por incubación con 1 mg de proteinasa K a 72°C por 10 min en agitación continua. Después de un paso corto de centrifugación a 3,600 x g por 5 min se tomó el sobrenadante y el DNA se extrajo con un volumen igual de fenol:sevag, este se precipitó con etanol absoluto frío y se realizó un lavado con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales, la pastilla de DNA obtenida se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar los rastros de etanol, una vez completamente seca se resuspendió en una cantidad entre 50 y 80 µl de TE 1X, se almacenó a -20°C hasta su análisis.

#### 4.2.6 Extracción de DNA de muestras de esputo.

Las muestras de esputo fueron tratadas con el método de Reischl y col. (79) con algunas variantes. En breve, aproximadamente 1 ml de esputo se mezcló con un volumen igual de solución 2% *N*-acetil-L-cisteína-2% NaOH y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta lograr licuar el esputo o máximo 1 hora (dependiendo de la viscosidad de la muestra). Se centrifugó a 10,000 x g por 10 min, el sedimento de bacterias se resuspendió en 0.2 ml de Buffer de extracción y la lisis de la pared bacteriana se realizó por cambios drásticos de temperatura por 20 min a -80°C seguido de calentamiento a 100°C por 1 min. Este paso se repitió por 5 ciclos más. La muestra se incubó por 30 min a 37°C con 150 µg de lisozima para asegurar la completa lisis de las bacterias seguido de una incubación con 1 mg de proteinasa K a 72°C por 10 min. Después de un paso de centrifugación a 3,600 x g por 5 min el sobrenadante se extrajo con un volumen igual de fenol:sevag, precipitando con etanol absoluto frío y resuspendiendo en TE 1X. Para confirmar la exitosa extracción de DNA bacteriano de las muestras, se utilizaron los iniciadores UNI2 y UNI5 universales para bacterias (36)(ver tabla 3), que flanquean una secuencia del gen 16S rDNA de todas las bacterias.

#### 4.2.7 Análisis molecular para *B. cepacia*.

Para el análisis por PCR se utilizó un termociclador GeneAmp 2400, Perking Elmer Applied Biosystem. La secuencia completa del gen *recA* del complejo *B. cepacia* (1,040 pb) se amplificó utilizando los iniciadores BCR1 y BCR2 (36)(Tabla 3), que flanquean los extremos 5' y 3' del locus del gen *recA* respectivamente.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50  $\mu$ l con Buffer de PCR 1X, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M (cada) dNTP, 150nM de cada BCR1 y BCR2, 5% (vol/vol) dimetilsulfóxido (DMSO), 3 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 5  $\mu$ l de DNA (Tabla 2). Una reacción control, conteniendo agua en lugar de DNA, se agregó en cada PCR.

El programa de PCR consistió en un paso inicial de hot-start de 3 min a 95°C, seguido por los pasos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 58°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min repetido por 40 ciclos y finalmente un paso de extensión a 72°C por 10 min.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación del *recA*

Reactivos	Volumen	Concentración
Buffer 10X	5 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 $\mu$ l	2 mM
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Oligo BCR1 (5 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	150 nM
Oligo BCR2 (5 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	150 nM
DMSO	2.5 $\mu$ l	5%
DNA Taq. polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l	3U
H <sub>2</sub> O	28.5 $\mu$ l	----
DNA	5 $\mu$ l	----
Volumen final	50 $\mu$ l	----

#### 4.2.8 Electroforesis en gel de agarosa.

Después de cada amplificación los productos obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 1.5%. El gel de agarosa al 1.5% se preparó en solución Buffer TBE 1X (0.089 M Tris-Borato y 0.089 M ácido bórico; pH=8), disolviendo en éste la agarosa con calor. La agarosa líquida se vació a un molde de electroforesis y una vez que esta gelificó a temperatura ambiente, el gel se depositó en una cámara de electroforesis y se cubrió con Buffer TBE 1X. Se mezclaron 17 µl de cada reacción y 2 µl de jugo azul 6X (0.3% azul bromofenol, 0.3% xilencianol y 30% glicerol). Se realizó la electroforesis, inicialmente a 60 V mientras se internaban las muestras y el colorante en el gel y posteriormente a 110 V por 1 hora (dejando correr el azul de bromofenol tres cuartas partes del gel). Concluida la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio a 2 µg/ml por 5 o 10 minutos para después lavarse varias veces con agua corriente para remover exceso de bromuro y así proceder a su observación en el transiluminador de luz UV.

#### 4.2.9 Identificación de los genomovares.

La identificación de los genomovares se realizó utilizando los iniciadores descritos anteriormente (36) específicos para los primeros 5 genomovares y los iniciadores descritos por Drvíněk y col. (38) para los genomovares VI y VII, utilizando como templado 1µl de producto amplificado de la reacción con iniciadores BCR1 y BCR2 (Tabla 3).

Tabla 3. Iniciadores utilizados en este estudio

Especificidad y nombre del iniciador	Secuencia (5' a 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño del producto (pb)
Universal 16S rDNA UNI2 UNI5	GACTCCTACGGGAGGCAGCAG CTGATCCGCGATTACTAGCGATTC	60	1,020
Complejo <i>B. cepacia recA</i> BCR1 BCR2	TGACCGCCGAGAAGAGCAA CTCTTCTTCGTCCATCGCCTC	58	1,040
<i>B. cepacia</i> genomovar I BCRG11 BCRG12	CAGGTCGTCTCCACGGGT CACGCCGATCTTCATACGA	62	492
<i>B. multivorans</i> (Bm) BCRBM1 BCRBM2	CGGCGTCAACGTGCCGGAT TCCATCGCCTCGGCTTCGT	62	714
<i>B. cepacia</i> genomovar III-A BCRG3A1 BCRG3A2	GCTCGACGTTCAATATGCC TCGAGACGCACCGACGAG	62	378
<i>B. cepacia</i> genomovar III-B BCRG3B1 BCRG3B2	GCTGCAAGTCATCGCTGAA TACGCCATCGGGCATGCT	60	781
<i>B. cepacia</i> genomovar IV BCRG41 BCRG42	ACCGGCGAGCAGGCGCTT ACGCCATCGGGCATGGCA	64	647
<i>B. vietnamiensis</i> BCRBV1 BCRBV2	GGGCGACGGCGACGTGAA TCGGCCTTCGGCACCAGT	62	378
<i>B. cepacia</i> genomovar VI BCRBM1 C6-3 *	CGGCGTCAACGTGCCGGAT TGATGAAGATCACGAGGCAA	62	260
<i>B. ambifaria</i> BCR1 CA-3 *	TGACCGCCGAGAAGAGCAA CCTCGGCTTCGTCTGGA	62	1,030

\* Iniciadores diseñados por Drvinek y col. (38). El resto de los iniciadores fueron diseñados por Mahenthiralingam y col. (36).

Asimismo, se realizó un análisis mediante RFLP, donde los amplicones de *recA* del CBC fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *HaeIII* y *Mn/I*. Los amplicones fueron agregados a la endonucleasa junto con el Buffer de la enzima apropiado, siguiendo las instrucciones recomendadas, antes de incubar a 37°C por 16 horas.

El gen 16S rDNA de las bacterias identificadas como *B. cepacia* se digirieron también con la endonucleasa *Ddel* y el patrón se comparó con los anteriormente reportados (36). Los patrones de restricción se observaron en geles de agarosa al 2.5%.

#### 4.2.10 Límites de detección del sistema molecular.

Para determinar la mínima cantidad de organismos del complejo *B. cepacia* detectables en esputo mediante la amplificación de *recA* por PCR, se siguió la misma técnica anteriormente reportada por McDoweld y cols (37), la cual consistió en lo siguiente: Inicialmente se toma una muestra de esputo de un paciente con FQ, negativa para la presencia de la bacteria. La muestra se trata en la forma convencional para la licuefacción y se divide en 6 alícuotas de 1 ml cada una. A estas se les inoculan concentraciones conocidas de la cepa seleccionada de la bacteria (control positivo) ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  UFC/ml).



El número de organismos inoculados en cada muestra de esputo fue determinado por dilución y siembra en placa para lo cual se utilizó incubación por 48 hrs a 37°C.

El DNA se extrajo a partir de las muestras de esputo inoculadas con las diferentes concentraciones de bacteria, siguiendo las condiciones previamente descritas para la extracción y se realizó la amplificación por PCR del gen *recA* también descrito previamente. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa como se describió anteriormente.

**4.2.11 Especificidad del método molecular.** Debido que las muestras de esputo de pacientes con FQ contienen un rango de diferente flora bacteriana, fue importante corroborar que los iniciadores BCR1 y BCR2 no reaccionan con otros organismos comúnmente encontrados en tales muestras. Por tanto se realizaron reacciones de PCR para diferentes cepas patógenas que comúnmente infectan el tracto respiratorio de pacientes con FQ (*P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus*), con los iniciadores específicos para el complejo *B. cepacia* y se verificó si existe reacción cruzada de estos con alguna otra bacteria.

## CAPÍTULO V

## RESULTADOS

## 5.1 Análisis por cultivo de las muestras de esputo.

El patógeno aislado con mayor frecuencia de estos pacientes fue *P. aeruginosa*, y en mucho menos proporción, *B. cepacia*, *A. xylosoxidans*, *P. putida* y *C. violaceum* (Tabla 4).

Tabla 4. Variedad de patógenos encontrados en las muestras de esputo de los pacientes con FQ analizadas.

Patógeno	Número de muestras infectadas	Porcentaje (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	92.5
<i>Burkholderia cepacia</i> *	1	2.5
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1	2.5
<i>Pseudomonas putida</i>	1	2.5
<i>Chromogenes violaceum</i>	1	2.5

\* De la muestra del paciente infectado con *B. cepacia* se aisló e identificó también *P. aeruginosa*.

## 5.2 Prevalencia del complejo *B. cepacia*.

La prevalencia del CBC en este estudio se determinó tanto por métodos microbiológicos como moleculares.

### 5.2.1 Análisis microbiológico.

Por cultivo, *B. cepacia* se aisló e identificó a partir de la muestra de un paciente (4%). Es importante señalar que en el medio selectivo BCSA se observó crecimiento de varias cepas identificadas posteriormente como *P. aeruginosa* por el sistema comercial API 20NE y confirmadas por PCR-RFLP. Aunque siendo este medio ampliamente recomendado para el aislamiento de *B. cepacia* es necesario realizar pruebas adicionales a las cepas que muestren crecimiento en éste. Es importante resaltar que de los pacientes con cultivo-negativo, 5 de ellos habían sido analizados previamente a este estudio y habían tenido muestras de esputo positivas por cultivo para *B. cepacia*.

### 5.2.2 Análisis molecular.

Por el método de PCR, utilizando los iniciadores BCR1 y BCR2, se identificaron 11 pacientes (48%) positivos para *B. cepacia* (Tabla 5). De la única bacteria aislada por cultivo e identificada como *B. cepacia*, también se comprobó su identificación a nivel molecular al obtener una reacción de PCR positiva con los iniciadores específicos para *B. cepacia*.

TABLA 5. Resultados positivos obtenidos por ambos métodos del análisis de las muestras de esputo.

Total de pacientes	23 (100%)
Análisis microbiológico	1 (4%)
Análisis molecular	11 (48%)

5.2.2.1 Extracción de DNA a partir de muestras de esputo.

Seguido de la extracción de DNA bacteriano a partir de cada muestra de esputo se realizó una PCR utilizando los iniciadores universales UNI2 y UNI5 para bacterias, los cuales amplifican un fragmento de 1,020 pb de la secuencia del gen 16S rDNA de todas las bacterias, para así poder verificar el éxito de la extracción (Fig 7).

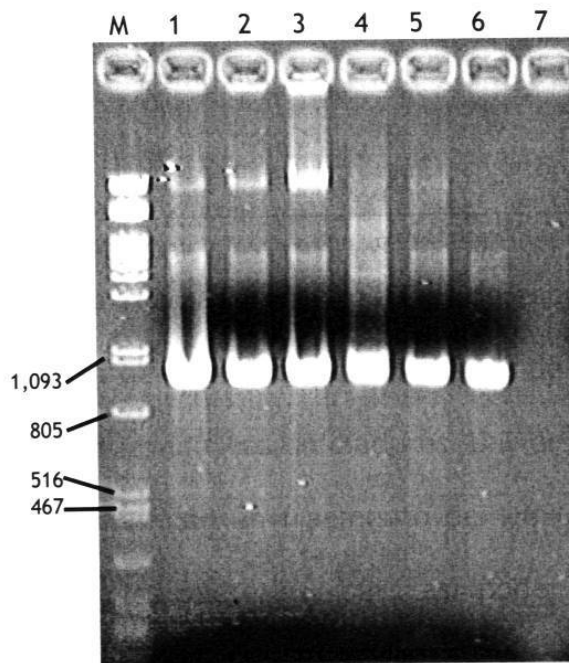


Figura 7. Amplificación con iniciadores universales para bacterias de muestras de esputo de diferentes pacientes. Carril 1-6, banda de 1,020 pb correspondiente a 16S rDNA de diferentes pacientes. Carril 7, control negativo. Carril M: marcador de peso molecular λ+PstI.

### 5.3 Determinación de genomovares mediante iniciadores específicos.

Del producto amplificado de estos 11 pacientes, se realizó el PCR anidado utilizando los iniciadores específicos para los genomovares (8 juegos de iniciadores diferentes). De todos se obtuvo reacción positiva con los iniciadores para el genomovar III-A y en un solo caso el amplicón de un paciente también fue positivo para el genomovar III-B. El DNA de la bacteria que se logró aislar por cultivo en uno de los pacientes también se evaluó con los iniciadores para los genomovares específicos de especie descritos en material y métodos y resultó negativo para todos éstos, con excepción de los específicos para *B. ambifaria* (genomovar VII) (Tabla 6).

Tabla 6. Reacciones positivas y negativas de las diferentes cepas control y del DNA aislado de la bacteria del paciente con FQ e identificada como *B. cepacia* con los 8 pares de iniciadores específicos para cada genomovar.

Genomovar	I	II	III-A	III-B	IV	V	VI	VII
Cepa control genomovar I	+	-	-	-	-	-	-	+
Cepa control genomovar III	-	-	+	-	-	-	-	+
Bacteria aislada de paciente	-	-	-	-	-	-	-	+

No obstante, como podemos ver en los resultados de la tabla 6, que la reacción supuestamente específica para genomovar VII, también resultó positiva cuando se utilizan los controles de los genomovar I y III, indicando una pobre especificidad de estos iniciadores.

#### 5.4 Determinación de genomovares mediante PCR-RFLPs.

Se amplificó el gen 16S rDNA de la cepa aislada del paciente e identificada como *B. cepacia* y fue digerida con la endonucleasa *DdeI* que generó el patrón tipo 2 (36) (Fig. 8) perteneciente a los genomovares I, III, IV y VII, descartando así a los genomovares restantes.

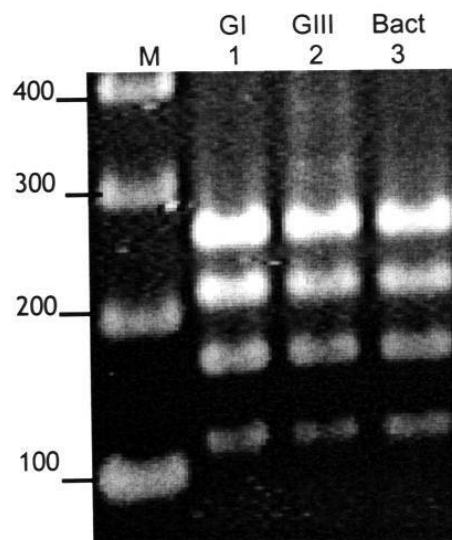


Figura 8. Análisis mediante RFLP del gen 16S rDNA. Carril 1, Cepa ATCC 25416, representante del genomovar I. Carril 2, Cepa J2315, representante del genomovar III. Carril 3, Bacteria aislada en este estudio de paciente con FQ. Carril M: marcador de peso molecular (100 pb).

De las muestras positivas por PCR y de la bacteria aislada por cultivo se digirió el gen *recA* con la endonucleasa *HaeIII* (Fig. 9-A), resultando en un mismo patrón para todas ellas. Este patrón fue reportado recientemente en Brasil (80) para cuatro aislados identificados como genomovares III-A. El gen *recA* también fue digerido con la enzima *Mn/I* y todas las muestras mostraron el mismo patrón (Fig. 9-B).

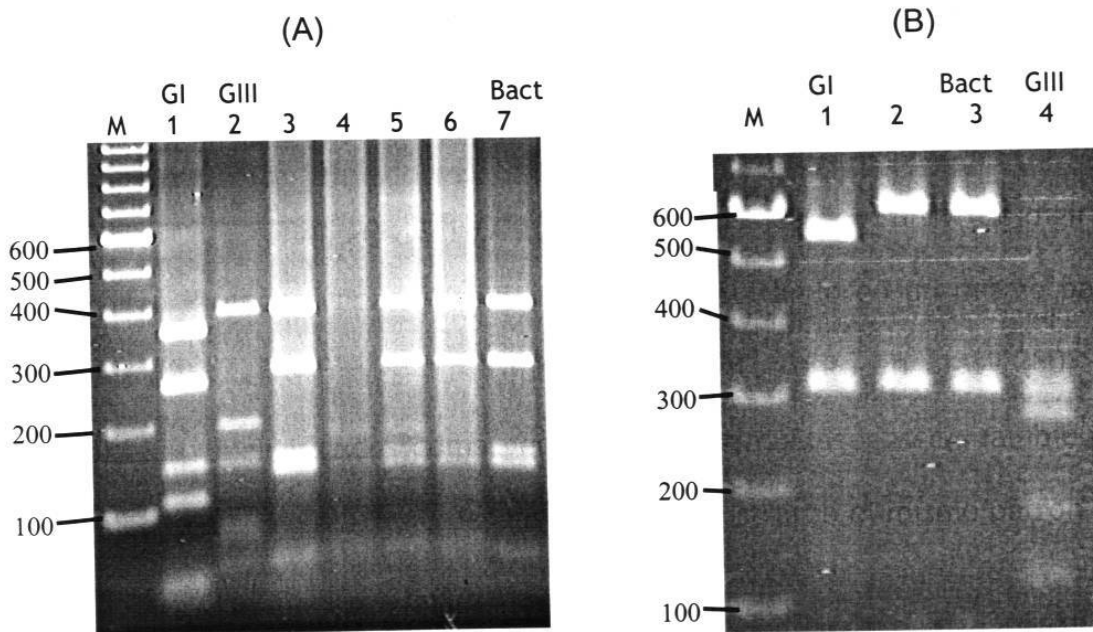


Figura 9. Análisis mediante RFLP del gen *recA*. (A) Enzima *HaeIII*. Carril 1, cepa ATCC 25416 (genomovar I). Carril 2, cepa J2315 (genomovar III). Carril 3-6, muestras de diferentes pacientes. Carril 7, bacteria aislada en este estudio de paciente con FQ. Carril M, marcador molecular (100 pb). (B) Enzima *Mn/I*. Carril 1, ATCC 25416. Carril 2, muestra de paciente. Carril 3, bacteria aislada. Carril 4, J2315. Carril M: marcador molecular (100 PB).

### 5.5 Limite de detección.

Una vez que nuestro sistema de detección molecular resultó exitoso para la detección del gen *recA* de *B. cepacia*, el siguiente paso, fue determinar la sensibilidad de este método directamente de muestras de esputo utilizando diluciones de la bacteria ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  y  $10^5$  UFC/ml). Se determinó el límite de detección utilizando la cepa J2315 perteneciente al genomovar III, que es el genomovar que con mayor frecuencia se aísla de pacientes con FQ. Este método alcanzó a detectar una concentración de  $10^6$  UFC por ml de esputo (Fig. 11-A).

### 5.6 Diseño de nuevos iniciadores.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad previamente mencionada, diseñamos un nuevo juego de iniciadores que amplifican una región interna de 430 pb del gen *recA* de *B. cepacia* (Tabla 7). Para lograr esto, utilizamos programas computacionales en donde alineamos las secuencias del gen *recA* de los 9 genomovares en busca de regiones homólogas, donde sería posible basarnos para el diseño de los nuevos iniciadores capaces de amplificar todos los genomovares del complejo *B. cepacia* y que no presentaran reacción cruzada con otras bacterias. Una vez obtenidos los nuevos iniciadores, se procedió a estandarizar las condiciones de la reacción, aunque finalmente se utilizaron las mismas condiciones de amplificación descritas para los iniciadores BCR1 Y BCR2 (Fig. 10 A y B).



Tabla 7. Secuencia de 2 pares de iniciadores para la detección inicial de organismos del complejo *B. cepacia* reportados anteriormente y diseñados para este estudio.

Iniciadores	Secuencia (5' a 3')	Especificidad	Tamaño del producto (pb)
BCR1* BCR2*	TGA CCG CCG AGA AGA CGA A CTC TTC TTC GTC CAT CGC CTC	gen <i>recA</i> -complejo <i>B. cepacia</i>	1,040
Cep1** Cep2**	AAG GTG AGA TGG TCG ATT CGC T CCG ATC TTC TCG CCG TTG TAG	gen <i>recA</i> -complejo <i>B. cepacia</i>	430

\* Iniciadores descritos por Mahenthiranlingam y col (36).

\*\* Iniciadores diseñados en este estudio.

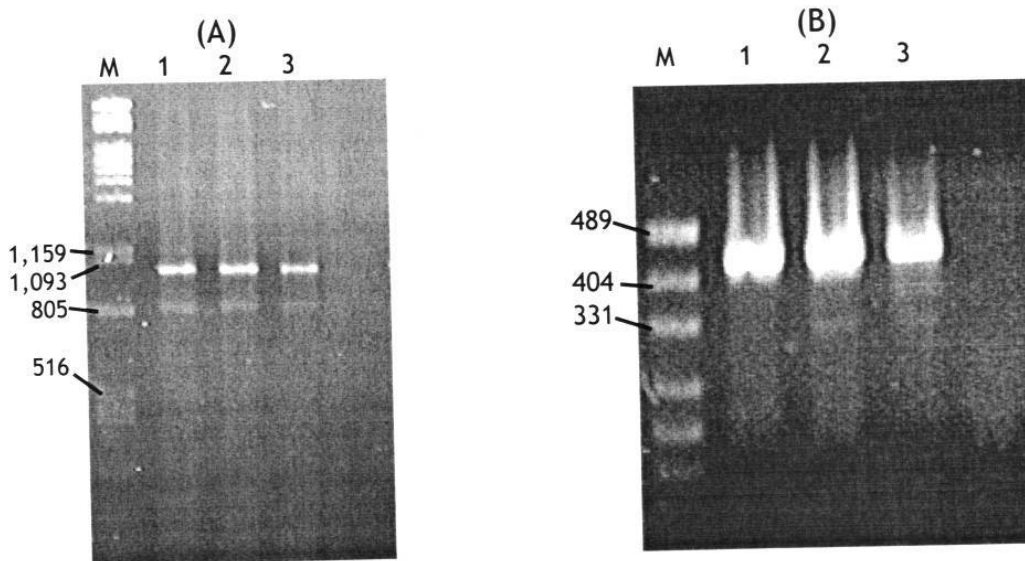


Figura 10. Amplificación de tres cepas control de *B. cepacia* utilizando las condiciones descritas en material y métodos. (A) Iniciadores BCR1 y BCR2. Carril 1, cepa ATCC 25416. Carril 2, cepa J2315. Carril 3, cepa BC5. Carril M, marcador de peso molecular,  $\lambda$  + *Pst*I. (B) Iniciadores diseñados en este estudio. Carril 1, ATCC 25416. Carril 2, J2315. Carril 3, BC5. Carril M: marcador de peso molecular.

La banda obtenida en la concentración de  $10^6$  UFC/ml con estos nuevos iniciadores es marcadamente más intensa que la que se obtiene con los iniciadores originales bajo la misma condición de la reacción. Los iniciadores diseñados en este estudio tienen una sensibilidad que se encuentra en el rango de  $10^6$  y  $10^5$  UFC/ml (Fig. 11-B).

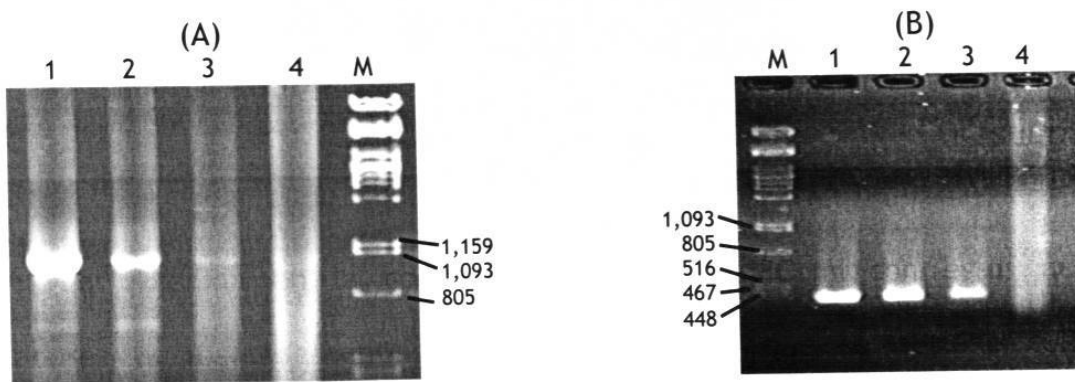


Figura 11. Limite de sensibilidad de los iniciadores utilizados para detectar *B. cepacia*. (A) Sensibilidad con iniciadores BCR1 y BCR2. Carril 1,  $10^8$  UFC/ml. Carril 2,  $10^7$  UFC/ml. Carril 3,  $10^6$  UFC/ml. Carril 4,  $10^5$  UFC/ml. Carril M: marcador de peso molecular  $\lambda$  + *Pst*I. (B) Sensibilidad con iniciadores nuevos, diseñados en este estudio. Carriles 1-4 contienen la misma concentración que los de la Fig. 4-A.

### 5.7 Especificidad del método.

Los iniciadores BCR1 y BCR2, si bien ya habían sido evaluados y utilizados en estudios previos, han demostrado su fiel especificidad hacia los organismos del complejo *B. cepacia*. Las reacciones de PCR utilizando estos iniciadores con cepas de bacterias normalmente encontradas en pacientes con FQ (*P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus*) no tuvieron reacción positiva (Fig 12).

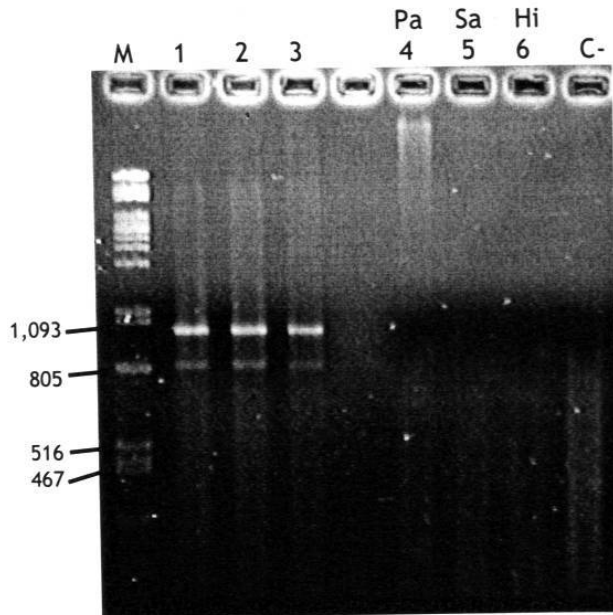


Figura 12. Especificidad de los iniciadores BCR1/BCR2. Carril 1-3, cepas controles positivos ATCC 25316, J2315, BC5. Carril 4-6, cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *H. influenzae*. Carril C-, control negativo. Carril M: marcador de peso molecular  $\lambda$ +PstI.

### 5.8 Evaluación del efecto de la infección por *B. cepacia* en el curso clínico de pacientes con FQ.

Se realizó una evaluación de diferentes parámetros clínicos entre 8 de los pacientes infectados con *B. cepacia* y un grupo control de pacientes con FQ no infectados. Los resultados indican una diferencia estadísticamente significativa en la caída del volumen expiratorio forzado (VEF<sub>1</sub>) en el último año mayor para los pacientes infectados que los no-infectados.

También los pacientes infectados demostraron una condición física más deteriorada al lograr recorrer en 6 minutos, en caminata, una distancia promedio de 286 metros, en donde el grupo control no-infectado logro recorrer un promedio de 458 metros, resultando esto en una diferencia significativa.

El número de tratamientos intravenosos (IV) por año también se observó altamente elevado (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación clínica entre pacientes infectados con *B. cepacia* y pacientes no-infectados

	Grupo Positivo <i>B. cepacia</i> + (DS)	Grupo Control <i>B. cepacia</i> - (DS)	Estadística (p=)
Edad	13 años (9.2)	13.1 años (6.6)	0.97
IMC*	14.7 (2.8)	14.85 (1.9)	0.90
VEF <sub>1</sub> **	32.3 (9.1)	53.8 (24.6)	0.10
Caída del VEF <sub>1</sub> /año	8.5 (7.1)	2.4 (3.5)	0.04
Saturación O <sub>2</sub> reposo	92.2 (2.6)	95 (2.7)	0.07
Brasfield	16.28 (2.6)	19.2 (2.8)	0.09
6MW***	286 mts (88)	458 mts (37)	0.0003
Nº de trat. IV/año	3.85 (2.4)	0.42 (0.5)	0.0041
Genotipo	4 ΔF508/ ΔF508 1 ΔF508/G542X 1 ΔF508/S549N 2 ΔF508/ X	5 ΔF508/ ΔF508 1 ΔF508/G542X 1 ΔF508/3849+10kbc>T 1 ΔF508/ X	No se observó diferencia significativa

(DS). Desviación estándar.

\* Índice de Masa Corporal.

\*\* Volumen espiratorio forzado en 1 minuto.

\*\*\* Caminata en 6 minutos.

## CAPITULO VI

### DISCUSIÓN

Los pacientes con FQ infectados con *B. cepacia* se enfrentan frecuentemente ante un mal pronóstico y al riesgo de transmitir este organismo a otros pacientes. Por ello, es de gran importancia una identificación precisa de *B. cepacia* a partir de muestras de esputo de pacientes con FQ para optimizar el manejo y control de los pacientes infectados. Sin embargo, debido a su complejidad taxonómica, la identificación de los patógenos del complejo *Burkholderia cepacia* ha demostrado ser una tarea desafiante para el microbiólogo clínico.

Actualmente, los sistemas comerciales de identificación fenotípicos poseen significantes variaciones en su capacidad para identificar con exactitud aislados del complejo *B. cepacia* y no diferencian entre los distintos genomovares (30-34). Por lo tanto, estudios recientes en otros países han demostrado un alto índice de identificaciones erróneas de *B. cepacia* en centros de tratamientos de FQ (35).

Nosotros investigamos, por primera vez en México, la prevalencia de este organismo y sus genomovares en una población de pacientes con FQ del noreste del país, utilizando un estudio polifásico (métodos microbiológico y molecular). En el presente estudio, la prevalencia de colonización mediante cultivo microbiológico fue del 4% (1 paciente), el aislamiento de *B. cepacia*, en este estudio, de este único paciente, se logró cuando se modificó el protocolo de

procesamiento de la muestra y a ésta se le realizó un paso previo de descontaminación con N-acetil-L-cisteína, el cual aparentemente aumenta la sensibilidad del aislamiento de *B. cepacia*. Desafortunadamente esta modificación a la metodología se realizó solamente al final del estudio (3 muestras), por lo que los aislados iniciales no pudieron tratarse de la misma forma. Del resto de los pacientes que resultaron con cultivo-negativo en este estudio, a 5 de ellos se les había logrado aislar *B. cepacia* de muestras de esputo en diagnósticos previos a este estudio. Lo que tal vez indica que cuando se realizó el diagnóstico previo, a los pacientes se les administró el tratamiento con antibióticos específico para esta bacteria y posiblemente los niveles de ésta disminuyeron considerablemente, de manera que no pudieron ser detectados por el método microbiológico en este estudio. Otra explicación a esto es que se ha postulado que *B. cepacia* es probablemente un organismo intracelular facultativo (81,82), lo que dificulta su recuperación por métodos microbiológicos tradicionales y se logra hacer evidente mediante métodos moleculares que implican lisis celular completa para liberar y extraer el DNA.

Es necesario advertir también, que se observó crecimiento en el medio selectivo BCSA de varias cepas *P. aeruginosa*, una observación también previamente reportada por otros autores (2,83), por lo cual se hace énfasis en la identificación bioquímica de los aislados de esputo.

Mediante el análisis molecular se obtuvo una prevalencia del 48% (11 pacientes) de un total de 23 pacientes analizados. En la mayoría de las clínicas, alrededor del mundo, *B. cepacia* se encuentra en menos del 10% de los pacientes; sin embargo, se han reportado en algunos estudios una prevalencia mucho mayor, por ejemplo: en el Reino Unido, en 1996, algunos centros alcanzaban una prevalencia de hasta el 40% (84); igualmente ocurrió en un centro de FQ en E.U.A. (10), y más recientemente se han reportado prevalencias del 30% en estudios en Italia (77) y Reino Unido (13).

El análisis mediante PCR-RFLP del gen 16S rDNA de la bacteria aislada e identificada como *B. cepacia* corresponde al patrón tipo 2 reportado por Mahenthiralingam y col. (36) perteneciente a los genomovares I, III, IV y VII (Fig. 8). El análisis mediante PCR-RFLP del gen *recA* de todas las muestras positivas y de la bacteria aislada presentó el mismo patrón con las enzimas *HaeIII* y *Mn/I*. Aunque se han encontrado más de 50 patrones de restricción para *B. cepacia* utilizando *HaeIII* (18) el patrón obtenido con esta enzima en este estudio ha sido recientemente reportado por un estudio en Brasil (80) para cuatro aislados identificados como pertenecientes al genomovar III-A (Fig. 9-A). Este genomovar es el que con mayor frecuencia se aísla de pacientes con FQ y el que posee un mayor grado de transmisibilidad y virulencia (36).

Se obtuvo la amplificación de *recA* con los iniciadores BCR1 y BCR2 del DNA de la bacteria aislada de uno de los pacientes que fue identificada como *B. cepacia* por el sistema comercial API ZONE. Utilizando los iniciadores “específicos de especie” descritos en material y métodos, no se obtuvo reacción con ninguno de éstos, excepto con el de genomovar VII. No obstante, se obtuvo reacción positiva para los controles de genomovar I y III, con este mismo juego de iniciadores, demostrando con esto una pobre especificidad de estos iniciadores.

Utilizando la técnica de PCR-anidado, y como templado el producto amplificado con los iniciadores BCR1/BCR2, se observó reacción positiva con los iniciadores específicos para genomovar III-A. Debido a que todos los pacientes comparten el mismo patrón de restricción con dos enzimas diferentes, se podría sospechar de una epidemiología por una cepa *B. cepacia* altamente transmisible, sin embargo, para asegurar esto, es necesario estudios futuros de secuenciación de otros genes adicionales a *recA* para confirmar si se trata de la misma bacteria en todos los casos.

Altas concentraciones de *B. cepacia* ( $>10^8$  UFC/ml) se encuentran presentes en la saliva de pacientes colonizados (84), la sensibilidad (de  $10^6$  UFC/ml) alcanzada en este estudio es similar a la descrita por McDowell y cols. (37) utilizando una estrategia similar a la nuestra. Los iniciadores diseñados en este estudio, con la



finalidad de mejorar la sensibilidad, confirmaron el estado de todos los pacientes previamente positivos con BCR1 y BCR2 y se detectaron 3 pacientes más, que no habían sido detectados con los iniciadores iniciales. Este par de iniciadores nuevos, aparentemente más sensibles, necesitan ser más profundamente estudiados y evaluarse tanto con cepas controles representantes de cada genomovar, como con otras bacterias comúnmente encontradas en pacientes con FQ para su uso rutinario; además, con estos iniciadores no se logra especificar entre genomovares.

En el presente estudio se realizó también una evaluación del efecto de la infección por *B. cepacia* en el curso clínico de pacientes con FQ y se observó que los pacientes infectados con este organismo sufren una mayor caída del VEF<sub>1</sub> en un año, en comparación de los pacientes no-infectados, reflejándose en una pérdida de la función pulmonar así como también en un mayor número de tratamientos IV por año, observaciones que también fueron previamente reportadas en otros estudios sobre la evolución de pacientes infectados con este organismo (6,7).

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

- 1.- Demostramos que en México sí existe *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística.
- 2.- De un total de 23 pacientes analizados: 11 positivos (48%) mediante PCR.  
1 positivo (4%) mediante cultivo.
- 3.- En esta población de pacientes el genomovar III-A resultó el de mayor prevalencia como ha sido reportado previamente.
- 4.- En los pacientes colonizados por *B. cepacia* se observó un significativo deterioro de la función pulmonar y un aumento en la frecuencia de tratamientos intravenosos por año.
- 5.- Nuestros resultados confirman también la dificultad previamente reportada sobre el aislamiento del CBC por cultivo.
- 6.- Debido a la alta prevalencia de pacientes colonizados por *B. cepacia*, recomendamos la aplicación de estrictas normas de control sobre estos pacientes.
- 7.- Es imperativo aumentar la conciencia sobre este problema entre centros de FQ y sus laboratorios afiliados, así como la recomendación de protocolos mejorados para el aislamiento de bacterias de muestras de esputo, y la utilización de laboratorios de referencia equipados para proveer un análisis más completo, incluyendo métodos genotípicos. Este es el primer reporte, en México, sobre la prevalencia de *B. cepacia* en pacientes con FQ.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hearst JE, Elliot KE. 1995. Identifying the killer in cystic fibrosis. *Nat. Med.* 1:626-627.
2. Govan JRW, Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Reviews.* 60:539-574.
3. LiPuma JJ. 1998. *Burkholderia cepacia*—Management issues and new insights. *Clin. Chest Med.* 19:473-486.
4. Cystic Fibrosis Foundation. 1999. Patient Registry 1998 Annual Data Report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation.
5. Burns JL, Lipuma JJ. Recovery and identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis respiratory samples in the clinical microbiology laboratory. Cystic Fibrosis Foundation. [www.cff.org/research/additional\\_online\\_resources.cfm?ID=160](http://www.cff.org/research/additional_online_resources.cfm?ID=160).
6. Muhdi K, Edenborough FP, Gumery L, O’Hickey S, Smith EG, Stableforth DE. 1996. Outcome for patients colonised with *Burkholderia cepacia* in a Birmingham adult cystic fibrosis clinic and the end of an epidemic. *Thorax.* 51:374-377.
7. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, Paton JY. 1995. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonization in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax.* 50:1194-1198.
8. Soni, R., G. Marks, D. A. Henry, M. Robinson, C. Moriarty, S. Parsons, P. Taylor, E. Mahenthiralingam, D. P. Speert, 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.
9. Ledson MJ, Gallagher MJ, Jackson M, Hart CA, Walshaw M. 2002. Outcome of *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. *Thorax.* 57:142-145.

10. Govan JRW, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, Greening AP, Webb AK. 1993. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet*. 342:15-19.
11. Smith DL, Gumery LB, Smith EG, y cols. 1993. Evidence of *Pseudomonas cepacia* transmission in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31:3017-3022.
12. Biddick R, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. 2003. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol. Letters*. 228:57-62.
13. Ledson MJ, Gallagher MJ, Corkill JE, Hart CA, Walshaw MJ. 1998. Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*. *Thorax*. 53:432-436.
14. Newsletter of the Association of Cystic Fibrosis Adults (UK). 1993. Cystic Fibrosis statement on *Pseudomonas cepacia*. 37:2-5.
15. Duff AJA. 2002. Psychological consequences of segregation resulting from chronic *Burkholderia cepacia* infection in adults with CF. *Thorax*. 57:756-758.
16. Govan JRW, Nelson JW. 1993. Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues. *J. R. Soc. Med.* 86:11-18.
17. Walters S, Smith EG. 1993. *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis: transmissibility and implications. *Lancet*. 342:3-4.
18. Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. 2002. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 51:533-538.
19. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39:3427-3436.
20. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyet M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JRW. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:1188-1200.

21. Coenye T, LiPuma JJ, Henry D y cols. 2001. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:271-279.
22. Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D y cols. 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.* 51:1481-1490.
23. Vandamme P, Henry D, Coenye T y cols. 2001. *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.* 33:143-149.
24. Murray PR. 1999. *Manual of clinical microbiology*. 7<sup>o</sup> edition. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. Chapter 34:526-533.
25. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 1998. *Bailey and Scotts Diagnostic microbiology*. 10<sup>o</sup> edition. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and similar organisms. Chapter 31:448-460.
26. Corey M, Farewell V. 1996. Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada. *Am. J. Epidemiol.* 143:1007-1017.
27. Frangolias DD, Mahenthiralingam E, Rae S, Raboud JM, Davidson AGF, Wittman R, Wilcox PG. 1999. *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: variable course disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:1572-1577.
28. Simpson IN, Finaly J, Winstanley DJ, Nelson J, Govan JRW. 1994. Multi-resistance isolates possessing characteristics of both *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and *Burkholderia gladioli* from patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:353-361.
29. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, Levison H. 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.* 104:206-210.
30. Brisse S, Stefani S, Verhoef J, Van Belkum A, Vandamme P, Goessens W. 2002. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 40:1743-1748.

31. Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. 2001. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. J. Clin. Microbiol. 39:1073-1078.
32. Kiska DL, Kerr A, Jones MC, Caracciolo JA, Jordan M, Huges D, Gilligan P. 1996. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 34:886-891.
33. Shelly DB, Spilker T, Gracely EJ, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2000. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. J. Clin. Microbiol. 38:3112-3115.
34. Van Pelt C, Verduin C, Goessens WH, Vos MC, Tümpler B, Segonds C, Reubsæet F, Verbrugh H, Van Belkum A. 1999. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. J. Clin. Microbiol. 37:2158-2164.
35. McMenamin JD, Zacccone TM, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2000. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers. Chest. 117:1661-1665.
36. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P. 2000. DNA-based diagnostic approaches Av-Gay for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, y *Burkholderia cepacia* genomovares I y III. J. Clin. Microbiol. 38:3165-3173.
37. McDowell A, Mahenthiralingam E, Moore JE, Dunbar KEA, Webb AK, Dodd ME, Martin SL, Millar BC, Scott CJ, Crowe M, Elborn JS. 2001. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 39:4247-4255.
38. Drvínek P, Hrbácková H, Cinek O, Bartosová J, Nyc O, Nemeč A, Pohunek P. 2002. Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. J. Clin. Microbiol. 40:3485-3488.
39. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. 1996. Cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154:1229-1256.
40. Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL. 1995. Cystic fibrosis, p.3799-3876. En, The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw-Hill Professional, New York, N.Y.

41. Bye MR, Ewing JM, Quittell LM. 1994. Cystic fibrosis. *Lung*. 172:251-270.
42. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2002. Lung infection associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Reviews*. 15:194-222.
43. Welsh MJ, Smith AE. 1995. Cystic fibrosis. *Scientific American*. December 1995.
44. Quinton PM, Bijman J. 1983. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med*. 308:1185-1189.
45. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Cox TK, Chakravarti A, Tsui L-C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 245:1078-1080.
46. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245:1066-1073.
47. Parke JL. 2000. *Burkholderia cepacia*: friend or foe? The Plant Health Instructor.
48. Holmes A, Govan J Goldstain, R. 1998. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: A threat to human health? *Emer. Infect. Disease*. 4.
49. BCCM News Edition 9 - June, 2001 - *Burkholderia cepacia*: Pandora's box redefined.
50. Burkholder WH. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*. 40:115-117.
51. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Arakawa M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol*. 36:1251-1275.
52. McArthur JV, Kovacic DA, Smith MH. 1988. Genetic diversity in natural population of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 85:9621-9624.

53. Craven DE, Moody B, Connolly MG, McCabe WR. 1981. Pseudobacteremia caused by povidone-iodine solution contaminated by *Pseudomonas cepacia*. N. Engl. J. Med. 305:621-623.
54. Gold R, Jin E, Levison H. 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. Agents Chemother. 37:123.
55. Thomassen MJ, Demko CA, Doershuk CF, Stern RC, Klinger JD. 1986. *Pseudomonas cepacia*: decrease in colonization in patients with cystic fibrosis. Am. Rev. Respir. Dis. 134:669-671.
56. Govan JRW, Hughes JE, Vandamme P. 1996. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. J. Med. Microbiol. 45: 395-407.
57. LiPuma JJ, Marks-Austin KA, Holsclaw DS, Winnie GB, Gilligan PH, Stull TS. 1994. Inapparent transmission of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* among patients with cystic fibrosis. Pediatr. Infect. Dis. J. 13:716-719.
58. Pegues DA, Carson LA, Tablan OC, FitzSimmons SC, Roman SB, Miller JM, Jarvis WR, y the Summer Camp Study Group. 1994. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. J. Pediatr. 124:694-702.
59. LiPuma JJ. 1998. *Burkholderia cepacia* epidemiology and pathogenesis: implications for infection control. Curr. Opin. Pulm. Med. 4:337-441.
60. Ensor E, Humphrey H, Peckham D, Webster C, Knox AJ. 1996. Is *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* disseminated from cystic fibrosis patients during physiotherapy? J. Hosp. Infect. 32:9-15.
61. Humphreys H, Peckham D, Patel P, Knox AJ. 1994. Airborne dissemination of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* from adult patients with cystic fibrosis. Thorax. 49:1157-1159.
62. Ledson MJ, Gallagher MJ, Walshaw MJ. 1998. Chronic *Burkholderia cepacia* bronchiectasis in a non-cystic fibrosis individual. Thorax. 53:430-432.
63. Jarvis WR, Olson D, Tablan O, Martone WJ. 1987. The epidemiology of nosocomial *Pseudomonas cepacia* infections: endemic infections. Eur. J. Epidemiol. 3:233-236.



64. Ederer GM, Matsen JM. 1972. Colonization and infection with *Pseudomonas cepacia*. J. Infect. Dis. 125:613-618.
65. Rosenstein BJ, Hall DE. 1980. Pneumonia and septicaemia due to *Pseudomonas cepacia* in a patient with cystic fibrosis. Johns Hopkins Med J. 147:188-189.
66. Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, Stern RC. 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis: a new opportunist. Am. Rev. Respir. Dis. 131:791-796.
67. Association of Cystic Fibrosis Adults (UK). 1993. Cystic fibrosis statement on *Pseudomonas cepacia*. Newsl. Assoc. Cystic Fibrosis Adults 37:2-5.
68. Lewin C, Doherty C, Govan JRW. 1993. In vitro activities of meropenem, PD 127391, PD 131628, ceftazidime, chloramphenicol, cotrimoxazole, and ciprofloxacin against *Pseudomonas cepacia*. Antimicrob. Agents Chemother. 37:123-125.
69. Fitzsimmons SC. 1993. The changing epidemiology of cystic fibrosis. J. Pediatr. 122:1-9.
70. Sajjan US, Corey M, Karmali MA, Forstner JF. 1992. Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Invest. 89:648-656.
71. Shreve MR, Butler S, Kaplowitz HJ, Rabin HR, Stokes D, Light M, Regelman WE for North American Scientific Advisory Group and Investigators for the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. 1999. Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 37:753-757.
72. Gilligan PH. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:35-51.
73. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formely *Burkholderia cepacia* genomovar IV). J. Clin. Microbiol. 38:1042-1047.
74. Gillis M, Van Van T, Bardin R. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. For N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:274-289.

75. LiPuma JJ, Spilker T, Gill LH, Campbell PW, Liu L, Mahenthiralingam E. Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 92-96.
76. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis in Canada: geographical distribution and clustering of strains. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (in press).
77. Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Giannino V, Sciacca A, Stefani S. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2891-2896.
78. Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. 1997. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J. Clin. Microbiol.* 35:614-619.
79. Reischl U, Pulz M, Ehret W, Wolf H. 1994. PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. *Biotechniques.* 17:844-845.
80. Detsika MG, Corkill JE, Magalhaes M, Glendinning KJ, Hart CA, Winstanley C. 2003. Molecular typing and distribution of genetic markers among, *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41:4148-4153.
81. Burns JL. 1992. Characterization of invasion of epithelial cells by *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr. Pulmonol.* 8(Suppl. 8):201.
82. Nelson JW, Butler SL, Krjeg D, Govan JRW. 1994. Virulence factors of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 8:89-98.
83. Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, Quesnes G, Lenoir G, Berche P, Gaillard JL. 2003. Phenotypic and genotypic characteristics of non fermenting atypical strains from cystic fibrosis patients. *Pathologie Biologie.* 51:405-
84. Nelson JW, Doherty CJ, Brown PH. 1991. *Pseudomonas cepacia* in inpatients with cystic fibrosis. *Lancet.* 338:1525.



DONATIVO

