UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
POSTGRADO DE CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES
MÉRIDA. ESTADO MÉRIDA

# ESTUDIO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DEL COMPLEJO *Burkholderia cepacia* y GÉNEROS RELACIONADOS

Yasmina Araque Calderón

Mérida-Venezuela

Febrero, 2008

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
POSTGRADO DE CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES
MÉRIDA, ESTADO MÉRIDA

# ESTUDIO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DEL COMPLEJO *Burkholderia cepacia* y GÉNEROS RELACIONADOS

AUTORA: Yasmina Araque Calderón
TUTOR: Vidal Rodríguez-Lemoine

Tesis presentada ante el Consejo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes como requisito parcial para optar al título de DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

Mérida-Venezuela

Febrero, 2008

El presente trabajo, requisito parcial para obtener el título de doctora en Ciencias Médicas Fundamentales, fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biología de Plásmidos y Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos de la Universidad Central de Venezuela, bajo la tutoría del Dr. Vidal Rodríguez-Lemoine y en el Laboratorio de Neuroquímica del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de Los Andes bajo la asesoría de la Dra. Leticia Miranda de Contreras y del Dr. Ernesto Palacios Prü†.

El financiamiento parcial de este trabajo se llevó a cabo por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Lab 97000677, y por la Comisión de Investigación, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, a través del proyecto CI-5-1005-1157.

# DEDICATORIA

*A Dios,*
*por darme fortaleza y empeño para escalar esta montaña.*

*A mis hijas,*

*Sintia Valentina y Yasmina María.*

*Espero que algún día entiendan mi ausencia en momentos importantes de su vida.*

*A mis padres,*

*por brindarme amor y apoyo incondicional.*

# AGRADECIMIENTO

*Al Dr. Vidal Rodríguez-Lemoine por su valioso asesoramiento, conocimiento y apoyo brindado durante el desarrollo de mi tesis.*

*Al Dr. Ernesto Palacios Prü †, por su constante apoyo, valiosos consejos y orientación en el transcurso de este trabajo.*

*A la Dra. Leticia Miranda, por su incondicional e invalorable esfuerzo, apoyo y dedicación en el transcurso del trabajo de tesis, aportando sus conocimientos, su paciencia y amistad.*

*A mis compañeros y amigos del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de Los Andes, que me concedieron el favor de su invalorable ayuda, contribuyendo de diferentes modos en el desarrollo de este trabajo.*

*A mis amigos, Pedro Benítez y Emperatriz Gomero, quienes me apoyaron en diferentes sitios y momentos a través de su amistad, sabios consejos y sugerencias.*

*A la Lic. Juana Vitelli-Flores, Dra. Guillermina Alonso, Dra. Rosa Virginia Mendoza, Dra. María del Carmen Araque, quienes me brindaron su apoyo con aportes académicos indicaciones y sugerencias.*

*Finalmente, mi reconocimiento a quienes estuvieron pendientes de mi tarea todo este tiempo y me apoyaron con su entusiasmo y ánimo en este prolongado camino, a mi familia y a mis amigos.*

# RESUMEN

*Burkholderia cepacia* es un bacilo aerobio no esporulado, con requerimientos especiales de cultivo, la cual forma parte de un complejo (C*Bc)* formado por nueve genomovares o especies y es reconocido como un patógeno oportunista en humanos, y como agente responsable del daño de cultivos. Su identificación es difícil, confundiéndose a menudo con otros bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF). *B. cepacia* En este trabajo se caracterizaron 74 aislados provenientes de muestras ambientales (agua, insectos y plantas), y de pacientes recluidos en servicios hospitalarios de tres ciudades de Venezuela con identificación previa como BGNNF o *Pseudomonas* sp. Para la identificación de *B. cepacia,* y su diferenciación de géneros muy relacionados, se emplearon métodos bioquímicos convencionales y comerciales automatizados, un conjunto de pruebas complementarias altamente selectivas, y la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR especie-específica). Adicionalmente, se determinó el perfil de resistencia para un grupo de antibióticos, y los patrones de proteínas mediante el análisis por SDS-PAGE. Un análisis de conglomerados permitió construir dendogramas de los patrones de resistencia a antibióticos y el perfil proteico de los aislados del C*Bc*. El empleo conjunto de pruebas bioquímicas convencionales con sistemas comerciales permitió la identificación de 28 aislados como *B. cepacia* (37,83%), 15 *S. maltophilia* (20,27%), 11 *Pseudomonas* sp. (14,86%), 9 *A. xylosoxidans* (12,16%), y otros 11 (12,16%) BGNNF. Los métodos convencionales mostraron una mayor sensibilidad (92,85%) y especificidad (95,83%) que los sistemas comerciales (API 20 NE e ID 32GN) con un rango de sensibilidad de 57,14% y 67,85% y de especificidad de 79,31-83,63% respectivamente, pero el índice discriminatorio resultó con valores promedios para el API 20 NE e ID 32 GN y bajos para los métodos convencionales (13,76%). La aplicación de la PCR permitió establecer una correlación entre los aislados identificados con algunos de los genomovares descritos para el C*Bc* y mostró altos valores de sensibilidad y especificidad, con un índice discriminatorio de 99%. Se identificaron 13 aislados en el genomovar I, 4 en el genomovar II, 3 en el genomovar III, 1 en el genomovar IV, y 7 cepas como *B. vietnamensis*. Los aislados restantes resultaron negativos. Tanto los aislados ambientales como los nosocomiales mostraron resistencia a múltiples antibióticos, con niveles de resistencia más alta para imipenem, tobramicina, amikacina y aztreonam en los aislados clínicos. Todas las cepas presentaron altos niveles de

sensibilidad a ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, ceftazidima, piperacilina tazobactam y piperacilina. Por otra parte los coeficientes del índice de Dice entre cepas nosocomiales y ambientales presentaron un rango de similaridad de 72% a 91,4%. El análisis comparativo entre las bandas de proteínas comunes y los patrones de resistencia a antibióticos reveló la estrecha asociación de bandas de $M_r$ 135kDa, 76kDa, 72kDa, 53kDa y 50kDa con resistencia a imipenem y aztreonam, $M_r$ 53kDa y 31kDa con trimetoprim/sulfametoxazol y $M_r$ 50kDa con ceftazidima. Los resultados obtenidos de las pruebas convencionales y galerías, así como de PCR con el uso de iniciadores especie-específicos ponen en evidencia la utilidad de estas técnicas para la identificación bioquímica y genotípica de aislados del C*Bc*. La metodología de la PCR permitió la identificación y diferenciación de los genomovares I, II, III y IV. Sin embargo, los genomovares identificados en principio como *B. vietnamensis* requieren estudios complementarios. Es conveniente examinar mayor número de aislados provenientes de diferentes ambientes naturales y muestras de origen hospitalario, para poder definir los perfiles bioquímicos de los diferentes genomovares y la aplicación de nuevas metodologías para la identificación de especies noveles incluidas en el C*Bc.* Por otra parte, es importante determinar la relación de las proteínas comunes entre diversas cepas del C*Bc* de fuentes hospitalarias y ambientales con las proteínas referidas como factores de virulencia.

# ÍNDICE GENERAL

Pág.

**RESUMEN**

**I. INTRODUCCIÓN** 1

A. Objetivos 3

B. Antecedentes históricos 5

C. Aspectos microbiológicos del Complejo *Burkholderia cepacia* 5

1. Morfología 5

2. Características de cultivo 6

3. Hábitat 7

D. Taxonomía del Complejo *Burkholderia cepacia* 7

1. Taxonomía 7

2. Complejo *Burkholderia cepacia* 7

E. Importancia clínica y biotecnológica 10

1.Patogenicidad de *Burkholderia cepacia* 10

a. Factores de virulencia 11

b. *Burkholderia cepacia* y fibrosis quística 12

c. Resistencia antimicrobiana 13

2. Papel de *B. cepacia* en la agricultura 14

F. Identificación de miembros del complejo *Burkholderia cepacia* 15

1. Métodos fenotípicos 15

a. Métodos convencionales y sistemas comerciales 15

b. Análisis de proteínas por SDS-PAGE 17

c. Análisis de ácidos grasos 17

2. Métodos moleculares 19

a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 19

b. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) 21

c. Ribotipificación 21

Pág.

**II. MATERIALES Y MÉTODOS**

A. Recolección de aislados 23

B. Caracterización fenotípica del Complejo *Burkholderia cepacia* y otros organismos relacionados. 23

1. Siembra y aislamiento 23

2. Caracterización bioquímica (métodos convencionales) 24

3. Caracterización bioquímica (sistema semiautomatizado ATB/PLUS) 24

4. Pruebas bioquímicas complementarias 24

C. Caracterización molecular de miembros del Complejo *Burkholderia cepacia* a través de iniciadores especie-específico por PCR 25

1.Aislamiento de ADN 25

2. Reacción en cadena de la polimerasa 25

D. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana 29

1. Método de difusión de disco en agar. 29

2. Concentración inhibitoria mínima 29

E. Electroforesis de proteínas totales en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) 30

1. Preparación de extractos de proteínas totales 30

2. Purificación de proteínas de la membrana externa 30

3. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% 31

F. Análisis de datos 31

**III. RESULTADOS** 34

A. Identificación bioquímica de *Burkholderia cepacia* y géneros relacionados por métodos convencionales 34

1. Características bioquímicas 34

B. Identificación bioquímica a través del sistema comercial ATBplus (galerías API 20NE e ID 32 GN) 40

Pág.

C. Identificación molecular de miembros del Complejo *B. cepacia* mediante PCR especie-específico 44

1. Resultados del análisis de clasificación de las pruebas bioquímicas y de los genomovares**.** 48

2. Resultados del análisis del poder discriminatorio de los cuatro métodos empleados en la identificación del C*Bc* a través de la aplicación del índice de diversidad de Simpson. 51

D. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana 51

E. Perfiles de proteínas por SDS-PAGE del Complejo *B. cepacia* 56

**IV. DISCUSIÓN** 62

**V. CONCLUSIONES** 68

**VI. RECOMENDACIONES** 70

**VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 71

**VIII. APÉNDICES** 83

**IX. ANEXOS** 93

# ÍNDICE DE TABLAS


Pág.

Tabla 1. Características del Complejo *B. cepacia* y organismos fenotípicamente similares. 18

Tabla 2. Iniciadores empleados en la PCR para la identificación de los genomovares I, II, III, IV del Complejo *B. cepacia*. 27

Tabla 3. Identificación bioquímica de *B. cepacia* y géneros relacionados por métodos convencionales. 35

Tabla 4. Perfil bioquímico de aislados del Complejo *B. cepacia* por métodos convencionales. 38

Tabla 5. Comparación de los sistemas comerciales API 20NE e ID3 2GN en la identificación de *Burkholderia cepacia y* BGNNF relacionados. 42

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales y sistemas comerciales en la identificación de *B. cepacia.* 43

Tabla 7. Identificación de genomovares del Complejo *Burkholderia cepacia* por PCR especie-específico. 48

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR en la identificación del Complejo *B. cepacia.* 49

Tabla 9. Índice discriminatorio para cuatro métodos de identificación del Complejo *Burkholderia cepacia*. 50

Tabla 10. Distribución de las cepas del Complejo *Burkholderia cepacia* de acuerdo a la resistencia antimicrobiana determinada por CIM. 54

Tabla 11. Porcentaje relativo de bandas proteicas de mayor ocurrencia en extractos de proteínas totales y de membrana externa en aislados nosocomiales y ambientales del Complejo *B. cepacia.* 58

Tabla 12. Bandas comunes de proteínas y porcentajes relativos de resistencia a imipenem y aztreonam en aislados ambientales y nosocomiales del Complejo *B. cepacia*. 61

# ÍNDICE DE FIGURAS


Pág.

Figura 1. Árbol filogenético basado en la secuencia 16s ARNr, mostrando la posición de las especies *de Burkholderia* y género relacionados. 9

Figura 2. Algoritmo de PCR para identificar las especies y genomovares del Complejo *B. cepacia* (I, II, III, IV y V). 28

Figura 3. Características morfológicas de *B. cepacia*. A: Bacilos Gram negativos típicos. B: Crecimiento en agar Luria Bertani. 36

Figura 4. Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales de aislados ambientales y nosocomiales de *B. cepacia.* 39

Figura 5. Amplificación por PCR del genomovar I del Complejo *B. cepacia*, en aislados ambientales: CVCM 626 (ATCC 25416), CVCM 810 (gusano de maíz), CVCM 1273 (ajo) y hospitalarios, CVCM 795. 45

Figura 6. Amplificación por PCR de los genomovares III (CVCM: 1331 y 1367) I (CVCM 1328), IV (CVCM 1274) del Complejo *B. cepacia.* 46

Figura 7. Amplificación por PCR de los genomovares I (CVCM 626 y 1332) II (CVCM 1220) del Complejo *B. cepacia*. 47

Figura 8. Dendograma del análisis de conglomerados basados en los resultados de las pruebas bioquímicas y su relación con los genomovares. 52

Figura 9. Dendograma derivado de simple coeficiente asociativo y UPGMA para patrones de resistencia a antimicrobianos de aislados nosocomiales y ambientales de *B. cepacia.* 55

Figura 10. Patrones de bandas de proteínas totales por SDS PAGE de aislados ambientales y nosocomiales del Complejo *B. cepacia*. 57

Figura 11. Dendograma derivado del método de conglomerados UPGMA, para perfiles de proteínas totales de aislados nosocomiales y ambientales del Complejo *B. cepacia*, en un rango de peso molecular de 10 000 a 140 000 daltons. 60

# I. INTRODUCCIÓN

Los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) son un grupo de bacterias que utilizan la glucosa y otros hidratos de carbono por la vía oxidativa (vía de Ender Doudoroff) (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger y Winn, 1999) que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluso en el medio ambiente hospitalario, y están representados principalmente por: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., y *Stenotrophomonas maltophilia* (Gales, Jones, Andrade y Sader, 2005).

Aunque ninguno de estos microorganismos forma parte de la flora habitual del organismo humano, se han encontrado con alta frecuencia en infecciones hospitalarias, asociada a pacientes inmunosuprimidos, debido a que presentan resistencia intrínseca a un amplio espectro de agentes antimicrobianos (Gales y col., 2005; Hancock, 1998).

Dentro del grupo de BGNNF, está incluida, *Burkholderia cepacia*, bacilo aerobio no esporulado con requerimientos especiales de cultivo, responsable de la descomposición de los bulbos de cebolla (Burkholder, 1950). Se ha demostrado, que esta especie forma parte de un complejo integrado por al menos nueve genomovares indistinguibles entre sí por pruebas bioquímicas. Actualmente este complejo ha sido designado *Burkholderia cepacia* (C*Bc*) (Coenye, Mahenthiralingam y col., 2001; Coenye, Vandamme y col., 2001; Vermis, Vandekerekhove, Nelis y Vandamme, 2002).

Estudios realizados en las tres últimas décadas reportan que *B. cepacia*, ha emergido como un importante patógeno oportunista causante de infecciones epidémicas, particularmente en pacientes con fibrosis quística y otros individuos inmunocomprometidos. Se ha observado que *B. cepacia* puede causar neumonía, infecciones de las vías urinarias, meningitis, peritonitis, infección de heridas quirúrgicas y de quemaduras, bacteriemia y endocarditis relacionada con la drogadicción (Holmes, Govan y Goldstein, 1998); también presenta resistencia a una amplia variedad de antimicrobianos (Govan y Deretic, 1996) y exhibe resistencia intrínseca para aminoglicósidos y resistencia inducible a betalactámicos (Bevivino

y col., 2002). *B. cepacia* presenta una extraordinaria versatilidad metabólica y desempeña un importante rol en promover el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas para la fijación del nitrógeno atmosférico (Estrada y col., 2001). Adicionalmente la gran versatilidad nutricional del género *Burkholderia* le permite degradar substratos aromáticos clorados (compuestos tóxicos encontrados en pesticidas) que puede utilizar como fuente de carbono y energía (Coenye y col., 2001; Estrada y col; Holmes y col.) y producir compuestos con actividad antimicrobiana, pudiendo ser utilizado como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos (Salles y col., 2002).

La identificación de los miembros del complejo *B. cepacia* es difícil y las pruebas de rutina de los laboratorios conducen con frecuencia a la identificación errónea de otros BGNNF. Requiere del empleo de una gran variedad de medios de cultivo, métodos convencionales o la aplicación de sistemas semiautomatizados empleando galerías bioquímicas (API 20 NE, Vitek GNI, BIOLOG) y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Koneman y col., 1999; Murray y col., 1999). Con frecuencia es necesario emplear métodos de tipificación molecular tales como: la reacción en cadena de polimerasa (PCR), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tipificación de secuencias de ADN y ribotipificación (Blecker y col. 2000; Henry y col., 2001).

En Venezuela la identificación de *B. cepacia* en el ámbito hospitalario está en un punto crítico, ya que no se aplican criterios complementarios a las técnicas convencionales porque no se dispone de equipos modernos basados en técnicas moleculares. Así, a menudo los BGNNF son reportados sólo como *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. En general no se toma en cuenta la resistencia múltiple a los antimicrobianos como elemento diferencial.

Dada la importancia de contar con una adecuada identificación de los miembros del C*Bc* empleando métodos de fácil aplicación, y confiables, se propuso evaluar una selección de aislados identificados como BGNNF ambientales y de muestras de pacientes hospitalizados mediante la aplicación de métodos fenotípicos y un método molecular (PCR).

## A. Objetivos

En el presente estudio, se desarrollaron los siguientes objetivos:

### 1. General

Caracterizar aislados del Complejo *Burkholderia cepacia* provenientes de muestras de pacientes hospitalizados y de muestras ambientales, mediante el empleo de métodos bioquímicos y semiautomatizados y una prueba molecular (PCR especie-específico) con los iniciadores (G1-G2; SPR3,G1 y SPR4.G1) para la identificación de los genomovares (I, II, III IV y V); así como determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana y los patrones de proteínas por SDS PAGE, relacionándolos con el comportamiento derivado de la aplicación de métodos fenotípicos y la PCR.

### 2. Específicos

2.1. Aislar e identificar cepas del Complejo *Burkholderia cepacia* y otros géneros relacionados, provenientes de muestras de pacientes hospitalizados y muestras ambientales, empleando métodos bioquímicos convencionales y a través de los sistemas comerciales (galerías API 20 NE e ID32 GN).

2.2. Evaluar la utilidad de dos pares de iniciadores especie-específicos (G1-G2; SPR3-SPR4) empleando la reacción en cadena de la polimerasa para diferenciar genomovares dentro del Complejo *B. cepacia*.

2.3. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana en las cepas de *B. cepacia* por el método de difusión en agar y la concentración inhibitoria mínima ante varios agentes antimicrobianos.

2.4. Analizar los patrones de proteínas totales y de la membrana externa en las cepas de *B. cepacia* estudiadas, mediante el empleo de electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Duodecil-Sulfato de sodio (SDS-PAGE), y determinar el grado de similitud entre las cepas de origen nosocomial y ambiental.

2.5. Identificar algunas bandas proteicas comunes entre las cepas de *B. cepacia* evidenciadas a través de SDS-PAGE y analizar la posible asociación con antimicrobianos específicos.

## B. Antecedentes históricos

*B. cepacia*, mejor conocida como *Pseudomonas cepacia*, fue descrita por primera vez por Walter Burkholder de la Universidad de Cornell (New York) en 1950, como un fitopatógeno, responsable de la descomposición de los bulbos de cebolla, y posteriormente reconocida como un saprófito en suelos y aguas (Morris y Roberts, 1959). A comienzo de la década de los setenta, aparece el primer reporte sobre la colonización pulmonar de pacientes con fibrosis quística, asociada con neumonía y septicemia derivada de problemas en las vías respiratorias. Para 1980, se presentó un incremento en la prevalencia e incidencia de aislamiento de *B. cepacia* en dos centros de atención de pacientes con fibrosis quística en Estados Unidos. Durante esta época, *B. cepacia* emerge como un patógeno nosocomial, multi-droga-resistente, particularmente en pacientes recluidos en unidades de cuidado intensivo y en pacientes inmunocomprometidos (Govan y Deretic, 1996; Wigley y Burton, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que los aislados ambientales de *B. cepacia*, presentan propiedades muy diversas tales como promover el crecimiento de las plantas (Hebbart y col., 1992), degradar compuestos hidrocarbonados (Abe y col., 1994; Folson y col., 1990). Dichas propiedades han despertado el interés sobre *B. cepacia* en el campo agrícola y biotecnológico (Wigley y Burton) pero debido a los problemas de salud que han causado en Estados Unidos (particularmente en los pacientes con fibrosis quística) en 1999, se impuso una moratoria a la aplicación de *B. cepacia* como agente para el biocontrol y bioremediación (Balandreau y col., 2001; Butler y col., 1995; Parke y Guriam-Sherman, 2001).

## C. Aspectos microbiológicos

### 1. Morfología

Las células del género *Burkholderia* son típicamente bacilos rectos, delgados, Gram negativos, cuya longitud varia de 1,6-3,2μ; presentan un penacho de 3 a 8 flagelos polares lo que les permite su movilidad, y no presenta esporas (Forbes y col., 2004).

## 2. Características de cultivo y bioquímicas

*B. cepacia* pertenece al grupo de bacilos no fermentadores, aerobio estricto y quimioorganotrófico cuya temperatura óptima de crecimiento es de 30-35 ºC. Crece en medios comunes de laboratorio, (agar nutritivo) y en medios selectivos como el agar MacConkey. Algunas cepas producen pigmentos solubles en agua, no fluorescente verde-amarillento, (pigmento fenazina) y pigmentos de color marrón, rojo o púrpura dependiendo de la fuente de carbono empleada para su crecimiento. Estos pigmentos no se difunden hacia la superficie del medio de cultivo, están solo presentes en las colonias. Las cepas provenientes de muestras clínicas generalmente no presentan pigmento. En agar sangre las colonias suelen ser opacas y producir hemólisis (Gilardi, 1991).

Se han descrito medios selectivos para el aislamiento de *B. cepacia*, con colorantes bacteriostáticos y antibióticos con pH bajo. Estos medios incluyen, el PCM, cuyos componentes selectivos son cristal violeta, polimixina B (PB) y ticarcilina; el OFBL, que contiene PB y bacitracina, y el medio TB-T que contiene azul tripan y tetraciclina. Estudios comparativos de estos medios, han permitido establecer que su empleo favorece la recuperación de los aislados a partir de muestras de pacientes con fibrosis quística (Carson y col., 1988; Henry y col, 1997; Koneman y col., 1999).

Desde el punto de vista bioquímico, *B. cepacia* es oxidasa y catalasa positiva, produce ácido en un amplio rango de hidratos de carbono, incluyendo lactosa y maltosa. Muchas cepas hidrolizan o-nitrophenyl-β-D- galactopiranosida (ONPG), la esculina y la gelatina y la descarboxilan lisina y la ornitina, siendo estas pruebas útiles en el diagnóstico microbiológico preliminar (Koneman y col., 1999). Sin embargo, se requiere de una amplia variedad de pruebas bioquímicas combinadas con otros métodos fenotípicos y genéticos para identificar a los miembros del C*Bc,* debido a la estrecha relación existente entre los diferentes miembros del C*Bc* y los grupos relacionados (Blecker y col, 2000; Henry y col., 2001; Holmes y col., 1994; Hughes, y col., 1996).

### 3. Hábitat

*B. cepacia* es un organismo ubicuo y puede encontrarse en diferentes ambientes, tales como suelo, agua, y plantas en una variedad de regiones geográficas, fuentes animales y muestras clínicas diferentes. Además puede crecer con requerimientos mínimos y sobrevivir en ambientes hostiles por largos períodos de tiempo en agua destilada, desinfectantes, equipos hospitalarios y farmacéuticos (Forbes y col., 2004; Koneman y col., 1999).

## D. Taxonomía del Complejo *B. cepacia*

### 1. Taxonomía

*B. cepacia* fue designada anteriormente como *P. cepacia*, *P. multivorans*, *P. kingii*, grupo Eugónico oxidador (Ballard y col., 1970; Jonson., 1970; Snell y col., 1972; Stanier y col., 1966). Una revisión taxonómica de este género, llevada a cabo desde principios de los 90, mostró la existencia de una notable heterogeneidad entre las presuntas cepas de *B. cepacia* identificadas a partir de diferentes nichos ecológicos (Kiska y col., 1996). Esta heterogeneidad entre las diferentes cepas aisladas y la carencia de esquemas de identificación, causaron problemas en el diagnóstico correcto de las especies (Coenye y col., 2001; Jones y col., 2001).

En 1992, *P. cepacia* y otros géneros que formaban parte del grupo II ARNr del género *Pseudomonas* fueron transferidos al nuevo género *Burkholderia*, perteneciente a la subdivisión beta (β) del phylum *Proteobacteria* (Yabuuchi y col., 1992). La taxonomía del nuevo género ha sufrido cambios considerables y en la actualidad incluye 31 especies validadas (Vandamme, 2002).

### 2. Complejo *B. cepacia*

Para 1992, se inició un extenso estudio polifásico taxonómico (fenotípico y genético) empleando: pruebas bioquímicas, electroforesis de proteínas celulares, perfil de ácidos grasos celulares, hibridación ADN-ADN , hibridación ADN-ARNr; llevado a cabo en la universidad

de Ghent, Bélgica. En 1997 se publicó el primer estudio, en el que se analizaron 128 cepas, aisladas de diferentes fuentes ambientales y clínicas (muestras de pacientes con fibrosis quística de varios niveles de virulencia, ambientes hospitalarios o residenciales, suelo, rizósfera y algunas especies de plantas); dando como resultado la identificación de al menos cinco especies genómicas distintas (genomovares) (Ursing y col., 1995) y referidas como el Complejo *Burkholderia cepacia*. Este Complejo de especies, presenta un alto grado de similaridad de secuencias 16S ADNr (98-99%) y moderados niveles de hibridación de ADN-ADN (30-50%) (Vandamme y col., 1997).

El nombre de Complejo *B. cepacia* (C*Bc*) fue propuesto por Vandamme y comprende un grupo o conglomerado de al menos cinco especies estrechamente relacionadas, originalmente referido como I, II, III, IV y V. El término genomovar, se introdujo para denotar cepas fenotípicamente similares pero genéticamente distintas (Vandamme, 1997).

El C*Bc,* en el presente está conformado por nueve genomovares, formalmente nombrados como: *B. cepacia,* especie tipo (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar III), *B. stabilis* (genomovar IV), *B. vietnamensis* (Genomovar V), *B. dolosa* (genomovar VI), *B. ambifaria* (genomovar VII), *B. anthina* (genomovar VIII) y *B. pyrrocinia* (genomovar IX) (LiPuma y col.,1999; Coenye, Vandamme y col., 2001, Vermis y col., 2002).

La figura 1, representa un árbol filogenético basado en la secuencia 16S ARNr, mostrando las posiciones de las especies de *Burkholderia* y géneros representativos relacionados.

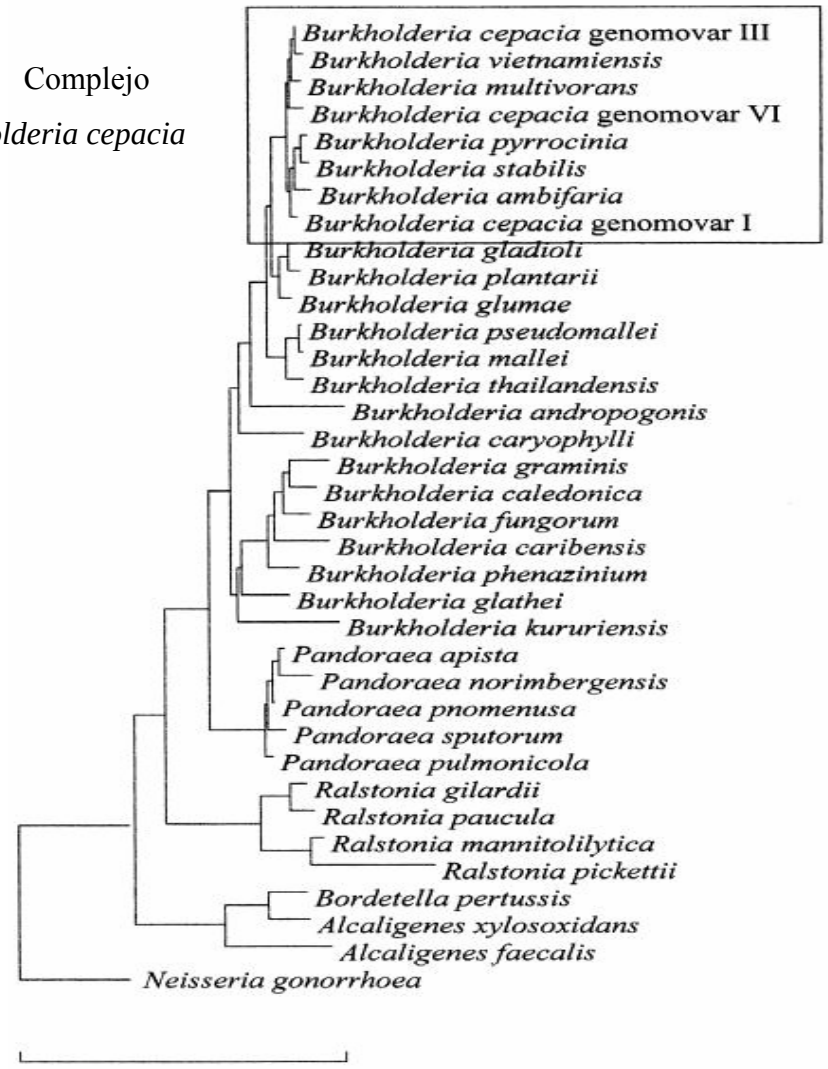



**Figura 1. Árbol filogenético basado en la secuencia 16s ARNr, mostrando la posición de las especies de *Burkholderia* y géneros relacionados.** Barra: 10% disimilaridad de secuencia. Fuente: Coenye, Vandamme y col., 2001.

## E. Importancia clínica y biotecnológica

### 1. Patogenicidad de *Burkholderia cepacia*

En el ámbito clínico *B. cepacia* constituye una importante causa de infección nosocomial, sin embargo, las infecciones epidémicas (pacientes con fibrosis quística) han recibido mayor atención que las endémicas. Estas últimas incluyen neumonía, bacteremia, infección del tracto urinario e infecciones de heridas, entre otras (Hodson, 1995; Wen-Liang y col., 1999; Wigley y Burton, 1999). Además, *B. cepacia* ha sido implicado en infecciones crónicas de las vías respiratorias inferiores, en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, en enfermos con hemoglobinopatías drepanocíticas (Kahyaoglu, Nolan y Kumar., 1995). En la actualidad, se reconoce como causa de infección nosocomial en pacientes con deterioro en sus defensas y críticamente enfermos; en estos pacientes puede ocasionar neumonía, infecciones de vías urinarias, endocarditis y bacteriemia. Esta última se produce en forma de brotes o casos aislados, al ser inoculada la bacteria de una fuente externa por un procedimiento invasivo (Doit y col., 2004).

Los sujetos con cultivos positivos para *B. cepacia,* que no presenten cambios en el ritmo de descomposición pulmonar, pueden terminar por mostrar una infección crónica con un deterioro más rápido de la función de los pulmones o un deterioro inesperadamente rápido en su estado clínico (Gil, 2001).

El patrón exacto de transmisión no es conocido, aunque se ha sugerido la transmisión persona a persona en ambientes hospitalarios; sin embargo, se han mencionado algunos factores que afectan la transmisión, como el tipo de cepa, el estado inmune del paciente y el uso de equipos médicos contaminados, por todo esto, se recomienda el aislamiento de los pacientes colonizados con el Complejo *B. cepacia* (Wen-Liang y col., 1999; Melo, 2007).

Los aislados de *B. cepacia* se han encontrado asociados a contaminación propia o frecuente de soluciones intravenosas ocasionada por la presencia de microorganismos antes de

su uso, durante el proceso de fabricación del fluido o durante el transporte y el almacenado. También se ha aislado como contaminante de desinfectantes, equipos médicos y fármacos (anestésicos o líquidos para irrigaciones), además de desarrollarse en desinfectantes como iodopovidona, compuestos de amonio cuaternario y clorheximida. Se han reportado bacteremias en pacientes con catéter venoso central, asociados con reservorios de agua contaminada, de válvulas intra-aórticas, sin embargo no se ha establecido, el que los pacientes con catéter intravenoso sean reservorios de cepas de *B. cepacia* (Wen-Liang y col., 1999).

Las medidas básicas para el control nosocomial de las infecciones por *B. cepacia* incluyen el aislamiento de contacto para el paciente colonizado y velar por una técnica aséptica en la práctica clínica. Finalmente debe mantenerse una vigilancia de las bacteremias por *B. cepacia* para evitar posibles brotes nosocomiales (Gil, 2001).

### a. Factores de virulencia

Algunos factores de virulencia o patogenicidad han sido propuestos para las cepas del C*Bc* que infectan pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, la relación entre las variedades genómicas y la virulencia no ha sido definida. Los determinantes potenciales de virulencia incluyen los pilis o fimbrias, lipopolisacáridos, producción de catalasa y la hemolisina (Holmes, 1998; LiPuma, y col., 2001**;** Melo, 2007; Sajjan, 2000).

El lipopolisacárido (LPS) favorece la respuesta inflamatoria en un alto grado y los niveles de inducción del factor de necrosis tumoral, (TNF-α) 10 veces más que el LPS de *P. aeruginosa* (Govan y Vandamme, 1996; Jones y col., 2001). La producción de catalasa, se encuentra posiblemente asociada con la resistencia de la bacteria a la fagocitosis en la enfermedad granulomatosa crónica (Speert y col., 1994) y la hemolisina actúa sobre los neutrófilos en la degradación y degranulación de los mismos (Govan y Vandamme).

Dentro de otros factores estudiados se incluyen lipasas, proteasas y sideróforos. Sin embargo, es difícil determinar si estos factores contribuyen a la patogenicidad, ya que

probablemente también depende en gran medida de las defensas del hospedero y de factores condicionantes del medio ambiente (Weingart y Morris, 1999; Sajjan y col., 2000).

### b. *Burkholderia cepacia* y fibrosis quística

En el caso particular de la fibrosis quística, la cual resulta de un defecto genético del hospedero en el transporte de sodio y cloro dentro de las células epiteliales ocasionando un anormal acumulo de mucosidad en el pulmón, es frecuente que se instauren infecciones bacterianas eventuales y crónicas siendo *Pseudomonas aeruginosa, S. aureus* y *B. cepacia* unas de las más frecuentes. (Govan y Deretic, 1996; Wen- Liang y col., 1999). A partir de 1980, *B. cepacia* emerge como un patógeno asociado con epidemias de infecciones severas del pulmón, colonizando pacientes con fibrosis quística que sucumben al síndrome cepacia: una neumonía necrotizante con fiebre, bacteremia, elevación de la velocidad de sedimentación globular y leucocitosis, culminando con un rápido y fatal deterioro clínico (Butler y col., 1995; Rodley y col., 1995; Wigley y Burton, 1999).

El pronóstico de la enfermedad pulmonar en pacientes con fibrosis quística, ocasionada por el C*Bc* varía y depende de algunos factores tales como: el genomovar, la patogenicidad en las cepas de un mismo genomovar, la virulencia y capacidad de transmisibilidad de la cepa, siendo por esto importante la correcta y rápida identificación de la bacteria para evaluar el riesgo, el pronóstico y la epidemiología de la fibrosis quística (Soni y col., 2002; Melo y col., 2007).

Todos los genomovares se han aislado en pacientes con fibrosis quística, siendo los más frecuentes *B. multivorans* (II) y *B. cenocepacia* (III). A partir de estudios epidemiológicos moleculares, cepas específicas (por ejemplo, el clon ET12 y el clon PHDC) del genomovar III de *B. cepacia*, han sido identificadas como causantes de la infección en un gran número de pacientes; sin embargo, esto no indica que este genomovar o cepas específicas del mismo sean más virulentas que otras, ya que aún no se han llevado a cabo las comparaciones rigurosas de los resultados clínicos entre personas infectadas con diferentes especies del C*Bc* o cepas

específicas. En este momento, los datos sólo sugieren su rápida diseminación de paciente a paciente y su alto índice de transmisibilidad. Cepas pertenecientes al genomovar I, han sido aisladas particularmente en ambientes y raramente cultivadas de pacientes con fibrosis quística (Sajjan y col., 2000; Soni y col., 2002).

Por todo lo anterior, es importante precisar si las amplias diferencias en la clínica y el pronóstico de pacientes colonizados con el C*Bc*, dependen del genomovar involucrado en el proceso infeccioso o de factores aún no bien determinados.

### c. Resistencia antimicrobiana del Complejo *B. cepacia*

El tratamiento de las infecciones provocadas por *B. cepacia* constituye un problema grave debido a que presenta resistencia a múltiples antimicrobianos que incluyen resistencia intrínseca a aminoglicósidos y resistencia inducible a betalactámicos (Rajyaguru y Muszynski, 1997; Aaron y col., 2000).

Existen otros factores que pueden estar relacionados con la resistencia antimicrobiana de esta bacteria como: permeabilidad selectiva de la pared celular, alteraciones celulares, degradación enzimática de antibióticos y bomba de eflujo (Parr y col., 1987; Miller, Gilligan y col., 2003). Todos estos factores contribuyen a dificultar la aplicación de un tratamiento antimicrobiano adecuado para los pacientes colonizados con *B. cepacia*. Sin embargo, un número de antimicrobianos tales como: piperacilina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima y trimetoprim sulfametoxazol han demostrado ser altamente efectivos particularmente en pacientes inmunocomprometidos (Pitt y col., 1996; Yu y col., 1999).

*B. cepacia* es resistente a las penicilinas pero con sensibilidad variable a las asociaciones de penicilinas e inhibidores de betalactamasas (piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulánico). Es resistente a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, pero sin afectar por completo a ceftazidima, cefepima, moxobactam y aztreonam (Bonacorsi y col., 1999; Gales y col., 2002). Aunque *B. cepacia* presenta resistencia intrínseca

a los aminoglicósidos, se ha observado sensibilidad de la bacteria *in vitro* al combinarse los aminoglicósidos con los betalactámicos, mostrando la combinación de ceftazidima y amikacina la mejor actividad sinérgica. También se han ensayado *in vitro* combinaciones de cloranfenicol-ceftazidima y cloranfenicol-minocilina e incluso asociaciones de tres fármacos, entre ellos un betalactámico, ciprofloxacina y tobramicina (Bonacorsi y col., 1999; Cantón y col., 2002).

## 2. Papel de *B. cepacia* en la agricultura

En los últimos años miembros del C*Bc* han emergido como agentes de importancia en estudios relacionados con la agricultura. Esto es debido fundamentalmente a la producción de una amplia gama de metabolitos activos que influyen positivamente sobre el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas, presenta un amplio espectro nutricional y no requiere de factores de crecimiento para su desarrollo. Así se ha encontrado como un género dominante en las comunidades microbianas del suelo, expresando su extraordinaria versatilidad metabólica, degradando compuestos aromáticos clorados (tóxicos presentes en complejos herbicidas y pesticidas, algunos con potencia carcinogénica) para utilizarlo como fuente de carbono y energía (Daubaras y col., 1996; Holmes y col., 1998; Dalmastri y col., 2003; Hernández y col., 2004; Balwin y col., 2007); puede antagonizar y represar muchos patógenos del suelo, y plantas tales como: *Alternaria Aphanomyces* y *Rhizoctonia solani*, patógenos, los cuales atacan plantas de interés agrícola como oleaginosas, guisantes y hortalizas. (Bowers y Parke, 1993; Cartwright y col., 1995; Kiska y col., 1996; Bevivino, y col.,1994). De aquí la importancia, de trabajar con su parte activa, es decir, con los metabolitos secundarios que al parecer son los responsables de los efectos benéficos en las plantas. Sin embargo, existe incertidumbre con respecto al potencial patogénico de la bacteria, debido a que los estudios realizados para distinguir la virulencia entre los aislados ambientales y clínicos han producido resultados ambiguos, razón por lo que no se puede discernir sobre la ausencia o presencia de potencial patogénico en los aislados ambientales y su uso para propósitos de productividad agrícola y biorremediación debe ser aplicado con precaución (Holmes y col., 1998; Meinikow y col., 2000 **;** Coenye y Vandamme, 2003).

## F. Identificación de miembros del complejo *B. cepacia*

### 1. Métodos fenotípicos

Los métodos de identificación fenotípicos se basan en características físicas o metabólicas observables de las bacterias, es decir, la identificación se realiza por el análisis de la información obtenida por las pruebas de laboratorio que describen los perfiles característicos, en el caso de los BGNNF y especies del C*Bc* , la combinación de métodos microbiológicos convencionales y sistemas comerciales son una herramienta útil aplicados eficazmente en un tiempo y a un costo efectivo (Kiska y col., 1996; Koneman y col.,1999; Wiedmann y col., 2000; Henry y col., 2001).

#### a. Métodos convencionales y sistemas comerciales

Los métodos convencionales incluyen análisis bacteriológicos, de rutina basados en las características de cultivo de *B. cepacia* y géneros relacionados, empleando esquemas de identificación y protocolos secundarios que permitan la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores, separar géneros similares y distinguir entre especies (Koneman y col.,1999). El estudio fenotípico se realiza tomando en cuenta las características morfológicas y bioquímicas entre las cuales son importantes: coloración al Gram, movilidad y morfología flagelar, crecimiento en medio selectivo como el agar MacConkey, indofenol oxidasa, utilización de azúcares, descarboxilación de aminoácidos, oxidación de glucosa, maltosa, manitol y xilosa en el medio basal oxidativo fermentativo. Se recomienda utilizar medios selectivos en el procesamiento de muestras clínicas tales como: medio PCM (polimixina B, cristal violeta y ticarcilina) y medio OFBL (polimixina B y bacitracina) a fin de inhibir *P. aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos (Carson y col., 1988; Koneman y col., 1999; Henry y col., 2001).

En el caso de aislados ambientales se recomienda la incubación de los medios de cultivo una vez sembrados a 30$^{o}$ C por espacio de 2 a 5 días. Los aislados clínicos podrán incubarse a temperatura entre 30$^{o}$ C a 37$^{o}$ C por un tiempo de 24 a 48 horas; las pruebas bioquímicas deben observarse por espacio de una semana para considerar el resultado final,

particularmente, las reacciones de oxidación de azúcares y derivados alcohólicos y la descarboxilación de aminoácidos, donde se observan reacciones lentas, debido a la escasa cantidad de productos finales. En cuanto al empleo de sistemas semiautomatizados y automatizados, se dispone de varios tipos de galerías bioquímicas (API 20 NE, Vitek GNI, Vitek NFC, Microscan), basados en técnicas estandarizadas y precisas cuyos resultados son iguales o mejores que los procedimientos convencionales y requieren menos tiempo de incubación. Sin embargo, debido a que estos sistemas dependen del desarrollo bacteriano y de la formación de productos bioquímicos en medios convencionales o en sustratos nutritivos escasos, sólo pueden identificarse las especies más activas bioquímicamente con un grado aceptable de precisión (Burdash, y col**.,** 1979; Koneman y col., 1999; Murray y col., 1999; van Pelt y col., 1999).

Tanto los métodos convencionales como los sistemas de identificación resultan insuficientes para el diagnóstico microbiológico certero de miembros del C*Bc* y su relación con otros bacilos Gram negativos no fermentadores, tales como: *Ralstonia*, *Stenotrophomonas* y *Alcaligenes* spp. (Blecker y col., 2000 ).

Algunas pruebas fenotípicas han permitido la separación entre *B. cepacia* y géneros relacionados y entre los genomovares (Henry y col., 2001) (Tabla 1). Sin embargo, cuando ocurren variaciones fenotípicas en cepas de la misma especie, suelen presentarse discrepancias en los resultados obtenidos con diferentes metodologías, por lo que la identificación basada en métodos fenotípicos debe ser confirmada por laboratorios de referencia equipados con métodos moleculares que permitan un diagnóstico certero y eficaz de los miembros del C*Bc* (van Pelt y col., 1999; Henry y col., 2001; Vermis y col., 2002).

Adicional a las pruebas bioquímicas, la caracterización fenotípica incluye: análisis de proteínas totales por electroforesis en gel de poliacrilamida duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) y análisis de ácidos grasos, ambas pruebas inicialmente permiten agrupar y establecer comparaciones a un gran número de especies estrechamente relacionadas (Segonds y col., 1999., Coenye, Vandamme y col.,2001; Vandamme y col., 2002).

### b. Análisis de Proteínas por SDS-PAGE

El análisis de proteínas totales por SDS-PAGE, conjuntamente con el análisis computarizado asistido por el patrón de bandas proteíco, se han empleado como uno de los primeros métodos de identificación de miembros del complejo, ya que permiten comparar gran número de bacterias y grupo de cepas estrechamente relacionadas (Vandamme y col., 1997). Este método presenta relativa simplicidad y bajo costo en relación al análisis de perfiles de ácidos grasos. Sin embargo, algunas veces, la comparación de los resultados obtenidos por este método con los obtenidos por otras técnicas reflejan discrepancias severas y discriminación baja entre los genomovares I, III, VII, VIII y IX. Una de las desventajas de este método para la identificación de *B. cepacia* es que muchas veces, se presentan distorsiones en una parte de los patrones de bandas proteicas y es necesario comparar el análisis de los patrones de proteínas con el resultado del análisis numérico para la delineación de los conglomerados en los dendogramas (Vandamme y col., 1997, Coenye, Vandamme y col., 2001; Vermis y col., 2002; Dalmastri y col., 2003).

### c. Análisis de ácidos grasos

Una variedad de lípidos están presentes en las células bacterianas. Los lípidos polares forman parte de la bicapa de la membrana de la célula bacteriana y, dentro de estos, los ácidos grasos son el mayor constituyente de lípidos y lipopolisacárido. De manera que estos se han empleado extensamente para propósitos taxonómicos. En el caso del alto grado de automatización del análisis de ácidos grasos, la relativa simplicidad y el bajo costo hacen esta técnica apropiada para el diagnóstico de los miembros del C*Bc*; aunque estudios llevados a cabo por Vandamme y col. (1997) Vandamme y col. (2000), reportan dificultades para distinguir entre las cinco primeras especies conocidas del complejo y también falla en las diferenciación entre miembros del Complejo *B. cepacia* y *B. gladioli* (Clode y col., 1999).

## Tabla 1. Características del complejo *B. cepacia* y organismos fenotípicamente similares

| Prueba bioquímica | % de cepas positivas para las pruebas según especie y genomovar | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Genomovar I** | **Genomovar II** | **Genomovar III** | **Genomovar IV** | **Genomovar V** | **Genomovar VI** | **Genomovar VII** | ***B. gladioli*** | *Pandoraea species* | ***R. pickettii*** |
| **Oxidación de** : | | | | | | | | | | |
| Glucosa | 100 | 100 | 95(96) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 11(89) | 100 |
| Maltosa | 39(70) | 98(99) | 78(86) | 93 | 97(100) | 100 | 100 | 0 | 0 | 92 |
| Lactosa | 61(91) | 100 | 79(88) | 93 | 97(100) | 100 | 100 | 0 | 0 | 92 |
| Xylosa | 87(100) | 98(99) | 88(92) | 44(78) | 75(86) | 100 | 100 | 96 | 0 | 83(92) |
| Sacarosa | 87(91) | 0 | 88(91) | 0 | 94(97) | 0 | 94 | 0 | 0 | 0 |
| Adonitol | 70(78) | 91(92) | 79(87) | 78(96) | 0 | 100 | 100 | 93(96) | 0 | 0 |
| Lisina decarboxylasa | 100 | 53 | 99 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Ornitina decarboxylasa | 30 | 0 | 71 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Crecimiento a 42°C | 43 | 100 | 84 | 0 | 100 | 100 | 22 | 4 | 89 | 83 |
| PNPG o ONPG | 100 | 98 | 99 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| Oxidasa | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 67 | 100 |
| Reducción de Nitrato | 4 | 94 | 31 | 4 | 47 | 100 | 67 | 33 | 11 | 17 |
| Licuefaccion de Gelatina | 74 | 2 | 55 | 93 | 0 | 0 | 94 | 70 | 0 | 33 |
| Hidrólisis de esculina | 56 | 2 | 33 | 0 | 0 | 0 | 56 | 11 | 0 | 0 |
| Crecimiento en agar | | | | | | | | | | |
| MacConkey | 83 | 96 | 84 | 93 | 83 | 100 | 100 | 96 | 100 | 50 |
| Pigmento marrón | 4 | 2 | 14 | 0 | 0 | 0 | 6 | 33 | 0 | 0 |
| Pigmento amarillo | 78 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 44 | 0 | 0 |
| Alfa hemolisis | 9 | 1 | 9 | 0 | 36 | 0 | 83 | 22 | 0 | 0 |
| Beta hemolisis | 9 | 0 | 3 | 0 | 36 | 0 | 83 | 22 | 0 | 0 |
| BCSA | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 18 | 100 | 100 |
| API 20 NE | 96 | 94 | 86 | 4 | 83 | 100 | 100 | 70 | 0 | 0 |
| BCESM | 0 | 0 | 63 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fuente de la muestra | | | | | | | | | | |
| Fibrosis quística (FQ) | 26 | 88 | 76 | 56 | 56 | 100 | 22 | 82 | 100 | 75 |
| Clínica (No FQ) | 30 | 6 | 20 | 33 | 19 | 0 | 0 | 11 | 0 | 25 |
| Ambiental | 44 | 6 | 4 | 11 | 25 | 0 | 78 | 7 | 0 | 0 |

BCSA: agar selectivo para *B. cepacia*; BCESM: cepas de l a genomovariedad III

Fuente: Henry y col. (2001)

## 2. Métodos moleculares

Dentro de los métodos de tipificación molecular se tiene la hibridación de ADN-ADN, reacción en cadena de polimerasa (PCR: por sus siglas en inglés), análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP: por sus siglas en inglés) del gen *rec*A, ribotipificación, entre otros, los cuales en definitiva permiten la diferenciación de especies de interés dentro del C*Bc* (Govan y Deretic, 1996; Blecker y col., 2000; Wiedmann y col., 2000; Vandamme y col., 2000; Vandamme y col., 2002; Vermis y col., 2002 ). La aplicación de estos métodos debe ofrecer eficacia y rápida detección de este grupo de bacterias, además de diferenciar características particulares presentes en aislados provenientes de diferentes fuentes (ambientales y nosocomiales) y evaluar el riesgo en relación con el potencial patógenico de los aislados ambientales (Segonds y col., 1999; Salles y col., 2002; Melo y col., 2007).

### a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Previo al reconocimiento y designación del Complejo *B. cepacia*, se describieron variados métodos basados en reacciones de amplificación de ADN, especialmente la de la reacción en cadena de la polimerasa, para la detección directa de *B. cepacia* y géneros relacionados en muestras clínicas, y ha sido adaptada para ser usada como una herramienta de tipificación en los últimos años. En general existen tres grupos de variantes de la PCR: aquellas en las que utilizando cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes separados por una distancia no superior a la que la Taq polimerasa puede amplificar. Estas variantes suelen dar patrones de amplificación constituidos por un número variable de bandas de ADN. Variantes en las que previa o posterior a la amplificación génica se somete el genoma o producto amplificado a digestión con enzimas de restricción, y aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación (Callaghan y col., 1994; Campbell y col.,1995; Karpati y Jonasson, 1996).

Los métodos desarrollados en los últimos años aplicando PCR, han incluido el uso de secuencias polimórficas de los genes ADNr 16S y 23S para el desarrollo de pruebas rápidas y

la identificación de los cinco primeros miembros (Bauerfeind y col., 1999; Lipuma, 1999). Estas técnicas han permitido identificar los genomovares II y V, pero no distinguen entre *B. cepacia* I y III y *B. stabilis* (IV), identificando estas últimas como un grupo. Las pruebas basadas en PCR especie-específico ADNr descritas por Whitby y col. (2000), permiten separar el genomovar III de *B. stabilis*, pero ninguno de estos puede ser distinguido del genomovar I.

Mahenthiralingam y col., (2000), desarrollaron pruebas de identificación del C*Bc* basados en el polimorfismo presente en el gen *rec*A cuyo producto es una proteína *RecA*, esencial para la reparación y recombinación del ADN, estando debidamente documentada su utilidad en estudios del C*Bc*. Iniciadores especie-específicos derivados del gen *rec*A conjuntamente con RFLP, permitieron el reconocimiento de múltiples tipos dentro de cada genomovar. El gen *rec*A presentó 94-95% de similaridad entre los diferentes genomovares y 98-99% de similaridad dentro de los genomovares. El principal inconveniente de esta técnica es la falta de reproducibilidad que puede presentar debida tal vez a la presencia de bandas de ADN de baja densidad ocasionada por diferencias en la relación de la concentración del ADN molde y del cebador (Coenye, Vandamme y col., 2001).

En general, la PCR es una técnica simple y rápida que ha sido sucesivamente aplicada para la delineación de variedades genómicas del C*Bc* en un amplio rango de cepas provenientes de muestras clínicas y fuentes ambientales. La discriminación es buena y puede correlacionarse con otras técnicas de genotipificación. El poder discriminatorio es variable de acuerdo al número y secuencia de los iniciadores y a las condiciones de amplificación. aunque requiere de varios factores técnicos para ser estrictamente estandarizado con una reproducibilidad óptima (Henry y col., 2001; LiPuma y col., 2001).

### b. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

En biología molecular, el término polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre cepas de una misma especie. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN de diferentes cepas de una especie, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción (Koneman y col., 1999, Coenye y col., 2001).

Estudios llevados a cabo por la técnica de RFLP en cepas de referencia del C*Bc,* así como aquellos provenientes de muestras clínicas y ambientales, empleando tres enzimas de restricción (*Alu* I, *Cfo*I y *Dde*) han revelado un poder discriminatorio limitado, al generar patrones de restricción idénticos en los genomovares II y IV; sin embargo, han permitido la obtención de patrones heterogéneos *para B. ambifaria*, *B. anthina* y *B. pyrrocinia*, así como también se pudieron distinguir clones virulentos dentro del genomovar III, el cual juega un papel importante en la fibrosis quistica (Vermis y col., 2002).

El desarrollo de la PCR especie-específico conjuntamente con RFLP de la región ADNr 16S ha permitido identificar *B. cepacia* genomovar II, IV, V y VI. Sin embargo, los genomovares I, III y VII no se han distinguido de los genomovares VII y IX (Segonds y col., 1999; Fiore y col., 2001).

### c. Ribotipificación

El método de ribotipificación utiliza secuencias iniciadoras, complementarias a secuencias conservadas de genes que codifican subunidades 16S e 23S del ARNr, para diferenciar especies de bacterias con base en el polimorfismo de la región espaciadora intergénica 16S-

23S del operon del ARNr. Todas estas bacterias poseen múltiples copias de genes que codifican el ARNr. Así mismo, cada operon de ARNr, contiene una región espaciadora con un tamaño potencialmente diferente al amplificado de estas regiones, pudiendo originar un perfil característico. Esta variación en número, tamaño y composición de las regiones espaciadoras permite una mayor o menor discriminación entre aislados (Máttar, 2000).

Normalmente, si se combina esta técnica con una digestión por enzimas de restricción da lugar a dos productos de amplificación con la finalidad de aumentar su poder discriminatorio, en casos en que un ribotipado por PCR no detecte polimorfismos de las regiones espaciadoras (Brosh y col., 1996). En este sentido, el ribotipado puede tener aplicaciones tanto taxonómicas como epidemiológicas.

En investigaciones realizadas para la identificación del C*Bc*, la ribotipificación ha presentado un gran potencial para la distinción entre cepas de los genomovares I, III, IV, V, VI y *B. gladioli*, empleando las enzimas de restricción *Pvu*II y *Eco*RI y a su vez ha permitido observar la heterogeneidad genética en cepas de los genomovares I, III y IV ( LiPuma y col., 1991; Brisse y col., 2000).

# II. MATERIALES Y MÉTODOS

## A. Cepas bacterianas

Se colectaron 156 cepas de BGNNF o *Pseudomonas* durante el período enero de 2001 hasta diciembre de 2002, de las cuales se seleccionaron al azar 74 aislados. De estos 49 provenientes de pacientes de servicios hospitalarios de tres ciudades de Venezuela (Caracas, Cumaná y Mérida) y 25 de cepas ambientales (agua, insectos y plantas) de las áreas gegráficas señaladas. Se empleó la cepa *B. cepacia* CVCM 626 como control, la cual es derivada de la cepa ATCC 25416.

## B. Caracterización fenotípica del complejo *Burkholderia cepacia* y otros organismos relacionados

Se emplearon métodos estandarizados basados en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Koneman y col., 1999, Murray y col., 1999) y los protocolos complementarios basados en las características morfológicas y bioquímicas (Apéndices 1, 3, 4 y 5).

### 1. Siembra y aislamiento

Las diferentes cepas fueron subcultivados en agar Luria Bertani (LB) y en agar MacConkey, se incubaron por un período de 24 a 72 h, a una temperatura de 30$^{o}$ C para los aislados ambientales, y a 37$^{o}$ C en condiciones de aerobiosis en el caso de los bacterias nosocomiales. Para el aislamiento, las colonias fueron seleccionadas tomando en consideración aspecto, consistencia, tamaño, forma y producción de pigmento.

La pureza de las colonias se comprobó a través de la coloración de Gram, observándose al microscopio la presencia de bacilos Gram negativos típicos.

### 2. Caracterización bioquímica (Métodos convencionales)

Para la identificación y caracterización de los diferentes BGNNF a nivel de género y especie se emplearon pruebas bioquímicas preliminares tales como: oxidasa, fermentación de los azúcares glucosa y lactosa empleando el agar Kligler, motilidad, oxidación de glucosa. Se incubaron y examinaron por espacio de 24 hasta 96 horas a 30$^{o}$ C (aislados ambientales) y 37$^{o}$ C (aislados nosocomiales) y el crecimiento a 42$^{o}$ C en agar LB durante 24 a 48 horas.

### 3. Caracterización bioquímica. Sistema semiautomatizado ATB/PLUS

Se utilizó el sistema comercial semiautomatizado ATB/PLUS, (software de identificación numérica) empleando las galerías API 20 NE e ID 32 GN (BioMérieux) y, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se preparó una suspensión de las cepas, inoculadas luego en las diferentes galerías. En el caso de las galerías API 20 NE, se incubaron a 30$^{o}$ C por 24 hasta 96 horas. Las lecturas de las reacciones producidas, espontáneas o reveladas mediante la adición de reactivos se llevaron a cabo utilizando una tabla de lectura respectiva y registrando los resultados mediante el sistema semiautomatizado ATB/PLUS con un programa de identificación para BGNNF. Para la galería ID 32 GN se incubaron a 30$^{o}$ C por 24 a 48 horas y las lecturas se realizaron directamente mediante el Sistema ATB/Plus.

### 4. Pruebas bioquímicas complementarias

Se compararon los perfiles obtenidos por ambas galerías y se realizaron pruebas bioquímicas complementarias que permitieron despejar las inconsistencias del sistema o perfiles erróneos. Para ello se emplearon pruebas tales como: oxidación-fermentación: maltosa/manitol/xylosa /fructosa/lactosa; arginina dihidrolasa; lisina descarboxilasa; hidrólisis de la esculina, gelatina; la incubación se llevó a cabo bajo iguales condiciones que las pruebas preliminares. También se realizó la prueba de resistencia al taxo de la polimixina B (300 U) y al crecimiento en agar LB con polimixina B (600 U) a 30º C y 37º C para aislados ambientales y nosocomiales respectivamente, incubando por 24 a 48 horas. Una vez identificada la cepa, se

procedió a su conservación en agar LB a temperatura ambiente (taco) y en caldo tripticasa soya con glicerol al 20% a temperatura de –20$^{o}$ C.

## C. Caracterización molecular de miembros del Complejo *Burkholderia cepacia* a través de iniciadores especie-específico por PCR

### 1. Aislamiento del ADN genómico

El aislamiento del ADN genómico se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Mahenthiralingam y col. (1997). El ADN se resuspendió en 250 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) a una concentración de 1 µg/ml. La muestra fue visualizada mediante electroforesis en geles de agarosa en buffer TBE 0.5X (Apéndice 6).

### 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El protocolo a seguir se llevó a cabo por el método descrito por Whitby y col. (2000) utilizando un termociclador Perkin Elmer GeneAmp (PCR System 2400). Se prepararon reacciones de 50 µl con 800 pmoles de cada iniciador, 100 ng de ADN genómico, 200 µM de cada dNTP y 1,25 U de Taq Polimerasa, en $MgCl_2$ 2 mM. La desnaturalización inicial se llevó cabo a 95 $^{o}$C por 3 min, con 30 ciclos repetidos de amplificación de hibridación a 60 $^{o}$C por 1 min, extensión a 72 $^{o}$C por 1 min, 30 seg y desnaturalización a 94 $^{o}$C por 1 min, con un tiempo final de extensión de 5 min a 75 $^{o}$C. Los productos amplificados fueron visualizados en electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó como control positivo una cepa de *B. cepacia* CVCM 626 derivada de la cepa ATCC 25416, y como control negativo se utilizó *E. coli* C-137. Los iniciadores utilizados fueron: PSL PSR, G1-G2, SPR3-G1,-SPR4-G1 (Tabla 2).

El par de iniciadores PSL-PSR se empleó como control para amplificar un producto de aproximadamente 300 pb de una región ARNr conservada en todas las bacterias (PCR Universal). Los iniciadores G1-G2 amplifican un producto de 1300 pb de los genomovares I,

III, y *B. stabilis*. Los iniciadores SPR3-G1 amplifican en cepas de los genomovares I y II (1200 pb), y el par SPR4-G1 amplifica en aislados de los genomovares I y *B. stabilis* (1200pb). Se estableció una correlación entre la identificación fenotípica y los genomovares determinados por la técnica de PCR, según esquema algorítmico (Figura 2) previamente descrito (Whitby y col., 2000).

**Tabla 2. Iniciadores empleados en la PCR para la identificación de los genomovares I, II. III y IV del Complejo *B. cepacia.***

| Iniciadores | Secuencia 5'-3 ' | Sitio Blanco |
|---|---|---|
| G1 | GCCATGGATACTCCAAAGGA | 153-133 (23S) |
| G2 | TCGGAATCCTGCTGAGAGGC | 938-958 (16S) |
| SPR3 | TCGGAAAGAGACCGGCG | 969-985 (16S) |
| SPR4 | TCGAAAGAACCATA | 969-985 (16S) |
| PSL * | AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA | 780-803 (16S) |
| PSR* | ACTTAACCCAACATCTACGCACGAC | 1092 -1068 (16S) |

* : Iniciadores universales para genoma bacteriano ( 300 pb)

Whitby y col.(2000)

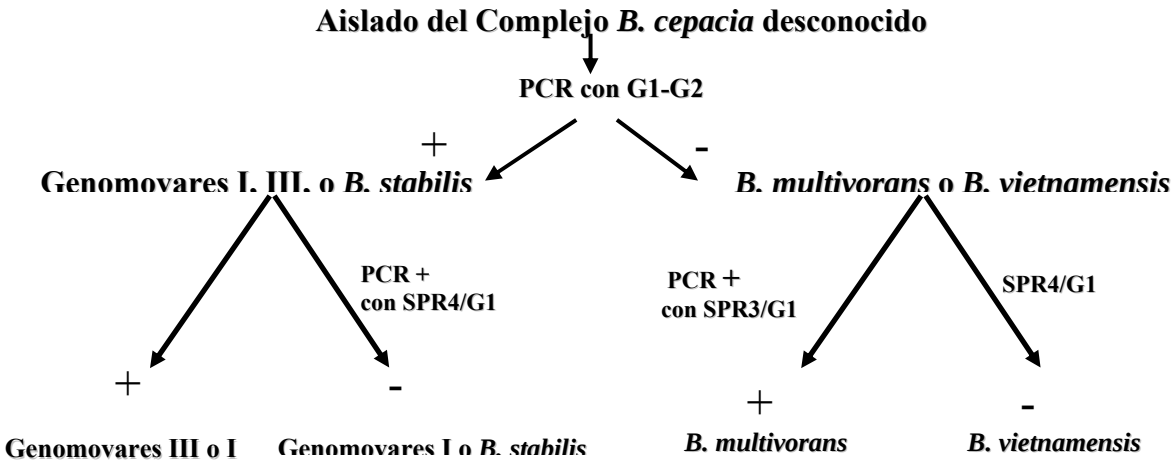



**Figura 2: Algoritmo de PCR para identificar las especies y genomovares del Complejo *B. cepacia* (I, II, III, IV y V)**

Fuente: Whitby y col. (2000).

## D. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en aislados ambientales y nosocomiales de *B. cepacia*

### 1. Método de difusión del disco en agar

Se determinaron los patrones de susceptibilidad antimicrobianos a los aislados identificados como *B. cepacia*, mediante el método de difusión del disco en agar, en medio Müeller-Hinton (Difco Laboratories), de acuerdo al criterio del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Las placas de agar Müeller-Hinton fueron inoculados con una suspensión bacteriana equivalente al patrón 0,5 McFarland y luego fueron colocados los diferentes discos de antimicrobianos (Becton Dickinson). Las zonas de inhibición de crecimiento (en milímetros) fueron registradas después de incubación a 37º C por 24 horas. Se empleó como cepa control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los antimicrobianos probados fueron imipenem (IPM) 10 μg, tobramicina (TOB) 10 μg, amikacina (AK) 30 μg, aztreonam (ATM) 30 μg, ciprofloxacina (CIP) 5 μg, ceftazidima (CAZ) 30 μg, piperacillina (PIP) 100 μg, piperacillina-tazobactam (TZP) 100/10 μg y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 1,25/23,75 μg.

### 2. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CIM para los diferentes antimicrobianos fue determinada por el método de dilución, en medio Müeller-Hinton según lo recomendado por el CLSI (2006), para lo cual se utilizaron soluciones stock de los diferentes antimicrobianos obtenidos comercialmente y reconstituidos según las indicaciones del fabricante. Para realizar el control de calidad, se emplearon cepas bacterianas con espectro de sensibilidad conocido, utilizando, las cepas certificadas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* 25922.

## E. Electroforesis de proteínas totales en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio

### 1. Preparación de extractos de proteínas totales

Aislados representativos de los diferentes genomovares ambientales y nosocomiales fueron subcultivados en 20 ml de caldo LB en frascos erlenmeyer de 100 ml de capacidad en rotador a 100 rpm, incubados a 30 ºC durante 18 horas. Posteriormente, cada cultivo se centrifugó a 5000g x por 15 min a temperatura ambiente. Los sedimentos fueron lavados con 500 µl de buffer fosfato, pH 7,2, y centrifugados 13000g por 15 min. Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos usando buffer Tris HCl 45Mm, 0,2%, N-lauroylsarcosine, pH 6,8, según el procedimiento descrito por Wu y col., (1997). Posteriormente, los sedimentos fueron homogeneizados brevemente en 500 µl de buffer de extracción conteniendo 45mM Tris-HCl, 0,2% N-Lauroylsarcosine, pH 6,8. Después de incubación a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugó la mezcla a 10000g por 2 min y se recolectó el sobrenadante. Las proteínas contenidas en el sobrenadante fueron determinadas de acuerdo al ensayo de proteínas de Lowry modificado (Stoscheck, 1990), empleando como estándar albúmina bovina (Apéndice 7).

### 2. Purificación de proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa fueron purificadas de acuerdo al método descrito por Zhang y col. (2000). Los aislados fueron incubados en 30 ml de caldo LB a 30 ºC, por 18h, con agitación constante a 100 rpm. Luego, 20 ml de cada cultivo fue centrifugado a 5000g, por 15 min, a temperatura ambiente. Los sedimentos fueron lavados con 20 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7,2 y centrifugados, a 5000g por 15 min. Los sobrenadantes fueron descartados y cada sedimento fue resuspendido en 3 ml de buffer fosfato 50 mM homogeneizado y centrifugado a 6000g, por 10 min a 4 ºC. Los sobrenadantes fueron decantados y recentrifugados a 260000g (50000 rpm, Sorvall TV865) por 30 min a 4 ºC. Los sedimentos fueron lavados una vez con buffer fosfato 50 mM y luego, resuspendidos en 300 µl de buffer fosfato e incubados con 1,5% N-Lauroylsarcosine por 30 min a temperatura

ambiente. Después de la centrifugación a 260000g por 30 min a 4 ºC, los sobrenadantes fueron descartados y los sedimentos resuspendidos en buffer para extracción de proteínas como se describió previamente. Las proteínas de membrana sarkosyl-insolubles fueron recobradas por ultracentrifugación a 80000 rpm (A100, 30º, rotor Beckman) por 30 min. Cada sedimento fue resuspendido en 60 µl de buffer para la extracción de proteínas y conservado a -20º C (Apéndice 8ª y 8B).

### 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%

Los extractos de proteínas totales y proteínas de membrana externa de los aislados de *B. cepacia* fueron colocados en un gel de 10% de poliacrilamida usando un sistema SDS-PAGE discontinuo, según lo descrito por Wu y col., (1997). Muestras de 60-80 µg de proteínas fueron desnaturalizadas por ebullición por 2 min en buffer solubilizante previo a la carga en el gel. El gel de poliacrilamida de 26cm x 12,5cm x 1,5mm fue colocado en una unidad horizontal (LKB 2117 Multiphor II Pharmacia Biotech), la corrida electroforética se llevó a voltaje constante de 60 volts, por 18-20 h, con la temperatura del gel mantenida a 15 ºC. Los geles fueron teñidos primero con 0,1% de azul brillante de Coomassie en 10% de ácido acético y 50% de metanol se decoloró con metanol/ácido acético/$H_2O$ (5:1:4), y seguidamente se sometió a coloración con nitrato de plata (Goldman y col., 1981). El análisis densitométrico de los geles se llevó a cabo usando el programa SigmaGel (Jandel Scientific software) y los valores $R_f$ de la proteínas individuales fueron calculados para obtener el peso molecular de las diferentes bandas. Se empleo un marcador de proteínas en un rango 10-225kDa de peso molecular (Promega Corporation).

## F. Análisis de datos

Los resultados de las diferentes determinaciones fueron representados en tablas y/o figuras. Los resultados obtenidos a través de los sistemas API 20NE e ID 32GN se reportaron de acuerdo a los criterios del fabricante en términos de aceptable: % de identificación mayor al 90%; dudoso: perfil con dos posibilidades a nivel de género o especie (se requieren pruebas

bioquímicas confirmatorias); inaceptable e incorrecto: el perfil presenta más de tres posibilidades a nivel de género o especie.

La sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales, sistemas comerciales y método de reacción en cadena de la polimerasa, fue calculada por el método estándar propuesto por Morton y col., (1993).

Se realizó un análisis de clasificación basado en los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas sobre el C*Bc* mediante los métodos convencionales, se aplicó un análisis multivariado (conglomerado de datos) sobre los datos de presencia-ausencia, con el fin de obtener grupos de cepas con las mismas características funcionales. Se utilizó como medida la distancia euclidiana al cuadrado, y como criterio de agrupación el método del "vecino más lejano" (Dice, 1945). A partir del dendograma obtenido, se definieron los grupos o conglomerados.

Se evaluó el poder discriminatorio de los métodos fenotípicos y la prueba molecular PCR para la identificación del C*Bc*, determinando la probabilidad promedio de que el marcador utilizado (método aplicado) clasificara en 2 tipos distintos a 2 cepas no relacionadas escogidas al azar de la población de un determinado taxón. El poder discriminatorio se cuantificó con el Índice de Diversidad de Simpson, según la fórmula:

$$ID= 1-1/N\ (N-1)S\ ^{s}_{j=1}n_j\ (n_j-1)$$

N= nº de cepas; S=nº tipos distintos; $n_j$= nº cepas pertenecientes al tipo J.

El valor de ID depende del número de tipos distintos definidos por el marcador y de la homogeneidad con la que la población estudiada se distribuye en los "n" tipos. Idealmente el valor de ID debe ser superior a 0,95 (Hunter y Gaston., 1988).

Para determinar los patrones de resistencia del C*Bc* para los diferentes antimicrobianos se construyó una matriz basada en resistencia (+) o sensibilidad (–) para nueve antibióticos y se elaboró un dendograma de coeficiente simple asociativo a través del método de agrupamiento no ponderado de distancia promedio (UPGMA).

En el caso de las proteínas se realizó un análisis de conglomerados, basado en la presencia o ausencia de bandas proteicas y se elaboró el dendograma respectivo mediante el método de agrupamiento. Se calculó el índice del coeficiente de similaridad (Dice, 1945) entre los grupos formados por los patrones de bandas en SDS-PAGE, usando la fórmula: S (%) =2X x 100/a+b, donde (a) representa el total de bandas en el carril 1, (b) el número total de bandas en el carril 2, y X el total del número similar de bandas en ambos carriles (Malik y col., 2003). Los datos fueron analizados usando el programa SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., USA).

# III. RESULTADOS

## A. Identificación bioquímica de *Burkholderia cepacia* y géneros relacionados por métodos convencionales

### 1. Características bioquímicas

Mediante la aplicación de un conjunto de pruebas morfológicas y bioquímicas preliminares, y el empleo de los métodos descritos en la sección de materiales y métodos, se procedió a la identificación de las 74 cepas incluidas en este estudio. Se obtuvieron los siguientes resultados: *Burkholderia cepacia*, 28 (37,83%); *Stenotrophomonas maltophilia*, 15 (20,27%); *Achromobater xylosoxidans*, 9 (12,16%) *Pseudomonas* sp, 11 (14,86%), y los 11 restantes (14,86%) BGNF (*Pseudomonas alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. luteola*, *P. fluorescens* y *Ralstonia picketti*) y 2 BGNNF no fueron identificados (Tabla 3). Los métodos convencionales presentaron una sensibilidad de 92,85% y una especificidad de 95,83% (Tabla 6).

Las cepas identificadas como *B. cepacia* mostraron al examen microscópico (coloración de Gram) bacilos Gram negativos típicos, pequeños, dispuestos de manera irregular (Figura 3A).

En cajas de petri con agar Luria Bertani se observaron colonias translúcidas, brillantes, de consistencia blanda, de bordes definidos y lisos; algunas de las colonias presentaban pigmento amarillo, el cual no se difundía al medio. (Figura 3B). En el agar MacConkey no todas las cepas se desarrollaron con la misma intensidad, las colonias eran lactosa negativa, en su mayoría con escaso crecimiento a las 24 horas.

**Tabla 3. Identificación bioquímica de *Burkholderia cepacia* y géneros relacionados por métodos convencionales**

| Organismo | Hospitalarios n (%) | Ambientales n (%) | Total N (%) |
|---|---|---|---|
| ***Burkholderia cepacia*** | 21 (28,37) | 7 (9,45%) | 28 (37,83%) |
| ***Stenotrophomonas maltophilia*** | 11 (14,86%) | 4 (5,4%) | 15 (20,27%) |
| ***Achromobacter xylosoxidans*** | 9 (12,16%) | 0 | 9 (12,16%) |
| ***Pseudomonas alcaligenes*** | 0 | 2 (2,7%) | 2 (2,70%) |
| ***Pseudomonas stutzeri*** | 0 | 3 (100%) | 3 (4,0%) |
| ***Pseudomonas sp.*** | 5 (6,75%) | 6 (8,1%) | 11(14,86%) |
| ***Pseudomonas mendocina*** | 0 | 1 (1,35%)) | 1 (1,35%) |
| ***Pseudomonas luteola*** | 0 | 1 (1,35%) | 1 (1,35%) |
| ***Ralstonia picketti*** | 0 | 1 (1,35%) | 1 (1,35%) |
| ***Pseudomonas fluorescens*** | 1 (1,35%) | 0 | 1 (1,35%) |
| BGNNF no identificado | 2 (100%) | 0 | 2 (2,70%) |
| Total | 49(66,21%) | 25(37,83%) | 74(100%) |

BGNNF: Bacilo Gram Negativo No Fermentador.

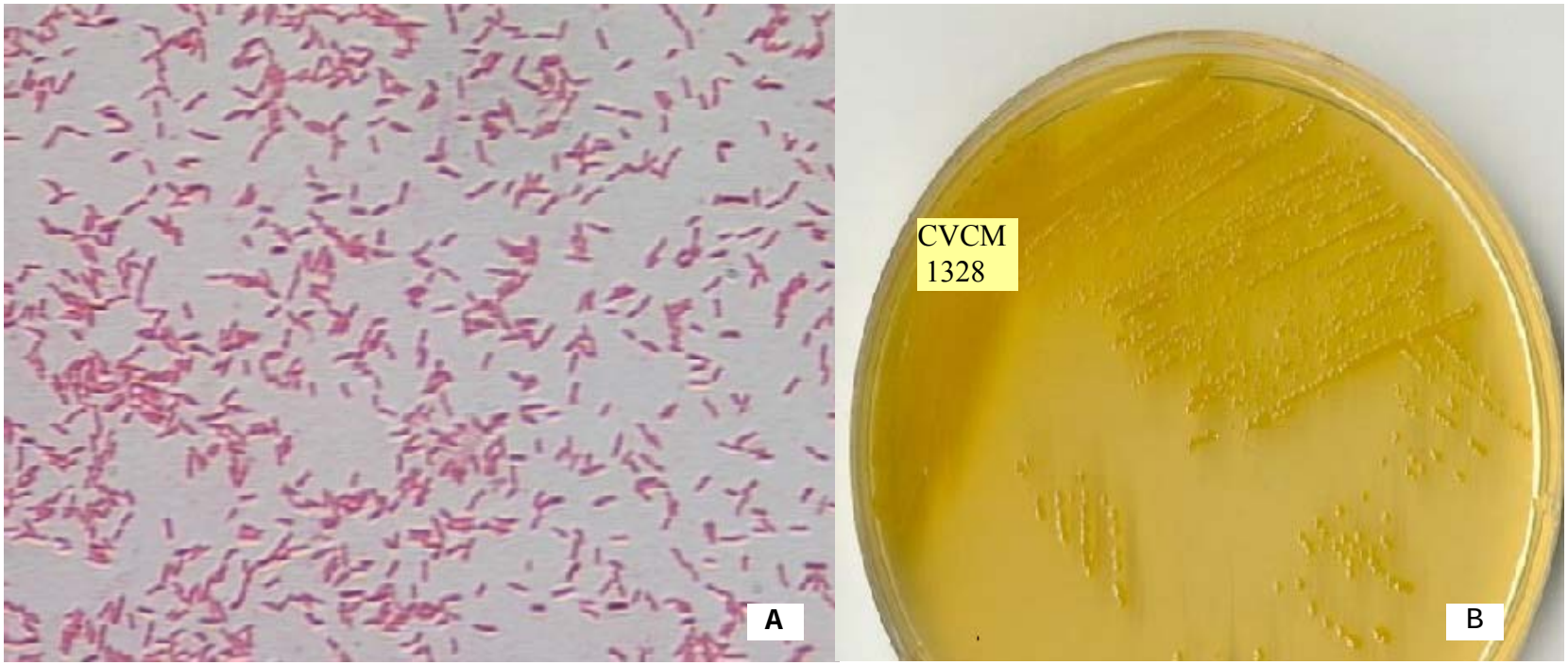



**Figura 3. Características morfológicas de *B. cepacia***: A: Bacilos Gram negativos típicos. B: crecimiento en agar Luria Bertani

En la tabla 4 y figura 4, se observa la gran heterogeneidad de perfiles bioquímicos presentados por los aislados nosocomiales y ambientales de *B. cepacia* en conjunto (sumatoria de los dos grupos), mostrando variaciones en relación con el perfil tipo para cada una de las siguientes pruebas: oxidasa (64,28%), OF maltosa (46,4%) y OF manitol (60,71%). Las pruebas de OF glucosa, asimilación del manitol, hidrólisis de arginina y polimixina B, se ajustaron más al perfil tipo, resultando muy útiles en la identificación del género. Tres cepas resultaron sensibles a la polimixina B y no crecieron en el medio con polimixina B añadido (CVCM: 1220, CVCM 1276 y CVCM1170). No obstante, fueron reportadas como *B. cepacia* al considerar las pruebas confirmatorias. Dos (2) cepas que no pudieron identificarse inicialmente mediante el empleo de las pruebas preliminares (CVCM1220 y CVCM1429), sistemas comerciales y pruebas confirmatorias pudieron identificarse dentro del C*Bc* por el método de la reacción en cadena de la polimerasa.

Con relación a los demás géneros identificados, (datos no presentados) las cepas identificadas como *S. maltophilia* (100%), mostraron un perfil bioquímico homogéneo de acuerdo al grado de similitud en las pruebas bioquímicas; oxidasa, OF maltosa y OF Manitol, y el 93,3% coincidieron con las pruebas crecimiento a 42° C, OF glucosa, ADH y polimixina B 600U. Una cepa (1428) no coincidió en tres pruebas bioquímicas: asimilación del manitol, ADH y PB 300U. Las identificadas como *A. xylosidans,* presentaron similitud en los perfiles bioquímicos, y variable para una sola prueba bioquímica.

Once de las cepas fueron identificadas sólo a nivel de género, debido a la diversidad de variables bioquímicas presentadas, siendo identificadas como *Pseudomonas sp.* Las restantes 14 cepas fueron identificadas a nivel de especie como: *P. alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. luteola*, *P. fluorescens* y *Ralstonia picketti*.

**Tabla 4. Perfil bioquímico de aislados del Complejo *B. cepacia*. Métodos bioquímicos convencionales**

| CVCM | Procedencia | Fuente | OXI | Crec 42°C | OF GSA | OF MAL | OF MAN | ASI MAN | ADH | Crec. PB 600 U | R PB 300 U | Identificación aceptable *Burkholderia cepacia* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Perfil tipo** | | | **96%** | **60%** | **100%** | **96%** | **100%** | **100%** | **0%** | **100%** | **0-8 mm** | |
| 626 | ATCC | Allium cepa | + | + | + | - | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 810 | Ambiental | Gusano de maíz | - | + | + | + | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 935 | Ambiental | Insecto | + | - | + | - | - | + | - | + | 0 mm | + |
| 1204 | Ambiental | Insecto | + | - | + | - | - | + | - | + | 0 mm | + |
| 1220 | Ambiental | Fresa | + | + | + | + | - | - | - | - | 12 mm* | - |
| 1273 | Ambiental | Ajo | - | - | + | - | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1274 | Ambiental | Ajo | - | + | + | + | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1201 | IMT | Sec. Traqueal | + | - | + | + | + | + | + | + | 0 mm | + |
| 795 | IAHUC | Hemocultivo | - | + | + | + | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1276 | IAHUC | Sec. bronquial | + | + | + | - | - | + | - | - | 13 mm* | + |
| 1170 | IAHJR | Sec. bronquial | + | + | + | - | - | - | + | - | 13 mm* | + |
| 1282 | SAHUAPA | Esputo | + | - | + | - | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1328 | SAHUAPA | Liq. peritoneal | + | - | + | + | + | + | + | + | 0 mm | + |
| 1329 | SAHUAPA | LCR | + | + | + | + | + | + | + | + | 0 mm | + |
| 1330 | SAHUAPA | Catéter | + | + | + | + | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1331 | SAHUAPA | LCR | + | - | + | + | + | + | + | + | 0 mm | + |
| 1332 | SAHUAPA | Catéter arterial | + | - | + | + | + | + | + | + | 0 mm | + |
| 1356 | SAHUAPA | Hemocultivo | + | + | + | + | - | + | + | + | 0 mm | + |
| 1357 | SAHUAPA | Liq. peritoneal | + | - | + | + | + | + | + | + | 0 mm | + |
| 1366 | SAHUAPA | Hemocultivo | + | + | + | + | - | + | - | + | 0 mm | + |
| 1367 | SAHUAPA | Hemocultivo | - | + | + | + | - | + | - | + | 0 mm | + |
| 1397 | SAHUAPA | Hemocultivo | - | - | + | - | - | + | - | + | 0 mm | + |
| 1398 | SAHUAPA | Hemocultivo | - | - | + | - | - | + | - | + | 0 mm | + |
| 1429 | SAHUAPA | Sec. bronquial | - | + | + | - | + | - | - | + | 0 mm | - |
| 1430 | SAHUAPA | Hemocultivo | - | + | - | - | - | - | + | + | 0 mm | + |
| 1287 | IAHULA | Sec. muslo | - | + | + | - | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1409 | IAHULA | Sec. bronquial | + | - | - | - | + | + | - | + | 0 mm | + |
| 1410 | IAHULA | Sec. bronquial | + | - | - | - | + | - | - | + | 0 mm | + |

CVCM: Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos / IAHUC: Instituto Autónomo Hospital Universitario de Caracas / IAHUAPA: Servicio Autónomo Hospital Universitario Antonio Patricio Alcalá, Cumaná-Edo Sucre / IAHJR Instituto Autónomo: Hospital Julio Rodríguez, Cumaná-Edo Sucre / IMT: Instituto de Medicina Tropical, Caracas / IAHULA: Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida / ULA: Universidad de Los Andes / LCR: Líquido cefalorraquídeo / Sec: Secreción / OXI: Oxidasa / Crec: crecimiento / *: pruebas no coincidentes / OF GSA / OF MAL / OF MAN: Oxidación-fermentación Glucosa/ Maltosa/ Manitol / ASI MAN: Asimilación Manitol / ADH: ArgininaD-hidrolasa / Crec: Crecimiento; R: Resistente / PB: Polimixina B / mm: milímetro.

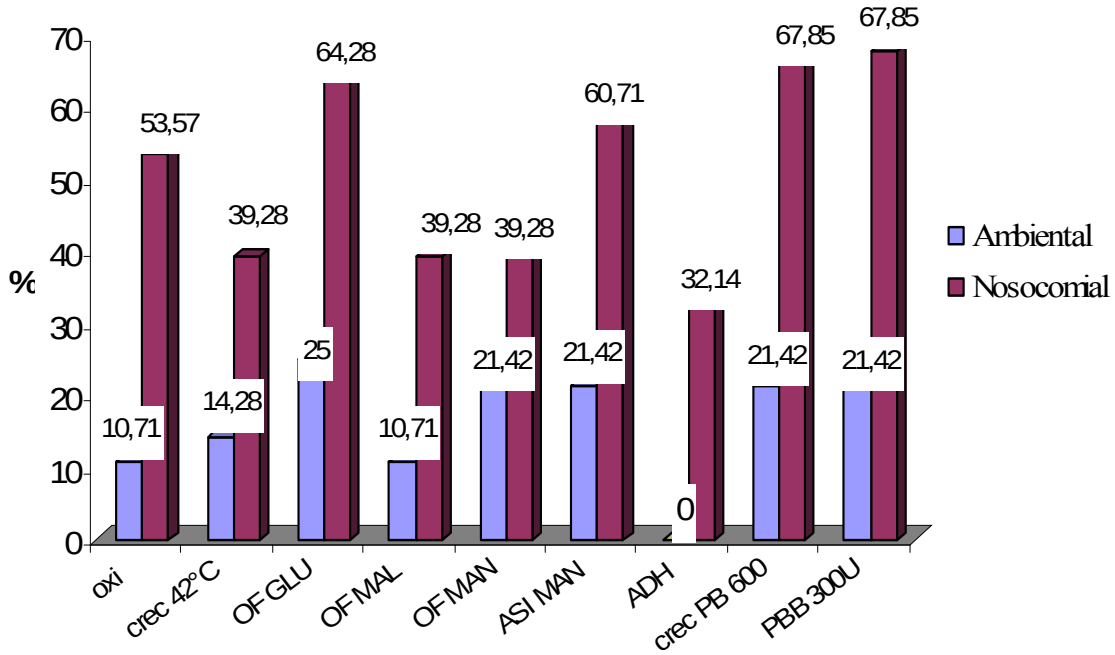



**Figura 4. Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales entre aislados ambientales y de origen nosocomial de *B. cepacia*.** OXI: Oxidasa / Crec: crecimiento; OF GSA / OF MAL / OF MAN: oxidación-fermentación Glucosa/Maltosa/ Manitol / ASI MAN: Asimilación Manitol / ADH: ArgininaD-hidrolasa / Crec: Crecimiento / PB: Polimixina B.

## B. Identificación bioquímica a través del sistema comercial ATBplus (galerías API 20NE e ID 32 GN)

En la tabla 5, se presentan los resultados obtenidos con el sistema ATBplus (Biomerieux) empleando las galerías API 20NE e ID 32 GN. Con la primera, se identificaron como *B. cepacia* 19 (67,85%), con perfil aceptable. Con la segunda galería, sólo 16 (57,11%) de las cepas fueron identificadas como *B. cepacia,* con perfil aceptable. En la identificación del C*Bc*, el sistema API 20 NE arrojó una sensibilidad correspondiente a 67,85% y una especificidad de 83,63 %, mientras que el sistema ID 32 GN presentó una sensibilidad de 57,14% y la especificidad fue de 79,31% .

El sistema ID 32 GN permitió identificar 14 (93,33%) como *S. maltophilia*, mientras que el API 20 NE caracterizó sólo la mitad de las cepas 7 (46,66%) *A. xylosoxidans* presentó 2 (22,22%) de perfiles aceptables y *P. stutzeri* 1 (33,33%). Los demás géneros bacterianos se ubicaron en perfiles aceptables de 45%-100%. Al comparar los dos sistemas, ID 32GN identificó 47 (63,51%) especies con perfiles aceptables, mientras que el API 20 NE sólo 29 (39,18%) especies con este perfil.

Para la identificación definitiva de los diferentes géneros o especies con perfil dudoso, e inaceptable por ambas galerías, se utilizaron pruebas bioquímicas complementarias (oxidación-fermentación: maltosa/ manitol/ xylosa/ fructosa/ lactosa; arginina-dihidrolasa; lisina-descarboxilasa; hidrólisis de la esculina, gelatina) que permitieron la identificación definitiva de las especies antes mencionadas. Sin embargo, 11 (14,86%) de las cepas fueron identificadas como *Pseudomonas sp.* con igual resultado al obtenido con la aplicación de los métodos convencionales. Estas cepas presentaron débiles discriminaciones con las galerías API 20 NE e ID 32 GN y resultados contradictorios con las pruebas confirmatorias seleccionadas para la diferenciación del género o especie. Dos (2) de los aislados no pudieron ser identificados por ninguno de los métodos empleados, reportándose como BGNNF a partir de los resultados arrojados por las pruebas bioquímicas preliminares. La determinación de la

resistencia a polimixina B mostró correspondencia en los métodos de difusión (disco PB 300U) y el de crecimiento en placa (PB 600U), poniendo en evidencia su uso práctico en el laboratorio para diferenciar al género *Burkholderia* de los demás géneros de BGNNF, por tratarse del único resistente a este antibiótico.

**Tabla 5. Comparación de las galerías API 20NE e ID3 2GN en la identificación de *Burkholderia cepacia y* BGNNF relacionados**

| | | | Perfiles bioquímicos | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Organismo | n(74) | Sistemas comerciales | Aceptable | Dudoso | Inaceptable | Incorrecto |
| *B. cepacia* | 28 (37,83%) | API 20 NE | 19 (67,85%) | 2 (7,14%) | 2 (7,14%) | 5 (17,85%) |
| | | ID 32 GN | 16 (57,14%) | 2 (7,14%) | 3 (10,71%) | 7 (25,0%) |
| *S. maltophilia* | 15 (20,27%) | API 20 NE | 9 (60%) | 2 (13,33%) | 3 (20,00%) | 1 (6,6%) |
| | | ID 32 GN | 14 (93,33%) | 0 | 1 (6,60%) | 0 |
| *A.xylosoxidans* | 9 (12,16%) | API 20 NE | 3 (22,22%) | 2 (22,22%) | 3(33,33%) | 1(11,11%) |
| | | ID 32 GN | 8 (88,88%) | 1 (11,1%) | 0 | 0 |
| *P. alcaligenes* | 2 (2,70%) | API 20 NE | 0 | 0 | 0 | 2(100%) |
| | | ID 32 GN | 0 | 2(100%) | 0 | 0 |
| *P. stutzeri* | 3 (6,52%) | API 20 NE | 1 (33,33%) | 2(66,66%) | 0 | 0 |
| | | ID 32 GN | 3 (100%) | 0 | 0 | 0 |
| | | API 20 NE | 1 (9,09%) | 2 (18,18%) | 0 | 8 (72,72%) |
| *Pseudomonas sp.* | 11(14,86%) | ID 32 GN | 5 (45,45%) | 1 (9,09%) | 2 (18,18%) | 3 (27,27%) |
| *P. mendocina* | 1 (1,35%) | API 20 NE | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | | ID 32 GN | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *P. luteola* | 1 (1,35%) | API 20 NE | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | ID 32 GN | 0 | 1 | 0 | 0 |
| *R. picketti* | 1 (1,35%) | API 20 NE | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | ID 32 GN | 0 | 0 | 1 | 0 |
| *P. fluorescens* | 1 (1,35%) | API 20 NE | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | ID 32 GN | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BGNNF no | 2 (2,70%) | API 20 NE | 0 | 0 | 0 | 1 |
| identificado | | ID 32 GN | 0 | 0 | 0 | 1 |

Aceptable: % de identificación mayor al 90%; dudoso: perfil con dos posibilidades a nivel de género o especie (se requieren de pruebas bioquímicas confirmatorias); inaceptable e incorrecto: el perfil presenta más de tres posibilidades a nivel de género o especie. BGNNF: bacilo Gram negativo no fermentador.

**Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales y sistemas comerciales en la identificación de *B. cepacia***

| Resultados de cepas de *B. cepacia* identificadas | Métodos convencionales | | API 20 NE | | ID 32 GN | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *B. cepacia* | Otros BGNNF | *B. cepacia* | Otros BGNNF | *B. cepacia* | Otros BGNNF |
| + n (28) | 26 | 2 | 19 | 0 | 16 | 0 |
| - n (46) | 2 | 46 | 9 | 46 | 12 | 46 |
| Sensibilidad | 92,85% | | 67,85% | | 57,14% | |
| Especificidad | 95,83% | | 83,63 % | | 79,31% | |

BGNNF: Bacilos Gram negativos no fermentador

+: positivos; -: negativo

## C. Identificación de miembros del Complejo *B. cepacia* mediante PCR especie-específico

Los 28 aislados identificados como *B. cepacia*, empleando métodos microbiológicos convencionales, fueron sometidos a estudio mediante la aplicación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa bajo las condiciones descritas en la sección materiales y métodos. En cada reacción se emplearon 50 µl con 800 pmoles de los iniciadores PSL, PSR, G1-G2, SPR3-G1, SPR4 y G1PCR descritos en la tabla 2. En las figuras 5, 6 y 7 se presentan los resultados de los productos obtenidos a través de la prueba de la PCR con algunas de las cepas estudiadas, representativas de los genomovares I (cepas CVCM626, CVCM810, CVCM 1327, CVCM1273 y CVCM795), II (cepas CVCM1220), III (cepas CVCM133, CVCM1367) y IV (cepa CVCM1274) identificados en el Complejo *Burkholderia cepacia.* Se ponen en evidencia los productos esperados (1300 pares de bases) para el genomovar I (con los iniciadores G1-G2, SPR3-G1 y SPR4-G1), genomovar II (con SPR3-G1) y el genomovar III (con G1-G2 y SPR3-G1), así como el producto de 310 pb para los iniciadores PSL-PSR, común para todas las bacterias. En la tabla 7, se presenta un resumen de los resultados obtenidos, con 13 cepas positivas para los pares de iniciadores G1-G2, SPR3-G1 y SPR4-G1 (genomovar I); 4 cepas positivas para SPR3-G1 (genomovar II, *B. multivorans*); 3 cepas positivas para G1-G2 y SPR3-G1 (genomovar III, *B. cenocepacia*); 1 sola cepa, aislada de ajo, positiva con G1-G2 (genomovar IV, *B. stabilis*) y 7 cepas que no amplificaron con G1-G2 y SPR3-G1, identificadas bioquímicamente como *B. cepacia*, y posible *B. vietnamensis*. Todos los ADN de los 74 aislados ensayados amplificaron con los iniciadores PSL-PSR. No se obtuvieron amplificados para las 26 cepas que bioquímicamente resultaron identificados como otros géneros, al igual que la cepa control negativo *E. coli* C-137. La sensibilidad de la prueba molecular PCR en la identificación de miembros del C*Bc* fue 75% y la especificidad de 86,79% (Tabla 8).

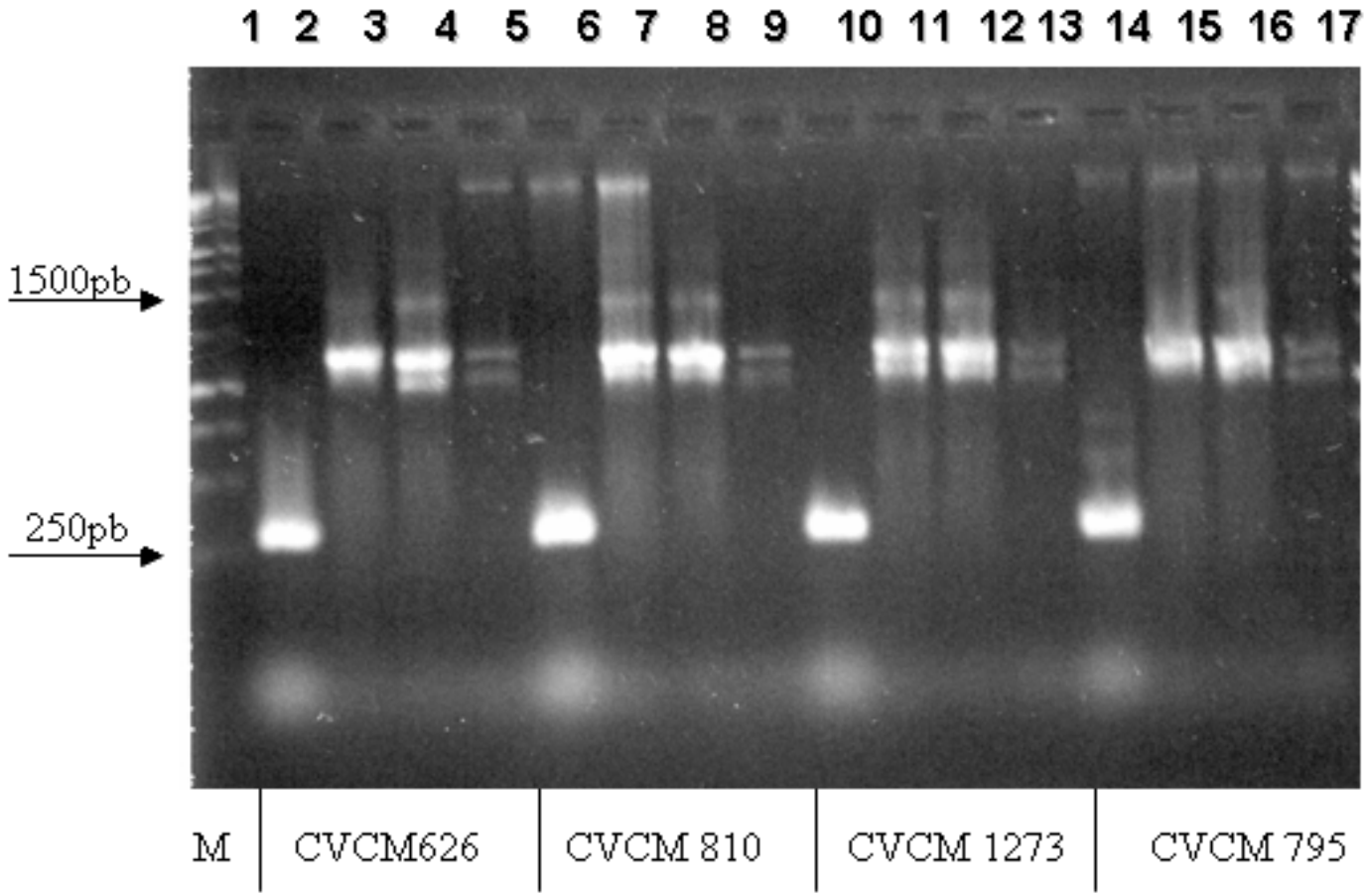



**Figura 5. Amplificación por PCR del genomovar I del Complejo *B. cepacia* en aislados ambientales: CVCM 626 (ATCC 25416), CVCM 810 (gusano de maíz), CVCM 1273 (ajo) y hospitalaria, CVCM 795.** Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder. Carriles 2, 6, 10, 14, amplificados con iniciadores PSL-PSR. Carriles 3, 7, 11, 15 amplificados con iniciadores G1-G2. Carriles 4, 8, 12, 16, amplificados con iniciadores SPR3-G1.Carriles 5, 9, 13, 17, amplificados con iniciadores SPR4-G1**.**

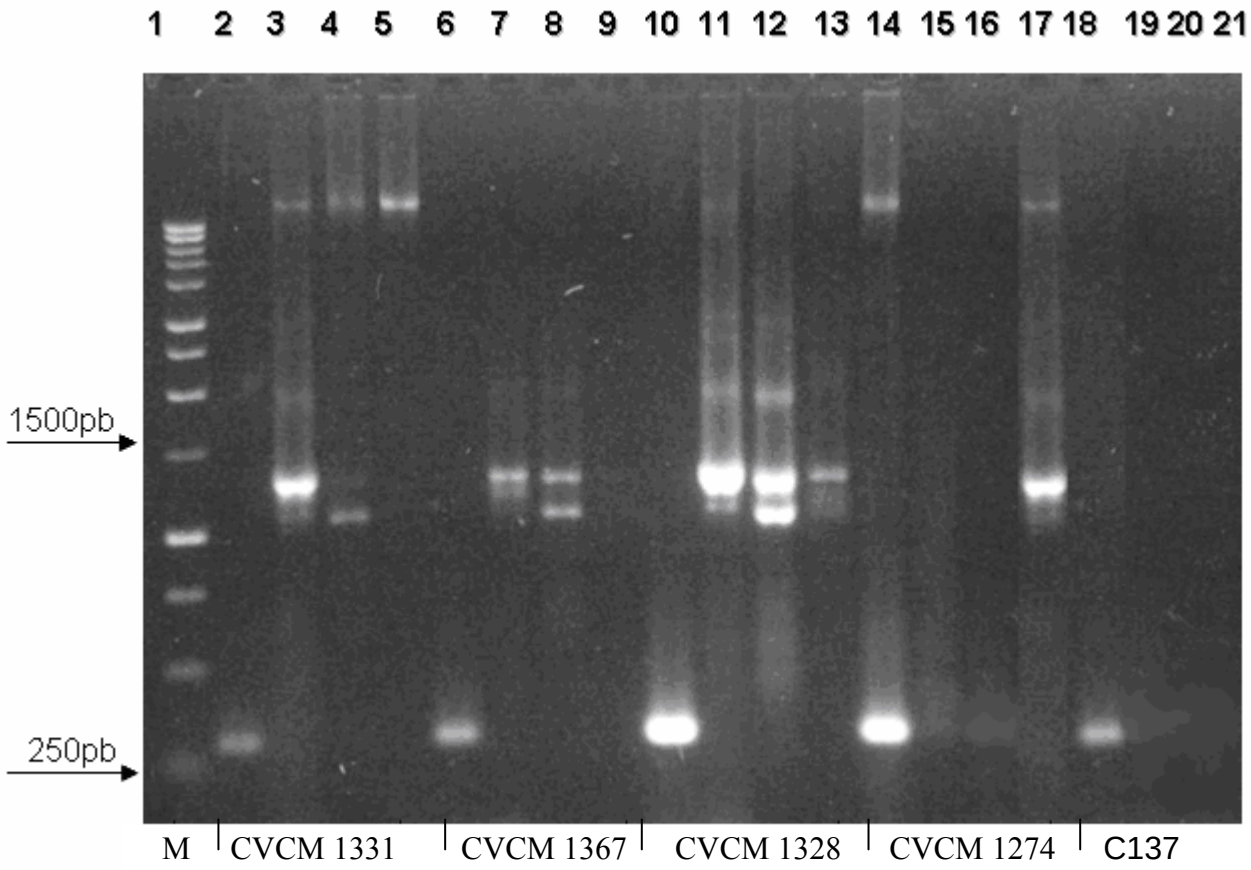



**Figura 6. Amplificación por PCR de los genomovares III (CVCM: 1331 y 1367) I (CVCM 1328), IV (CVCM 1274) del Complejo *B. cepacia*.** Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder. Carriles 2, 6, 10, 14,18 amplificados con PSL-PSR. Carriles 3, 7, 11, 15, 19, amplificados con iniciadores G1-G2. Carriles 4, 8, 12, 16, 20, amplificados con iniciadores SPR3-G1. Carriles 5, 9, 13, 17, 21, amplificados con iniciadores SPR4-G1. Control negativo, *Ecoli* C-137.

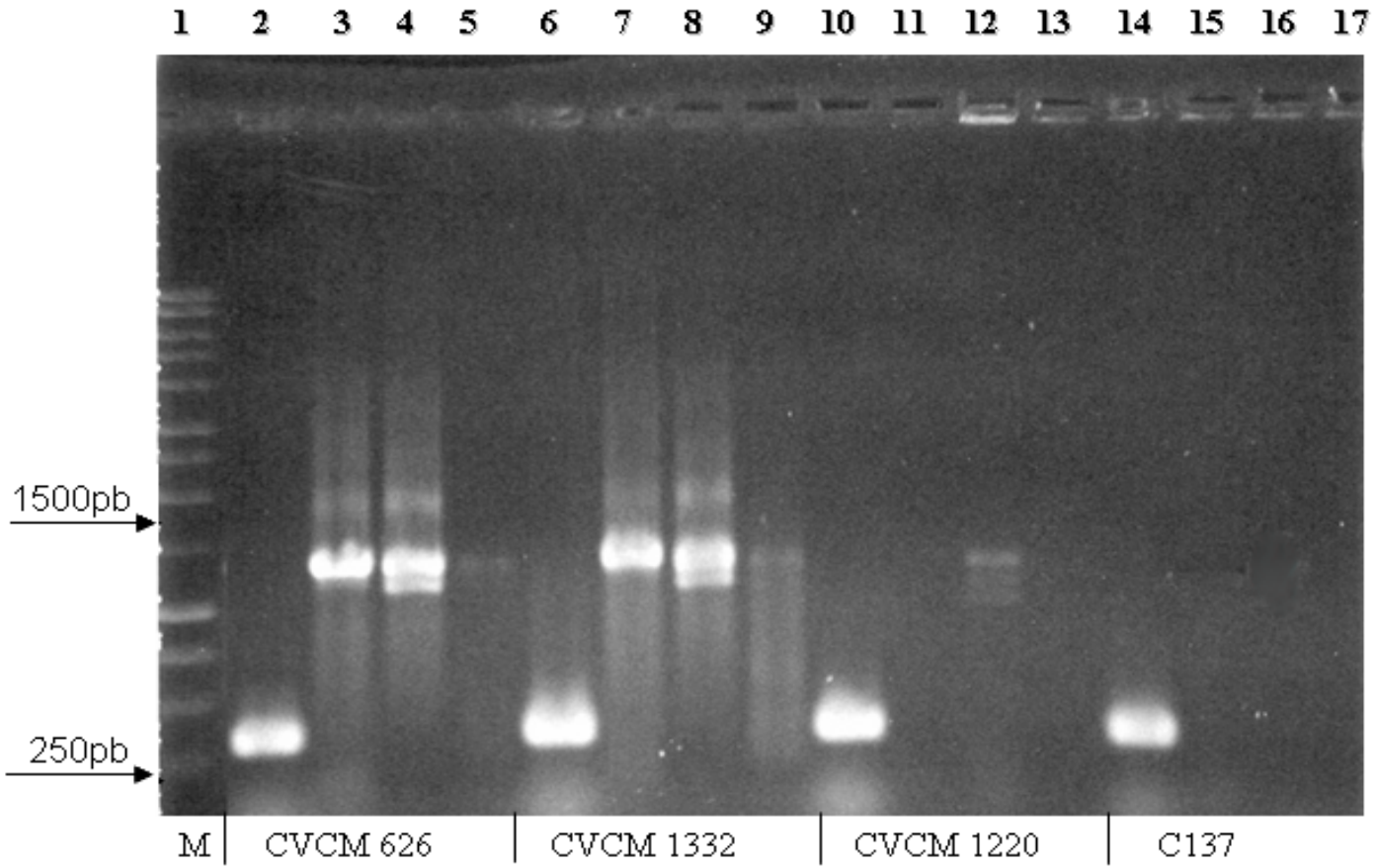



**Figura 7. Amplificación por PCR de los genomovares I (CVCM 626 y 1332) II (CVCM 1220) del Complejo *B. cepacia,*** Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder. Carriles 2, 6, 10, 14, amplificados con iniciadores PSL-PSR. Carriles 3, 7, 11, 15, amplificados con iniciadores G1-G2. Carril 4, 8, 12, 16, amplificados con iniciadores SPR3-G1. Carriles 5, 9, 13, 17, amplificados con iniciadores SPR4-G1. Control negativo, *Ecoli* C-137.

**Tabla 7. Identificación de genomovares del Complejo *Burkholderia cepacia* por PCR especie-específico**

| | | Iniciadores | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Nº CVCM | Fuente | G1-G2 | SPR3-G1 | SPR4-G1 | Genomovares |
| 626 | Allium cepa | + | + | + | I |
| 810 | Gusano de maíz | + | + | + | I |
| 1273 | AJO | + | + | + | I |
| 795 | HUC | + | + | + | I |
| 1287 | ULA | + | + | + | I |
| 1328 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1329 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1330 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1332 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1356 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1366 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1397 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1398 | SAHUAPA | + | + | + | I |
| 1357 | SAHUAPA | - | + | - | II (*B. multivorans*) |
| 1220 | Fresa | - | + | - | II (*B. multivorans* ) |
| 1429 | SAHUAPA | - | + | - | II (*B .multivorans*) |
| 1201 | IMT | - | + | - | II (*B. multivorans*) |
| 1367 | SAHUAPA | + | + | - | III (*B. cenocepacia)* |
| 1204 | Insecto | + | + | - | III (*B. cenocepacia)* |
| 1331 | SAHUAPA | + | + | - | III (*B. cenocepacia)* |
| 1274 | Ajo | - | - | + | IV (*B. stabilis*) |
| 935 | Insecto | - | - | - | V(*B. vietnamensis)* |
| 1276 | HUC | - | - | - | V*(B. vietnamensis*) |
| 1170 | HJR | - | - | - | V*(B. vietnamensis*) |
| 1282 | SAHUAPA | - | - | - | V(*B. vietnamensis*) |
| 1409 | IAHULA | - | - | - | V(*B vietnamensis*) |
| 1410 | IAHULA | - | - | - | V(*B. vietnamensis*) |
| 1430 | SAHUAPA | - | - | - | V(*B. vietnamensis*) |

CVCM: Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos / IAHUC: Instituto Autónomo Hospital Universitario de Caracas / SAHUAPA: Servicio Autónomo Hospital Universitario Antonio Patricio Alcalá, Cumaná-Edo Sucre / IAHJR: Instituto Autónomo Hospital Julio Rodríguez, Cumaná-Edo Sucre / IMT: Instituto de Medicina Tropical, Caracas / IAHULA: Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida / ULA: Universidad de Los Andes. (+): resultado de los amplificados positivo con los pares de iniciadores G1-G2, SPR3-G1 y SPR4-G1. (-): resultado de los amplificados negativos con los diferentes pares de iniciadores probados.

**Tabla 8. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR en la identificación del Complejo *B. cepacia***

| Resultados de cepas de *B. cepacia* identificadas | PCR | |
|---|---|---|
| | *B. cepacia* | Otros BGNNF |
| + | 21 | 0 |
| - | 7 | 46 |
| Sensibilidad | 75% | |
| Especificidad | 86,79% | |

BGNNF: Bacilos Gram negativos no fermentadores

+: positivos; -: negativo

**Tabla 9. Índice discriminatorio para cuatro métodos de identificación del Complejo *B. cepacia***

| Método | Cepas identificadas | Nº de tipos | Índice discriminatorio (%) |
|---|---|---|---|
| **PCR** | 21 | 5 | 99,2 |
| **ID 32GN** | 16 | 2 | 50,79 |
| **API 2O NE** | 19 | 2 | 45,24 |
| **Método convencional** | 26 | 2 | 13,76 |

## 1. Resultados del análisis de clasificación de las pruebas bioquímicas y de los genomovares

El análisis de conglomerados representado por un dendograma (Figura 8) reveló que las cepas se distribuyen en al menos cinco grupos principales:

- Grupo 1: integrado por las cepas CVCM: 1429, 1201, 1397, 1331, 1332,1366, 1330 las cuales se separarn porque todas son oxidasa positiva, descarboxilan la ornitina y la lisina.
- Grupo 2: integrado por las cepas 1204, 1357, 128,1282, 935, 1328, estas se separan porque no crecen a 42º C y todas crecieron en agar MacConkey.
- Grupo 3: integrado por las cepas CVCM: 1220, 1356,1367, 1398,1274, 1329, 795,1273. Estas se separan porque reaccionaron a la arginina D-hidrolasa.
- Grupo 4: integrado por las cepas CVCM: 1410,1409,1430,810. Estas se separan por la falta de oxidación-fermentación de la xilosa y la maltosa.
- Grupo 5: integrado por las cepas CVCM: 626, 1276, y 1170. Estas se separan porque oxidan glucosa, crecen a 42º C y oxidan la glucosa.

Con respecto a los diferentes genomovares no se observó un perfil bioquímico específico de grupo: las cepas pertenecientes al genomovar I se ubicaron en todos los grupos. Las cepas del genomovar II presentaron dos perfiles bioquímicos ubicándose en los grupos bioquímicos 1 y 3. Las cepas del genomovar V se ubicaron en los grupos 2, 4 y 5. Las tres cepas pertenecientes al genomovar III, presentaron perfiles bioquímicos distintos entre sí y se ubicaron en los grupos 1,2 y 3.

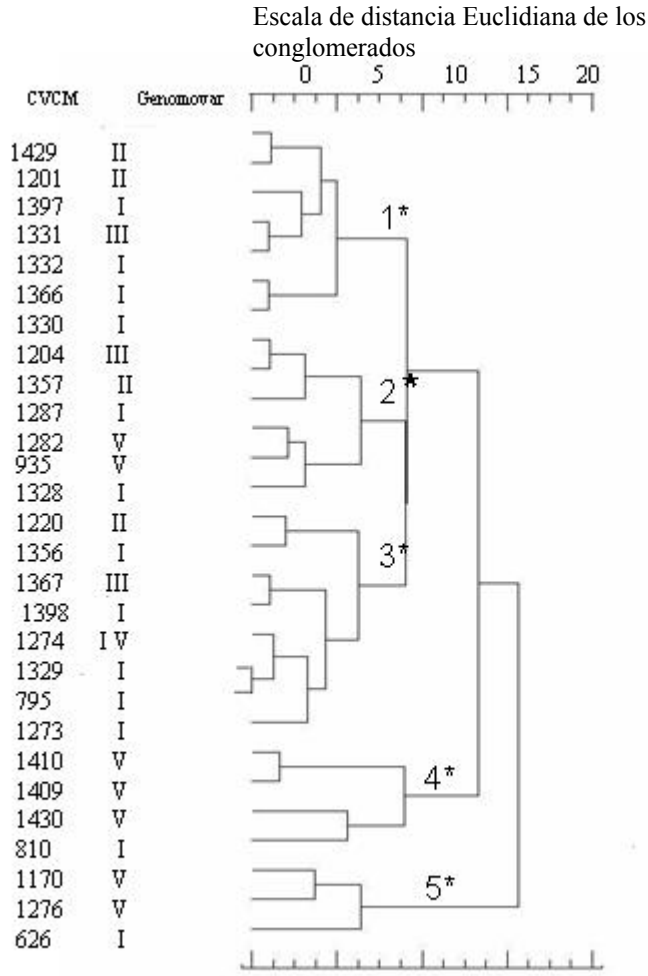



**Figura 8. Dendograma del análisis de conglomerados basado en los resultados de las pruebas bioquímicas y los genomovares del Complejo *Burkholderia cepacia*.**

***:** Conglomerados formados

### 2. Resultados del análisis del poder discriminatorio de los cuatro métodos empleados en la identificación del C*Bc* a través de la aplicación del índice de diversidad de Simpson

En la Tabla 9 se presentan las cepas identificadas dentro del C*Bc*, y el índice o poder discriminatorio de cada uno de ellos. La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa presentó el más alto índice discriminatorio (99,2%) al distribuir las 28 cepas en cinco tipos. El sistema ID 32 GN resultó con un índice discriminatorio de 50,79% identificando 16 aislados y discriminando las especies de *B. cepacia* en 2 tipos, y el API 20 NE con un índice discriminatorio de 45,24%. Los métodos convencionales presentaron un índice discriminatorio muy bajo de 13,76%.

## D. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

En la tabla 10, se presenta la distribución de la resistencia antimicrobiana de las cepas del C*Bc* de acuerdo a la resistencia determinada por CIM. Todos los aislados nosocomiales y 71% de aislados ambientales fueron resistentes para AK; 100% de nosocomiales y 57% de aislados ambientales fueron también resistentes a TOB. En el caso del ATM, 76% de los aislados nosocomiales y 57% de los aislados ambientales presentaron resistencia a este antimicrobiano. La resistencia para IPM en los aislados nosocomiales fue de 67% y en los aislados ambientales de 43%. Los antibióticos más efectivos fueron: PIP, CIP, SXT, CAZ y TZP. Sin embargo, la CIM para PIP y CAZ, así como para IPM, AK y TOB, fue más alta en los aislados nosocomiales.

El análisis de conglomerados, representado por un dendograma (Figura 9), muestra 18 perfiles con un nivel de 75% de similaridad. Es notorio que, tanto los aislados nosocomiales como los ambientales formaron un gran conglomerado (cluster). En 11 aislados nosocomiales se observó un perfil homogéneo, mientras que el resto de los perfiles de los aislados nosocomiales y ambientales de diferentes orígenes fue francamente heterogéneo.

**Tabla 10. Distribución de las cepas del Complejo *Burkholderia cepacia* de acuerdo a la resistencia antimicrobiana determinada por CIM**

| | **Aislados ambientales (7)** | | **Aislados nosocomiales (21)** | |
|---|---|---|---|---|
| | **% Resistencia** | **CIM/ Rango (µg/ml)** | **% Resistencia** | **CIM/ Rango (µg/ml)** |
| Imipenem | 42,9 | 1-32 | 66,7 | 2-64 |
| Tobramicina | 57,1 | 2-64 | 100,0 | 2-128 |
| Amikacina | 71,4 | 4-128 | 100,0 | 4-256 |
| Aztreonam | 57,1 | 4-32 | 76,2 | 4-32 |
| Ceftazidima | 28,6 | 1-32 | 14,3 | 4-64 |
| Ciprofloxacina | 28,6 | 0,5-4 | 23,8 | 0,5-4 |
| Trimetoprim/ sulfametoxazol | 28,6 | 1/38- 4/76 | 4,8 | 1/38- 4/76 |
| Piperacilina | 14,3 | 1- 128 | 9,5 | 1- 256 |
| Piperacilina/ Tazobactam | 17,9 | 16/4-128/4 | 14,3 | 16/4-128/4 |

CIM: concentración inhibitoria mínima

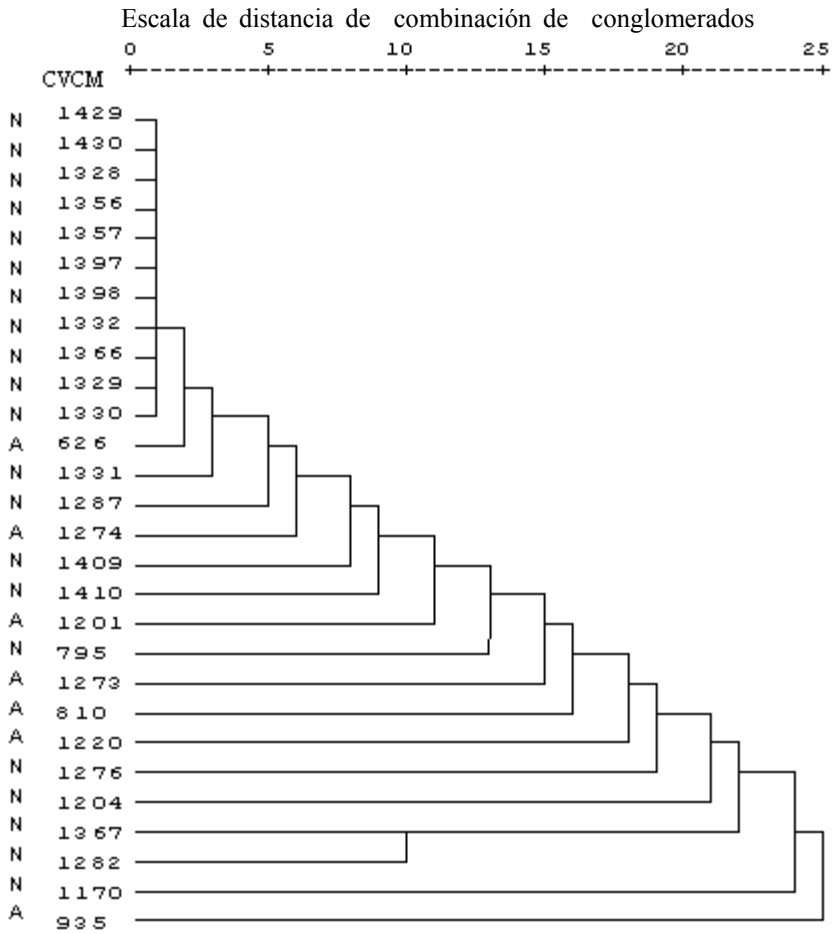



**Figura 9. Dendograma derivado del coeficiente simple asociativo y UPGMA, para patrones de resistencia a antimicrobianos de aislados de *B. cepacia* nosocomiales y ambientales**. N: nosocomial; A: ambiental.

## E. Perfiles de proteínas por SDS-PAGE del Complejo *B. cepacia*

En la figura 10, se observa el patrón de bandas de extractos de proteínas totales, obtenido por SDS-PAGE de un grupo representativo de aislados nosocomiales y ambientales donde se señalan algunas de las bandas comunes entre ambos grupos (bandas de $M_r$ 50,76 y 86 kDa). El análisis densitométrico computarizado de los perfiles de extractos de proteínas totales y de membrana externa de todos los aislados del C*Bc* obtenidos por SDS-PAGE, se representa en la tabla 11. Se expresa el porcentaje relativo de bandas de proteínas de mayor ocurrencia en extractos de células completas y de membrana externa en aislados nosocomiales y ambientales del C*Bc* y revela bandas con pesos moleculares ($M_r$): 135k, 114k, 98k, 96k, 82k, 86k, 72k, 76k, 63k, 61k, 57k, 53k, 39k, 31k, 27k y 25k Da que están presentes en más del 50% del total de cepas del C*Bc*. Una banda de $M_r$ 135kDa se encontró aproximadamente en 71% de aislados nosocomiales y 57% de ambientales. En 67% de aislados nosocomiales y 71% de los aislados ambientales se detectó una banda de $M_r$ 76kDa, mientras que una banda de $M_r$ 50kDa fue observada en 43% de aislados nosocomiales y 86% de aislados ambientales. Seis bandas de proteínas de $M_r$ 96k, 82k, 76k, 72k, 63k y 39k Da se encontró en >70% de aislados ambientales. Todas las bandas de proteínas antes mencionadas se observaron en extractos de proteínas totales tanto en aislados nosocomiales como en ambientales. Por otra parte, las proteínas de membrana externa, comunes en ambos grupos de aislados fueron las siguientes: $M_r$, 76k,72k, 63k,61k,57k,53k,39k,31k,27k y 25 k Da.

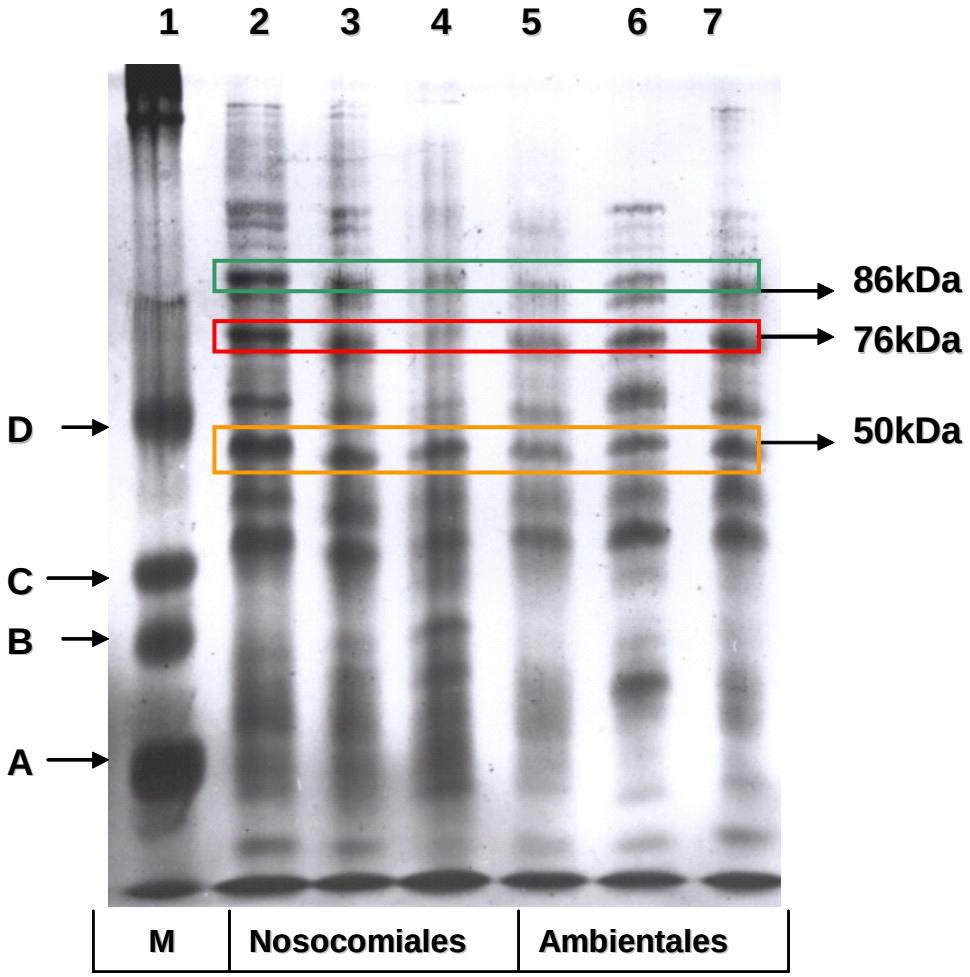



**Figura 10. Patrones de proteínas por SDS PAGE de aislados ambientales y nosocomiales del Complejo *Burkholderia cepacia*.** Carril 1: Marcador (A:14,2kDa, B:29kDa, C:45kDa, D:66kDa); Carril 2: CVCM, 626. Carril 3: CVCM 795; Carril 4: CVCM 1398; Carril 5: CVCM 1331; Carril 6: CVCM1273; Carril 7: CVCM 1274.

**Tabla 11. Porcentaje relativo de bandas proteicas de mayor ocurrencia en extractos de proteínas totales y de membrana externa en aislados nosocomiales y ambientales del Complejo *B. cepacia***

| | Proteínas totales | | Proteínas de membrana externa | |
|---|---|---|---|---|
| **Peso molecular (kDa)** | **[a]Aislados nosocomiales (%)** | **[b]Aislados ambientales (%)** | **[c]Aislados nosocomiales (%)** | **[d]Aislados ambientales (%)** |
| 135 | 76 | 57 | - | - |
| 114 | 62 | 57 | - | - |
| 98 | 38 | 57 | 25 | 67 |
| 96 | 24 | 71 | - | - |
| 86 | 48 | 57 | - | - |
| 82 | 43 | 71 | - | 50 |
| 76 | 67 | 71 | 75 | 50 |
| 72 | 53 | 71 | 25 | 33 |
| 63 | 48 | 83 | 100 | 100 |
| 61 | 33 | 29 | 50 | 33 |
| 57 | 43 | 57 | 75 | 67 |
| 53 | 52 | 57 | 75 | 42 |
| 50 | 43 | 86 | 50 | 67 |
| 31 | 48 | 57 | 50 | 50 |
| 27 | 57 | 43 | 75 | 50 |
| 25 | 33 | 57 | 25 | 67 |

**[a] n = 21;[b] n = 7; [c] n = 4; [d] n = 6**

El análisis de conglomerados de los patrones de bandas de proteínas por UPGMA y representado por un dendograma reveló dos grupos principales con un nivel de 75% de similaridad; cada grupo estuvo a su vez subdividido en varios conglomerados (Figura 11). Un grupo, compuesto por 43% del total de los aislados, incluyendo 5 ambientales y 8 nosocomiales, mientras que el otro grupo estuvo conformado por 2 aislados ambientales y 13 nosocomiales. Tres aislados ambientales provenientes de ajo del C*Bc* (CVCM 626, 1273 y 1274) demostraron 97% de similaridad con el aislado nosocomial CVCM 1170. Aislados del Complejo *B. cepacia* obtenidos de insectos (CVCM 1204) y larva de gusano de cultivo de maíz (CVCM 810) presentaron 90-93% similaridad con dos aislados nosocomiales, CVCM 1328 y 1170. Una cepa proveniente de cultivo de fresa (CVCM 1220) demostró 97% de similaridad con los aislados nosocomiales CVCM 1398 y 795. Por otra parte, un aislado del C *Bc* proveniente de insecto (CVCM 935) presentó 93% de similaridad con el CVCM 1201 y exhibió un nivel de similaridad del 82% con otros 8 aislados nosocomiales.

Basados en las bandas proteicas comunes encontradas mediante SDS-PAGE y el coeficiente de similaridad de Dice, los aislados ambientales y sus correspondientes aislados nosocomiales más cercanos, de acuerdo a lo inferido por el dendograma de la figura 11, mostraron un rango de índice de similaridad de Dice entre 72% y 91,4%.

Un análisis comparativo de porcentajes de aislados nosocomiales y ambientales del C*Bc* con bandas de proteínas comunes y la resistencia para IPM y ATM demostró estrecha asociación con cinco bandas proteicas de $M_r$ 135k, 76k, 72k, 53k and 50k Da (Tabla 12). Estas bandas estuvieron presentes en 57-79% de aislados nosocomiales y 25-50% de ambientales resistentes a IPM, así como también en 71-82% de aislados nosocomiales y 50-75% de ambientales resistentes para ATM.

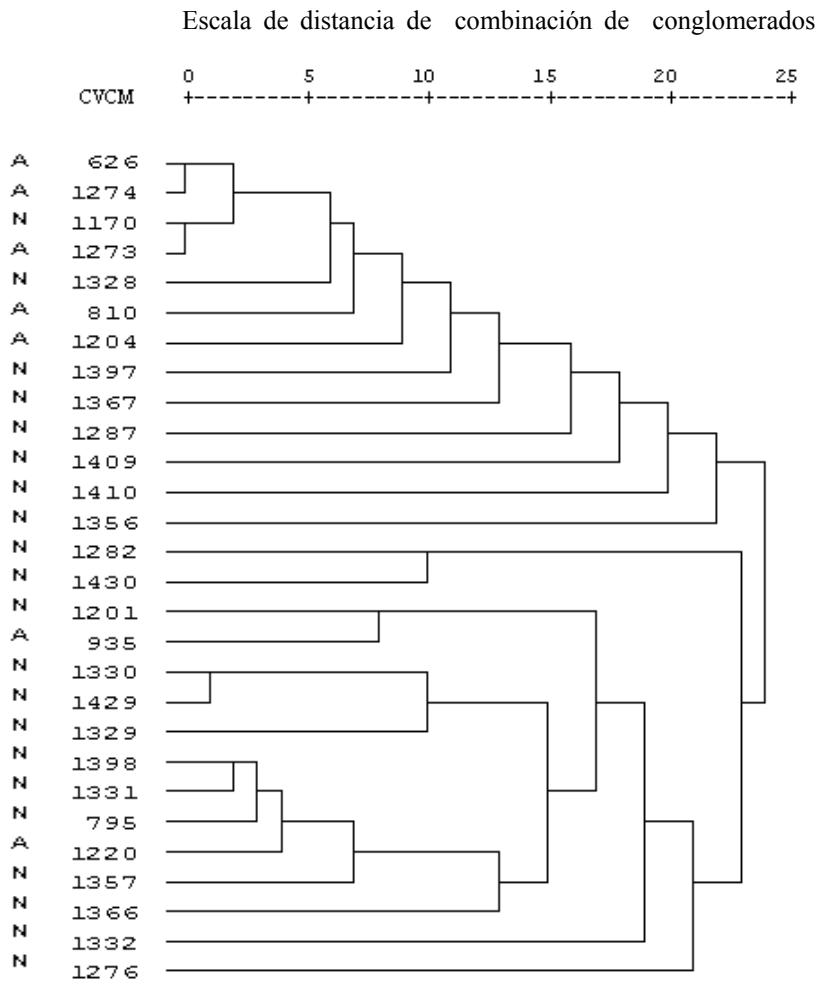



**Figura 11. Dendograma derivado del método de conglomerados UPGMA, para perfiles de proteínas totales de aislados nosocomiales y ambientales del Complejo *Burkholderia cepacia*, en un rango de peso molecular de 10 000 a 140 000 Daltons.**

N: nosocomial. A: ambiental.

**Tabla 12. Bandas comunes de proteínas y porcentajes relativos de resistencia a imipenem y aztreonam y en aislados ambientales y nocomiales del Complejo *B. cepacia***

| Bandas comunes PM(kDa) | Nosocomiales | | Ambientales | |
|---|---|---|---|---|
| | IPM(%) | ATM(%) | IPM(%) | ATM(%) |
| 135 | 67 | 80 | 50 | 71 |
| 76 | 57 | 71 | 40 | 60 |
| 72 | 73 | 82 | 40 | 60 |
| 53 | 79 | 79 | 25 | 75 |
| 50 | 67 | 78 | 50 | 50 |

PM: peso molecular; IPM: Imipenem; ATM: Aztreonam

# IV. DISCUSIÓN

*Burkholderia cepacia,* descrita previamente como *Pseudomonas cepacia*, es un bacilo Gram negativo difícil de aislar debido a que presenta un crecimiento lento en relación con el de otros microorganismos con los cuales se encuentra formando comunidades que comparten nichos ecológicos (Vandamme, 2002) y, en consecuencia, su aislamiento exige el manejo de medios de cultivos que favorezcan su crecimiento. La identificación de *B. cepacia* es una tarea compleja, ya que requiere no solo condiciones especiales de laboratorio sino experiencia, a los fines de evitar los errores e imprecisiones que se observan con frecuencia en los reportes de laboratorio clínico. La identificación es todavía más compleja y laboriosa si consideramos que no se trata de una especie única sino de un grupo heterogéneo, referido como el complejo *B. cepacia* (C*Bc*) formado por nueve especies difíciles de diferenciar empleando métodos fenotípicos convencionales. La caracterización del C*Bc* a nivel de especie o genomovar, es importante para el manejo clínico adecuado de pacientes, así como también es relevante desde el punto de vista epidemiológico para detectar brotes de un genomovar, en particular los genomovares II y III asociados a la mayoria de los brotes entre pacientes con fibrosis quística y con alto grado de transmisibilidad (Turton y col. 2007).

En el presente estudio se aplicaron condiciones para el aislamiento selectivo, y la identificación a nivel de especie de miembros del complejo C*Bc* presentes en una muestra aleatoria de aislados de BGNNF provenientes de muestras ambientales y hospitalarias. La selección preliminar se realizó en agar Luria Bertani-polimixina B, limitando el crecimiento de la mayoría de los géneros de BGNNF, a excepción de *R. picketti*, *C. acidovorans,* y *B. diminuta* que muestran crecimiento variable. Los ensayos preliminares (Apéndice 3) y las pruebas bioquímicas diferenciales dirigidas a la identificación de *B. cepacia* y de géneros relacionados (Apéndices 4 y 5) fueron complementados por un conjunto de pruebas de oxidación de azúcares (glucosa, maltosa, xilosa y manitol) descarboxilación de la lisina, hidrólisis de la arginina y la hidrólisis de la esculina que permitieron la diferenciación de los miembros del grupo (C*Bc*) de géneros estrechamente relacionados (*Stenotrophomonas, Pseudomonas, Achromobacter* y otros).

Todas las cepas incluidas en este estudio se encuentran conservadas en forma de liofilizados, en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

La identificación de bacilos del grupo C*Bc,* empleando métodos bioquímicos convencionales, pruebas bioquímicas complementarias y sistemas comerciales no permitieron una clara discriminación a nivel de especies dentro del complejo, a pesar de que los mismos presentaron moderados rangos de sensibilidad y especificidad similares (Tabla 6), a los reportados previamente por Segonds y col. (1999) y van Pelt y col. (1999). Sin embargo, el índice discriminatorio de los métodos convencionales y de los sistemas comerciales arrojó valores en el rango de 13,76% -50,79%, muy por debajo de las pruebas moleculares. Mediante el empleo de los sistemas comerciales no se logró la diferenciación entre genomovares. La incorporación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) especie-específico, empleando iniciadores para la amplificación de secuencias de genes ribosomales mostró una buena sensibilidad de 75% y una especificidad de 86,79, resultados similares a los reportados por LiPuma y col., 1999 y Whitby y col., 1998, empleando los mismos pares de iniciadores. En el presente estudio se emplearon los iniciadores descritos en la tabla 2 para la identificación y diferenciación de los genomovares I, II, III y IV. Se obtuvieron resultados positivos al amplificar y separar en un mismo gel varios aislamientos observándose un alto poder discriminatorio (99,2%) de amplificación con los perfiles de bandas para cada iniciador utilizado. La combinación de los iniciadores G1-G2, SPR3-G1 y SPR4-G1 permitió la identificación de 13 aislados pertenecientes al genomovar I, y diferenciar a éste del genomovar III, el cual amplificó con los pares G1-G2 y SPR3-G1 mas no con el par de iniciadores SPR4-G1. Otros autores, empleando los pares de iniciadores descritos no obtuvieron amplificados con el par de SPR3-G1 y, por lo tanto, no pudieron diferenciar estos genomovares (Silva y col., 2002 y Whitby y col., 2000).

En el caso de las cepas CVCM 935, CVCM 1276, CVCM 1170, CVCM 1282, CVCM 1430, CVCM 1409 y CVCM 1410, no se logró amplificación con los pares (G1-G2 y SPR3-G1). Estas cepas fueron ubicadas en el genomovar V (*B. vietnamiensis*) tomando en

consideración el esquema algorítmico propuesto por Whitby y col. (2000). Estudios recientes, empleando PCR conjuntamente con técnicas como PCR *recA* y RFLP han permitido identificar genomovares no descritos previamente para el grupo C*Bc* (Bauernfeind y col., 1999; Mahenthiralingam y col., 1997 y Mc Dowell y col., 2001).

El análisis de los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales representado en un dendograma (Figura 9), mostró una similaridad ≥ al 85% entre los miembros del C*Bc* identificados y la formación de cinco grupos con base en al menos dos (2) pruebas bioquímicas. Se observó que diferentes genomovares pueden presentar perfiles bioquímicos comunes por lo que no es posible establecer diferencias. Las cepas identificadas dentro del genomovar I (13 aislados), mostraron un perfil similar para las siguientes pruebas: crecimiento a 42 ºC, oxidación de glucosa y manitol, asimilación del manitol y las pruebas con polimixina B. Dos aislados CVCM1220 y CVCM1429 no fueron identificadas como *B. cepacia* por métodos convencionales, ni por las galerías API 20NE e ID 32GN. Sin embargo, fueron ubicados como pertenecientes al genomovar II al amplificar con el par de iniciadores SPR3-G1. Los aislados como pertenecientes al genomovar V no oxidaron el manitol. En relación con los aislados ambientales las pruebas de oxidación de glucosa (positiva) e hidrólisis de la arginina (negativa) fueron comunes a todos los genomovares.

Al relacionar los perfiles bioquímicos con los genomovares se encontró que los aislados identificados por ambas galerías se ubicaron dentro de los genomovares I, III y IV, mientras que aquellos con perfiles inaceptables o incorrectos se ubicaron en los genomovares II y V.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos por los métodos bioquímicos (pruebas convencionales y galerías) con los de la PCR pone en evidencia la utilidad de los métodos moleculares al identificar positivamente 21 aislados dentro del grupo C*Bc*. Sin embargo, en 48 de los 74 aislados estudiados no se logró la amplificación con los pares de iniciadores G1-G2, SPR3-G1 y SPR4-G1, pero fueron identificados por métodos bioquímicos como otros géneros relacionados (*Stenotrophomonas, Achromobacter*, *Pseudomonas* sp y

*Ralstonia*). Estos resultados permiten aseverar que la aplicación de métodos convencionales es de gran utilidad si van acompañados de técnicas moleculares como la PCR.

El número de aislados estudiados limitó las posibilidades de establecer una relación directa entre los perfiles bioquímicos y los genomovares, por lo que se considera necesario realizar estudios con un mayor número de aislados provenientes de diferentes ambientes naturales y muestras de origen hospitalario, y la inclusión de otras metodologías que han permitido revelar y diferenciar especies noveles (Balwin y col., 2007; Ramette y col., 2005 y Vandamme y col., 1997).

La resistencia de *B. cepacia,* y de los demás miembros del grupo C*Bc* a los agentes antimicrobianos ha sido considerada como un factor importante en el proceso de colonización, adaptación y modificación de nuevos ecosistemas. La resistencia intrínseca del grupo C*Bc* a algunos antibióticos revela, en buena medida, las adaptaciones experimentadas a lo largo del tiempo como una respuesta a la presión selectiva ejercida por las interacciones con el medio y con la diversidad de microorganismos que predominan en un hábitat particular. Así, podría esperarse que aquellos aislados provenientes de fuentes hospitalarias presentaran diferencias en sus patrones de resistencia a los agentes antimicrobianos, con respecto a aquellos provenientes de fuentes ambientales.

Los estudios de resistencia a agentes antimicrobianos revelan la presencia de altos niveles de resistencia intrínseca a AK y TOB, como resultado de alteración en la permeabilidad de la membrana. Todos los aislados nosocomiales, provenientes de los centros hospitalarios HUAPA, IMT ULA, HJR, y HUC mostraron resistencia a ambos antibióticos, mientras que en las cepas de origen ambiental sólo el 70% presentó resistencia a estos antibióticos. Los aislados ambientales mostraron una amplia diversidad en los patrones de resistencia. Dos cepas aisladas de ajo y gusano del maíz, fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos probados. Estos resultados coinciden con reportes anteriores (Di Cello y col., 1997; Meinikow y col., 2000 y Yu y col., 1999) en los que describen altos niveles de

variabilidad de resistencia entre cepas ambientales del grupo C*Bc*. Por otra parte, el análisis jerárquico de conglomerados de los patrones de resistencia reveló un alto nivel de semejanza (>el 75%) entre ellos (Figura 9). Estos resultados sugieren que los aislados ambientales pudieran ser una fuente potencial de infección en pacientes hospitalizados. La caracterización molecular de estos aislados, empleando técnicas como la ribotipificación, permitiría esclarecer esta hipótesis.

Los estudios sobre susceptibilidad *in vitro* muestran que los antibióticos más efectivos contra las cepas del grupo C*Bc* identificadas son: CIP, SXT, CAZ, TZP y PIP. Los aislados clínicos presentaron valores en CIM dos veces más alta para los agentes antimicrobianos AMK, TOB, CAZ y PIP, que los de origen ambiental. Para el resto de los antibióticos, las CIM fueron similares en ambos grupos. Resultados del presente estudio coinciden con reportes anteriormente descritos (Gales y col., 2005 y Nzula y col., 2002). Sin embargo, es importante considerar que *B. cepacia* es a menudo resistente a diferentes antimicrobianos y a ceftazidima pese a ser sensible *in vitro* (Gold y col., 1983).

El análisis de los perfiles de proteínas totales y de membrana externa por SDS-PAGE permitió diferenciar dos grupos principales de aislados con un nivel de 75% de semejanza; cada grupo a su vez subdividido en varios conglomerados, así también se observó la ocurrencia de bandas comunes en los aislados ambientales y nosocomiales. Sin embargo es conveniente aumentar el número de cepas para discernir sobre la inclusión del SDS-PAGE, en el diagnóstico inicial de miembros del grupo C*Bc*, según resultados obtenidos por Vandamme y col., (1997) y Vermis y col., (2002), quienes aseveran que el SDS- PAGE y el análisis computarizado asistido del patrón de bandas de proteínas, permiten comparar gran número de bacterias y especies estrechamente relacionadas. Este método sin embargo, por si sólo resulta insuficiente en la identificación del C*Bc* y debe aplicarse conjuntamente con otros métodos fenotípicos y moleculares (Cain y col., 2000 y Vermis y col.2002).

Con relación a los perfiles de proteínas encontradas tanto en los aislados nosocomiales como ambientales se observaron bandas densas de $M_r$ 96-98kDa en extractos de proteínas

totales y de membrana externa. Estas bandas han sido reportadas como proteínas de unión al Heme ($M_r$ 96-100kDa) localizado en la membrana externa de una cepa epidémica del genomovar III (Smalley y col., 2001).

Un análisis comparativo de las bandas de proteínas con los patrones de resistencia a antibióticos reveló alta ocurrencia de bandas de proteína $M_r$ 135kDa, 76kDa, 72kDa, 53kDa y 50kDa en las cepas que presentaron resistencia a IPM y ATM (tabla 12). Además, las bandas de $M_r$ 53kDa y 31kDa, fueron encontradas como comunes en los aislados del grupo C*Bc* que mostraron resistencia a SXT y al CIP, mientras que la banda de $M_r$. 50kDa estuvo presente principalmente en cepas resistentes a CAZ. Se requieren estudios complementarios para determinar la posible correlación de las bandas de proteínas con factores de virulencia identificados en cepas de origen hospitalario y ambiental en nuestro medio. En este contexto es imprescindible ampliar la colección de cepas ambientales con muestras colectadas en diferentes hábitats.

# V. CONCLUSIONES

El empleo de medios altamente selectivos y el uso combinado de métodos bioquímicos convencionales, pruebas complementarias y sistemas comerciales, permitieron una buena identificación de *B. cepacia* entre aislados de BGNNF provenientes de muestras ambientales y de centros hospitalarios colectados en varias regiones de Venezuela. Sin embargo, la sola aplicación de aproximaciones fenotípicas no fue suficiente para establecer una separación a nivel de especie entre los miembros del grupo de bacilos descritos como pertenecientes al Complejo *Burkholderia cepacia* (C*Bc*). El índice discriminatorio de los métodos convencionales y sistemas comerciales arrojó valores en el rango de 13,76% -50,79%, muy por debajo de la prueba molecular.

Para lograr una correcta identificación de las especies es indispensable acompañar la metodología fenotípica con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando iniciadores para la amplificación de secuencias de genes ribosomales. El uso de pares de iniciadores en reacciones separadas permitió, con un alto poder discriminatorio (99,2%) diferenciar entre los genomovares I, II, III, IV y V.

La relación entre los métodos bioquímicos (pruebas convencionales y galerías) con los resultados de la PCR, pone en evidencia el alto nivel de resolución de esta metodología. Fue posible identificar, a nivel de genomovares, 28 aislados entre un total de 74 examinados. Sin embargo, un número importante de cepas no amplificaron con los pares de iniciadores G1-G2, SPR3-G1 y SPR4-G1 y fueron identificados como otros géneros (*Stenotrophomonas, Achromobacter*, *Pseudomonas* sp y *Ralstonia).* Los genomovares identificados como *B. vietnamensis* con los iniciadores probados, deben ser confirmados por otros métodos como la ribotipificación, que permite la diferenciación a nivel de subespecies o variedades.

El análisis de conglomerados de las bandas de proteínas de los ensayos con SDS-PAGE demostró un alto grado de similitud entre los aislados ambientales y nosocomiales, así como también entre los diferentes genomovares.

Tanto los aislados ambientales como los nosocomiales presentaron resistencia a la mayoría de los antibióticos, sin embargo, los aislados clínicos mostraron niveles de resistencia dos veces más alta que los aislados ambientales. El valor de las CIM fue dos veces más alto para AK, TOB, CAZ, PIP e IPM en los aislados nosocomiales.

Se encontraron bandas de proteínas específicas tanto en aislados nosocomiales como en ambientales, las cuales pueden estar asociadas con la resistencia intrínseca antimicrobiana de los miembros del C*Bc.* Polipéptidos de $M_r$ 135kDa, 76kDa, 72kDa, 53kDa y 50kDa pueden estar relacionados con resistencia a IPM y ATM, $M_r$ de 53kDa y 31kDa con SXT y $M_r$ 50kDa con CAZ.

# VI. RECOMENDACIONES

En el diagnóstico de miembros del C*Bc* y géneros similares, es importante utilizar métodos combinados basados en características morfológicas y bioquímicas, acompañados con procedimientos de sistemas comerciales (API 20 NE, ID 32 GN), a fin de mejorar el diagnóstico clínico a nivel hospitalario, ya que a menudo se confunde con géneros muy próximos.

Es recomendable realizar estudios para evaluar la relación entre la resistencia a agentes antimicrobianos entre aislados de origen nosocomial y aquellos de origen ambiental en los que el hombre desarrolla tareas de producción agrícola. En este contexto, es recomendable realizar un estudio más amplio con muestras ambientales.

# VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Aaron, S., Ferris, W., Henry, D., Speert, D. y MacDonald, N. (2000). Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med 161*:1206-1212.

Abe, M. y Nakazawa, T. (1994). Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalycin, from *Pseudomonas cepacia*. *Microbiol Immunol 38*(1): 1-9.

Balandreau, J.,Viallard, V., Cournoyer, B., Coenye,T., Laevens, S. y Vandamme, P. (2001). *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant associated bacterium. *Appl Enviroment Microbiol* 67:982-985.

Ballard, R., Palleroni, N., Doudoroff, M. y Stenier, R. (1970). Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. Allicola*, and *P. Caryophylli*. *J Gen Microbiol*. *60*: 199-214.

Balwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Vandamme, P., Govan, J., Waine, D., Dalmastri, A., Henry, Apert, D., Honeybournne, D., Maiden, M. y Dowson, C. (2007). Environmental *Burkholdeia cepacia* complex isolates in humans infections. *Emerg Infect Dis 13*(3):458-461.

Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, C. y Roller, C. (1999). Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* genomovars I, III, and IV by PCR. *J Clin Microbiol*. *37*: 1335-1339.

Bevivino, A., Dalmastri, C.,Tababacchioni, S., Chiarini, L., Belli, M., Piana, S., Materazzo, A., Vandamme, P. y Manno, G. (2002). *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria from Clinical and Environmental Sources in Italy: Genomovars Status and Distribution of Traits Related to Virulence and Transmissibility.*J Clin Microbiol.40* (3): 846-851.

Bevivino, A., Tabacchioni, S., Chiarini,, L., Caruri, M., Del Gallo, M. y Visca, P. (1994). Phenotypic comparison between rizhosphere and clinical isolates of *Burkholdeia cepacia* . *Microbiol .140*: 1069-1077.

Blecker, D., Spilker, T., Gracely, E., Coenye, T., Vandamme, P. y Lipuma, J. (2000). Utility of Commercial Systems for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex from Cystic Fibrosis Sputum Culture. *J Clin Microbiol*; *38* (8): 3112-3115.

Bonacorsi, S., Fitooussi, F., Lhopital, S. y Bingen, E. (1999). Comparative in vitro activities of meropenem, imipenem, temocilina, piperacilina, and ceftazidima in combination with tobramicina, rifampicina or ciprofloxacin against Burkholderia cepacia isolates from patients with cystic fibrosis.*Antimicrob Chemother*.*43*: 213-217.

Bowers, J. y Parke, J. (1993). Epidemiology of Pythium damping-of and Aphanomyces root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology*. *83*: 1466-1473.

Brisse, S., Cees, M.,Milatovic, D.,Fluit, A.,Verhoef, J.,Laevens,S.,Vandamme, P., Tummler, Brugh, H., y Belkum, (2000). Distinguing Species of the *Burkholderia cepacia* Complex and *Burkholderia gladioli* by automated ribotyping. *J Clin Microbiol;38*:1876-1884.

Brosh, R., Lefrevre, M., Grimont, F. y Grimont P. (1996). Taxonomic diversity of Pseudomonads revealed by computer-interpretation of ribotyping data. *Syst Appl Microbiol*.19: 541-555.

Burdash, N., Bannister, E., Manos, J. y West, M. (1979). Comparison of Four Commercial Systems for the Identification of Nonfermentative Gram-negative Bacilli.*Amer Soc Clin Pathol*. *73*: 564-569.

Burkholder, W. H. (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopath*. *64*: 468-475.

Butler, S., Doherty, C., Hughes, J., Nelson, J. y Govan, J. (1995). *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard?. *J Clin Microbiol*. *33*:1001-1004.

Cain, C., Henry, A., Waldo. R., Casida, L. y Falkinham. J. (2000). Identification and characteristics of a Novel *Burkholderia* strain with broad spectrum antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol*. *66*(9): 4139-4141.

Callaghan, E., Tanner, M. y Boulnois, G. (1994). Development of a PCR probe test for identifyng *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas (Burkholderia cepacia)*. *J Clin Pathol*. *47*: 222-226.

Campbell, P., Phillips, J., Heidecker, M., Krishnamani, R. y Stull, T. (1995). Detection of *Pseudomonas(Burkholderia) cepacia* using PCR. *Pediatric.Pulmonol*. *20*: 44-49.

Cantón, R., Martínez, L., Oliver, A., Solé, A., Valdezate, S. y Maíz, L. (2002). Patógenos multirresistentes en la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*. *38*(8):376-385.

Carson, L., Tablan, O., Cusick, I., Jarvis, W., Favero M. y Bland, L. (1988). Comparative Evaluation of Selective Media for Isolation of *Pseudomonas cepacia* from Cystic Fibrosis Patients and Environmental Sources. *J Clin Microbiol 26* (10): 2096 – 2100.

Cartwright, D., Chilton, C. y Benson, D. (1995). Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*.*Appl Microbiol Biotechnol*. *43*. 211-216.

Clinical y Laboratory Standards Institute/CLSI. (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement.*CLSI* document, *M100-S16*: 184.

Clode, F., Kaufmann, M., Malnick, H. y Pitt, T. (1999). Evaluation of three oligonucleotide primer sets in PCR for the identification of *Burkholderia cepacia* and their differentiation from *Burkholderia gladioli* . *J Clin Pathol*. *52:* 173-176.

Coenye, T. y Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol 5*:710-729.

Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Henry, D., Lipuma, J., Laevens, S., Gillis, M., Speert, D. y Vandamme, P. (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.

Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. y Lipuma, J. (2001). Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J clin Microbiol*. *39*(10): 3427-3436.

Dalmastri,C., Fiore, A., Alisi, C., Bebivino, A., Tabacchioni, S. y Giuliano, G. (2003). A rihizospheric *Burkholderia cepacia* complex population. Genotipic and phenotipic diversity

of *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia ambifaria*. FEMS *Microbiol Ecol*. *46*: 179-187.

Daubaras, D., Danganan, C., Hubner, A., Wine, R., Hendrickson, W. y Chakrabarty, A. (1996). Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight. *Gene*. *179*:1-8.

Di Cello, F., Bevivino, A.,Chiarini, L., Pafetti, D., Tabacchioni, S. y Dalmastri, C. (1997). Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolate from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol*. *63*:4485-4493.

Dice, L. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. *26*:297-302.

Doit, C., Loukil, C., Simon, A., Ferroni. A., Fontan, J. y Bonacorsi, S. (2004). Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in a pediatric hospital due to contamination of lipid emulsion stoppers. *J Clin Microbiol*.*42*:2227-30.

Estrada, P., Bustillos-Cristales, R. y Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *App Environ Microbiol*.*67*: 2790-2798.

Fiore, A., Laevens, S., Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., Vandamme,P. y Chiarini, L. (2001). *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. *Environm Microbiol 3*: 137-143.

Folson, B., Chapman, P. y Pritchard, P. (1990). Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics interactions between substrates.*Appl Environ Microbiol*. *56*: 1279-1285.

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld,A. y Trevino, E. Diagnóstico Microbiológico. (2004). 11ª ed. *Edit Med Panam.* Buenos Aires.; p. 396.

Gales, A., Jones, R., Andrade, S. y Sader, H. (2005). Antimicrobial susceptibility of unusual nonfermentative gram-negative bacilli isolated from Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial surveillance program (1997-2002).*Mem Ins Oswaldo Cruz.*; *100*(6):671-677.

Gales, A., Reis, A. y Jones, R. (2002). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polimixin B and colistin, Review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol*. *39*(1); 183-190.

Gil, Mónica. (2001). Bacteremia de curso fatal por *Burkholderia cepacia*: Revisión de la literatura a propósito de un caso clínico .*Rev Chil Infectol*. *18* (1):1-4.

Gilardi, G. (1991). *Pseudomonas* and related genera. En Balows A.(ed). *Manual of Clinical Microbiology* . 5th ed. Washintong DC, American Society for Microbiology. 429-441 p.

Gold, R., Jin, E. y Levinson, H. (1983). Ceftazidime alone and combination in patients with cystic fibrosis; lack of efficacy in treatment of severe respiratory infections caused by *Pseudomonas cepacia. J Antimicrob Chemoter* 12 (SupplA): 331.

Goldman, D., Sedman, S. y Ebert, M. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*. *211*:1437-1438.

Govan, J. y Deretic, V. (1996). Microbial patogenesis in cystic fibrosis; mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*. *60*(3):539-574.

Govan, J. y Vandamme, P. (1996). *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol*.*45*: 395-407.

Hancock, R. (1998). Resistence mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other Nonfermentative Gram-Negative bacteria. *Clin Infect Dis*. *27*(1): 593-599.

Hebbart, K., Davey, A. y Dart, P. (1992). Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fuzarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: isolation and identification.*Soil Biol Biochem*. *24:* 979-987.

Hebbart, K., Martel, M. y Heulin, T. (1998). Suppression of pre and post emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia* . *Eur J Plant Pathol 104*. 29-36 .

Hendrickson, W. (2000). Clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia* exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells. *Mol Microbiol. 36*(6): 1481-1493.

Henry, D., Campbell, M., Lipuma, J. y Speert, D. (1997). Identification of *Burkholderia* isolates from patients with cystic fibrosis and use a simple new

Henry, D., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P.,Coenye, T. y Speert, D. (2001). Phenotypic methods for determining genomovars status of the *Burkholderia cepacia* Complex. *J Clin Microbiol*; *39* (3): 1073-1078.

Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A. y Heydrich, M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Rev Colomb Biotec* 6 (1): 6 – 13.

Hodson, M. (1995). Bacterial infection in cystic fibrosis (CF): special reference to mycobacteria and *Burkholderia cepacia*. *Pediatric Pulmonol* (Suppl 1); 11: 66-7.

Holmes, A., Govan, J. y Goldstein, R. (1998). Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas) cepacia*: A Threat to Human Health? *Emerg Infect Dis*. *4:*221-227.

Holmes, B., Costas, M., Ganner, M., On, S. y Stevens, M. (1994). Evaluation of biology system for identification of some Gram Negative bacteria of clinical importance. *J Clin Microbiol*. *32*(8): 1970-1975.

Hughes, D., King, N. y 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.

Hunter, P. y Gaston, M. (1988), Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*. 26(11): 2465-2466.

John, E., Moore, J. y Stuart, E. (2003). *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis

Jones, A., Dood, M. y Webb, A. (2001). *Burkholderia cepacia*. Current clinical issues, environmental controversias and ethical dilemmas. *Eur Respir J*. 17: 295-301.

Jonson,V. (1970). Proposal of a new species *Pseudomonas kingii*. *Int J Syst Bacteriol*.*20*: 255-257.

Kahyaoglu, O., Nolan, B. y Kumar, A. (1995). *Burkholderia cepacia* sepsis in neonatos. *Pediatr Infect Dis J*. 14:815-816.

Karpati, F. y Jonasson, J. (1996). Polymerase chain reaction fot the detection of *Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. *Mol Cell Probes.10*: 397-403.

Kiska, D., Kerr, A., Jones, M., Caracciolo, J., Eskridge, B., Jordan, M., Miller, S., King, E. y Parke, J. (1996). Population density of the biocontrol agent *Burkholderia cepacia* AMMDRI on four pea cultivars. *Soil Biol Biochem 28*. 306-312..

Koneman, E., Allen, S., Janda, S., Schreckenberger,W. y Winn, W. (1999). *Diagnóstico Microbiológico*. 5ta.ed. Edit Med. Panam Buenos Aires; p 251-307.

LiPuma, J., Dulaney, B., McMenamin, J. D., Whitby, P., Stull, T., Coenye, T. y Vandamme, P. (1999). Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. *37*: 3167-3170.

LiPuma, J., Spilker, Gill, L., Campbel, P., W., Liu, L. y Mahenthiralingam, E. (2001). Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. *164*: 92-96.

Mahenthiralingam, E., Bischof, J., Byrne, S., Radomski, C., Davies, J., Av-Gay, Y. y Vandamme, P. (2000). DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis, Burkholderia multivorans, Burkholderia stabilis,* and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol*. *38*: 3165-3173.

Mahenthiralingam, E., Simpson, D. y Speert, D. (1997). Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. *35*: 808-816.

Malik, A., Hasani, S., Shahid, M., Kham, H. y Ahmad, A. (2003). Nosocomial *Klebsiella* infection in neonates in a tertiary care hospital: Protein profile by SDS-PAGE and klebocin typing as epidemiological markers. *Indian J Med Microbiol. 21*:82-86.

Máttar, S. (2000). Utilidad de la biología molecular en el estudio de la zoonosis. *MVZ Cordoba*. 5(1): 46-50.

Mc Dowell, A., Mahenthiralingam, E., Moore, J., Kerstin, E., Dunbar, A., Kevin, A., Dood, M., Martin, L., Millar, CH., Scott, C., Crowe, M. y Elborn, S. (2001). PCR-Based and identification of *Burkholderia cepacia* Complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 39(12): 4247-4255,

Meinikow, A., Zaborina, O., Dhiman, N., Prabhakar, A., Chakrabarty, A. y Hendrickson, W. (2000). Clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia* exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells. *Mol Microbiol*. *36*:1481-1493.

Melo, H. (2007). *Burkholderia cepacia* complex: Virulence characteristics, importance and relationship with cystic fibrosis. *Indian J med Sci*. *61*: 422-429.

Miller, M. y Gilligan, P. (2003). Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. *41*: 4009-40015.

Morris, M. y Roberts, J. (1959). A group of pseudomonads able to synthesize poly- β-hydroxyburyric acid. *Nature*. *183*: 1538-1539.

Morton, R., Hebel, J. y McCarter, R. (1993). Bioestadística y epidemiología. 3$^{era}$. Ed. Interamericana. México, D.F.: McGraw-Hill. p 61-69.

Murray, P., Aaron, J., Pfaller, M., Tenover, F. y Yolken, R. (1999). Manual of Clinical Microbiology. 7$^{th}$. Ed. *Am Soc Microbiol* Washington Dc, pp. 116-125.

Nzula, S., Vandamme, P. y Govan, J. (2002). Influence of taxonomic status on the *in vitro* antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother*.*50*: 265-269.

Parke, J. y Guriam-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Ann Rev Phytopathol*. *39*:225-258.

Parr, T., Moore, R., Moore, L. y Hancock, R. (1987). Role of porins in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*. *31*:121-123.

Pitt, T., Kaufmann, M., Patel, P., Benge, L., Gaskin, S. y Livermore, D. (1996). Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*

isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol*.*44*:203-210.

Rajyaguru, J. y Muszynski, M. (1997). Association of resistance to trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol and quinolones with changes in major outer membrane proteins and lipopolysaccharide in *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother*.*40*:803-809.

Ramette, A., Lipuma, J. y Tiedje, J. (2005).Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the environment. *Appl Environ Microbiol*.; *71*(3): 1193-1201.

Rodley, P., Romling, U. y Tummler, B., (1995). A Physical Genome Map of the *Burkholderia cepacia* Type Strain. *Mol Microbiol*. *17* ( 1 ): 57 – 67.

Sajjan, U., Wu, Y., Kent, G. y Forstner, J. (2000). Preferential adherence of cable-piliated *Burkholderia cepacia* to respiratory epithelia of CF knockout mice and human cystic fibrosis lung explants. *J Med Microbiol*. 49:875-885.

Salles, J., Souza, F. y Elsas, Van J. (2002). Molecular method to assess the diversity of *burkholderia* specie s in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol*; *68*:1595-1603.

Segonds, C., Heulin, T., Marty, N. y Chabanon, G. (1999). Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol*. *37*: 2201-2208.

selective medium *J Clin Microbiol*. *35* (3): 614-619.

Silva, F., Velloso, L., Bento, C., Gytin, E., Teno, A., Levi, J., Rodríguez, J. y Ramos, S. (2002). Use of selective médium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory simples from cystic fibrosis patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.; 44(4): 203-208.

Smalley, J., Charalabous, P., Birss, A. y Hart, A. (2001). Detection of heme-binding proteins in epidemic strains of *Burkholderia cepacia*. *Clin Diagnost Lab Immunol*.*8*: 509-514.

Smalley, J., Charalabous, P., Birss, A. y Hart, A. (2001). Detection of heme-binding proteins in epidemic strains of *Burkholderia cepacia*. *Clin Diagnost Lab Immunol* . *8*:509-514.

Snell, J., Hill, L., Lapage, P. y Curtis, J. (1972). Identification of *Pseudomonas cepacia* Burkholder and its synonymy with *Pseudomonas kingii* Jhonsson. *Int J Syst Bacteriol. 22*: 127-138.

Soni, R., Marks, G., Henry, D., Robinson, M., Moriarte, C. y Parsons, S. (2002). Effect of *Burkholderia cepacia* infection in the clinical course of patients with cystic fibrosis: *Respirology. 7*:241-245.

Speert, D., Bond, R., Woodman, R. y Curnutte, T. (1994). Infection with *Pseudomonas cepacia* in chronic granulomatous disease: role of non-oxidative killing by neutrophils in host defense. *J Iinfect Dis.*170: 1524-1531.

Stanier, E., Palleroni N. y Doudoroff, M. (1966). The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*. *43*: 159-271.

Stoscheck, CM. (1990). Quantitation of protein. In Deutscher MP, editor. Methods in Enzymology. New York: Academic Press; 182: 50-68.

Turton, J., Arif, N., Hennesy, D., Kaufmann, M. y Pitt, T. (2007). Revised approach for identification of isolates within the *Burkhoderia cepacia* Complex and description of clinical isolates not assigned to any of the known Genomovars. *J Clin Microbiol*. 45(7): 3105-3108.

Ursing, J. B., R. A. Rossello-Mora, E. García-Valdés, y J. Lalucat. (1995). Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 45: 604.

Vailable from http://www.cysticfibrosismedicine.com/15/06/07.

Van Pelt, C., Verduin, C., Goessens, W., Vos, M., Tummer, C., Segonds, F. Reubsaet., H., Verbrugh, H. y 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.

Vandamme, P. (2002). Polyphasic Taxonomy in practise: the *Burkholderia cepacia Challenge. World Federation for culture collections*. ISSN. *34*: 17-24.

Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. y Govan, J. (1997). Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. *Int J Syst Bacteriol. 47*:1188-1200.

Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., Henry, D. y Speert, D. (2000). Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol*. *38*: 1042-1047.

Vermis, K., Coenye, T., Mahenthiralingan, E., Hans, N. y Vandamme, P. (2002). Evaluation of species-specific *rec*A-based PCR test for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med. Microbiol*. *51:* 937-940.

Vermis, K., Vandekerekhove., Nelis, H. y Vandamme P. (2002). Evaluation of restriction fragment lenght polymorphism analysis of 16s rDNA as a tool for genomovar characterization within *the Burkholderia cepacia* complex.*FEMS Microbiol Lett.* 214: 1-5.

Weingart, C. y Morris, A. (1999). A Nonhemolytic phospholipase C from *Burkholderia cepacia*.*Current Microbiol*. *38*:233-238.

Wen-Liang, Y., Der-Yuan, W., Cheng-Wen, I. y Mei-Fen, T. (1999). Endemic *Burkholderia cepacia* Bacteremia: Clinical Features and Antimicrobial Susceptibilities of Isolates. *Scand J Infect. Dis*. 31: 293–298.

Whitby, P., Carter, K., Hatter, K., LiPuma, J. y Stull, T. (2000). Identification of members of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. *J Clin Microbiol*. *38*: 2962-2965.

Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S., Ralyea, R. y Boor, K. (2000). Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp Isolated from Milk. *Appl Environ Microbiol*. *66* (5): 2085–2095.

Wigley, P. y Burton, N. (1999). Genotipic and phenotypic relationships in *Burkholderia cepacia* isolated from cystic fibrosis patients end the environment. *J Appl Microbiol. 86*: 460-468.

Wu, W., Welsh, M., Kaufman, P. y Zhang, H (1997). Analysis of gene expression at the protein level. In Methods in Gene Biotechnology. New York, CRC Press. 241-258.

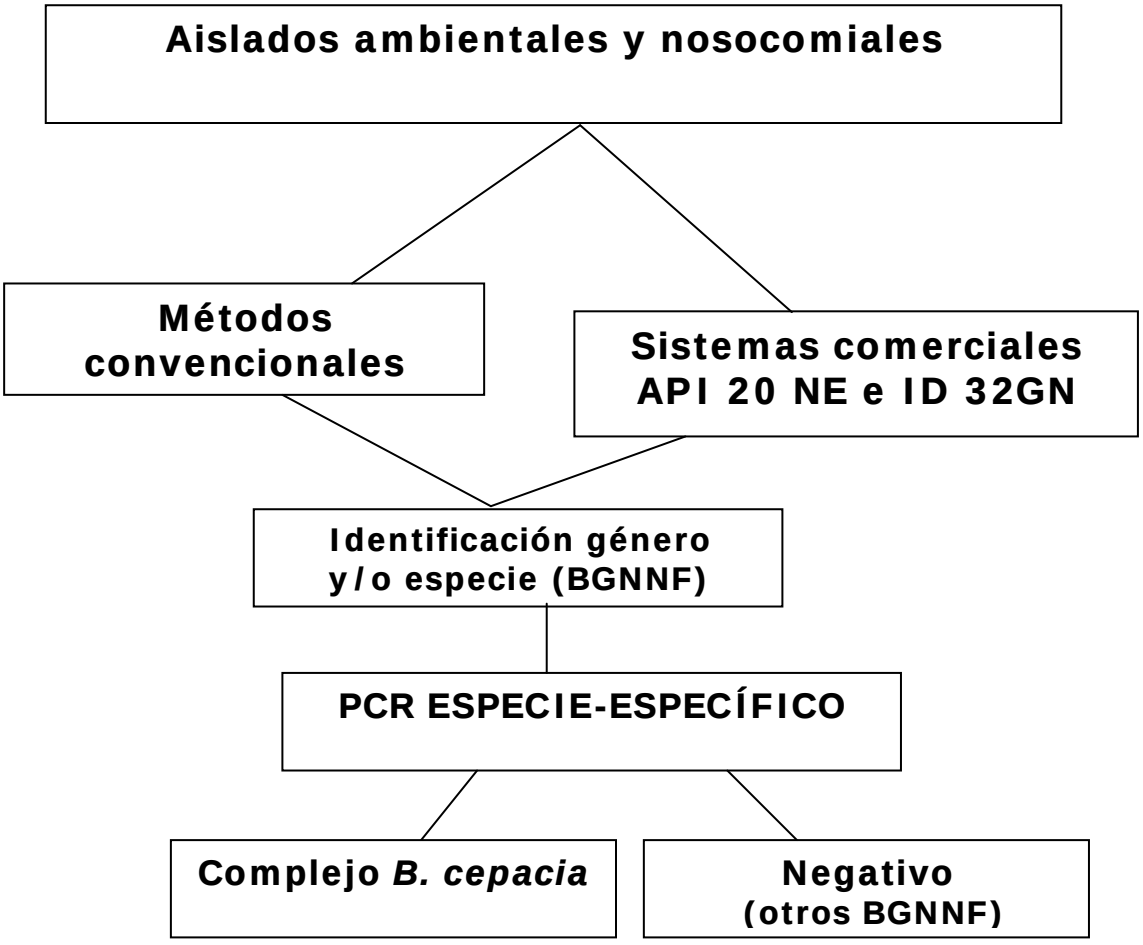
Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hottah., Hashimoto, Y., Ezaki, T. y Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni y Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol*.36: 1251-1275.

Yu, W., Wang, D., Lin, C. y Tsou, M. (1999). Endemic *Burkholderia cepacia* bacteraemia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *Scand J Infec Dis*. *31*: 293-298.

Zhang, L., Li, X. y Poole, K. (2000). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrob Agents Chemother*.*44*: 287-293.

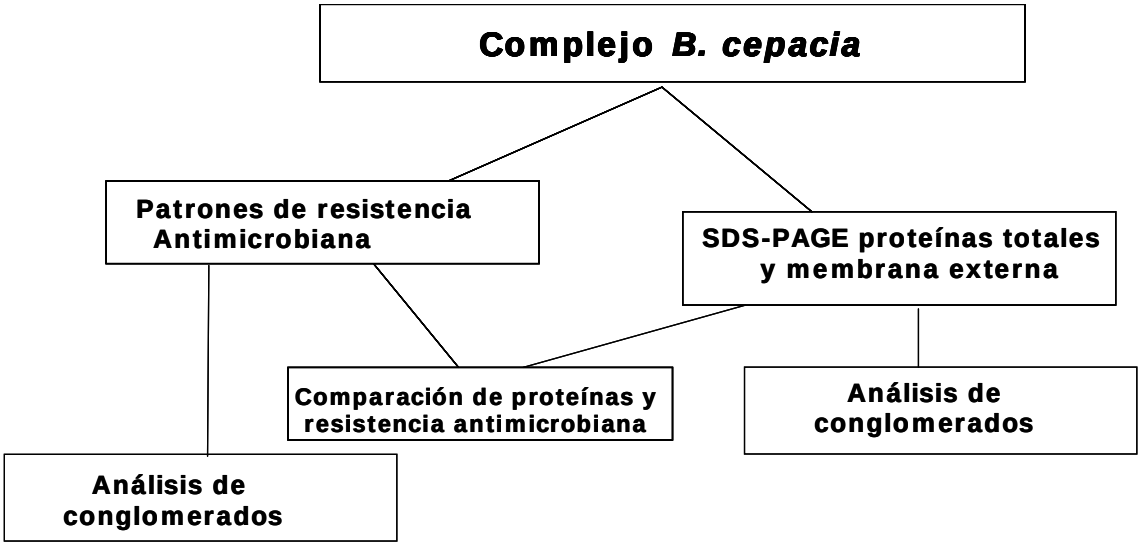
# VIII. A P É N D I C E S

# APÉNDICE 1




Protocolo para la identificación fenotípica y genética de aislados del Complejo *B. cepacia*.

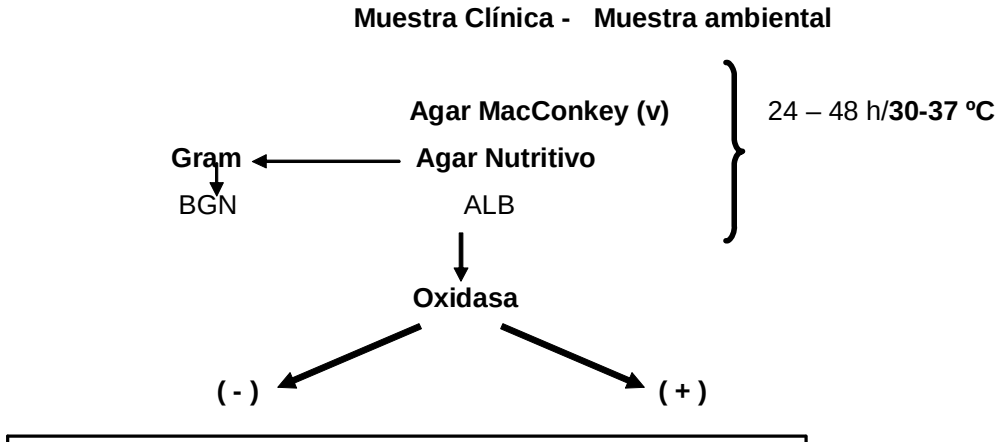
# APÉNDICE 2




Protocolo para la identificación fenotípica de aislados del Complejo *B. cepacia*. Comparación de perfiles proteicos y patrones de resistencia.

# APÉNDICE 3

## IDENTIFICACIÓN DE *Burkholderia cepacia* Y OTROS BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES




*P.aeruginosa* *P.stutzeri* *Género Achromobacter* Complejo *B.cepacia*

*P.fluorescens* *P.mendocina* *Género Brevundimonas* *P.putida*

Género *Stenotrophomonas* Grupo Vb-3

ALB: Agar luria Bertani

# APÉNDICE 4

## Pruebas bioquímicas diferenciales para la identificación de B. cepacia y géneros relacionados. BGNNF, oxidasa positiva-móviles.

| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Oxidasa | V (86) | + | + | + | + | + | + |
| Motilidad | + | + | + | + | + | + | + |
| Pioverdina | - | + | + | + | - | - | - |
| Ácido de glucosa | + | + | + | + | + | + | + |
| Maltosa | + | V | V | V | + | - | + |
| Xilosa | + | + | + | + | + | V(75) | + |
| Manitol | + | V | + | V | V | - | + |
| (10%) lactosa | + | - | - | - | - | - | - |
| Sacarosa | V (86) | - | V | V | - | - | - |
| Arginina DH | - | + | + | + | - | + | + |
| Lisina DC | + | - | - | - | - | - | - |
| Gelatina | V (74) | V | + | - | - | - | - |
| Esculina | V | - | - | - | - | - | - |
| DNasa | - | - | - | - | - | - | - |
| Ureasa | V | V | V | V | V | V | V |
| ONPG | V | - | - | - | - | - | - |
| Polimixina | R | S | S | S | S | S | S |
| MacConkey | + | + | + | + | + | + | + |
| 42 ºC | V | + | - | - | + | + | + |

(1) *Burkholderia cepacia* – Grupo fluorescente
(2) *P. aeruginosa* (3) *P. fluorescens* (4) *P. putida* ; Grupo Stutzeri
(5) *P. stutzeri* (6) *P. mendocina* y (7) *CDC Vb – 3*

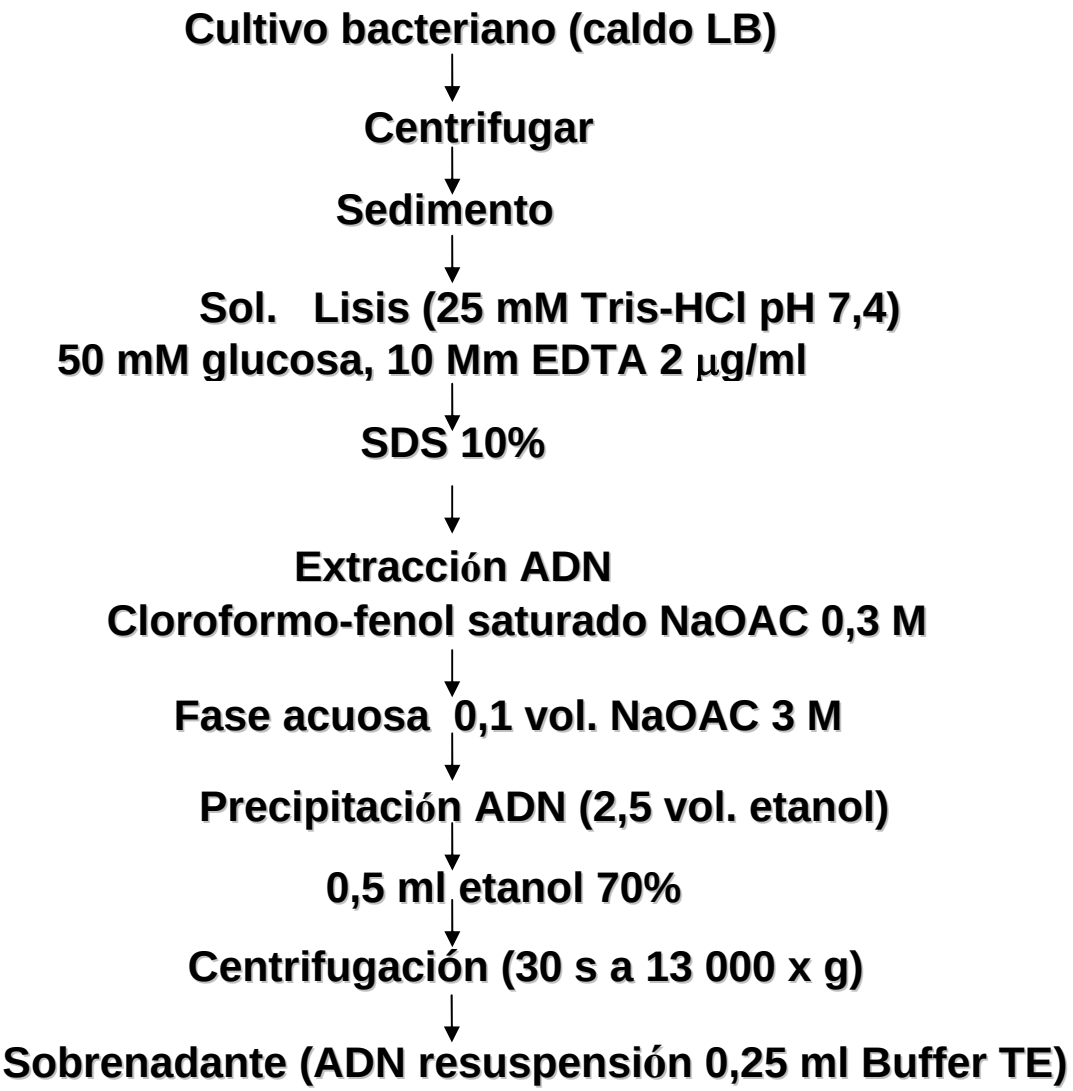
# APÉNDICE 5

Pruebas bioquímicas diferenciales para la identificación de *B.cepacia* y géneros relacionados. BGNNF, oxidasa negativa-móviles

| | (1) | (2) | (3) | (4) |
|---|---|---|---|---|
| Oxidasa | V (86) | - | - | - |
| MacConkey | + | + | + | + |
| Pigmento | Amarillo | Verduzco | Amarillo | Amarillo |
| Motilidad | + | + | + | + |
| 42 ºC | V | V | V | V |
| Ácido de glucosa | + | V | + | + |
| Lactosa | + | + | - | - |
| Sacarosa | V | V | - | V |
| Maltosa | + | + | + | + |
| Manitol | + | - | + | + |
| Xilosa | + | V | + | + |
| Nitrato a nitrito | V | V | V | - |
| Esculina | V | + | + | - |
| Gelatina | V | + | V | - |
| Ureasa | V | - | V | V |
| DNasa | - | + | - | - |
| Lisina DC | V | + | - | - |
| Arginina DH | - | - | V | - |
| ONPG | V | + | + | - |
| Polimixina B | R | S | S | S |

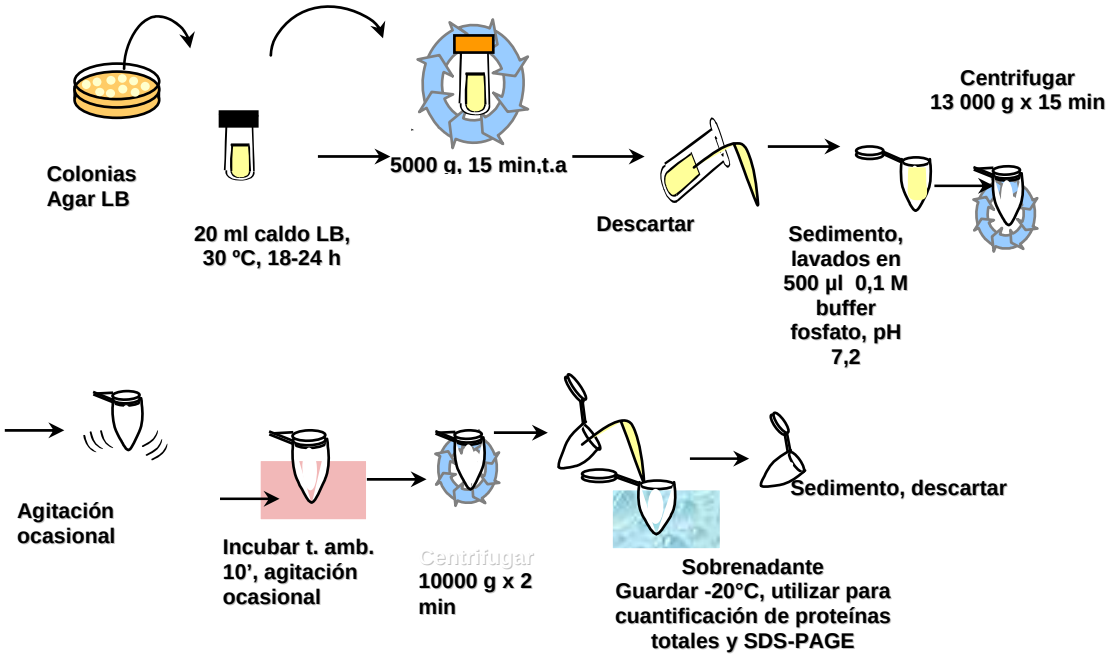
(1) *Burkholderia cepacia*
(2) *S. maltophilia*
(3) *C. luteola*
(4) *F. horyzihabitans*

# APÉNDICE 6



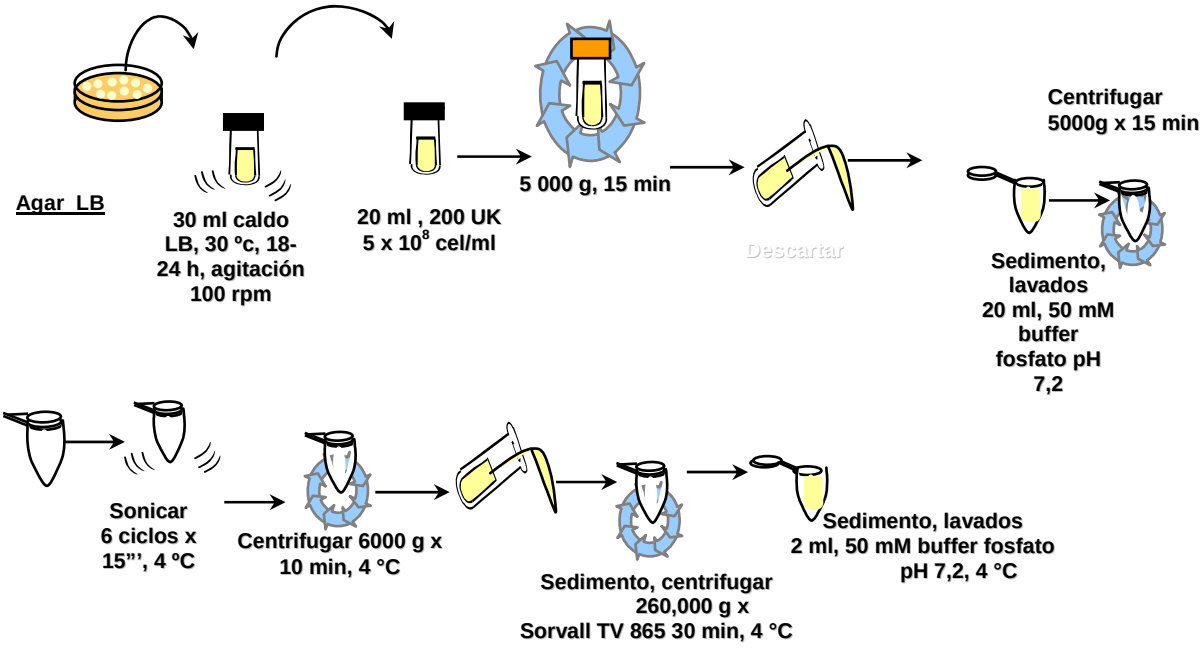

**Aislamiento del ADN Genómico**

# APÉNDICE 7



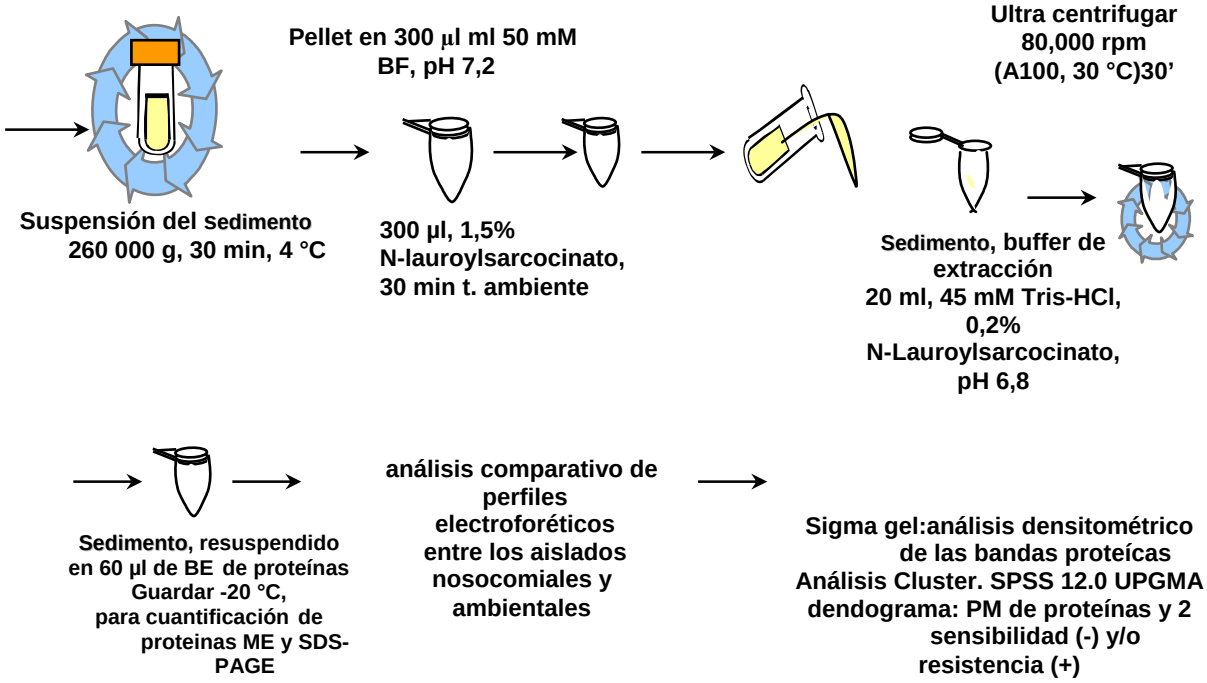

**Extracción de proteínas totales de cultivos bacterianos**

# APÉNDICE 8A




## Purificación de proteínas de membrana externa

# APÉNDICE 8B




## Purificación de proteínas de membrana externa

# IX. A N E X O S

# ANEXO 1

## MEDIOS DE CULTIVO

**Caldo Luria Bertani**

| | |
|---|---|
| Bacto triptona | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Cloruro de sodio | 5 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH 7,2

**Agar Luria Bertani**

| | |
|---|---|
| Bacto triptona | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Cloruro de sodio | 5 g |
| Agar | 10 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH 7,2

**Agar MacConkey**

Peso ( g) x volumen de agua destilada

**50 g/1000 ml**

**Medio oxidación/ fermentación ( O/F )**

| | |
|---|---|
| Peptona | 2 g |
| Cloruro de sodio | 5 g |
| D-glucosa | 10 g |
| Azul de bromotimol | 0,03 |
| Agar | 3 g |
| Fosfato dipotásico | 0,3 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH 7,2

**Caldo base de Müeller para descarboxilasa**

| | |
|---|---|
| Peptona | 5 g |
| Extracto de carne | 5 g |
| Púrpura de bromocresol | 0,01 g |
| Rojo de cresol | 0,005 g |
| Glucosa | 0,5 g |
| Piridoxal | 0,005 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Cloruro de sodio | 5 g |

pH 7,2

Aminoácido (Lisina, arginina, ornitina). Agregar 10 g (concentración final 1%) de la forma L (levo).

**Agar Müeller-Hinton**

| | |
|---|---|
| Infusión de carne | 17,5 g |
| Hidrolizado de caseína | 0,005 g |
| Almidón | 1,5 g |
| Agar-agar | 13 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

pH 7,2

# ANEXO 2

## SOLUCIONES Y REACTIVOS

**Solución de lisis (para aislamiento de ADN)**

| | |
|---|---|
| Tris-HCl ( pH 7,4) | 25 mM |
| Glucosa | 50 mM |
| EDTA | 10mM |
| Lisozima 2 μg/ml | 25 mM |

**Soluciones empleadas en SDS-PAGE**

**Solución stock poliacrilamida**

| | |
|---|---|
| Acrilamida | 116,8 g |
| N,N-Metileno-bis-acrilamida | 3,2 g |
| Disolver después de cada adición en 300 ml de agua bidestilada | |
| Agua bi-destilada (volumen final) | 400 ml |

**Buffer para gel separador**

| | |
|---|---|
| Tris 1,5 M | 72,6 g |
| Agua bidestilada | 250 ml |
| Ajustar a pH 8,8 con HCl 6 N | |
| Agua bidestilada (volumen final) | 400 ml |
| Estable a 4° C | 25 mM |

**Buffer para gel concentrador**

| | |
|---|---|
| Tris 0,5 M | 1,2 g |
| Agua bidestilada | 200 ml |
| Ajustar a pH 6,8 con HCl 6 N | |
| Agua bidestilada ( volumen final) | 400 ml |
| Estable a 4 °C | 25 mM |

**Buffer denaturalizante**

| | |
|---|---|
| Buffer para gel concentrador | 5 ml |
| Solución SDS (10%) | 8ml |
| Glicerol | 4 ml |
| β-- Mercaptoetanol | 2 ml |
| Agua bidestilada | 20 ml |
| Azul de bromofenol | 20 ml |

Dividir en alícuotas y estable a -20 °C.

**Buffer de corrida**

| | |
|---|---|
| Tris 0,25 M | 12 g |
| Glicina | 57,6 g |
| Solución SDS (10%) | 40 ml |

Adicionar agua bidestilada a 4 L