

RECYT

Año 18 / N° 25 / 2016 / 4–10

Diversidad genética y resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de pacientes fibroquísticos adultos de Argentina

Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from adult cystic fibrosis patients in Argentina

Pablo Martina^{1,2,4,*}, Fernando Mazur², Laura Cazzola³, Claudia Prieto¹, Silvia Pérez³,
Marina Quiroga², Osvaldo Yantorno¹, Eusebia Valdez², Alejandra Bosch¹

1 - Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET, CCT-La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, calle 50 N° 227, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2 - Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

3 - Hospital Interzonal General de Agudos Prof. "Dr. Rodolfo Rossi", Calle 37 N°183, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

4 - Instituto de Biología Subtropical (IBS), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

- Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Jujuy N°1745, CP 3300, Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: pfmartina@hotmail.com

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un organismo comúnmente hallado en la naturaleza que ha sido reconocido como un patógeno oportunista de gran relevancia clínica, particularmente como principal agente infeccioso en pacientes con fibrosis quística. La elevada resistencia a muchos antibióticos de uso frecuente y la capacidad de formar *biofilm* convierten a *P. aeruginosa* en un microorganismo difícil de eliminar. El objetivo de este trabajo fue la tipificación molecular de 58 aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes adultos con fibrosis quística, con el fin de analizar si había una correlación entre características moleculares y el patrón de susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Mediante análisis de BOX-PCR, se demostró que existe una elevada heterogeneidad genética entre los aislamientos, sin embargo no pudo establecerse una correlación con la resistencia a agentes antimicrobianos.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*; Fibrosis quística; Resistencia antibiótica; Diversidad genética.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a common organism found in nature which has been recognized as an opportunistic pathogen of great clinical relevance, particularly as the main infectious agent in patients with cystic fibrosis. The high resistance levels to several commonly used antibiotics and the ability to form biofilms make *P. aeruginosa* a microorganism difficult to eradicate. The aim of this study was to determine the molecular characterization of 58 isolates of *P. aeruginosa* from adult patients with cystic fibrosis, in order to examine whether there was a correlation between molecular features and the pattern of susceptibility to antimicrobial agents. By BOX-PCR analysis, it was demonstrated that there is a high genetic heterogeneity between isolates, Nevertheless, this could not be correlated with resistance to antimicrobial agents.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Cystic fibrosis; Antibiotic resistance; Genetic diversity.

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva potencialmente mortal con una mayor incidencia en la población caucásica [1]. Aunque se estima que solo el 50 % de los casos clínicos son diagnosticados, la enfermedad afecta aproximadamente a 1 de cada 6 750 na-

cidos vivos en Argentina [2]. Las infecciones pulmonares, causadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, pueden persistir durante décadas y son la principal causa de morbilidad y mortalidad para estos pacientes [3; 4]. Después de un período de infecciones recurrentes, los pacientes fibroquísticos se infectan de forma permanente con un único linaje de *P. aeruginosa*, generalmente adquirida

de reservorios ambientales [5]. Durante el establecimiento de la infección, este único linaje de *P. aeruginosa* se diversifica en fenotipos adaptados específicamente para el medio ambiente hostil del pulmón fibroquístico, lo que permite su persistencia a largo plazo [6].

Métodos de tipificación genética, tales como ribotipificación [7], polimorfismo de ADN amplificado al azar (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) [8], electroforesis en gel de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) [9], PCR basada en elementos repetitivos (rep-PCR) [10; 11, 14] y la tipificación de secuencias multilocus (*multilocus sequence type*, MLST) [12] han demostrado que proporcionan una buena especificidad y sensibilidad para una efectiva vigilancia epidemiológica de aislamientos de *P. aeruginosa* potencialmente transmisibles entre pacientes con FQ. Estas metodologías han sido aplicadas para deducir la epidemiología de infecciones en individuos infectados y para entender la diseminación de clones multi-resistentes.

En el Hospital Interzonal de Agudos “Dr. Rossi” de la ciudad de La Plata, Argentina, se realizó un análisis epidemiológico sobre pacientes con FQ, en base a 700 aislamientos recuperados de secreciones bronquiales durante los años 2006 a 2013. Se observó la siguiente distribución: *P. aeruginosa* 77,4%, *Staphylococcus aureus* 68,8%, Complejo *Burkholderia cepacia* 5,7%, *Stenotrophomonas maltophilia* 3,4% y *Achromobacter xylosoxidans* 1,8%. En el 61% de los casos se aislaron dos o más microorganismos simultáneamente, siendo la asociación más frecuente *P. aeruginosa* - *S. aureus* [13]. Este material biológico constituye una importante fuente de información que decidimos explorar en colaboración con el hospital mencionado.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la diversidad genética dentro de una población de *P. aeruginosa* aisladas entre los años 2007 y 2011, de muestras de esputo de pacientes adultos con FQ, tratados en el hospital “Dr. Rossi” de La Plata. Además, a partir del análisis de susceptibilidad a distintos agentes antimicrobianos se buscó determinar si existía alguna correlación entre estructura genética de la población y resistencia a antibióticos.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos

En este trabajo se analizó molecularmente 58 aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados de secreciones bronquiales de 23 pacientes adultos con FQ (entre 16 y 56 años) tratados en el Servicio de Bacteriología del Hospital Interzonal de Agudos “Dr. Rossi” de ciudad de La Plata, Argentina entre los años 2007 y 2011 (tabla 1); para la realización de este estudio se contó con el consentimiento informado de los 23 pacientes. Los aislamientos bacterianos se preservaron liofilizados y pertenecen a la colección

de cepas del Laboratorio Vacunas Bacterias del CINDEFI-CONICET-UNLP. La historia clínica e identidad de cada paciente es reservada.

Tabla 1: Colección de aislamientos recuperados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ.

Paciente	Cepa	Fecha aislamiento
P1	HR112	31/03/2010
	HR196	16/06/2011
P2	HR153	13/10/2010
	HR037	13/05/2009
P3	HR030	24/04/2009
	HR184	27/05/2011
P4	HR011	17/05/2007
	HR048	24/06/2009
	HR045	07/08/2009
	HR233	06/09/2011
P5	HR013	18/05/2007
	HR173	14/01/2011
P6	HR242	18/05/2007
	HR033	14/05/2009
	HR040	04/06/2009
P7	HR204	10/08/2011
	HR076	26/03/2010
P8	HR150	13/10/2010
	HR228	14/07/2011
P9	HR066	03/10/2009
	HR236	21/09/2011
P10	HR028	23/05/2009
	HR214	08/07/2011
	HR232	02/10/2011
P11	HR071	08/10/2009
	HR245	08/10/2011
P12	HR029	24/05/2009
	HR086	03/05/2010
	HR166	25/01/2011
P13	HR016	20/04/2007
	HR017	20/04/2007
	HR135	01/10/2009
	HR259	02/11/2011
P14	HR065	25/09/2009
	HR091	02/07/2010
	HR229	26/08/2011
P15	HR067	03/11/2009
	HR240	01/10/2011
P16	HR023	21/05/2009
	HR109	21/07/2010
	HR217	16/07/2011
P17	HR179	19/05/2010
	HR180	20/05/2011
P18	HR005	11/05/2007
	HR070	08/10/2009
	HR216	08/07/2011
P19	HR043	29/07/2009
	HR050	26/08/2009
	HR092	24/06/2010
	HR189	08/06/2011
P20	HR019	30/05/2007
	HR069	06/11/2009
	HR179	04/01/2011
P21	HR020	07/11/2008
	HR160	13/10/2010
P22	HR001	26/04/2007
	HR171	22/12/2010
P23	HR190	30/05/2011

Condiciones de cultivo y extracción de ADN genómico bacteriano

Los aislamientos de *P. aeruginosa* se inocularon en 5 ml de medio LB (extracto de levadura 5 g/l, triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l; Laboratorios Britania S.A., Argentina) y se incubaron durante 20 h a 37 °C con agitación. Para la extracción del ADN, 1,5 ml de cada cultivo bacteriano se centrifugó durante 5 min a 12 000 g. El sedimento

bacteriano se resuspendió en 200 µl de solución de NaCl 1 M y se realizó una nueva centrifugación. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue suspendido en 500 µl de una solución de lisis (glucosa 50 mM, EDTA 70 mM, Tris-HCl 50 mM, lisozima 5 mg/ml (Sigma, USA), pH 8,0). La mezcla se incubó 1 h a 37 °C con agitación periódica. Posteriormente, se agregó 100 µl de sarcosil 5% (Sigma, USA) y se mezcló suavemente por inversión. La incubación se repitió una vez más (1 h a 37 °C). Luego, se agregó 100 µl de sílica 5% (Sigma, USA), se mezcló por inversión y se centrifugó a 5 000 g. El *pellet* se lavó 3 veces con 500 µl de solución de lavado (20 mM EDTA, 30 mM Tris, 5% Etanol 96° y 2% NaCl 1 M), y se descartó el sobrenadante. El sedimento obtenido se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en un volumen de 70 µl de agua bidestilada estéril y se incubó a 65 °C por 15 min. Finalmente, se mezcló mediante vortex, se centrifugó 1 min a 12 000 g y se transfirió el sobrenadante, conteniendo el ADN puro, a un tubo nuevo. La concentración de ADN se obtuvo midiendo la absorbancia a 260/280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific, USA). Las extracciones fueron almacenadas a -20 °C o utilizadas inmediatamente.

Tipificación por BOX- PCR fingerprinting

Se empleó para estudiar la diversidad genómica las secuencias repetitivas conservadas de los elementos BOX de *Streptococcus pneumoniae* (BOX) [15]. El estudio de diversidad genética se realizó mediante la técnica de BOX-PCR. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µl, constituido por 7 – 9 ng/µl de la muestra de ADN y 11 µl de la mezcla de reacción o *master mix* (1,5 µl de *buffer* 10X (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0,1%); 1,5 µl de mezcla de dNTPs, cada uno con 5 µM; 1,8 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,15 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 U/µl) (Fermentas, USA) y 1 µl del cebador BoxAR1 (5'-CTACGGCAAGGC-GACGCTGACG-3') [14]. Para la amplificación se utilizó un termociclador Bio-Rad programado con un primer ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min; seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 30 s; un ciclo de hibridación a 58 °C durante 1 min; un ciclo de extensión a 70 °C durante 5 min y finalmente 1 ciclo de incubación a 70 °C durante 15 min. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % suplementados con bromuro de etidio 5 ng/ml en 0,5X TBE. La corrida electroforética se realizó con un tiempo inicial de 6 min a 45 mV y luego 90 min a 85 mV con la finalidad de conseguir una separación óptima de las bandas.

Análisis de imagen

Las imágenes obtenidas de los geles se digitalizaron y convirtieron a formato TIFF con la finalidad de llevar

a cabo el análisis de los perfiles de *fingerprint* obtenidos, para lo que se utilizó el programa informático GEL Compare II (versión 2.1 Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Cada imagen fue convertida con una resolución de calle de 250 ppp (puntos por pulgada) y normalizada (resolución, 900; *smoothing*, 5; sustracción de *background rolling disk intensity*, 12) usando el marcador de peso molecular Lambda ladder (Bio-Rad) como referencia. Los perfiles con dos o más bandas de diferencia entre sí, se consideraron no relacionados. La variación en la intensidad de las bandas no se consideró como una diferencia genética. Las bandas evaluadas como demasiado débiles para ser interpretadas, no se incluyeron en el análisis. El análisis de similitud de los resultados para cada ensayo fue calculado utilizando el coeficiente de *Dice* y el análisis de *clusters* generados por matrices de similitud se realizó usando el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Meted with Arithmetic Mean*) [16]. El criterio para definir clones relacionados fue considerar perfiles con el $\geq 85\%$ de similitud de bandas.

Susceptibilidad a antimicrobianos

La susceptibilidad a antibióticos fue evaluada por el método de difusión en agar según recomendaciones e interpretación del CLSI [17] para piperaciclina 100 µg (PIP), piperaciclina-tazobactam 100/10 µg (PTZ), ceftazidima 30 µg (CFZ), cefepima 30 µg (FEP), imipenem 10 µg (IMP), meropenem 10 µg (MER), ampicacina 30 µg (AMK), gentamicina 10 µg (GEN), ciprofloxacina 5 µg (CIP), colistina 10 µg (COL) (Laboratorio Britania S. A., Argentina).

Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el test de Chi-cuadrado empleando el programa SPSS statistics 17.0.

RESULTADOS

Empleando el cebador BOX-A1R, las amplificaciones del ADN de los 58 aislamientos estudiados generaron fragmentos de entre 280 pb y 3 200 pb (figura 1). A partir de estos resultados la utilización del programa informático *Gel Compare II* permitió agrupar los 58 aislamientos analizados en 17 perfiles genotípicos (subtipos BOX-PCR) (figura 2). Los diferentes perfiles fueron designados como BOX-A a BOX-Q y presentaron la siguiente frecuencia: BOX-A 23 aislamientos (39,6%), BOX-D y BOX-I 5 aislamientos (8,6%) cada uno, BOX-J 4 aislamientos cada uno (6,9%), BOX-B y BOX-Q 3 aislamientos cada uno (5,2%) y BOX-C, BOX-M, BOX-N y BOX-P 2 aislamientos para cada uno (3,4%). Los restantes genotipos estuvieron representados por un único aislado (12,2 %).

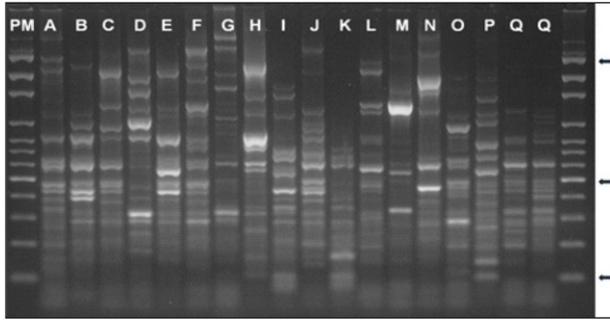


Figura 1: Perfiles BOX-PCR de *P. aeruginosa*. Calle A a Q, corresponden a perfiles representativos de aislamientos clínicos estudiados. PM, peso molecular (Axygen, USA). La flecha indica bandas 100 - 500 - 3500pb.

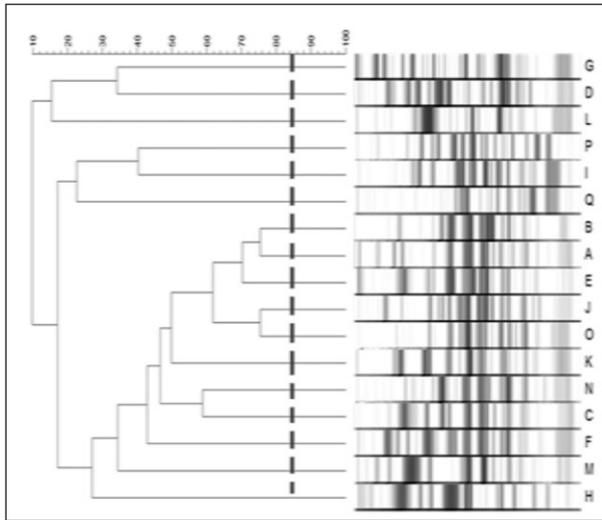


Figura 2: Relación filogenética entre los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Letras A - Q corresponden a los perfiles representativos de BOX-PCR. El Dendrograma fue construido por el método de UPGMA, empleando los valores de similitud del coeficiente Dice. La línea vertical de puntos indica un 85 % de similitud.

Aislamientos sucesivos en pacientes FQ con infecciones crónicas

La figura 3 muestra la secuencia cronológica de subtipos de BOX-PCR para los 58 aislamientos de *P. aeruginosa* recuperados de los 23 pacientes con FQ en estudio. En el 78,2% de los pacientes, se mantuvo el genotipo de la cepa colonizadora inicialmente aislada. En 8 de esos pacientes estuvo presente el genotipo BOX-A, 2 pacientes con el genotipo BOX-D, 2 pacientes con el genotipo BOX-I, y 6 pacientes con los genotipos BOX-B, BOX-C, BOX-J, BOX-O, BOX-P y BOX-Q. En los 5 pacientes restantes se detectó un cambio de genotipo respecto al primer aislado recuperado o se trató de pacientes con aislado único.

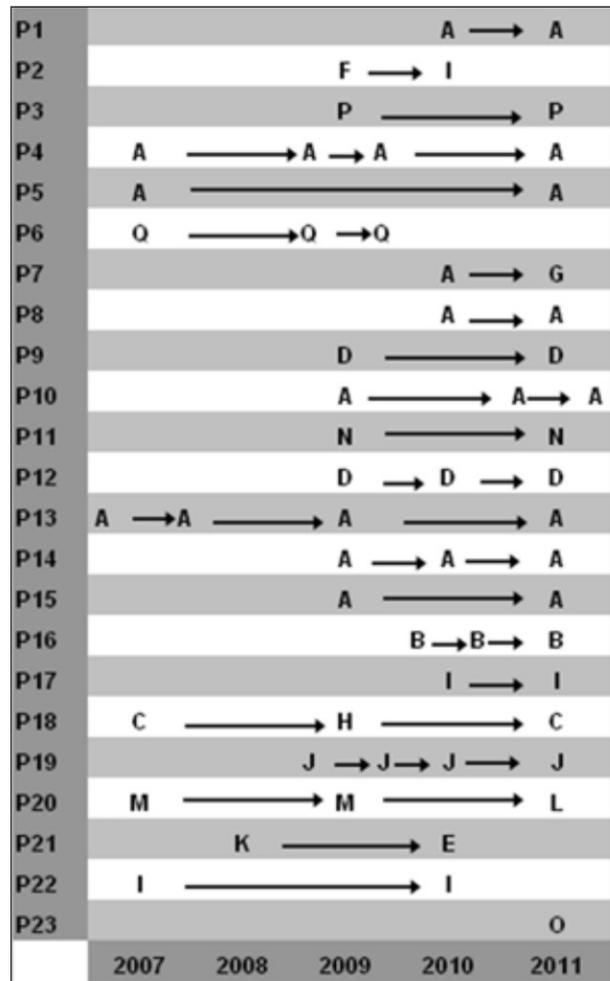


Figura 3: Evolución de aislamientos de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes adultos con FQ colonizados crónicamente. Pacientes P1 a P23. Letras A - Q corresponden a los genotipos aislados a lo largo de 5 años de vigilancia.

Susceptibilidad Antimicrobiana

Se muestra en la tabla 2, los porcentajes de resistencia correspondientes al análisis de susceptibilidad antimicrobiana de los 58 aislamientos aquí estudiados. Es interesante destacar la combinación de piperaciclina-tazobactam (PTZ) reflejo un incremento de la susceptibilidad estadísticamente significativo ($p < 0,03$) a su forma original (PIP). Todas las cepas analizadas fueron sensibles a colistin y el 10% de las cepas presentaron multirresistencia.

Tabla 2: Resistencia a antimicrobianos en aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ.

Antibiótico	R *	%
PIP	≤17	33
PTZ	≤17	16
CAZ	≤14	38
FEP	≤14	38
IMP	≤13	27
MER	≤13	27
AMK	≤14	44
GEN	≤12	61
CIP	≤15	33
COL	≤10	0

R, resistentes. * Criterio CLSI, halo de inhibición en milímetros.

En la tabla 3, se muestran los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* que comparten el mismo genotipo (BOX-A). Tanto en los aislamientos isogénicos recuperados de un mismo paciente como de distintos pacientes durante el año 2011, se evidenció un heterogéneo grado de resistencia a los diferentes antibióticos. Sin embargo, para los antibióticos PTZ y COL todos ellos fueron sensibles.

Tabla 3: Diferencia de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de *P. aeruginosa* que comparten el mismo genotipo (BOX-A) recuperados de pacientes con FQ durante el año 2011.

Paciente	Cepa	PIP	PTZ	CAZ	FEP	IMP	MER	AKN	GEN	CIP	COL
P1	HR196	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S
P4	HR233	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P5	HR173	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
P8	HR228	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
P10	HR214	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
P10	HR232	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
P13	HR259	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P14	HR229	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S
P15	HR240	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S

R, resistentes y S, sensibles; según criterio CLSI.

Discusión

La importancia de *P. aeruginosa* como patógeno de humanos ha sido ampliamente reportada a nivel internacional, sin embargo de acuerdo a nuestros conocimientos poco ha sido lo informado sobre características genéticas y resistencia a antimicrobianos de poblaciones circulantes en Argentina. En el presente trabajo presentamos resultados sobre la diversidad genética observada de una población de 58 aislamientos recuperados de pacientes adultos con FQ. Los resultados obtenidos se buscaron correlacionar con el perfil de resistencia a antibióticos de cada aislamiento. Para el estudio de biodiversidad, se tuvo en cuenta la variabilidad de secuencias repetitivas de ADN bacteriano, las cuales representan hasta un 5% del genoma y han sido el blanco de técnicas de diferenciación como rep-PCR [15; 18; 19]. En *P. aeruginosa* y en otras especies de patógenos oportunistas, la técnica de BOX-PCR demostró ser una herramienta adecuada para cuantificar el polimorfismo genético de una población [10; 11; 16; 20]. La aplicación de esta metodología a nuestra población puso en evidencia la existencia de una gran diversidad genética dentro de los aislamientos locales de *P. aeruginosa* analizados. Los datos aquí reportados se correlacionan con lo informado por Morelli *et al.* [21], quienes estudiaron una colección de mayor tamaño. Diecisiete variantes genéticas fueron identificadas entre los 58 aislamientos. Dentro de esta diversidad se constató que el 56,9 % de los perfiles observados pertenecían a 3 genotipos (BOX-A, BOX-D y BOX-I). Para el caso del genotipo A, el de mayor ocurrencia, podría significar que existe una cepa preponderante en las

infecciones de pacientes fibroquísticos de la región, lo que podría estar dado por alguna característica no identificada, que le conferiría una mayor transmisibilidad. La mayor prevalencia de un genotipo particular en las infecciones indicaría un comportamiento epidémico (clonal). No obstante, la diversidad encontrada es un indicador que confirmaría el comportamiento panmítico [22] en los aislamientos estudiados. Esta observación refuerza los resultados locales reportados por Iglesia *et al.* [8] quienes estudiaron la diversidad genética de *P. aeruginosa* recuperada de pacientes infantiles con FQ mediante RAPD y no encontraron un genotipo prevalente entre los aislamientos obtenidos de pacientes con infección crónica [8].

Por otro lado, el poder de discriminación mostrado por BOX-PCR sobre los aislamientos aquí estudiados, permitiría inicialmente emplear esta metodología para analizar la posibilidad de variación genotípica de bacterias recuperadas de un mismo paciente en una línea de tiempo, detectar la ocurrencia de brotes clonales y/o la aparición de nuevos genotipos circulantes [20]. Sin embargo esta metodología no permite confirmar clonalidad. Fue reportado que en la mayoría de los pacientes FQ la infección por *P. aeruginosa* es de tipo crónica, ya que los clones perduran aún después de intensos y sucesivos tratamientos antimicrobianos [23]. Asimismo, la infección crónica es producida en general por una sola cepa de *P. aeruginosa*. Sin embargo, cuando estas infecciones son muy prolongadas, puede ocurrir un evento de co-infección con una o dos cepas adicionales distintas [24]. En cuanto a la evolución en el tiempo de los aislamientos de un mismo paciente, analizados por BOX-PCR, se observó en algunos casos que las primeras muestras obtenidas de un determinado paciente (P4, P5 y P13), comparten el perfil genotípico de muestras aisladas luego de 3 o 4 años. Estos datos podrían indicar que dichos clones son capaces de perdurar en el tiempo, gracias a alguna característica que podría conferir alguna ventaja adaptativa (resistencia a antimicrobianos, formación de *biofilm*, modulación metabólica, etc.), o bien persistir en las fosas nasales del individuo hospedador y volver a los pulmones ante la entrada de algún otro agente viral o bacteriano [25; 26]. A diferencia, se ha visto para otros pacientes (P2, P7 y P21) que a lo largo de un período menor (6 meses a 2 años) se han recuperado organismos con diferentes características genotípicas al aislamiento inicial. Por otra parte, en los pacientes P18 y P20 se han aislado genotipos intermitentes en el lapso de 36 meses (figura 3). En casos como estos, es probable que normalmente coexistan más de una especie genotípica y que por alguna razón en algún momento de la infección se aísle una y en otro momento se aísle la otra o las dos simultáneamente [27].

Resistencia a antibióticos. En pacientes con FQ, los procesos de adaptación de las bacterias asociadas a esta patología y la presión ejercida por el propio tratamiento antibiótico, pueden originar un ambiente propicio para

la aparición y selección de mutantes resistentes a las concentraciones clínicas de los antimicrobianos utilizados habitualmente en el tratamiento. En este estudio, los altos niveles de resistencia observados a los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de infecciones graves por *Pseudomonas* (aminoglucósidos, cefalosporinas, piperaciclina y ciprofloxacina) [25] podrían estar vinculados a la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos [22; 28]. Una observación útil para respaldar la resistencia por mecanismos de presión selectiva es la baja resistencia a la colistina (1 aislado en 600 muestras), un antibiótico cuyo empleo en los pacientes es limitado debido a la nefrotoxicidad que produce [29] y que en consecuencia está reservado como última línea de defensa en casos extremos. Nuestros datos muestran valores de resistencia a antimicrobianos superiores a los informados en distintos centros de salud de países cercanos como Brasil [30; 31] o distantes como Alemania [32] e Irán [33], así como a la informada en Argentina en pacientes pediátricos con FQ [34].

Finalmente, en cuanto a la sensibilidad a antibióticos analizada por genotipo, como se mostró en la tabla 3, no se encontró un patrón de resistencia vinculado directamente con un tipo de genotipo en particular. Este hecho podría deberse a que la técnica de *fingerprinting* utilizada no es lo suficientemente específica como para discriminar modificaciones del ADN que sean consecuencia de mutaciones cromosómicas implicadas en el mecanismo de resistencia y/o que la adquisición de genes codificadores de resistencia más frecuentes estén relacionado a la presencia de cassettes genéticos e integrones [29] los cuales pueden no ser detectados en el patrón de bandeado de BOX-PCR [10].

Los resultados de este estudio demostraron que BOX-PCR es un ensayo rápido, altamente discriminatorio y reproducible, por lo que resultó ser una poderosa herramienta para revelar la diversidad genética de los aislamientos locales de *P. aeruginosa*. Si bien los resultados obtenidos pertenecen a un solo centro y la situación epidemiológica es particular para las distintas instituciones del país, dada la alta prevalencia de *P. aeruginosa*, su alta resistencia a los antimicrobianos estudiados y la cuantiosa diversidad genética, se hace necesario el permanente monitoreo de la flora microbiana y su sensibilidad en los pacientes adultos con FQ para establecer una adecuada terapia antibiótica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Secretaría de Investigación y Postgrado (SECIP) de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. P. Martina es becario Postdoctoral de CONI-

CET y A. Bosch es miembro Investigador de CIC-PBA. A Julio Figari por su excelente asistencia técnica.

Referencias bibliográficas

1. Di Sant'Agnesse, P. y Davis, P. *Research in cystic fibrosis*. N. Engl. J. Med. 295: 597–602, 1976.
2. Martina, P. *Epidemiología y evolución de aislamientos clínicos pertenecientes al Complejo Burkholderia cepacia recuperados del tracto respiratorio de pacientes fibroquísticos*. (Tesis Doctoral). Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. P. 17, 2013. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/30885> (verificado 12/09/2014).
3. Govan, J.R. y Deretic, V. *Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia*. Microbiol. Rev.60: 539–74, 1996.
4. Lyczak, J.B.; Cannon, C.L. y Pier, G.B. *Lung infections associated with cystic fibrosis*. Clin Microbiol Rev.15: 194–222, 2002.
5. Römling, U.; Wingender, J.; Müller, H. y Tümmler, B. *A major Pseudomonas aeruginosa clone common to patients and aquatic habitats*. Appl. Environ. Microbiol.60: 1734–8, 1994.
6. Martin, C.; Ichou, M.; Massicot, P.; Goudeau, A. y Quentin, R. *Genetic diversity of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region*. J. Clin. Microbiol.33: 1461–1466, 1995.
7. Stull, T.; LiPuma, J. y Edlind, T. *A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA*. J Infect Dis.157: 280–286, 1988.
8. Iglesias, N.G.; Marengo, J.M.; Rentería, F.; Gatti, B.; Segal, E. y Semorile, L. *Tipificación molecular de aislamientos de Pseudomonas aeruginosa obtenidos de pacientes con fibrosis quística*. Rev. Argent. Microbiol. 40: 3–8, 2008.
9. Govan, J.R. *Evidence for transmission of Pseudomonas cepacia by social contact in cystic fibrosis*. Lancet 342: 15–19, 1993.
10. Syrmis, M.W.; O'Carroll, M.R.; Sloots, T.P.; Coulter, C.; Wainwright, C.E.; Bell, S.C. y Nissen, M.D. *Rapid genotyping of Pseudomonas aeruginosa isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays*. J. Med. Microbiol. 53: 1089–1096, 2004.
11. Wolska, K.; Kot, B.; Jakubczak, A. y Rymuza, K. *BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates*. Folia Histochem. Cytobiol. 49:734–8, 2011.
12. Ji, J.; Wang, J.; Zhou, Z.; Wang, H.; Jiang, Y. y Yu, Y. *MLST Revealed genetic diversity of carbapenems or ceftazidime non-Susceptible Pseudomonas aeruginosa in China*. Antimicrob Agents Chemother. 57: 5697–5700, 2013.

13. Cazzola, M. y Perez, S. *Fibrosis quística del adulto: Estudio en 84 pacientes. Libro de Resumen. XIII Congreso Argentino de La Sociedad de Infectología*. Mar del Plata, 9-11 Junio, Argentina. P154. 2013. <http://sadi.posterelectronicos.com/Abstract/60e24d6d-2ba2-441e-9ed9-02c3b9cf9cad/> (verificado 12/09/2014).
14. De Bruijn, F.J. *Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2180–7, 1992.
15. Olive, D.M. y Bean, P. *Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms*. J. Clin. Microbiol. 37: 1661–1669, 1999.
16. Currie, B.J.; Gal, D.; Mayo, M.; Ward, L.; Godoy, D.; Spratt, B.G. y LiPuma, J.J. *Using BOX-PCR to exclude a clonal outbreak of melioidosis*. BMC Infect. Dis. 7:68, 2007.
17. NCLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17*, Clinical. ed. Pennsylvania, USA, 2007.
18. Ishii, S. y Sadowsky, M.J. *Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution*. Environ. Microbiol. 11: 733–40, 2007.
19. Tobes, R. y Ramos, J.L. *REP code: defining bacterial identity in extragenic space*. Environ. Microbiol. 7: 225–228, 2005.
20. Martina, P.; Bettiol, M.; Vescina, C.; Montanaro, P.; Mannino, M.C.; Prieto, C.I.; Vay, C.; Naumann, D.; Schmitt, J.; Yantorno, O.; Lagares, A. y Bosch, A. *Genetic diversity of Burkholderia contaminans isolates from cystic fibrosis patients in Argentina*. J. Clin. Microbiol. 51: 339–344, 2013.
21. Morelli, P.; Melioli, G.; Mentasti, M.; Cirilli, N.; Manso, E. Gioffrè, F.; Scuteri, D.; D'Aprile, A. y Manno, G. *Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa from Italian cystic fibrosis patients*. In: 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, 19-22 April, Spain. P1676. 2008. http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=59713&XNSPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=73&XNMASKEN_ID=900. (verificado 12/09/2014).
22. Pirnay, J.P.; De Vos, D.; Cochez, C.; Bilocq, F.; Vanderkelen, A.; Zizi, M.; Ghysels, B. y Cornelis, P. *Pseudomonas aeruginosa displays an epidemic population structure*. Environ. Microbiol. 4: 898–911, 2002.
23. Pitt T, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. *Survey of resistance of Pseudomonas aeruginosa from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents*. Thorax. 58: 794–796, 2003.
24. Mahenthiralingam, E.; Campbell, M.E.; Foster, J. y Lam, J.S. *Random amplified polymorphic DNA typing of Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from patients with cystic fibrosis*. J. Clin. Microbiol. 34: 1129–1135, 1996.
25. Cantón, R.; Cobos, N.; Graciab, J.; Baqueroa, F.; Honoratoc, J.; Gartnerb, S.; Álvarezb, A.; Salcedod, A.; Oliver, A. y García-Quetglas, E. *Tratamiento antimicrobiano frente a la colonización pulmonar por Pseudomonas aeruginosa en el paciente con fibrosis quística*. Arch Bronconeumol. 41: 1–25, 2005.
26. Hauser, A.R. *Pseudomonas aeruginosa*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 178: 438–9, 2008.
27. Winkler, U.; Wingender, J. y Jäger, K.E. *Infections of the respiratory tract with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. Klin. Wochenschr. 63: 490–498, 1985.
28. Rao, P.; McCaughan, J.; McCalmont, M.; Goldsmith, C.E.; Hall, V.; Millar, B.C.; McCann, M.A.; Downey, D.G.; Rendall, J.C.; Elborn, J.S. y Moore, J.E. *Comparison of antibiotic susceptibility patterns in Pseudomonas aeruginosa isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF) with invasive Pseudomonas aeruginosa from non-CF patients*. J. Cyst. Fibros. 4: 349–52, 2012.
29. Livermore, D.M. *Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?* Clin. Infect. Dis. 34: 634–40, 2002.
30. Lutz, L.; Leão, R.S.; Ferreira, A.G.; Pereira, D.C.; Raupp, C.; Pitt, T.; Marques, E.A. y Barth, A.L. *Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic fibrosis patients from two Brazilian cities*. J. Clin. Microbiol. 51: 927–30, 2013.
31. Paixão, V.A.; Barros, T.F.; Mota, C.M.C.; Moreira, T.F.; Santana, M.A. y Reis, J.N. *Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis*. Braz J Infect Dis. 14: 406–409, 2010.
32. López-Causapé, C.; Rojo-Molinero, E.; Mulet, X.; Cabot, G.; Moyà, B.; Figuerola, J.; Togores, B.; Pérez, J.L. y Oliver, A. *Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and antibiotic resistance evolution in Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis chronic lung infection*. PLoS One. 8:e71001, 2013.
33. Forozsh, F.M.; Irajian, G.; Moslehi, T.Z.; Fazeli, H.; Salehi, M. y Rezaia, S. *Drug resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients at Isfahan AL Zahra hospital, Iran (2009-2010)*. Iran. J. Microbiol. 4: 94–7, 2012.
34. Busquets, N.P.; Baroni, M.R.; Ochoteco, M.C. y Zurbriggen, M.L. *Aislamientos bacterianos de muestras respiratorias de pacientes pediátricos con fibrosis quística y su distribución por edades*. Rev. Argent. Microbiol. 45: 44–49, 2013.

Recibido: 15/09/2014.

Aprobado: 17/07/2015.