

Tipificación molecular de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística

N. G. IGLESIAS^{1*}, J. M. MARENGO^{1*}, F. RENTERÍA², B. GATTI³, E. SEGAL² y L. SEMORILE^{1,4}

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña N° 352 (B1876BXD) Bernal, Buenos Aires, Argentina; ²Centro Provincial de Referencia de Fibrosis Quística – Servicio de Neumología, Hospital de Niños “Sor María Ludovica”, Calle 14 N° 1631 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina; ³Laboratorio Central, Hospital de Niños “Sor María Ludovica”; ⁴Carrera de Investigador de la CIC-PBA

*Correspondencia. E-mail: lsemorile@unq.edu.ar

RESUMEN

La fibrosis quística es la enfermedad genética letal de mayor frecuencia en la población caucásica. La infección pulmonar crónica es la principal causa de morbilidad de la enfermedad, siendo la infección por *Pseudomonas aeruginosa* la más importante, ya que resulta de difícil erradicación. El Centro de Referencia Provincial de Fibrosis Quística que funciona en el Hospital de Niños “Sor María Ludovica” de La Plata asiste a alrededor de 220 pacientes con fibrosis quística cuyas edades oscilan entre los dos meses y los 45 años. La edad de sobrevida depende de una serie de factores entre los que se encuentran el diagnóstico temprano de la enfermedad y la adquisición de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa*. La misma puede adquirirse en forma directa, por transmisión persona a persona o de forma indirecta a través del uso de elementos hospitalarios contaminados. El objetivo de este trabajo fue la tipificación molecular de aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística, con el fin de evaluar la relación genómica entre los mismos. El estudio se llevó a cabo mediante RAPD-PCR. El análisis demostró que existe gran heterogeneidad genética entre los aislamientos. La separación en cohortes de pacientes de acuerdo con su bacteriología, que implica la asistencia en días diferentes y las hospitalizaciones en habitaciones aisladas ha demostrado, junto a otras estrategias, disminuir las infecciones cruzadas.

Palabras clave: tipificación molecular, RAPD-PCR, *Pseudomonas aeruginosa*, fibrosis quística

ABSTRACT

Molecular typification of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis is the most frequent lethal genetic disease that affects the caucasian population. The main cause of morbidity is the chronic lung infection, being the infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* the most difficult to eradicate. This bacteria can be acquired in direct form, by person-to-person transfer, or indirectly, by hospital acquired infection. The Centro Provincial de Referencia de Fibrosis Quística functioning in the Hospital de Niños “Sor María Ludovica”, in La Plata, cares almost 220 patients aged two months to 45 years. The life expectancy depends of factors like the early diagnosis of the disease and the later acquisition of the chronic lung infection. The purpose of this work was the molecular typing of *P. aeruginosa* isolates obtained from cystic fibrosis patients to evaluate the genomic relationship among them. The study was carried out using RAPD-PCR. The analysis showed a great genetic heterogeneity among the isolates. The separation of the patients in groups in accordance with its bacteriology, that implies the attendance in different days and the implementation of isolation (or segregation) measures had demonstrated to be, in addition to other strategies, effective in the reduction of cross infections.

Key words: molecular typing, RAPD-PCR, *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad genética letal más frecuente en la población caucásica e involucra la mutación de un único gen llamado regulador de la conductancia de transmembra de la fibrosis quística (*cftr*, por sus siglas en inglés). Este gen codifica una proteína de membrana (CFTR) que regula el transporte de cloro y sodio en los tejidos y órganos donde se expre-

sa (16). La incidencia de FQ es variable. En la provincia de Buenos Aires, a partir de datos del programa de pesquisa neonatal, escrutando el 22% de los 250.000 nacimientos anuales (2) entre julio de 1995 y julio de 2001, resultó ser de 1 enfermo cada 5715 nacimientos. Si bien no existen datos actualizados, la expectativa de vida promedio en Argentina para los pacientes con FQ es de 12 años, siendo de 33 años en Canadá (10).

Los determinantes más importantes de la morbilidad de la enfermedad son la afección del aparato respiratorio y sus complicaciones asociadas. La infección pulmonar

*Los autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

crónica es la principal causa de morbilidad. La infección de las vías aéreas, debida a una variedad de especies bacterianas, se caracteriza por colonizar dicho órgano a distintas edades del paciente. Sin embargo, la infección con *Pseudomonas aeruginosa* es la más importante, ya que produce una infección crónica de difícil erradicación. Existen dos fases en la infección por *P. aeruginosa* (6, 8, 14). La primera etapa es una infección insidiosa con presencia intermitente de *P. aeruginosa* (8, 14), caracterizada por esporádicos aislamientos de la bacteria. Esta fase no se asocia a una disminución en la función pulmonar y tiene un período de duración variable (0 a 5,5 años) (6). La siguiente etapa es el establecimiento de la infección crónica, la que ha sido relacionada en varios estudios epidemiológicos a mayor morbi-mortalidad. La infección crónica se caracteriza por el aislamiento persistente de *P. aeruginosa* en cultivos de secreción bronquial, los cuales generalmente adoptan un fenotipo mucóide junto a un aumento de los anticuerpos séricos contra esta bacteria. *P. aeruginosa* puede adquirirse en forma directa, por transmisión persona a persona, o de forma indirecta a través del uso de elementos hospitalarios contaminados.

La tipificación molecular de patógenos microbianos es de fundamental importancia para la elucidación de rutas de transmisión de clones en enfermedades infecciosas (15, 17), para realizar hipótesis acerca de las fuentes y modos de transmisión de esas cepas y para monitorear reservorios de organismos epidémicos (17). La tipificación contribuye a la vigilancia epidemiológica y a la evaluación de medidas de control (17). El proceso de tipificar epidemiológicamente es importante para el reconocimiento de brotes infecciosos, la detección de transmisión cruzada entre patógenos nosocomiales, la determinación de la fuente de infección, el reconocimiento de cepas virulentas y el monitoreo de programas de vacunación (15).

La premisa básica en la tipificación epidemiológica es que los aislamientos de un agente infeccioso que es parte de la misma cadena de transmisión se relacionan clonalmente. Existe diversidad genómica y fenotípica entre poblaciones de patógenos microbianos de la misma especie, lo cual refleja la divergencia evolutiva (17).

El Centro de Referencia Provincial de Fibrosis Quística que funciona en el Hospital de Niños "Sor María Ludovica" de La Plata asiste a alrededor de 220 pacientes con fibrosis quística, cuyas edades oscilan entre los dos meses y los 45 años. La edad de sobrevida depende de una serie de factores entre los que se encuentran el diagnóstico temprano de la enfermedad y la adquisición de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa*.

El estudio epidemiológico de *P. aeruginosa* resulta necesario para tomar medidas que eviten o demoren la colonización con estos patógenos, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue la tipificación molecular de aisla-

mientos de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística, con el fin de evaluar la relación genómica entre los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Los microorganismos analizados en este trabajo se aislaron de secreciones bronquiales de pacientes con fibrosis quística asistidos en el Centro de Referencia Provincial de Fibrosis Quística de la Provincia de Buenos Aires, ubicado en el Hospital de Niños "Sor María Ludovica" de la ciudad de La Plata. Los mismos se identificaron en el Laboratorio Central del Hospital de Niños mediante técnicas microbiológicas convencionales. Durante cada aislamiento se analizó un clon bacteriano en el caso de observarse un solo fenotipo o dos, un clon de cada fenotipo, cuando se observó fenotipo mucóide y no mucóide. Previo al análisis molecular se comprobó la pureza de los aislamientos mediante observación microscópica de extendidos preparados por tinción de Gram.

Crecimiento de los microorganismos y extracción de DNA bacteriano

Los aislamientos de *P. aeruginosa* se inocularon en 10 ml de medio R3A (extracto de levadura 1 g/l, triptona 1 g/l, casaminoácidos 1 g/l, glucosa 1 g/l, almidón 1 g/l, ácido pirúvico 0,5 g/l, HK_2PO_4 0,6 g/l, MgSO_4 0,1 g/l) y se incubaron durante 16 h a 37 °C con agitación. Los aislamientos bacterianos empleados en este trabajo se criopreservaron a -80 °C con glicerol y pertenecen a la colección del laboratorio.

Una de las principales dificultades para el análisis de estos microorganismos es la elevada producción de alginato, un exopolisacárido que dificulta notablemente la extracción de ADN. Luego de evaluar distintos métodos de extracción de ADN se seleccionó la metodología que se describe a continuación (13). Se centrifugaron 10 ml de cultivo bacteriano durante 5 min a 5000 g. El sedimento bacteriano se resuspendió en 200 µl de GET (glucosa 50 mM, EDTA 70 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y 2,8 ml de buffer de lisis (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0) conteniendo 60 µg/ml de RNasa A (Promega, USA) y 30 µg/ml de proteinasa K (Promega, USA). La mezcla se incubó 3 h a 37 °C en agitación (500 g), en tubos cónicos de 15 ml para favorecer el lisado completo de las bacterias. Luego se agregó 1 ml de solución saturada de acetato de amonio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó (30 min a 15.000 g a 4 °C), se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, se agregó un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 24 h. Luego se tomó 1,5 ml de la solución y se centrifugó (20 min a 15.000 g a 4 °C) para precipitar el ADN. El *pellet* obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70%, se secó y se resuspendió en 15 µl de agua bidestilada estéril.

Tipificación mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis)

Para el análisis RAPD de las muestras se utilizaron diferentes *primers*. Se emplearon los *primers* 208 y 270. Estos *primers* fueron seleccionados por Mahenthalingam *et al*, a partir de un conjunto de 100 *primers* diseñados al azar, para el análisis específico de muestras de *P. aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* (11, 12). Los *primers* pueden hibridar con diferentes porciones del genoma pero sólo se produce la amplificación cuando un par de ellos se ubica suficientemente cerca. Cuando se realiza un análisis RAPD de este modo se obtiene un patrón de bandas típico de cada cepa y el resultado es representativo del genoma completo. La técnica RAPD es robusta, simple y reproducible y facilita el análisis cuando se trabaja con un elevado número de muestras (4).

La mezcla de reacción consistió en buffer de reacción 1x (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100 y 500 µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA)), 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 200 µM de *primer*, 2 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega, USA) y entre 10 y 100 ng de DNA cromosomal como molde, en un volumen total de 25 µl. La amplificación se realizó en un termociclador *Mastercycler Gradient* de *Eppendorff*, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C 1 min, hibridación a 30 °C 1 min y extensión a 72 °C 3 min. La amplificación se completó con una incubación de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 100 min y se visualizaron por transiluminación con luz UV. Los tamaños de los fragmentos se determinaron por comparación con un patrón estándar de peso molecular (*Ladder* 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos).

Análisis de datos

El cálculo de la distancia entre los aislamientos a partir de los patrones RAPD se realizó con el paquete RAPDist (1). Para dicho cálculo se computó el coeficiente de Jaccard, que calcula la distancia entre las muestras de a pares a través de la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{similitud} = n_{11}/(n-n_{00}), \text{ distancia} = 1 - \text{similitud};$$

donde n es el número total de bandas observadas, n_{11} es el número de bandas presentes en ambas muestras, y n_{00} es el número de bandas ausentes en ambas muestras.

Para la construcción de dendrogramas se utilizó el programa MEGA 2.1 (9), empleando el método UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tipificación por RAPD-PCR

La tipificación molecular de patógenos oportunistas contribuye a la vigilancia epidemiológica y a la evaluación de medidas de control (17). La técnica RAPD es útil para analizar gran número de muestras debido a su eficiencia y a su poder discriminatorio, similar al de la técnica PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (7). En este trabajo, un total de 80 aislamientos de *P. aeruginosa* se tipificaron mediante RAPD-PCR utilizando los *primers* 208 y 270, con el fin de determinar la relación clonal entre los mismos y de analizar la estabilidad del genotipo de los aislamientos durante la conversión fenotípica a cepa mucoide.

La Figura 1 muestra los perfiles RAPD obtenidos con el *primer* 208. Con este *primer* se tipificaron 72 aislamientos, que representan un 90% del total de los aislamientos. El método resultó reproducible, ya que cada reacción de PCR se realizó al menos por duplicado, obteniéndose perfiles similares. Si bien los dos *primers*

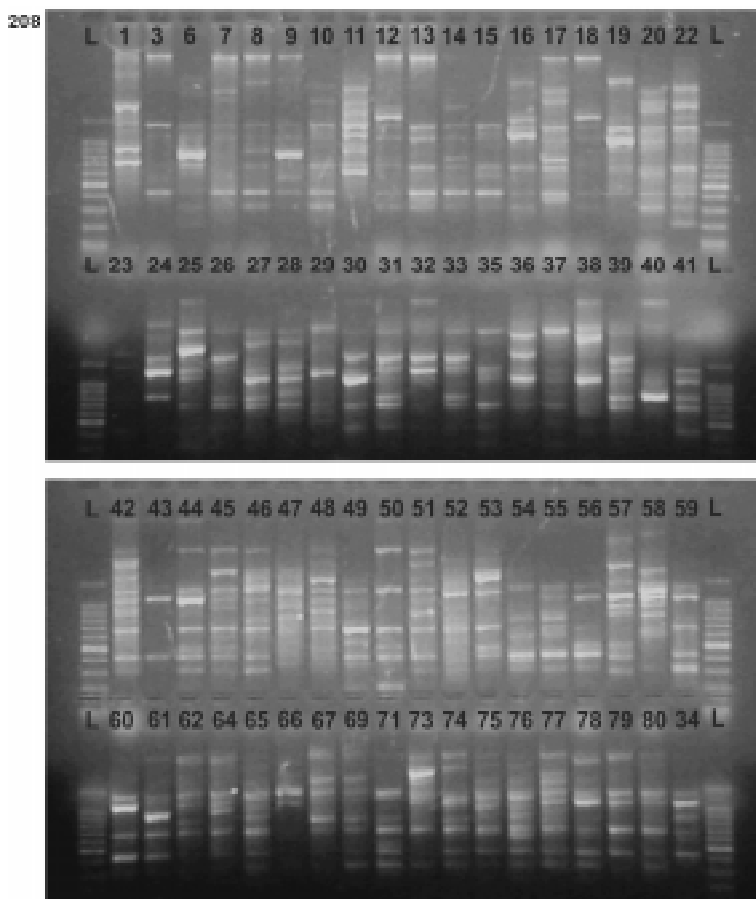


Figura 1. Perfiles RAPD obtenidos con el *primer* 208. Gel de agarosa 1,5%. L. *Ladder* 100 pb. Los números sobre las calles indican el aislamiento correspondiente.

utilizados fueron capaces de producir patrones RAPD, el *primer* 208 presentó mayor poder de discriminación. La utilización del *primer* 270 no produjo un incremento en el poder de discriminación de la técnica (resultados no mostrados), por lo cual no se incorporó en el análisis.

Un brote epidémico se caracteriza por un elevado número de pacientes infectados con una misma cepa, adquirida en un lugar común o transferida por infección cruzada. El análisis visual de los geles de la Figura 1 no evidenció un patrón RAPD mayoritario. Por el contrario, se observó una elevada heterogeneidad en los perfiles, indicando la no clonalidad de los aislamientos, es decir, no se trató de un brote epidémico.

Para determinar la relación genómica entre los aislamientos se construyó una matriz de datos a partir del

análisis detallado de los geles, asignando a cada banda una posición y computando para cada aislamiento la presencia o ausencia de dicha banda en el gel. Para construir la matriz se utilizaron los patrones obtenidos con el *primer* 208, por ser el de mayor poder discriminativo. La matriz de datos obtenida se empleó para realizar una matriz de distancia, calculando el coeficiente de Jaccard entre pares de muestras. A partir de esta matriz se realizó un dendrograma empleando el algoritmo UPGMA implementado con el programa MEGA (Figura 2).

El dendrograma obtenido mostró una amplia diversidad en las cepas analizadas, presentando 9 grupos conteniendo de 2 a 5 aislamientos que mostraron un perfil RAPD-PCR similar al utilizar una línea de corte de 85% de similitud, la cual se tomó de manera arbitraria. Los aislamientos 67, 69 y 71 correspondientes a diferentes

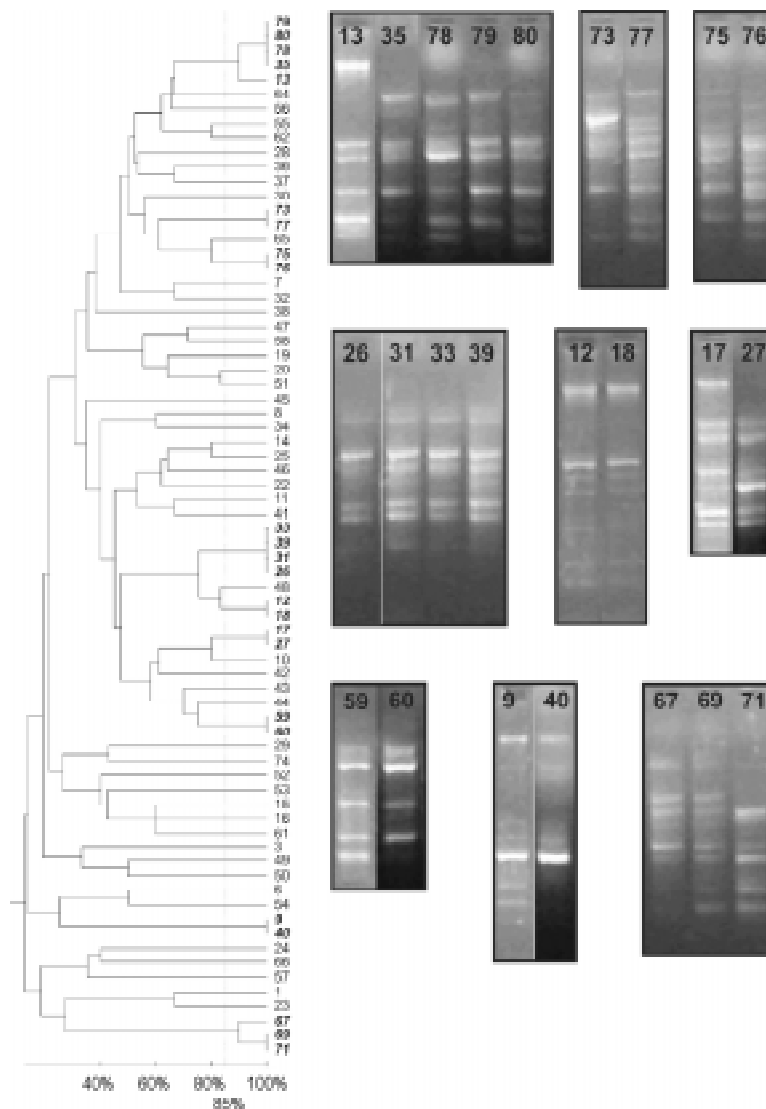


Figura 2. Dendrograma generado a partir del perfil RAPD-PCR obtenido con el *primer* 208. La línea inferior indica el porcentaje de similitud. La línea punteada corresponde a la línea de corte utilizada. A la derecha se muestran las comparaciones de patrones RAPD entre los aislamientos que agruparon en el dendrograma.

pacientes mostraron el mismo perfil electroforético. Los aislamientos 9 y 40 provinieron de un mismo paciente, antes y después del establecimiento de la infección crónica, al igual que los aislamientos 59 y 60. Estos aislamientos se analizan más adelante con mayor detalle, al igual que los aislamientos 26, 31, 33 y 39, que pertenecen a dos pacientes en las mismas condiciones. En este caso, la misma cepa estableció una infección crónica en ambos pacientes. De los aislamientos 13, 35, 78, 79 y 80, que agruparon juntos, el 13 y el 35 correspondieron al mismo paciente antes y después del establecimiento de la infección crónica y también son analizados en detalle más adelante, mientras que los aislamientos 78, 79 y 80 correspondieron a pacientes diferentes.

El hecho que aislamientos obtenidos de diferentes pacientes agrupen juntos (tal es el caso de los aislamientos 67, 69 y 71; 13, 78, 79 y 80; 73 y 77) indica que han sido adquiridos a partir de una fuente común de contaminación o por infección cruzada. El Centro de Referencia Provincial de Fibrosis Quística ha puesto en práctica,

desde hace unos años, medidas destinadas a disminuir la prevalencia de infecciones y evitar las infecciones cruzadas entre pacientes. La ausencia de relación clonal en la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* sugiere la efectividad de las medidas aplicadas para disminuir las infecciones cruzadas entre los pacientes que allí se asisten, ya que el número de casos de pacientes infectados con aislamientos genéticamente similares es muy bajo. La mayoría de los aislamientos en los que se hallaron genotipos similares correspondieron a un mismo paciente, pero el genotipo no resultó similar entre pacientes.

La infección crónica por *P. aeruginosa* se caracteriza por la conversión del aislamiento inicial no mucóide a mucóide, el cual expresa factores de virulencia tales como secreción de alginato, exotoxinas, proteasas, y muestra cambios en la movilidad. El periodo necesario para el establecimiento de la infección crónica es variable; clínicamente se la define como la presencia de *P. aeruginosa* en el árbol bronquial durante 6 meses con 3 cultivos positivos y signos de infección y daño tisular, asociado a un incremento en la respuesta por anticuerpos (3, 5). Una vez establecida la infección crónica, en la mayoría de los casos la cepa de *P. aeruginosa* adquirida inicialmente permanece presente en las vías aéreas. Por lo general, el perfil RAPD de estos aislamientos permanece estable, sugiriendo que los cambios resultan de una adaptación fenotípica a la colonización inicial (11). Sin embargo, fenómenos epidemiológicos más complejos, tales como coinfección y reemplazo de la cepa pueden ser observados (11). Como se mencionó anteriormente, algunos de los aislamientos analizados en este trabajo corresponden a aislamientos no mucóides y mucóides obtenidos de un mismo paciente. Para evaluar la estabilidad genotípica entre aislamientos mucóides y no mucóides, se observó el agrupamiento de éstos en el dendrograma. Se analizaron 22 aislamientos correspondientes a 10 pacientes infectados crónicamente. La Tabla 1 muestra la fecha de obtención de los aislamientos y si mantienen o no el genotipo. Se encontró que en la mayoría de los casos el genotipo del aislamiento antes y después del establecimiento de la infección crónica es similar, excepto para los pares de muestras 1 y 67, 34 y 37, 48 y 12 y 13 y 42. En algunos casos (muestras 17 y 27, 59 y 60, y 75 y 76) se aislaron cepas mucóides y no mucóides en la misma fecha con igual genotipo. Esto mismo ha sido observado previamente por otros autores utilizando la misma técnica de tipificación (11) y posiblemente se deba a que la adaptación fenotípica no es inmediata y se esté llevando a cabo en el momento en el cual fue obtenida la muestra.

Las muestras 1 y 67 se aislaron con una diferencia de cinco meses. La diferencia en el genotipo podría deberse a que la cepa que se aisló por primera vez no es la que inició la infección crónica, es decir que el paciente estaba colonizado con más de un aislamiento o que esta cepa fue reemplazada.

Tabla 1. Aislamientos mucóide y no mucóide pertenecientes a un mismo paciente, indicando la fecha de obtención y si mantienen o no el genotipo.

| Aislamiento | Fecha de aislamiento | Mantienen el genotipo |
|-------------|----------------------|-----------------------|
| 1 | 03/02/2003 | |
| 67* | 21/07/2003 | NO |
| 9* | 25/07/2003 | Sí |
| 40 | 23/04/2003 | |
| 12* | 19/09/2003 | Sí |
| 18 | 14/03/2003 | |
| 48 | 28/06/2003 | NO |
| 13* | 31/10/2003 | Sí |
| 35 | 14/03/2003 | |
| 42 | 28/06/2003 | NO |
| 17 | 13/12/2002 | |
| 27* | 13/12/2002 | Sí |
| 26 | 11/12/2002 | |
| 33* | 23/12/2002 | Sí |
| 31 | 13/02/2003 | |
| 39* | 16/04/2003 | Sí |
| 34* | 18/02/2003 | |
| 37 | 13/02/2003 | NO |
| 59 | 29/04/2003 | |
| 60* | 29/04/2003 | Sí |
| 75 | 21/11/2003 | |
| 76* | 21/11/2003 | Sí |

* Aislamiento mucóide.

Las muestras 12 y 48 se aislaron en un período de tres meses. Seis meses antes de aislar la muestra 12, correspondiente al fenotipo mucoide, se aisló del mismo paciente la muestra 18, con un genotipo similar al de la muestra 12. Esto indica que podría haber ocurrido una coinfección y que una de las cepas cambió su fenotipo a mucoide (muestra 18). Lo mismo ocurre entre las muestras 13 y 42, que fueron aisladas en un período de cuatro meses. Tres meses antes se aisló del mismo paciente la muestra 35, con un genotipo similar al del aislamiento mucoide.

Las muestras 34 y 37 se aislaron con una diferencia de cinco días. El patrón RAPD observado indica que se trata de cepas diferentes, sugiriendo coinfección, dado que el período transcurrido entre ambos aislamientos es demasiado corto como para tratarse de una nueva infección que pudiera establecerse luego como crónica.

Finalmente, no se encontró un genotipo prevalente entre los aislamientos obtenidos de pacientes con infección crónica. El único caso donde se halló la misma cepa corresponde a los aislamientos mucoides 33 y 39. Los resultados obtenidos sugieren que la exposición a una fuente común o la infección cruzada entre pacientes con *P. aeruginosa* es poco frecuente; en su mayoría la infección crónica es causada por las mismas cepas que inician la infección. En el Hospital se llevó a cabo la separación en cohortes de pacientes de acuerdo con su bacteriología, lo cual implica la asistencia de los mismos en días diferentes y las hospitalizaciones en habitaciones aisladas; este hecho posiblemente contribuyó a la baja frecuencia de infecciones cruzadas observada en estos pacientes.

Agradecimientos: A la Asociación de Padres Pro-Ayuda al Niño con Enfermedad Respiratoria (APPANER) y a la Universidad Nacional de Quilmes por los fondos aportados para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Armstrong J, Gibbs A, Peakall R, Weiller G. RAPDIST Version 1.03. Australian National University, 1993, Canberra, Australia.
2. Borrajo GJC, Pistaccio LG, Gómez FR. *Genética*. En: Segal E, Fernández A, Rentería F, editors. Fibrosis Quística. Ediciones Journal, 2004, p. 6.
3. Burns MW, May JR. Bacterial precipitins in serum of patients with cystic fibrosis. *Lancet* 1968; 1: 270-2.
4. Coenye T, Spilker T, Martin A, LiPuma JJ. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3300-7.
5. Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humoral response. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1974; 82: 551-8.
6. Johansen HK, Hoiby N. Seasonal onset of initial colonization and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax* 1992; 47: 109-11.
7. Kersulyte DM, Struelens J, Deplano A, Berg DE. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2216-9.
8. Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 1993; 341: 1065-9.
9. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; 17: 1244-5.
10. Macri CN, Pivetta OH, Gentile A, Cafferata EG, Luna MC. *Genética*. En: Segal E, Fernández A, Rentería F, editors. Fibrosis Quística. Ediciones Journal, 2004, p. 7.
11. Mahenthalingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1129-35.
12. Mahenthalingam E, Campbell ME, Henry DA, Speert DP. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2914-20.
13. Mahenthalingam E, Simpson DA, Speert DP. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic *Burkholderia cepacia* strains recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 808-16.
14. Pedersen SS. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *APMIS* 1992; Suppl 28: 1-79.
15. Renders N, Romling Y, Verbrugh H, van Belkum A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3190-5.
16. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelcák Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
17. Struelens MJ. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 581-5.