

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Polimorfismo de los genes *mucA* y *fpvA* en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente

María José Pozuelo^a, Pedro A. Jiménez^a, Andrea D. Valderrey^b, Ana Fernández-Olmos^c, Rafael Cantón^c y Rafael Rotger^{b,*}

^a Departamento de Biología Celular, Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Madrid, España

^b Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal y CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 22 de marzo de 2010

Aceptado el 20 de mayo de 2010

On-line el 30 de diciembre de 2010

Palabras clave:

Pseudomonas aeruginosa

Fibrosis quística

mucA

fpvA

RFLP

Genotipado

R E S U M E N

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* coloniza la mucosa respiratoria del paciente con fibrosis quística (FQ), seleccionándose en general una única cepa dominante en un proceso de variación genética.

Métodos: Se obtuvieron secuencialmente 123 aislados de *P. aeruginosa* en 6 pacientes con FQ atendidos durante su seguimiento habitual o en las exacerbaciones a lo largo de 2-12 años en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid). Otros 13 aislados se obtuvieron de un sólo paciente en un estudio a corto plazo (7 días). Se estudió su sensibilidad antimicrobiana por microdilución y caracterizaron mediante polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de los genes *mucA* y *fpvA*, que codifican respectivamente el regulador de la síntesis de alginato y un receptor de pioverdina.

Resultados: Se identificó en cada paciente una cepa dominante según el perfil de RFLP. Los polimorfismos de los genes *mucA* y *fpvA* se correlacionaron bien con dicho perfil, pero en dos pacientes hermanos se observó una relación entre cepas no evidente por RFLP. Las mutaciones sin sentido en *mucA* fueron exclusivas de la cepa dominante de cada paciente, reflejando el proceso adaptativo. La detección alternativa de los mismos polimorfismos en *mucA* o *fpvA* mostró la coexistencia de subpoblaciones en cada paciente. Esta hipótesis se confirmó en el estudio prospectivo de 7 días al aislar 6 variantes en un único paciente.

Conclusiones: En la colonización crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ coexisten variantes genotípicas no siempre detectadas por RFLP y con diferentes perfiles de sensibilidad.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Polymorphism of *mucA* and *fpvA* genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients: co-existence of genetically different variants

A B S T R A C T

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is able to colonize the lungs of cystic fibrosis patients (CF) in an adaptive process that results in the selection of a dominant strain through a process of genetic variation.

Methods: One hundred and twenty three isolates of *P. aeruginosa* were sequentially recovered from 6 CF patients during the routine follow-up or exacerbations over periods of 2 to 12 years in the Ramon y Cajal University Hospital (Madrid, Spain). Another 13 isolates were obtained from a single CF patient in a short-term study. They were analysed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequencing of *mucA* and *fpvA* genes, which code for the alginate biosynthesis regulator and a pyoverdine receptor, respectively, and their antibiotic susceptibility was studied by microdilution.

Results: A dominant colonising strain was found in each patient based on the RFLP profile. The polymorphisms of *mucA* and *fpvA* genes correlated well with these profiles, but suggested a relationship between strains isolated from two brothers, not inferred by RFLP. Stop codon mutations in *mucA* were unique to each dominant strain, indicating the adaptive process suffered. The alternate detection of the same *mucA* and/or *fpvA* genotypic variants suggested the coexistence of several subpopulations. This hypothesis was confirmed in a prospective study in which 6 variants were isolated in 7 days from the same patient.

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Cystic fibrosis

mucA

fpvA

RFLP

Genotyping

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rrotger@farm.ucm.es (R. Rotger).

Conclusions: Genotypic variants of the *P. aeruginosa* dominant strains can coexist in the chronic colonization in CF patients. These variants can be undetected by RFLP and they might present variable antibiotic susceptibility.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una alteración hereditaria causada por mutaciones recesivas del gen que codifica el regulador de conductancia transmembrana de FQ (CFTR). La resultante pérdida de fluidez en las secreciones bronquiales facilita la colonización crónica por algunos patógenos oportunistas. Entre ellos, *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria mejor adaptada y contribuye significativamente a la morbilidad y mortalidad ligada a la FQ¹⁻³. La colonización se produce por cepas ambientales, y suele hacerse permanente tras una conversión a fenotipo mucóide, haciéndose muy difícil la erradicación debido a la formación de biofilm⁴⁻⁶. El análisis genotípico en diferentes estudios ha mostrado que la colonización crónica se debe generalmente a una sola cepa de *P. aeruginosa* que se hace dominante, siendo infrecuente la adquisición de otras⁷⁻¹². Recientemente se ha demostrado la persistencia de *P. aeruginosa*, a diferencia de *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae*, en un modelo experimental en ratón de colonización crónica de la mucosa respiratoria¹³.

El proceso de colonización patogénica adaptativa de *P. aeruginosa* implica cambios genéticos, y los aislados en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ presentan una amplia variedad fenotípica. La más evidente es el morfotipo mucóide, debido a mutaciones en el gen *muca* regulador del operón biosintético de alginate y en otros genes de ese operón^{2,14,15}. En fases más tardías de colonización es frecuente la pérdida del fenotipo mucóide por reparación génica o, más comúnmente, por supresión extragénica¹⁶. Estos cambios se favorecen por procesos de hipermutación, frecuentes en estos aislados y que facilitan también la resistencia a antibióticos¹⁷.

Con el objetivo de conocer mejor la diversidad de las poblaciones de *P. aeruginosa* que colonizan la mucosa respiratoria del paciente de FQ, hemos analizado la secuencia de dos genes que experimentan gran variabilidad en esta bacteria: el propio *muca*, y el que codifica el receptor del sideróforo pioverdina, *fpvA*. Aunque, como se ha citado, el fenotipo mucóide suele revertir, lo habitual es que las mutaciones sufridas en *muca* se mantengan, quedando la huella del proceso adaptativo, por lo que se ha utilizado su polimorfismo para caracterizar aislados clínicos^{7,16,18}. El receptor de pioverdina, *FpvA*, está codificado en una de las regiones más variables del genoma de *P. aeruginosa*¹⁵, y es posible que esté sujeto a selección positiva durante el proceso de colonización¹⁹. El uso de estos dos marcadores puede permitir conocer la presencia de variantes de la cepa colonizadora dominante que no se aprecien por polimorfismo de restricción (RFLP).

En el presente trabajo se ha realizado un análisis genotípico mediante RFLP y polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) de los aislados de 6 pacientes de FQ, obtenidos durante su seguimiento habitual o en las exacerbaciones del cuadro respiratorio en la unidad de FQ del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid). Posteriormente, se ha llevado a cabo un estudio prospectivo a corto plazo (una semana) en otro paciente para confirmar la coexistencia de variantes de una misma cepa colonizadora de *P. aeruginosa*.

Métodos

Pacientes, muestras, aislados bacterianos y sensibilidad

Las muestras de esputo se obtuvieron durante exacerbaciones o en el seguimiento normal de 6 pacientes (denominados

aleatoriamente FQ1 a FQ6) entre agosto de 1996 y mayo de 2007, así como durante un estudio prospectivo de siete días de un único paciente (FQ7). La cohorte estuvo compuesta por 4 hombres y 3 mujeres, con edades comprendidas entre 6 y 35 años, e incluyó dos hermanos (FQ2 y FQ3). Este estudio se realizó cumpliendo los requisitos éticos del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Las muestras de esputo se homogenizaron con N-acetil-cisteína y se procesaron mediante una técnica cuantitativa²⁰. Los cultivos en agar Columbia con 5% de sangre y agar de MacConkey se incubaron aeróbicamente 24 h a 37 °C, seguidas de 24 h a 25 °C. Además, se inocularon placas de agar chocolate con bacitracina y se incubaron 48 h a 37 °C con 5% de CO₂. Cada colonia fenotípicamente distinta de cada muestra de esputo se aisló e identificó mediante la reacción de la oxidasa y pruebas bioquímicas, utilizando paneles PASCO (Difco, Detroit, MI, EE. UU.) o WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España). Estos mismos paneles se utilizaron para el estudio de sensibilidad a antibióticos interpretándose los resultados siguiendo los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Ciento treinta y cinco aislados se identificaron como *P. aeruginosa* y fueron seleccionadas para este estudio.

Análisis del polimorfismo de restricción (RFLP)

Los aislados de *P. aeruginosa* se cultivaron durante 18 h a 37 °C en agar Columbia con 5% de sangre y se resuspendieron (OD₄₂₀ = 0,5) en tampón Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0. Se añadió proteinasa K a una concentración final de 30 mg ml⁻¹ y la suspensión (400 µl) se mezcló en proporción 1:1 con agarosa de bajo punto de fusión al 1% [p/v]. Las bacterias embebidas en el agar se trataron 1 h a 54 °C con proteinasa K (0,2 mg ml⁻¹) en tampón de lisis (N-lauril-sarcosinato 1% [p/v] en Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0). El ADN librado se digirió con 40 U de endonucleasa *SpeI* durante una noche a 37 °C en 100 µl del tampón suministrado por el fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en campo pulsado (PFGE) en un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) utilizando geles de agarosa al 1,2% (p/v). Las condiciones de electroforesis fueron: una rampa lineal de 20 a 60 seg. durante 40 h a 5 V cm⁻¹, seguida de una rampa lineal de 5 a 10 seg. durante 20 h a 6 V cm⁻¹. Para la calibración y comparación de los geles se utilizó ADN de la cepa PAO-1, empleando el programa Diversity Database (Bio-Rad) y aplicando los criterios de similitud de Tenover et al²¹.

Análisis de los genes *muca* y *fpvA*

Para la amplificación por PCR de un fragmento interno del gen *muca* (nt 42 a 544) se diseñaron los cebadores 5'-GGATAACGAAGCGGATGAAC-3' y 5'-CGCTCTGTACCACTGACG-3'. Las condiciones empleadas para la PCR fueron: 1 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 seg. a 95 °C, 30 seg. a 54 °C y 30 s a 72 °C; finalizando con un ciclo de 4 min a 72 °C. Para la amplificación de los alelos *fpvA* correspondientes a los tipos I, II y III se emplearon los cebadores FpvAI-1F/FpvAI-1R, FpvAII-2F/FpvAII-2R, y FpvAIII-3F/FpvAIII-3R descritos por Chial et al., obteniendo fragmentos de 326, 897, y 506 nt, respectivamente²². Los productos de PCR se purificaron mediante el GFX PCR DNA Purification Kit (GM Health Care, Buckinghamshire, UK) y se secuenciaron en doble cadena. Como cepa de referencia para detectar cambios en las secuencias de *muca* y *fpvA* tipo I se utilizó *P. aeruginosa* PAO-1 (GeneBank

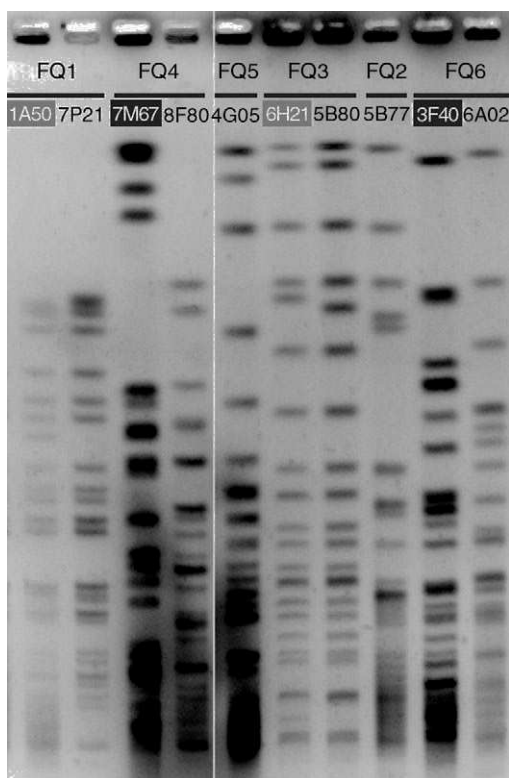


Figura 1. PFGE de las digestiones de ADN total con *SpeI*. Se eligió un aislado representativo del perfil RFLP dominante de cada paciente. Los restantes aislados que se muestran presentaban perfiles muy relacionados (rotulados con fondo gris) o totalmente diferentes (rotulados con fondo negro) del dominante.

AE004091). Las secuencias de los genes *fpvA* de tipo II se compararon con las de las cepas *P. aeruginosa* MSH (AY765263) y PA7 (CP000744), según la similitud detectada con el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Cada nuevo cambio detectado se comprobó mediante una nueva amplificación y secuenciación para evitar los errores de la ADN polimerasa.

Resultados

RFLP

Los perfiles de RFLP resultaron idénticos para todos los aislados de cada uno de los pacientes, indicando en cada caso la colonización por un único clon, con tan sólo cuatro excepciones. En dos aislados procedentes de los pacientes FQ1 y FQ3 (1A50 y 6H31 respectivamente; *fig. 1*) se observaron diferencias sólo en una o dos bandas con respecto al perfil del clon, mientras que en los pacientes FQ4 y FQ6 se detectó una cepa en cada uno de ellos (7M67 y 3F40 respectivamente; *fig. 1*) con un perfil totalmente distinto al del clon dominante, indicando una colonización temporal por una cepa distinta.

Polimorfismo del gen *muca*

Al alinear las secuencias del gen *muca* de los diferentes los aislados con la de la cepa PAO1 se detectaron 12 polimorfismos de un nucleótido (SNPs), cuya agrupación en los distintos aislados permitió definir tres genotipos: I (A342G) II (T126C, T198G, A243G, A342G, T381G) y III (T133C, C156T, A342G). La presencia de cambios adicionales con sustitución de aminoácidos (indicada entre corchetes) se utilizó para definir 5 variantes: Ia (I + C188G [A→G]), Ib (I + C394T [P→S]), IIa (II + C469T [R→C]), IIab (IIa + C467T [T→I])

y IIIa (III + C424A [Q→K]). Así mismo, se identificaron 8 mutaciones sin sentido que determinaban la aparición de un nuevo codón de terminación (en la posición indicada entre corchetes): Tres inserciones (G.:160 [nt 478], C.:171 [nt 478]; y GCCTGCT.:202 [nt 484]), cuatro deleciones (Δ T180 [nt 283], Δ 187-197 [nt 466], Δ G430 [nt 439] y Δ C453 [nt 752]) y una transversión (C424T [nt 424]). El codón de terminación normal de *muca* se sitúa en posición 584. La distribución por aislados y pacientes de muestra en la *tabla 1*.

Tabla 1

Genotipado *muca/fpvA* de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Paciente: FQ1 (nacido en 1973)			
Fecha aislado	Aislado ^a	Genotipo ^b	
		<i>muca</i>	<i>fpvA</i>
08/1996	96K11*	I	2b12
08/1997	97P21	I	2b12
07/1998	98D22*	I	2b12
	98D23	I	2b12
	98D24	I	2b12
02/1999	99A30*	I	2b12
09/2000	00E65	I	2b12
	00E66*	Ib	2b12
01/2001	01A49	I	2b12
	01A50	I	2b12
	01A51*	I	2b12
	01A52	I	2b12
05/2002	02B78*	I	2b12
	02B79	I	2b12
06/2003	03D16*	I	2b12
	03D17	I	2b12
03/2004	04B69*	Ib	2b12
	04B70	I	2b12
	04B76	I	2b12
02/2005	04A62*	I	2b12
	04A63	I	2b12
05/2005	05D13*	II	2b12
	05D14	I	2b12
12/2005	05G55	I	2b12
05/2006	05C68	I	2b12
10/2006	05F26	I	2b12
	05F27	I	2b12
	05F40*	I	2b12
01/2007	05B05	I	2b12
Paciente: FQ2 (nacido en 1977)			
Fecha aislado	Aislado ^a	Genotipo ^b	
		<i>muca</i>	<i>fpvA</i>
09/2000	0E67*	III, Δ T180, Δ 187-197	2b1
	0E68*	III, Δ 187-197	2b1
11/2001	1F76*	III, Δ 187-197	2b1
11/2002	2E43*	III, Δ 187-197	2b1
	2E44*	IIIa, Δ 187-197	2b1
03/2003	3B45*	III, Δ 187-197	2b1
	3B46	IIIa	2b1
03/2004	4B48*	III, Δ 187-197	2b1
02/2005	5B11*	III, Δ 187-197	2b1
	5B12	IIIa, Δ 187-197	2b1
04/2005	5B76*	III, Δ 187-197	2b1
	5B77*	IIIa, Δ 187-197	2b1
06/2005	5D34*	III, Δ 187-197	2b1
	5D35	IIIa, Δ 187-197	2b1
	5D36	IIIa, Δ 187-197	2b1
08/2005	5E41	IIIa, Δ 187-197	2b1
	5E42*	III, Δ 187-197	2b1
09/2005	5F25*	III, Δ 187-197	2b1
04/2006	6C26*	IIIa, Δ 187-197	2b1
	6C28*	III, Δ 187-197	2b1
08/2006	6E27	IIIa, Δ 187-197	2b1
12/2006	6H28*	III, Δ 187-197	2b1
	6H29	IIIa, Δ 187-197	2b1
03/2007	7C14*	IIIa, Δ 187-197	2b1

Tabla 1 (continuación)

Paciente: FQ3 (nacido en 1979)			
Fecha aislado	Aislado ^a	Genotipo ^b	
		<i>mucA</i>	<i>fpvA</i>
04/2005	5B80	III	2b
	5C01*	III, G::160, ΔC453	2b
05/2005	5C02	III, ΔC453	2b
	5C51*	III, ΔC453	2b
10/2006	5C52	III	2b2
	6F56	III	2b2
12/2006	6F57	III*	2b
	6H21*	III, ΔC453, GCCTGCT::202	2b
	6H22	III	2b2
	6H23	III	2b2
Paciente: FQ4 (nacido en 1987)			
Fecha aislado	Aislado	Genotipo ^a	
		<i>mucA</i>	<i>fpvA</i>
02/1997	7M67	IIa, 171::C	2c
08/1998	8D51*	II, ΔG430	2c
10/1998	8E62*	II, ΔG430	2c
	8E63	II	2c
12/1998	8F79*	II, ΔG430	2c
	8F80	II	2c
12/2004	4G62*	II, ΔG430	2c
	4G63	II, ΔG430	2c
	4G73*	II, ΔG430	2c
02/2007	7B73*	II, ΔG430	2c
	7B74	II, ΔG430	2c
	7B75*	II, ΔG430	2c
05/2007	7D62*	II, ΔG430	2c
Paciente: FQ5 (nacido en 1991)			
Fecha aislado	Aislado	Genotipo ^a	
		<i>mucA</i>	<i>fpvA</i>
08/1997	7P23	II	2a1
08/1998	8D66	II, C424T	2a1
04/1999	9B44	II	2a1
	9B45	II	2a1
09/2000	0E05	II	2a1
	0E06	II	2a1
	0E07	II	2a1
10/2001	1E56	II	2a1
	1E57	II	2a1
10/2002	2D50	II	2a1
	2D51	II	2a1
09/2003	3E19	I	2a11
11/2004	4G03*	II, C424T	2a1
	4G04	II, C424T	2a1
	4G05*	II	2a1
	4G06	II	2a1
01/2005	5A17*	II, C424T	2a1
	5A19*	II, C424T	2a1
02/2005	5B16*	II	2a1
	5B17	II, C424T	2a1
05/2005	5C38	II, C424T	2a1
	5C39	II, C424T	2a1
	5C40	II	2a1
10/2005	5F66*	II, C424T	2a1
	5F67	II, C424T	2a1
02/2006	6B15*	II	2a11
	6B16	II	2a1
06/2006	6D79	II, C424T	2a1
09/2006	6E55	II, C424T	2a1
	6E56*	II, C424T	2a11
01/2007	7A22	II, C424T	2a11
Paciente: FQ6 (nacido en 2002)			
Fecha aislado	Aislado	Genotipo ^a	
		<i>mucA</i>	<i>fpvA</i>
10/2003	3F20	Ia	1
11/2003	3F40	II	1

Tabla 1 (continuación)

09/2004	4E46	Ia	1
12/2004	4G77	Ia	1
	4G78	Ia	1
	4G79	Ia	1
05/2005	5C32	I	1
04/2005	5B69	Ia	1
06/2005	5D22	Ia	1
01/2006	6A02	Ia	1
02/2006	6B20	Ia	1
02/2007	7B45	Ia	1
	7B46	Ia	1
05/2007	7D43*	Ia	1

^a Un asterisco indica aislado mucóide; se señalan con fondo gris aquellos con perfil PFGE distinto de la cepa dominante, y con fondo gris los que presentaron un perfil relacionado (fig. 1).

^b La nomenclatura se detalla en los apartados del texto: Polimorfismo del gen *mucA* y Polimorfismo del gen *fpvA*.

Polimorfismo del gen *fpvA*

En la mayoría de los aislados se obtuvo amplificación positiva con los cebadores correspondientes al receptor de pioverdina tipo 2 (121 de 135; 89,6%), siendo los de restantes de tipo 1; no se detectó ninguno de tipo 3. Las secuencias amplificadas del gen *fpvA* se alinearon con las representantes de los tipos descritos de receptor FpvA^{19,23}: PAO1 para el tipo 1 y MSH, 2-146 y W15Dec11 para las diferentes subtipos del tipo 2. Dentro de los genes *fpvA* de tipo 2 se detectaron 20 SNPs, agrupados en 9 genotipos FpvA. Todos los aislados del tipo 2a presentaban el polimorfismo G960T, denominándolo subtipo 2a1. Algunos aislados presentaron, además de este cambio, transversiones que han permitido definir más variantes: 2a11 (2a1+G1315A [G→S]), 2a12 (2a1+G1283A [G→D]), 2a121 (2a12+C1258T [R→C]) y 2a1211 (2a121+C1466T [A→V]). Del mismo modo, dentro del tipo 2b se definieron las siguientes variantes: 2b1 (+A699G), 2b11 (2b1+C1134T) y 2b2 (G1066A [V→M]). Finalmente, 13 aislados presentaron un alelo *fpvA* que no se correspondía con ninguna de las secuencias publicadas²³, presentando los siguientes cambios con respecto a la de tipo 2b: A699G, G804A, C852T, G856A, C861T, C975T, A1044G, C1140T, G1152C, T1153C [F→L], T1161C, C1177T [L→F], G1242A y G1308A. Esta variante se denominó 2c. La distribución por aislados y pacientes de muestra en la tabla 1.

Coexistencia de variantes de la cepa dominante

Para discriminar si las variantes detectadas por sus diferencias genotípicas en *mucA* y *fpvA* aparecen y desaparecen secuencialmente, o por el contrario pueden persistir en las secreciones respiratorias, se analizaron 7 muestras de esputo tomadas en tres días de una semana, procedentes de un paciente (FQ7) con colonización crónica establecida desde 1994. Se obtuvieron 13 aislamientos con morfotipos diferentes, con el mismo perfil PFGE (no mostrado), pero con diferencias en los genotipos *mucA* o *fpvA*. De este modo se pudieron definir 6 variantes genotípicas y proponer su aparición en base a la adquisición de las distintas mutaciones, como se esquematiza en la figura 2. Dos de los aislados mostraron sensibilidad intermedia a ciprofloxacino; un tercero era resistente a este antibacteriano, y un cuarto aislado presentó sensibilidad intermedia a amikacina, siendo los restantes 9 sensibles a ambos antibacterianos (fig. 2).

Discusión

La colonización por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ se caracteriza por el establecimiento de una cepa clonal dominante,

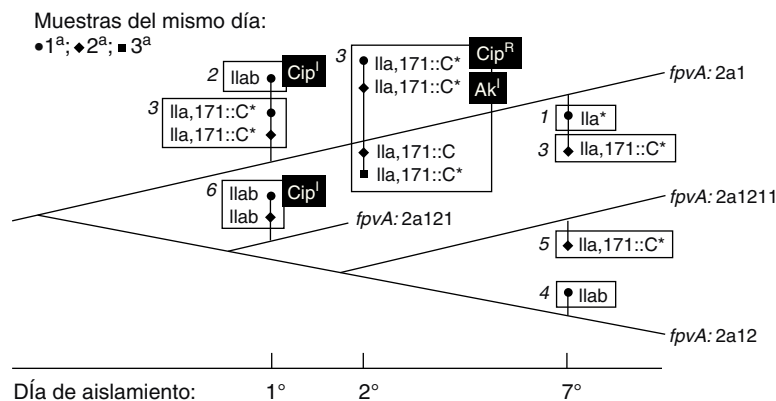


Figura 2. Representación de la posible evolución de la cepa de *P. aeruginosa* colonizadora del paciente FQ7, según el análisis de 13 aislados obtenidos de 7 muestras tomadas en tres días distintos. Las líneas gruesas indican el genotipo *fpvA* (cada nueva mutación marca una bifurcación, que se sitúa de forma arbitraria en el dibujo), mientras que el genotipo *muca* de los aislados se indica junto al símbolo correspondiente a cada muestra tomada, en cada uno de los tres días. Las 6 variantes detectadas, según su genotipo *fpvA-muca*, se indican en rectángulos numerados, teniendo en cuenta el número de mutaciones sufridas. Los aislamientos mucoides se señalan con un asterisco (*). Las desviaciones en sensibilidad a antibióticos de algunos aislados respecto al clon colonizador se indican en fondo negro: Ak^I, CMI amikacina = 16 µg ml⁻¹; Cip^I: CMI ciprofloxacino = 2 µg ml⁻¹; Cip^R: CMI ciprofloxacino = 4 µg ml⁻¹.

una vez que se ha alcanzado una fase de colonización estable. En los pacientes con FQ estudiados y según los perfiles de RFLP, sólo se ha detectado en dos de ellos, FQ4 y FQ6, la presencia de una cepa diferente a la que coloniza crónicamente. En ambos casos se aisló en las primeras muestras del estudio y no se detectó nuevamente, siendo posteriormente sustituida por la cepa dominante. Este hecho ha sido también observado en las fases de colonización intermitente posterior a la primocolonización²⁴. Otros 2 aislados, de FQ1 y FQ3 mostraron diferencias en el perfil de RFLP insuficientes para adjudicarlas a un clon diferente según los criterios de Tenover et al²¹ (fig. 1 y tabla 1).

El desarrollo de un fenotipo mucoide, debido a la hiperproducción de alginato, es característico de las poblaciones de *P. aeruginosa* que colonizan las vías aéreas en casos de FQ^{2,14}, facilitando la formación de biofilm y marcando generalmente la fase irreversible de colonización crónica. Este fenotipo se debe a mutaciones que afectan al operón de biosíntesis de alginato, especialmente al gen *muca* (en un 85% de los casos, aproximadamente²⁵), que codifica un regulador negativo de la síntesis. En nuestra cohorte, al aislamiento de cepas mucoides osciló entre el 25,9% (FQ5) y el 70,8% (FQ2), exceptuando FQ6, en quien sólo el último aislado (7%) fue mucoide, lo que se corresponde probablemente con su corta edad y reciente colonización; en el caso de FQ5 la detección de aislados mucoides se inicia sólo a partir de los 13 años (2004), mientras que en los restantes pacientes se detectan desde el comienzo del estudio (tabla 1).

Del total de 56 aislados mucoides, en el 70% (39) se detectaron mutaciones capaces de truncar la proteína Muca. Cada una de estas 8 mutaciones han sido exclusivas de un clon, y sólo dos de ellas se han descrito anteriormente: la más común es la delección de una G en el grupo de 5 que ocupa la posición 426 a 430 (Δ 430G), conocida como *muca*A22^{7,11,18,26}; otra es la mutación sin sentido C424T²⁶. La distribución por pacientes sugiere que cada una es resultado de un suceso único en la cepa dominante (aunque se conserve también la cepa silvestre, como se discute más adelante): Δ GCGGCGGTCTC187 en FQ2, Δ C453 en FQ3, Δ G430 en FQ4 y C424T en FQ5 (tabla 1). Al igual que en otros estudios, todas las mutaciones afectan al dominio periplásmico de la proteína Muca (aminoácidos 113-170) implicado en la interacción con MucB. Se cree que la pérdida de interacción con MucA permite la degradación de MucA por proteasas periplásmicas²⁷⁻²⁹. En el 30% restante de los aislados mucoides no se detectaron mutaciones sin sentido o con desfase del marco de lectura. Se ha descrito que la frecuencia de mutaciones responsables de fenotipo mucoide en la

zona no secuenciada de *muca* es muy baja (<0,3%)²⁵, por lo que la explicación más probable para estos aislados es la presencia de mutaciones en los genes *mucB* o *mucD*^{26,30,31}.

Otros 17 aislados no fueron mucoides a pesar de poseer también alguna de esas mutaciones (tabla 1). Se ha descrito que la pérdida del carácter mucoso se debe normalmente a supresiones extragénicas¹⁶. Curiosamente, tres aislados presentaron una supresión intragénica del codón de terminación prematura sin perder el fenotipo mucoide: Δ T180 + Δ 187-197 (OE67 de FQ2), G₁₆₀ + Δ C453 (5C01 de FQ3) y GCCTGCT₂₀₂ + Δ C453 (6H21 de FQ3).

El genotipado del receptor de pioverdina mostró predominancia del tipo II, sujeto a una notable variabilidad, y ausencia del tipo III. Otros estudios han detectado una proporción similar de los tres tipos en pacientes de FQ, mientras que en los aislamientos ambientales de *P. aeruginosa* predomina el tipo I^{23,32}. La distribución de tipos y variantes es coherente con la de los diferentes clones; la diferencia de subtipo en la cepa D24 de FQ1 va acompañada de un cambio en el perfil de PFGE y podría reflejar un fenómeno de recombinación¹⁹. No se detectó ninguna mutación sin sentido, lo que es consistente con la importancia de la captación de hierro para *P. aeruginosa* en la colonización pulmonar³³.

Los genotipos *muca*/*fpvA* dominantes en los aislados de cada paciente muestran una discriminación similar al RFLP: I/2b12 en FQ1, II/2c en FQ4, II/2a1 en FQ5 y Ia/1 en FQ6 (tabla 1). Sin embargo, los pacientes FQ2 y FQ3 mostraron mayor coincidencia: el mismo genotipo *muca* III, y los genotipos *fpvA* 2b1 en FQ2 y 2b ó 2b2 en FQ3, que difieren sólo en un SNP. Esta similitud puede deberse a que ambos pacientes son hermanos y pueden haber sido colonizados inicialmente por una cepa común, pero la divergencia en los perfiles de PFGE y el período de estudio realizado no permite asegurarlo.

En todos los pacientes el genotipado *muca*/*fpvA* reveló la presencia de variantes de la cepa dominante, por adquisición de SNPs o mutaciones diversas. La alternancia de tales variantes es especialmente evidente en FQ2 (*muca* III ó IIIa), FQ3 (*fpvA* 2b ó 2b2) y FQ5 (*muca* C424T o silvestre y *fpvA* 2a1 o 2a11), que se aíslan simultáneamente de las mismas muestras. La presencia de alelos silvestres de *muca* intercalados con alelos delecionados, como ocurre en FQ2 (Δ 187-189, ausente en el aislado B46) o FQ4 (Δ G430 ausente en E63 y F80) se explica más fácilmente por la persistencia de la cepa original que por retromutación. Para explorar este fenómeno se proyectó el estudio de muestras tomadas del mismo paciente (FQ7) en un intervalo corto de tiempo (para reducir la posibilidad

de aparición de nuevas variantes) pero con mayor frecuencia (2–3 esputos diarios). Los resultados demuestran la coexistencia de hasta 6 variantes de la misma cepa, que no se detectaron en todas las muestras. Cuatro de los aislados, pertenecientes a dos variantes genéticas, habían desarrollado, bien resistencia a ciprofloxacino, o niveles de sensibilidad intermedia a este antibacteriano o a amikacina (fig. 2). Se ha demostrado que la hipermutación es un factor esencial en el desarrollo de resistencia durante la colonización en pacientes con fibrosis quística u otras enfermedades obstructivas pulmonares, y que está probablemente ligada a la propia adaptación a la colonización crónica³⁴. Estos resultados indican que en el pulmón del enfermo de fibrosis quística pueden coexistir varias subpoblaciones de la cepa colonizadora, posiblemente ocupando diferentes nichos. La dificultad para diferenciarlas, especialmente si se parte de una única muestra, puede tener consecuencias a la hora de determinar su sensibilidad a antibacterianos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PI050569 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). A.V. fue becario del Ministerio de Medio Ambiente, y A.F.-O. contratada (CM08/00166) mediante una ayuda del Instituto de Salud “Carlos III”, Ministerio de Ciencia e Innovación. Agradecemos a P. Gómez su valiosa asistencia técnica y a la Unidad de Genómica, Parque Científico de Madrid/UCM, por el trabajo de secuenciación.

Bibliografía

- Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5:5367–9.
- Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: *Mucoid Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1996;60:539–74.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:194–222.
- Deretic V, Schurr MJ, Yu H. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol*. 1995;3:351–6.
- Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JR, Holloway BW, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8377–81.
- Højby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros*. 2005;4:49–54.
- Anthony M, Rose B, Pegler MB, Elkins M, Service H, Thamotharampillai K, et al. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2772–8.
- Bennekov T, Colding H, Ojieniyi B, Bentzon MW, Højby N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 1996;34:202–4.
- Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol*. 2004;53:1089–96.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:8487–92.
- Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thogersen R, Thomsen LE, Ciofu O, et al. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun*. 2007;75:2214–24.
- Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, Vandemheen K, Saginur R, Tullis E, et al. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:811–5.
- Margolis E, Yates A, Levin B. The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*. *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response *BMC Microbiology*. 2010;10:59.
- Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol*. 2005;56:309–22.
- Spencer DH, Kas A, Smith EE, Raymond CK, Sims EH, Hastings M, et al. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2003;185:1316–25.
- Bragonzi A, Wiehlmann L, Klockgether J, Cramer N, Worlitzsch D, Doring G, et al. Sequence diversity of the *mucABD* locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology*. 2006;152:3261–9.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000;288:1251–4.
- Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V, Mucoïd. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun*. 1997;65:3838–46.
- Smith EE, Sims EH, Spencer DH, Kaul R, Olson MV. Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2005;187:2138–47.
- Wong K, Roberts MC, Owens L, Fife M, Smith AL. Selective media for the quantitation of bacteria in cystic fibrosis sputum. *J Med Microbiol*. 1984;17:113–9.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233–9.
- de Chial M, Ghysels B, Beatson SA, Geoffroy V, Meyer JM, Pattery T, et al. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2003;149:821–31.
- Bodilis J, Ghysels B, Osayande J, Matthijs S, Pirnay J-P, Denayer J, et al. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2009;11:2123–35.
- Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9:492–7.
- Moyano AJ, Smania AM. Simple sequence repeats and mucoid conversion: biased *mucA* mutagenesis in mismatch repair-deficient *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2009;4:e8203.
- Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, Højby N, et al. Investigation of the *algT* operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology*. 2008;154:103–13.
- Cezairliyan BO, Sauer RT. Control of *Pseudomonas aeruginosa* AlgW protease cleavage of MucA by peptide signals and MucB. *Mol Microbiol*. 2009;72:368–79.
- Reiling SA, Jansen JA, Henley BJ, Singh S, Chattin C, Chandler M, et al. Prc protease promotes mucoidy in *mucA* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2005;151:2251–61.
- Qiu D, Eisinger VM, Rowen DW, Yu HD. Regulated proteolysis controls mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:8107–12.
- Boucher JC, Martinez-Salazar J, Schurr MJ, Mudd MH, Yu H, Deretic V. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J Bacteriol*. 1996;178:511–23.
- Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Deretic V. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol*. 1993;9:497–506.
- Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:8101–6.
- Mossialos D, Amoutzias GD. Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends? *Int J Med Microbiol*. 2009;299:87–98.
- Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3382–6.