



# Caracterización del *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística

Valeria Andrea Vélez Lozano

Asesores

Ibeth Cristina Romero Calderón, Bacterióloga, MSc., PhD;

Ruth Mélida Sánchez Mora, Bacterióloga, MSc., PhD

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá D.C, junio 2022

# Tabla de Contenido

- |   |                        |   |                          |
|---|------------------------|---|--------------------------|
| 1 | Introducción           | 5 | Conclusiones             |
| 2 | Objetivos              | 6 | Perspectivas futuras     |
| 3 | Metodología            | 7 | Participación en eventos |
| 4 | Resultados y discusión |   |                          |

# Generalidades microbiológicas

*Pseudomonas aeruginosa*

➔ Bacilo Gram Negativo ➔



Adaptabilidad

Pigmentos



Características

Genes reguladores

Factores Virulencia

Biopelículas, QS

Alginate

Alginate

Capsula

Resistencia a A/B



Evasión Rta Inmune

Resistencia antimicrobianos

"La resistencia a los antibióticos está creciendo, y nos estamos quedando rápidamente sin opciones de tratamiento"

**Bacterias resistentes a los antibióticos**

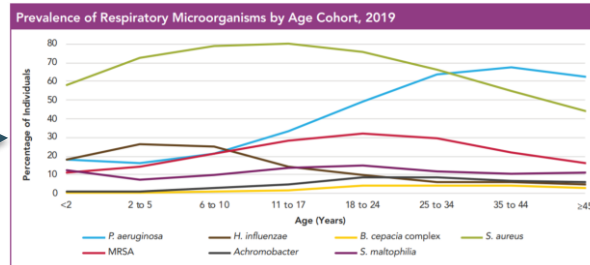
Los investigadores necesitan encontrar nuevos antibióticos para estas «superbacterias»

*Dra. Marie-Paule Kieny, asistente del director general de la OMS*

| Prioridad | Bacteria                       | Puede causar         | Resistente a   |
|-----------|--------------------------------|----------------------|----------------|
| Crítica   | <i>Acinetobacter baumannii</i> | Infección de heridas | Carbapenémicos |
|           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Infecciones          |                |

○ Riesgo mayor en hospitales

Asociación con enfermedades



Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report to the Center Directors 2019. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry [internet] 2020

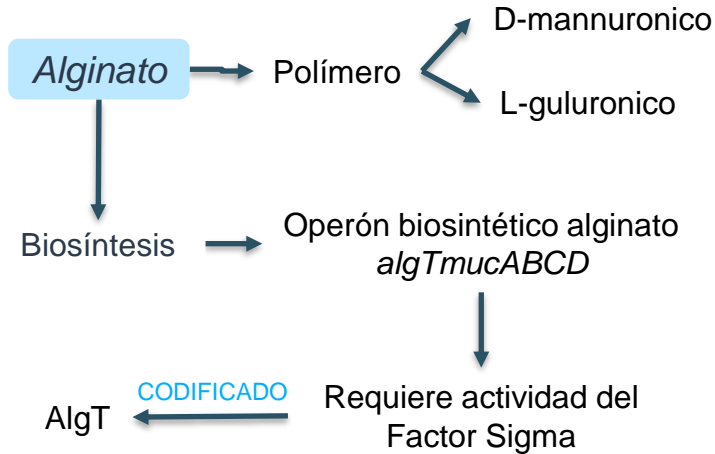
ETAPAS INFECCIÓN

Adquisición

Aguda

Crónica

# Regulación de la producción de alginato



**Mutaciones**  
*Gen mucA*



Impacto clínico

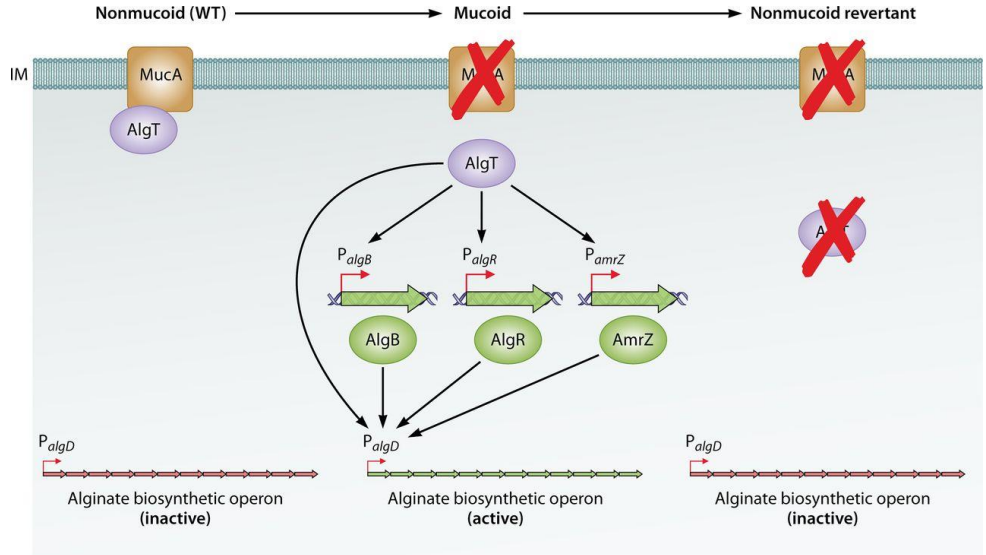


Cambio □ fenotipo

FENOTIPO MUCOIDE



Tasas de mortalidad



**Regulación de la biosíntesis de alginato: conversión y reversión mucoide.**

# Objetivo General

Caracterizar el *gen mucA* en tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística.

## Objetivos Específicos

- Aislar el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Identificar posibles mutaciones que se encuentren en el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística mediante el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

# Metodología del objetivo 1

- 1 Aislar el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## Muestra

- Cepa ATCC *Pseudomonas aeruginosa* 27853
- 3 aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes con F.Q

Clínica  
de la Mujer  
Grupo  quirónsalud

## Conservación de los aislados

*Secretaría de Salud de Bogotá*

- Crioviales con Skim Milk y se dejan a -70°C

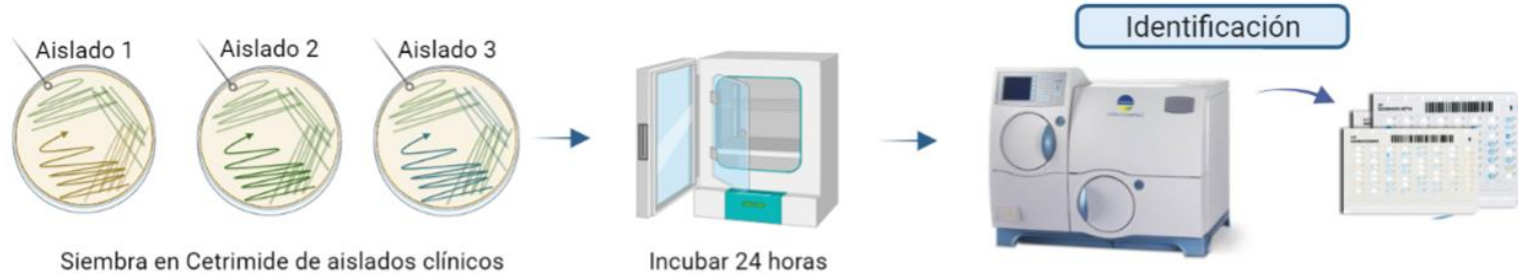


BOGOTÁ  
MEJOR  
PARA TODOS

SECRETARÍA DE SALUD

# Metodología del objetivo 1

## 1 Cultivo e identificación de aislados clínicos



## 2 Curvas de crecimiento de aislados clínicos y cepa ATCC 27853

**Cepa ATCC 27853**



**Control:** medio Luria Bertani  
**Condiciones:**

- Incubación 37°C
- Agitación alta por 10 segundos
- Medición de abs cada 15 min
- Medición abs a 600nm

**Aislados Clínicos**



**Control:** medio Luria Bertani  
**Condiciones:**

- Incubación 37°C
- Agitación alta por 14 horas
- Medición de abs cada hora
- Medición abs a 620nm

# Metodología del objetivo 1

## 3 Extracción de ADN genómico a partir de los aislados clínicos y ATCC 27853

Métodos

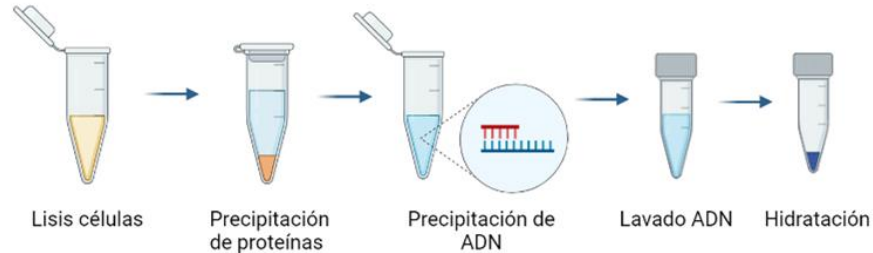


Kit comercial

1. Lisado de células

2. Precipitación de proteínas

3. Precipitación ADN

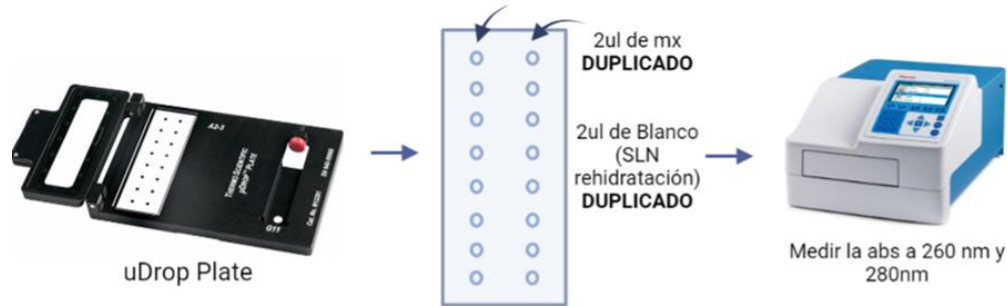


Salting Out

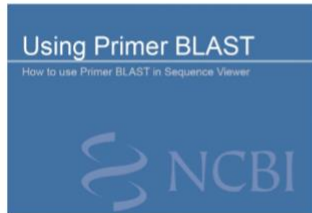


# Metodología del objetivo 1

## 4 Cuantificación de ADN de los productos de extracción



## 5 Diseño de primers



Secuencia del *gen mucA*: NCBI  
Utiliza la herramienta  
Primer-Blast

Parámetros a tener en cuenta:

- Tamaño de primers
- Porcentaje de Guanina-Citosina (%GC)
- Temperatura melting
- Autocomplementariedad.

## 6 Alineamiento de la secuencia del gen *mucA* de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC PAO1 y 27853



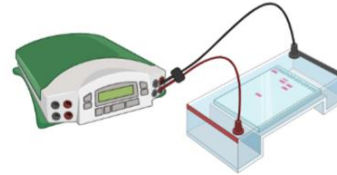
genomes.atcc.org (**cepa ATCC 27853**)  
pseudomonas.com (**cepa PAO1**).

# Metodología del objetivo 1

## 7 Estandarización de la PCR y electroforesis



- **Taq polimerasa:** BlasTaq 2X PCR MasterMix (abm)
- **Cebadores:** forward (5'-ATGAGTCGTGAAGCCCTGC-3') [10pmol/ul] y reverse (5'-TCAGCGGTTTTCCAGGCT-3') [10pmol/ul]
- **Programa termociclador:**
  - > Desnaturalización inicial (1 ciclo de 10 min a 94°C)
  - > 40 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C)
  - > Extensión final de, 10 min a 72°C.



**Agarosa 1%** --> 100 voltios por 30 min  
**Marcador de peso molecular:** HyperLadder I  
Muestras: 3,5 ul  
Marcador: 3 ul

## 8 Purificación y secuenciación de productos de PCR

Método



Secuenciación de Sanger por electroforesis capilar



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA

SSiGMol

# Caracterización fenotípica de los aislados clínicos

## 1 Cultivo e identificación de aislados clínicos

**Figura 2AI, BI y CI (Agar MacConkey)**

↳ Colonias traslúcidas (bacteria no fermentadora)

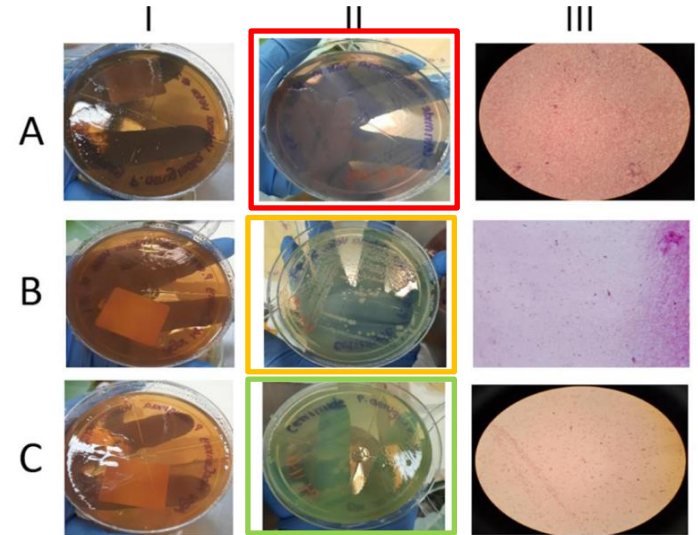
**Figura 2AIII, 2BIII y 2CIII (Gram)**

↳ Bacilos Gram negativos

Prevalencia *P. aeruginosa* - Cystic Fibrosis Foundation

1994 □ 60%      2020 □ 30%

*P. fluorescens* □ Especie ambiental



**Figura 2. Morfología colonial y Gram de los aislados clínicos.** La distribución de las filas es: fila A (aislado 1), fila B (aislado 2), fila C (aislado 3); en el caso de las columnas, su distribución es: columna I (Agar MacConkey), columna II (Agar Cetrimide) y columna III (Visualización Gram)

# Perfiles de resistencia de los aislados

## 2 Perfiles de resistencia de los aislados clínicos

- Penicilinas
- Cefalosporinas de tercera y cuarta generación
- Carbapenémicos
- Aminoglucósidos
- Fluoroquinolonas

Sensibilidad  
A/B

Excepción

### Aislado *P. fluorescens*

Resistencia intermedia a ciprofloxacino

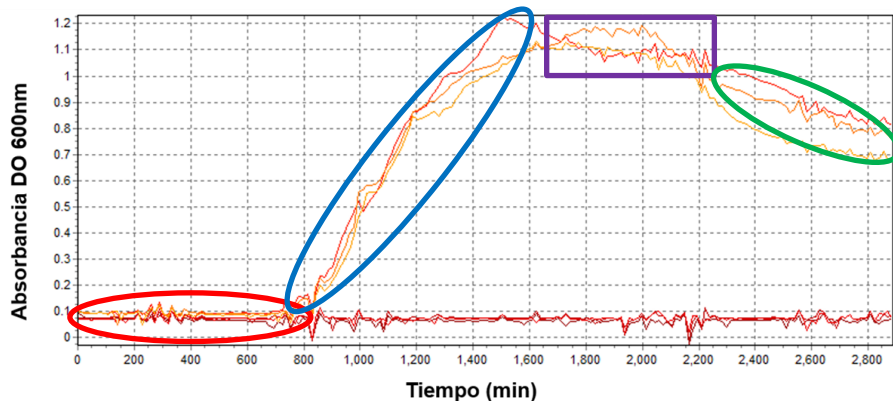
Tabla 1. Perfil de Sensibilidad/Resistencia de los aislados de *Pseudomonas*

sp.

| Antibiótico            |                | Aislado 1             | Aislado 2            | Aislado 3            |
|------------------------|----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
|                        |                | <i>P. fluorescens</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Piperacilina/Sulbactam | CMI            | 8                     | 8                    | 8                    |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Ceftazidima            | CMI            | 2                     | 4                    | 4                    |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Cefepima               | CMI            | 8                     | 2                    | 2                    |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Doripenem              | CMI            | <=0,12                | 0,25                 | 0,5                  |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Imipenem               | CMI            | 1                     | 1                    | 2                    |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Meropenem              | CMI            | <=0,25                | <= 0,25              | 0,5                  |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Amicacina              | CMI            | <=2                   | <=2                  | <=2                  |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Gentamicina            | CMI            | <=1                   | <=1                  | <=1                  |
|                        | Interpretación | Sensible              | Sensible             | Sensible             |
| Ciprofloxacino         | CMI            | <=0,25                | <=0,25               | <=0,25               |
|                        | Interpretación | Intermedio            | Sensible             | Sensible             |
| Colistina              | CMI            | <=0,5                 | N/A                  | <=0,5                |
|                        | Interpretación | Sensible              | N/A                  | Sensible             |

# Curvas de crecimiento de cepas evaluadas

## 3 Curvas de crecimiento de cepa ATCC y aislados clínicos



**Figura 6.** Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Estudio por  
Liu y col.  
2020



*P. aeruginosa* ATCC 9027 □ Variación duración de las fases (lag de 4 horas; log de 5 a 36 horas);

3 réplicas del inóculo y 3 controles de medio (LB)

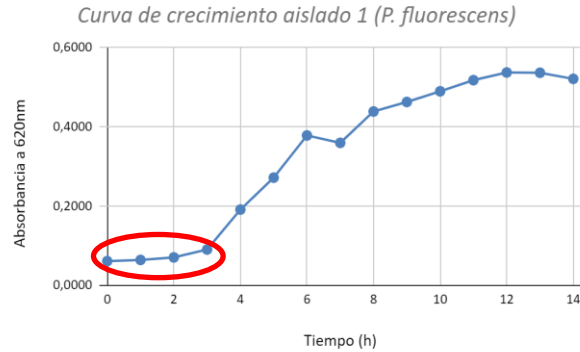
**Fase Lag:** 13 horas (800 min)

**Fase Log:** 14 horas (820 min □ 1700 min)

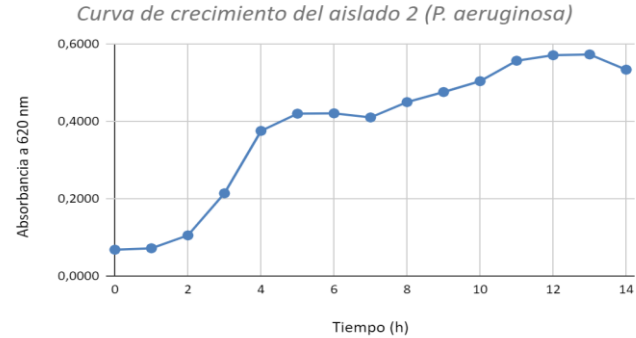
**Fase Estacionaria:** 6 horas (1700 □ 2200 min)

**Fase Muerte:** 10 horas (2200 min □ 2800 min)

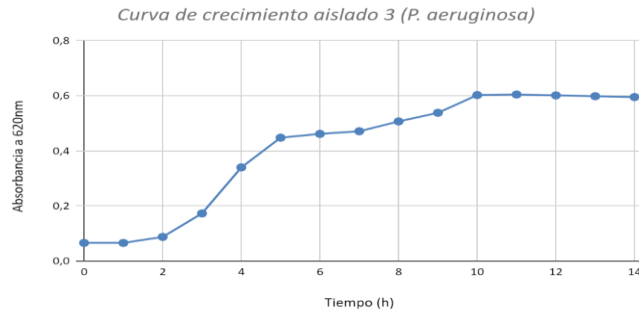
# Curvas de crecimiento de cepas evaluadas



**Figura 7.** Curva de crecimiento del aislado 1 (*Pseudomonas fluorescens*)



**Figura 8.** Curva de crecimiento del aislado 2 (*Pseudomonas aeruginosa*)



**Figura 8.** Curva de crecimiento del aislado 3 (*Pseudomonas aeruginosa*)

Estudio por Liu  
y col.  
**2020**



**AISLADOS** tienen curvas de  
duración menores

# Cuantificación ADN genómico

## 4 Cuantificación ADN genómico

**Tabla 2. Cuantificación ADN genómico obtenido a partir del KIT y Salting Out**

|                    | Cuantificación de ADN por método de KIT |            |          |                 |        |                  | Cuantificación de ADN por método de Salting Out |            |          |                 |        |                  |
|--------------------|---|------------|----------|-----------------|--------|------------------|---|------------|----------|-----------------|--------|------------------|
|                    | Medición 1                              | Medición 2 | Promedio | Promedio-blanco | µg/mL  | Relación 260/280 | Medición 1                                      | Medición 2 | Promedio | Promedio-blanco | µg/mL  | Relación 260/280 |
| SLN TE (260 nm)    | 0,0490                                  | 0,0487     | 0,0489   | 0,0000          | 0,000  | 0,000            | 0,0636  | 0,0613     | 0,0625   | 0,0000          | 0,000  | 0,000            |
| SLN TE (280 nm)    | 0,0433                                  | 0,0433     | 0,0433   | 0,0000          |        |                  | 0,0588  | 0,0576     | 0,0582   | 0,0000          |        |                  |
| Aislado 1 (260 nm) | 0,7531                                  | 0,6934     | 0,7233   | 0,6744          | 674,40 | 2,02             | 0,4050  | 0,2822     | 0,2822   | 0,2198          | 219,75 | 2,35             |
| Aislado 1 (280 nm) | 0,3939                                  | 0,3614     | 0,3777   | 0,3344          |        |                  | 0,2164  | 0,1519     | 0,1519   | 0,0937          |        |                  |
| Aislado 2 (260 nm) | 0,9519                                  | 0,7760     | 0,8640   | 0,8151          | 815,10 | 1,83             | 0,2365  | 0,2337     | 0,2351   | 0,1727          | 172,65 | 2,34             |
| Aislado 2 (280 nm) | 0,5404                                  | 0,4374     | 0,4889   | 0,4456          |        |                  | 0,1354  | 0,1288     | 0,1321   | 0,0739          |        |                  |
| Aislado 3 (260 nm) | 0,2715                                  | 0,2140     | 0,2428   | 0,1939          | 193,90 | 1,84             | 0,2939  | 0,2974     | 0,2957   | 0,2332          | 233,2  | 2,17             |
| Aislado 3 (280 nm) | 0,1729                                  | 0,1241     | 0,1485   | 0,1052          |        |                  | 0,1672  | 0,1641     | 0,1657   | 0,1075          |        |                  |
| ATCC 27853 (260nm) | 0,3020                                  | 0,2634     | 0,2827   | 0,2339          | 233,90 | 1,91             | 0,1894  | 0,5785     | 0,1894   | 0,1270          | 126,95 | 2,24             |
| ATCC 27853 (280nm) | 0,1747                                  | 0,1574     | 0,1661   | 0,1228          |        |                  | 0,1148  | 0,3251     | 0,1148   | 0,0566          |        |                  |

Se obtuvo una mayor concentración y pureza óptima del ADN genómico obtenido por el Kit de Promega, comparado con lo obtenido por el método de Salting Out.

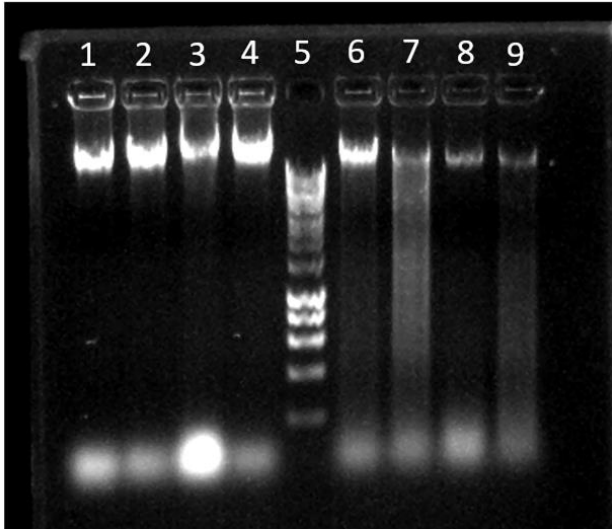
Estudio  
Becker y col.  
(2016)



Pureza DNA del estudio □ 1,5  
[DNA] □ 18,1 µg/ml

# Electroforesis de ADN genómico

## 5 Electroforesis ADN genómico



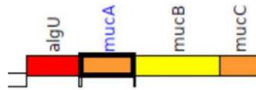
**Figura 10. Electroforesis de ADN genómico obtenido por dos métodos de extracción (Kit y Salting Out).** Los carriles 1 al 4, corresponden a las muestras extraídas por el Kit de Promega; el carril 5, corresponde al marcador de peso molecular, HyperLadder I; los carriles 6 al 9, corresponden a las muestras extraídas por Salting Out.



# Diseño y confirmación de utilidad experimental de los primers

## 6 Diseño de primers

### gen mucA - Pseudomonas aeruginosa PA01



**Posición:** 831914 - 832498

**Tamaño:** 585 nucleótidos

ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGAAACTCTGCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATGAACTCGAGTTGC  
GGCGGGTGCTCGCAGCTTGGCGGAGGATGCCGAGCTGCTCCACCTGGTCGCGTTACAGTTGGCGCG  
GTCGTCATGCACCCGAGCTACCCTGCCAAGCTGGATATCGCTGCAGCGGTCTGCTGCCCTGGCCG  
ACGAGGCCGCTCCGCCAAAGCGGAGAAGGGACCGTGCGCGGATGGTCGGTCGCCCTGGCGGTGCTGCT  
CGGTGACCTGGCGGTGCTGGCCGGCTGGCTGTACAACAGAACGACCCCTGGCGCAATGGCGCA  
ACAGGGGACACCCCGCAGATGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGCGGTGCTGGCGGCTACAGCGAA  
GAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATACCAACTCCTGCTCAGCGATACCCGCTGGCATGAGCAGCGTCTGC  
CGATCTACCTGCGTCAGCACGTGCAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAGAGAGCGCGCTGCCCTACGCTCG  
GCAGCCAGCCTGGAAAACCGCTGA

| Primers        | Secuencia           | Tamaño | GC%   | Tm    |
|----------------|---------------------|--------|-------|-------|
| Forward primer | ATGAGTCGTGAAGCCCTGC | 19     | 57.89 | 60.08 |
| Reverse primer | TCAGCGGTTTTCCAGGCT  | 18     | 55.56 | 59.16 |

**Figura 13.** Ubicación de primer forward (amarillo) y primer reverse (azul) en la secuencia fasta del gen mucA.

## 7 Alineamiento de secuencias

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

mucA27853 ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGAAACTCTGCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATGAA 60
PA0763 ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGAAACTCTGCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATGAA 60
*****

mucA27853 CTCGAGTTGCGGCGGGTCTGCCAGCTTGGCGGAGGATGCCGAGCTGCTCCACCTGG 120
PA0763 CTCGAGTTGCGGCGGGTCTGCCAGCTTGGCGGAGGATGCCGAGCTGCTCCACCTGG 120
*****

mucA27853 TCGCGTTACAGTTGGCGGGTCCGTCATGCACCGCAGCTACCCGCGAAGCTGGAT 180
PA0763 TCGCGTTACAGTTGGCGGGTCCGTCATGCACCGCAGCTACCCGCGAAGCTGGAT 180
*****

mucA27853 ATCGCTGCGGCGGTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCGCTCCGCCGAAAGCGGAGAAG 240
PA0763 ATCGCTGCGGCGGTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCGCTCCGCCGAAAGCGGAGAAG 240
*****

mucA27853 GGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCGCGGTGCTGCTCGGTGACCTGGCGGTGCTG 300
PA0763 GGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCGCGGTGCTGCTCGGTGACCTGGCGGTGCTG 300
*****

mucA27853 GCCGGCGTGCCTGTACAACAGAAGCAGCCCTGCCGCAATGGCGCAACAGGGGACC 360
PA0763 GCCGGCGTGCCTGTACAACAGAAGCAGCCCTGCCGCAATGGCGCAACAGGGGACC 360
*****

mucA27853 ACCCCGCAGATGCCCTGCCCTCAGGTGAAAAGCCGCGCTGCTGGCCGCTACAGCGAA 420
PA0763 ACCCCGCAGATGCCCTGCCCTCAGGTGAAAAGCCGCGCTGCTGGCCGCTACAGCGAA 420
*****

mucA27853 GAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATCACCACCTCCTGCTCAGCGATACCCGCTGGCATGAG 480
PA0763 GAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATCACCACCTCCTGCTCAGCGATACCCGCTGGCATGAG 480
*****

mucA27853 CAGCGTCTGCCGATACCTGCGTCAGCAGCTGCAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAGAG 540
PA0763 CAGCGTCTGCCGATACCTGCGTCAGCAGCTGCAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAGAG 540
*****

mucA27853 AGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCTGGAAAACCGCTGA 585
PA0763 AGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCTGGAAAACCGCTGA 585
*****
    
```

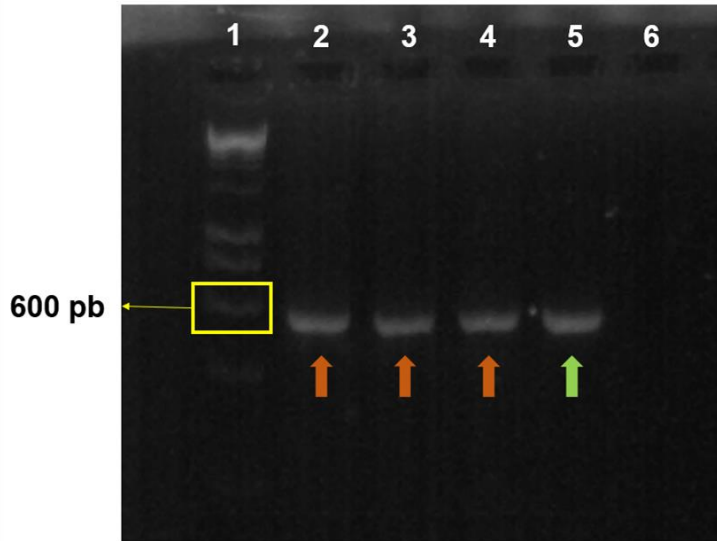


Porcentaje de similitud: 99,83%

La posición 342, en el caso de la cepa PA01, hay una Adenina y la ATCC 27853, hay una Guanina.

# Electroforesis de PCR

## 8 Electroforesis de la PCR del gen *mucA*



**Figura 14. Electroforesis del gen *mucA* de las cepas ATCC 27853 y aislados clínicos amplificadas por PCR.** En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (HyperLadder I); el carril 2, corresponde al aislado 1 (*P. aeruginosa*); el carril 3, correspondiente al aislado 2 (*P. fluorescens*); el carril 4, correspondiente al aislado 3 (*P. aeruginosa*); en el carril 5, corresponde a la cepa ATCC 27853, y, por último, en el carril 6, se encuentra un control negativo con agua free.

# Metodología del objetivo 2

- ② Identificar posibles mutaciones que se encuentren en el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística mediante el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas.



**BioEdit**

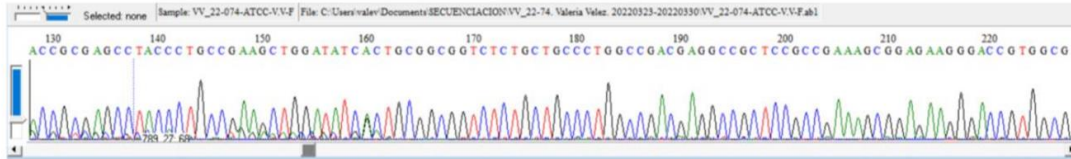
- ① *Visualización de las secuencias obtenidas*
- ② *Depuración de las secuencias*
- ③ *Alineamiento de las secuencias con los primers forward y reverse (Secuencia consenso)*
- ④ *Comparación con bases de datos*
- ⑤ *Alineamiento secuencia consenso con secuencia ATCC*

# Electroferogramas de secuencias ATCC

9.1

Visualización de secuencias cepa ATCC 27853

A. Electroferograma cepa ATCC – Primer Forward



B. Electroferograma cepa ATCC – Primer Reverse

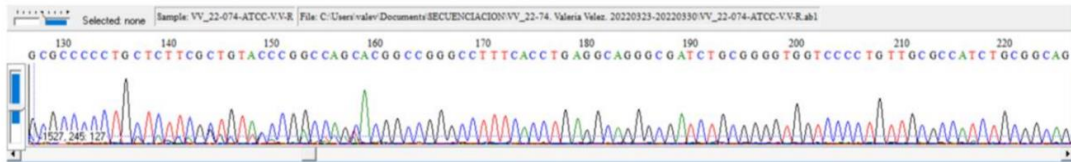


Figura 12. Electroferogramas de un fragmento del *gen mucaA* de *P. aeruginosa* ATCC 27853 obtenido a partir del secuenciamiento con el primer forward y reverse. (A) fragmento del electroferograma obtenido a partir del primer forward; (B) fragmento del electroferograma obtenido a partir del primer reverse.

# Blast de comparación con bases de datos

9.2

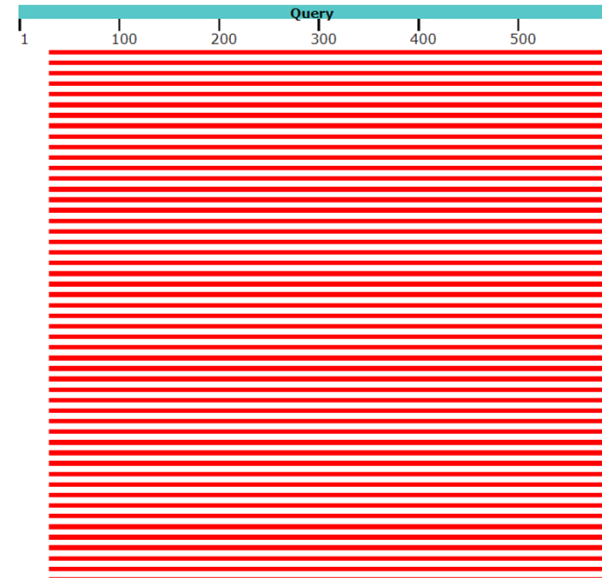
Blast de búsqueda de secuencia ATCC en base de datos

- Longitud de la secuencia del *gen mucA* ATCC
- Secuencia abarcada por las bases de datos

Figura 13. Blast de comparación de secuencia ATCC y bases de datos

Alignment Scores  < 40  40 - 50  50 - 80  80 - 200  >= 200

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences



| Description   | Scientific Name                        | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | A |
|---|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain DVT410 chromosome, complete genome</a>  | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain DVT421 chromosome, complete genome</a>  | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain DVT423 chromosome, complete genome</a>  | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain PAAK088 chromosome, complete genome</a> | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain PAC1 chromosome, complete genome</a>    | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 7 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain K19PSE24 chromosome</a>                 | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain LYT4 chromosome, complete genome</a>    | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain AA2 chromosome, complete genome</a>     | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1061      | 1061        | 99%         | 0.0     | 98.98%     | 6 |

# Alineamiento de secuencia consenso y ATCC

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Consensus      TTATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATG    60
ATCC27853      --ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATG    58
                *****

Consensus      WACTCGAGTTGCGCGGGTGCCTGCAGCTTGGCGGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCACCT    120
ATCC27853      WACTCGAGTTGCGCGGGTGCCTGCAGCTTGGCGGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCACCT    118
                *****

Consensus      GGTCCGCTTACCAGTTGGCGGGTCCGTATGCACCGCAGGCTACCCCTGCCGAAGCTGG    180
ATCC27853      GGTCCGCTTACCAGTTGGCGGGTCCGTATGCACCGCAGGCTACCCCTGCCGAAGCTGG    178
                *****

Consensus      ATATCGTGGCGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGA    240
ATCC27853      ATATCGTGGCGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGA    238
                *****

Consensus      AGGGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCTGGCGGTGCTGCTCGGTGACCTGGCGGTGC    300
ATCC27853      AGGGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCTGGCGGTGCTGCTCGGTGACCTGGCGGTGC    298
                *****

Consensus      TGGCCGGCGTGCCTGTACAACAGAACGACGCCCTGCCGAGATGGCGCAACAGGGGA    360
ATCC27853      TGGCCGGCGTGCCTGTACAACAGAACGACGCCCTGCCGAGATGGCGCAACAGGGGA    358
                *****

Consensus      CCACCCGAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGGCGGTGCTGGCCGGSTACAGCG    420
ATCC27853      CCACCCGAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGGCGGTGCTGGCCGGSTACAGCG    418
                *****

Consensus      AAGAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGATACCCGCTGGCATG    480
ATCC27853      AAGAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGATACCCGCTGGCATG    478
                *****

Consensus      AGCAGCGTCTGCCGATCTMCS TGGCTCAGCACGTGCAACAATCCGCGCTCAGTGGTACAG    540
ATCC27853      AGCAGCGTCTGCCGATCTACT TGGCTCAGCACGTGCAACAATCCGCGCTCAGTGGTACAG    538
                *****

Consensus      AGAGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAAACCGTGAA    588
ATCC27853      AGAGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAAACCGTGAA-    585
                *****
    
```

9.3

Comparación con bases de datos

**Figura 13. Alineamiento de secuencia consenso ATCC 27853 y la secuencia de la base de datos de ATCC 27853.**

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

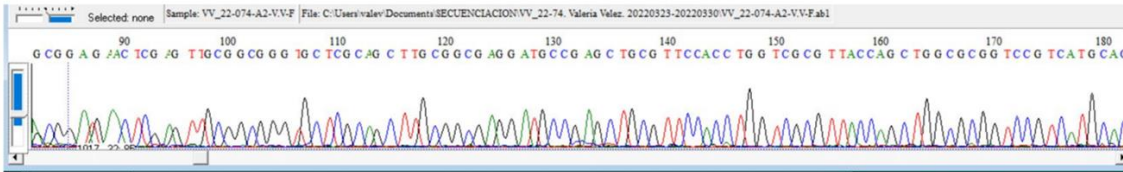
|              |        |        |
|--------------|--------|--------|
| 1: Consensus | 100.00 | 98.97  |
| 2: ATCC27853 | 98.97  | 100.00 |

**Figura 14. Porcentaje de identidad obtenido al hacer el alineamiento en Clustal-Omega.**

# Electroferogramas de secuencias aislado 2

## 9.4 Visualización de secuencias aislado 2

A. Electroferograma aislado 2 – Primer Forward



B. Electroferograma aislado 2 – Primer Reverse

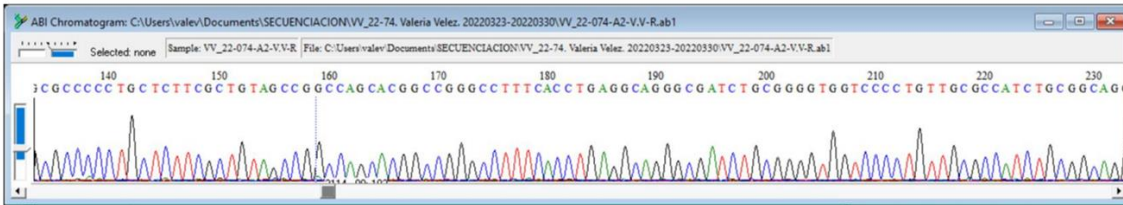


Figura 15. Fragmento del electroferograma del *gen muCA* del aislado 2 obtenido a partir del secuenciamiento con el primer forward y reverse. (A) fragmento obtenido a partir del primer forward; (B) fragmento obtenido a partir del primer reverse.



No fue posible obtener la secuencia de los aislados 1 y 3 (picos superpuestos)

# Blast de comparación con bases de datos

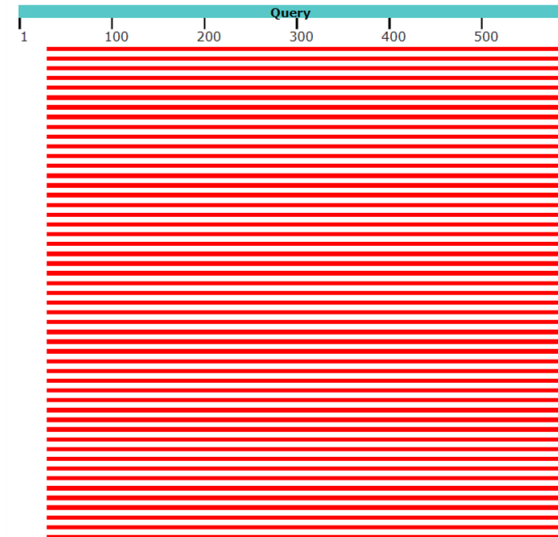
## 9.5 Blast de búsqueda de secuencia en base de datos

- Longitud de la secuencia del *gen mucA*
- Secuencia abarcada por las bases de datos

Figura 16. Blast de comparación de secuencia ATCC y bases de datos

Alignment Scores ■ < 40 ■ 40 - 50 ■ 50 - 80 ■ 80 - 200 ■ >= 200

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences



| Description   | Scientific Name                        | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident |
|---|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain CDN118 chromosome, complete genome</a>      | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain DVT419 chromosome, complete genome</a>      | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain 1811-18R001 chromosome, complete genome</a> | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain 1811-13R031 chromosome, complete genome</a> | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain IMP66 chromosome, complete genome</a>       | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain IMP67 chromosome, complete genome</a>       | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain IMP68 chromosome, complete genome</a>       | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain AR_0111 chromosome, complete genome</a>     | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain AR_460 chromosome, complete genome</a>      | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain K34-7 chromosome, complete genome</a>       | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain AR_0110 chromosome, complete genome</a>     | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain CCUG 70744 chromosome, complete genome</a>  | <a href="#">Pseudomonas aeruginosa</a> | 1026      | 1026        | 94%         | 0.0     | 100.00%    |



# Alineamiento secuencia consenso aislado 2 y ATCC



## 9.6 Comparación con bases de datos - aislado 2

**Figura 17. Alineamiento de secuencia consenso aislado 2 y la secuencia de la base de datos de ATCC 27853.** En color amarillo se observan las bases que no fueron compatibles en la secuencia consenso y, por lo tanto, no fue compatible con la secuencia ATCC 27853. En color rojo, se observan las mutaciones que se presentaron a lo largo de la secuencia.

- 17 mutaciones en la secuencia consenso (flecha de color rojo)
- 10 bases las cuales no fueron identificadas en la secuencia (color amarillo).

# Identificación de mutaciones en aislado 2

## 9.7 Identificación de mutaciones en el aislado 2

**Tabla 3. Frecuencia de mutaciones presentes en el aislado 2.**

| Frecuencia de mutaciones presentes en el aislado 2 |              |        |       |       |          |            |                |          |           |
|--|--------------|--------|-------|-------|----------|------------|----------------|----------|-----------|
| SUSTITUCIONES                                      |              |        |       |       |          |            |                |          |           |
|  | Transversión |        |       |       |          | Transición |                |          | INSERCIÓN |
| Cambio evidenciado                                 | A → C        | T → G  | C → A | A → T | C → G    | G → A      | C → T          | T → C    | (+A)      |
| Frecuencia   | 3            | 2      | 1     | 1     | 2        | 2          | 3              | 2        | 1         |
| Posición   | P1; P23; P25 | P5; P9 | P6    | P24   | P15; P28 | P10; P30   | P14; P26; P115 | P29; P92 | P386      |

- 9 mutaciones por transversión
- 7 mutaciones por transición
- 1 mutación por inserción

(p) posición en la secuencia observada en el alineamiento.

Estudio Candido y col. (2018)



Evalúan cambio en secuencia, mutaciones del *gen mucA* y fenotipo

Bragonzi y col. (2006)



Mutaciones del *gen mucA* □  
SUSTITUCIÓN  
(transición =168)



**Mutaciones:**  
sustituciones, inserciones

# Conclusiones

- Se observó una variabilidad en cuanto a presencia de diferentes cepas de *Pseudomonas spp.* en pacientes con Fibrosis Quística, permitiendo no solamente encontrar a *P. aeruginosa*, sino también a *P. fluorescens*.
- Existe una variación en cuanto a las curvas de crecimiento de los aislados, la cual puede estar relacionada con el método y tiempo evaluado, lo cual se evidencia en las diferencias de la duración de las fases lag, log y estacionaria de cada uno.
- En el presente estudio, se dan a conocer mutaciones del tipo inserción y sustitución (predominan las transversiones) que anteriormente no han sido descritas en la literatura revisada.
- No necesariamente todas las mutaciones presentes en el *gen mucA* van a influir de forma directa en el cambio del fenotipo bacteriano (de no mucoide a mucoide), y que existe algunas descritas en literatura que se conocen porque están presentes en el fenotipo mucoide como es el caso de la mutación *mucA22*.

# Perspectivas futuras

- Volver a secuenciar los aislados 1 y 3 para determinar si en estas secuencias también hubo mutaciones presentes.
- Realizar un nuevo estudio con un número mayor de aislados, en donde se identifiquen a mayor escala las mutaciones presentes en el *gen mucA* de *P. aeruginosa* en pacientes con F.Q.
- Continuar en un futuro con los estudios sobre los aislados, en este caso, haciendo una correlación entre los niveles de alginato y el fenotipo presentado por los aislados.
- Inducir el fenotipo mucoide en los aislados de forma *in vitro* y nuevamente evaluar la presencia de mutaciones en el *gen mucA*.

# Participación en eventos

Universidad Francisco de Paula Santander  
Vigilada Mineducación

Universidad Francisco de Paula Santander  
Ucana - Colombia  
Vigilada Mineducación

$(e^i)^i = 1$

CERTIFICATE  
OF PARTICIPATION

This is to certify that:

Valeria Andrea Velez Lozano

Attended the

**INTERNATIONAL WEEK OF SCIENCE,  
TECHNOLOGY, AND INNOVATION**  
(8th IWSTI)

September 21-24, 2021  
San José de Cúcuta, Colombia.

Byron Medina Delgado, Chairman  
Vicerrector Asistente de Investigación y Extensión

Torcorama Velásquez Peto  
Torcorama Velásquez, Chairman  
Directora de Investigación y Extensión

UNIVERSIDAD DEL CAQUETÁ

UTADEO

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ

UNIVALLE

UNIVERSIDAD DE LA GUAYANA

UNIVERSIDAD DE LA PAZ

UNIVERSIDAD DE LOS RIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE BOGOTÁ

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE BOGOTÁ

INVITE

Nodo Bogotá Cnd. 11 años

**XIX ENCUENTRO REGIONAL  
DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN 2021**

**"LOS SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN EN PANDEMIA  
RETOS PARA LOS PROCESOS DE FORMACIÓN"**

La Fundación Red Colombiana de Semilleros de Investigación RedColSI  
Nodo Bogotá - Cundinamarca

Otorga certificado a:

**Valeria Andrea Vélez Lozano**

Con cedula de ciudadanía: 1.007.742.683  
en calidad de: **Ponente**

En el XIX Encuentro Regional de Semilleros de Investigación,  
Nodo - Bogotá - Cundinamarca Modalidad Virtual, durante los días 10 al 14 de Mayo de 2021.

Carlos Carranza.  
Carlos Edwin Carranza Gutierrez  
Coordinador RedCOLSI  
Nodo Bogotá - Cundinamarca

German Eduardo Vargas Zapata  
German RedColSI  
Nodo Bogotá - Cundinamarca

# Bibliografía

1. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report to the Center Directors 2020. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry [internet] 2021 [cited 28 jan 2022] Available in: <https://www.cff.org/media/23476/download>
2. Scales BS, Erb-Downward JR, Huffnagle IM, LiPuma JJ, Huffnagle GB. Comparative genomics of *Pseudomonas fluorescens* subclade III strains from human lungs. *BMC Genomics* [Internet] 2015. [cited 28 jan 2022] Available in: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-2261-2>
3. Liu X, Cai J, Chen H, Zhong Q, Hou Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* [internet] 2020; 141 [cited 30 march 2022]. Available in: <https://doi.org/10.1038/srep28063>
4. Becker, L., Steglich, M., Fuchs, S. et al. Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosome and plasmid DNA for MiSeq sequencing. *Sci Rep* [internet] 2016;6 [cited 28 march 2022]. Available in <https://doi.org/10.1038/srep28063>
5. Candido N, da Costa CP, Montero LA, Oana RG, da Costa AL, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the chronic phenotype by mutations in the *algTmucABD* operon in isolates from Brazilian cystic fibrosis patients. *PLOS ONE*. [internet] 2018 [cited 29 march 2022]. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208013>
6. 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 Society*. [internet] 2006 [cited 30 march 2022] Available in: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.29175-0;jsessionid=5cpIGMZ6xeYgWJqDxIHLVGw8.mbslive-10-240-10-188>