



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

Valeria Andrea Vélez Lozano

Asesora Interna

Ruth Mélida Sánchez Mora, Bacterióloga, MSc., PhD

Asesora Externa

Ibeth Cristina Romero Calderón, 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, abril 2022



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

**APROBADA** \_\_\_\_\_

**JURADOS** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ASESORES** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de Grado  
Bogotá D.C, abril 2022

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar este trabajo de grado a mi familia, que me apoyo y me brindaron una voz de aliento, para darme motivación mientras recorría este camino. De igual forma, a mis asesoras (profesora Ibeth Romero y Ruth Sánchez Mora), porque no solamente me ayudaron a crecer como persona en este camino, sino también como profesional.

## **Agradecimientos**

Quiero comenzar dándole gracias a todas esas personas que me acompañaron en este camino, que permitieron que este trabajo de grado, llegara a ser lo que es hoy. Por eso, quiero darle las gracias a la profesora Martha Gomez, por ayudarme a conseguir los aislados clínicos, a la profesora Maria del Socorro Chalá, por brindarme su apoyo durante esos momentos duros de pandemia guardando las muestras, a las personas del grupo de Receptores de la FIDIC, que me guiaron para poder aprender a realizar los ensayos, a la profesora Ruth Mélida Sanchez Mora, porque sentí la paciencia y dedicación con la cual me guiaba para el desarrollo de algunos ensayos, y también me apoyó para poder gestionar los trámites en la Universidad; pero ante todo quiero agradecer a la persona que me guió hasta el momento, me inspiró a ser mejor cada día y que me hizo enamorarme de la ciencia, muchas gracias profesora Ibeth Romero Calderón, por creer no solamente en mí, sino también en este trabajo de investigación y gracias por la paciencia y sabiduría que me diste en estos años.

Pero no solamente quiero agradecer a las profesoras que me ayudaron, sino que también quiero resaltar la importancia que tuvo mi familia (mi mamá, mi padre y hermanos), amigos (Maria Fernanda Bolívar, Karoll Silvestre) y personas más cercanas en este proceso (César Caldas), porque siguieron creyendo en mi cuando a veces yo dudé y me dieron su energía para seguir adelante.

## Tabla de contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Planteamiento del problema.....	1
Objetivo general .....	2
Objetivos específicos .....	2
Justificación .....	2
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>6</b>
2.1 Generalidades microbiológicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
2.2 Importancia a nivel intrahospitalario y enfermedades asociadas a la bacteria .	7
2.2.1 Fibrosis Quística _____	7
2.2.1.1 Manifestaciones clínicas.....	8
2.2.1.2 Diagnóstico .....	8
2.3 Infección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en pacientes en F.Q .....	9
2.3.1 Etapas de la infección por <i>P. aeruginosa</i> _____	9
2.4 Regulación y biosíntesis del alginato .....	10
<b>3. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	<b>12</b>
3.1 Universo, población, muestra .....	12
Tipo de investigación _____	12
Nivel, alcance o enfoque de la investigación _____	12
Población objeto de estudio _____	12
Muestra _____	12
3.2 Técnicas y procedimientos.....	13
3.2.1 Conservación de la muestra clínica _____	13
3.2.2 Cultivo e identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> _____	13
3.2.3 Curvas de crecimiento de los aislados clínicos y ATCC 27853 _____	13
3.2.4 Amplificación del <i>gen mucA</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) _____	14

3.2.4.1 Extracción de ADN genómico a partir de los aislados clínicos y ATCC 27853.....	14
3.2.4.2 Cuantificación de ADN de los productos de extracción.....	15
3.2.4.3 Búsqueda y comparación de las secuencias nucleotídicas del <i>gen mucA</i> mediante herramientas bioinformáticas .....	15
3.2.4.3.1 Alineamiento de la secuencia del <i>gen mucA</i> de las cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC PAO1 y 27853 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 .....	16
3.2.4.4 Diseño de primers .....	16
3.2.4.5 Amplificación del <i>gen mucA</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	16
3.2.4.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	17
3.2.4.7 Purificación y secuenciación del <i>gen mucA</i> .....	17
3.2.4.8 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas del <i>gen mucA</i> ..	17
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Cultivo e identificación de aislados clínicos .....	19
4.1.1 Perfil de resistencia de los aislados clínicos .....	20
4.2 Curvas de crecimiento de cepa ATCC 27853 y aislados clínicos .....	21
4.3 Aislamiento del <i>gen mucA</i> por PCR.....	23
4.3.1 Cuantificación y electroforesis del ADN genómico .....	23
4.3.2 Comprobación de primers forward y reverse <i>in silico</i> mediante herramientas bioinformáticas. ....	25
4.3.2.1 Alineamiento de las secuencias del <i>gen mucA</i> de las cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC PAO1 y 27853.....	25
4.3.2.2 Alineamiento de secuencia del <i>gen mucA</i> de las cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 .....	26
4.3.3 Diseño de primers .....	27
4.3.4 Amplificación del <i>gen mucA</i> por medio de PCR .....	28
4.4 Purificación y secuenciamiento .....	29
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Regulación de la biosíntesis del alginato en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no mucoide, mucoide y no mucoide revertante.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2. Morfología colonial y Gram de los aislados clínicos.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3. Curvas de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> spp. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4. Electroforesis de ADN genómico obtenido por dos métodos de extracción (Kit y Salting Out).....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 5. Alineamiento de las secuencias de los genes <i>mucA</i> de las cepas ATCC PAO1 y ATCC 27853 .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 6. Alineamiento de las secuencias de los genes <i>mucA</i> de las cepas <i>P. fluorescens</i> SBW25 y ATCC 27853.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 7. Ubicación de primer forward (amarillo) y primer reverse (azul) en la secuencia fasta del gen <i>mucA</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 8. Electroforesis del gen <i>mucA</i> de las cepas ATCC 27853 y aislados clínicos amplificados por PCR.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 9. Fragmento del electroferograma del gen <i>mucA</i> del aislado 2 obtenido a partir del secuenciamiento con el primer forward y reverse. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 10. Alineamiento de secuencia consensus aislado 2 y la secuencia de la base de datos de ATCC 27853. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 11. Porcentaje de identidad entre la cepa ATCC 27853 de la base de datos y el aislado 2 obtenido al hacer el alineamiento en Clustal-Omega.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 12. Electroferogramas de un fragmento del gen <i>mucA</i> de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 obtenido a partir del secuenciamiento con el primer forward y reverse. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 13. Alineamiento de secuencia consensus ATCC 27853 y la secuencia de la base de datos de ATCC 27853. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 14. Porcentaje de identidad obtenido al hacer el alineamiento en Clustal-Omega. ....</b>	<b>34</b>

## **Índice de tablas**

<i>Tabla 1. Perfil de Sensibilidad/Resistencia de los aislados de Pseudomonas sp. ....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2. Cuantificación ADN genómico obtenido a partir del KIT y Salting Out.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3. Frecuencia de mutaciones presentes en el aislado 2. ....</i>	<i>32</i>



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

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

### **Resumen**

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo de gran importancia a nivel clínico, se encuentra comúnmente aislado de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y también en pacientes con enfermedad de base como la Fibrosis Quística (F.Q). Dicha enfermedad genética es de tipo autosómico recesivo, caracterizada por tener una afectación multisistémica y, a su vez, por presentar acumulación de moco dentro de los pulmones de los pacientes, permitiendo la colonización de un amplio espectro de microorganismos. En el caso del estadio crónico de la infección producida por *P. aeruginosa* en los pacientes con F.Q, se presentan una gran variedad de mutaciones en el genoma, debido a la exposición prolongada a factores estresores, tales como el ambiente anaerobio producido por el moco, la insuficiencia nutricional, la presencia de altas concentraciones de antibióticos para erradicar la infección y la constante activación de la respuesta inmune encabezada por los neutrófilos y especies reactivas de oxígeno (ROS). Uno de los genes que se encuentra asociado al estadio crónico de la infección en pacientes con F.Q es el *gen mucA*, el cual en condiciones normales se encarga de controlar la producción del alginato. No obstante, cuando se presenta la mutación, se genera la conversión mucoide de la bacteria. En ese sentido, el objetivo de esta investigación es caracterizar el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que se encuentran asociadas a la infección crónica producida en fibrosis quística.

**PALABRAS CLAVES:** *P. aeruginosa*; Fibrosis Quística; *gen mucA*;

## **INTRODUCCIÓN**

### **Planteamiento del problema**

*Pseudomonas aeruginosa*, es un patógeno de gran importancia a nivel clínico, no solo porque es una de las principales bacterias aisladas de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) o infecciones nosocomiales<sup>1</sup>, sino también porque es uno de los microorganismos más comúnmente aislados en las secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística, produciendo infecciones en el tracto respiratorio y así mismo causando un aumento de la mortalidad y morbilidad que tienen estos pacientes<sup>2</sup>.

El fenotipo mucoide es una de las adaptaciones más importantes que presenta *P. aeruginosa*, ya que surge como resultado de la exposición prolongada a los antibióticos y de la constante respuesta inmune que se activa para poder erradicarla<sup>2</sup>. El fenotipo mucoide se expresa cuando hay una mutación en el *gen mucA*, el cual hace parte del operón *algTmucABCD*, encargado de controlar y regular la producción del alginato, sin embargo, al presentarse las mutaciones en *gen mucA* la producción del alginato se vuelve positiva y se genera como consecuencia la sobreproducción del mismo<sup>3</sup>. Dentro de las funciones potenciales del alginato está la producción de una barrera compuesta por este exopolisacárido, la cual protege a *P. aeruginosa* de la fagocitosis permitiendo así que no se controle la infección y desencadenando la muerte del paciente<sup>3</sup>.

De igual forma, el fenotipo mucoide se ha asociado a una etapa crónica de la infección y a un incremento en la mortalidad, esto principalmente debido al aumento en la capacidad para formar biopelículas que adquiere la bacteria, evitando así la erradicación con antibióticos y permitiendo la persistencia de ésta dentro del ambiente pulmonar<sup>2</sup>. También el fenotipo mucoide ha sido asociado a la regulación negativa de los factores de virulencia (flagelos, pili, LPS, T3SS y sistemas QS)<sup>4</sup>, es

decir que su expresión se ve inhibida debido a la alta carga energética que es utilizada para la producción continua del alginato.

Por las razones anteriormente mencionadas, se vuelve necesario comprender y profundizar el conocimiento que se tiene acerca de las mutaciones adquiridas en el *gen mucA*, con el fin de en un futuro idear estrategias para contrarrestar este cambio. Es por eso que en este trabajo se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son las principales mutaciones que se identifican en el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección producida en fibrosis quística?

### **Objetivo general**

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

### **Objetivos específicos**

- Aislar el *gen mucA* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a la infección 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 producida en fibrosis quística mediante el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

### **Justificación**

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales patógenos causantes de infecciones en el ser humano tales como, otitis externa, bacteriemia, queratitis,

foliculitis y en menor proporción neumonía<sup>5</sup>. Además, es una de las bacterias más comúnmente encontradas en el ambiente intrahospitalario, afectando a pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados, causando neumonía en pacientes en UCI<sup>6</sup>, colonizando catéteres y también encontrándose adherida a equipos médicos<sup>7</sup>.

Esta bacteria ha tomado gran importancia debido a que hace parte de las bacterias que encabezan la lista de patógenos prioritarios en cuanto a resistencia a antibióticos, destacando que se encuentra en la prioridad crítica por su resistencia a carbapenémicos<sup>8</sup>, esto se le atribuye a su resistencia tanto intrínseca como adquirida, dentro de las cuales cabe destacar algunos mecanismos como lo son, la producción de betalactamasas y una gran cantidad de genes que codifican para bombas eflujo, además, de la transferencia horizontal de genes de resistencia<sup>9</sup>.

Así mismo, *Pseudomonas aeruginosa* ha sido fuertemente relacionada con fibrosis quística; en donde la prevalencia de éste patógeno sobrepasa el 50% en individuos entre 18 y 45 años<sup>10</sup>. Por otro lado, en pacientes con infecciones crónicas y debido a las diferentes presiones a las cuales está sometida la bacteria, (tratamiento con antibióticos, la insuficiencia nutricional, estrés osmótico, entre otras), se genera un cambio a fenotipo mucoide como consecuencia de una mutación en el *gen mucA*, que conduce a una sobreproducción de alginato, lo que le permite continuar instaurada dentro de los pulmones y seguir produciendo daño de los pacientes con fibrosis quística<sup>11,12</sup>.

Es así que, en esta investigación se pretende identificar mutaciones en el *gen mucA* además de la comúnmente reportada (*mucA22*), las cuales puedan estar asociadas a la conversión hacia un fenotipo mucoide en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, fenotipo encontrado en infecciones crónicas por esta bacteria en pacientes con fibrosis quística y que ha sido fuertemente asociado con un aumento no solo en la morbilidad sino también en la mortalidad, por el daño generado en las vías aéreas y el deterioro de la función pulmonar de los pacientes<sup>3,12,13</sup>. La caracterización de esas mutaciones, permitirá a futuro desarrollar estrategias, para contrarrestar y/o

frenar esta conversión y evitar el desenlace fatal que normalmente tienen en estos pacientes.

## 1. ANTECEDENTES

La instauración del fenotipo mucoide de *Pseudomonas aeruginosa*, es un mecanismo que facilita el establecimiento de una infección crónica en los pacientes con Fibrosis Quística<sup>14</sup>. El factor que determina la conversión mucoide de esta bacteria, es la presencia de mutaciones en el *gen mucA* o también conocido como factor anti-sigma, que es uno de los genes que hace parte de un operón *algTmucABCD* encargado de la biosíntesis del alginato<sup>15</sup>.

Las adaptaciones que normalmente se presentan se basan en la aparición de mutaciones de pérdida de función en una variedad de genes, en donde se destacan el *gen mucA*, el cual es un regulador negativo de la biosíntesis del alginato. De acuerdo con el estudio realizado por Feliziani *et al*, en donde caracterizaron el *gen mucA*, encontraron que predominaba la presencia de pequeñas deleciones en un 64,7% de los aislados evaluados y el resto de mutaciones correspondían a transiciones y transversiones<sup>16</sup>.

Al igual que el anterior estudio, en el caso de Pozuelo *et al*, de la totalidad de aislados mucoides evaluados (56), el 70% de estos tenían mutaciones que eran capaces de truncar a la proteína MucA, de las cuales ocho eran nuevas y exclusivas de un clon y dos de ellas ya habían sido descritas, de las cuales la mutación más comúnmente presentada es la deleción de una guanina que ocupa la posición 426 a 430 ( $\Delta 430G$ ), conocida como *mucA22* y la segunda a una mutación sin sentido C424T<sup>17</sup>.

Asimismo, de acuerdo con el estudio realizado por Candido *et al*, al evaluar la presencia de mutaciones en el operón *AlgT/mucABCD* de *Pseudomonas aeruginosa*, encontraron que, para el *gen mucA*, las mutaciones o cambios en la secuencia de nucleótidos predominantemente se debe a deleciones, también a

transiciones y, transversiones y en menor medida inserciones, las cuales en su mayoría pueden conducir a cambios del marco de lectura y/o codones de parada prematuros, que generan como consecuencia que la proteína MucA tenga pérdida de función<sup>18</sup>.

Por último, de acuerdo a un estudio realizado por Schofield *et al*, donde se evaluó la eliminación del *gen mucA* de *P. aeruginosa* mediante intercambio alélico, se determinó que el *gen mucA* es esencial para la viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa*, señalándose que la viabilidad está relacionada con alelos que codifican para los 50 primeros aminoácidos de la proteína MucA<sup>19</sup>.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 Generalidades microbiológicas de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, que se caracteriza por ser aerobio estricto, asimismo por su gran adaptabilidad a diferentes ambientes, siendo un saprófito que se encuentra no solo en suelo, superficies acuosas, sino también produciendo infecciones en el ser humano<sup>20</sup>.

Este patógeno, posee un genoma de gran extensión (5,5 a 7 millones de pares de bases), con una alta proporción de genes reguladores que codifican para una amplia variedad de factores de virulencia, en donde cabe destacar la presencia de un flagelo polar, un pili de tipo 4, Quorum Sensing (QS), la capacidad de producción de pigmentos como la piocianina, la formación de biopelículas, la presencia del sistema de secreción tipo 4, y sobre todo la producción del alginato, un polisacárido que funciona como una cápsula que recubre a la bacteria y le confiere diversas propiedades como resistencia a antibióticos y la evasión de la respuesta inmune<sup>20,21,22</sup>.

Para la identificación de esta bacteria, se hace uso de pruebas bioquímicas, las cuales en este caso son, lactosa (-), glucosa (-), oxidasa (+), Simmon citrato (+), ureasa (-), TSI (K /K), lisina descarboxilasa (-), MR (-), VP (-), hidrólisis de gelatina (+), indol (-), motilidad (+) y crecimiento de colonias amarillas en medio agar MacConkey<sup>23</sup>.

Por otra parte, una de las principales razones por la cual es considerado a *Pseudomonas aeruginosa* como un microorganismo de importancia clínica, es debido a que se caracteriza por ser resistente a la erradicación por parte de antimicrobianos, esto debido a que tiene la presencia de mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos ( $\beta$ -lactamasas, sobreexpresión de bombas efflux y carbapenemasas de espectro extendido)<sup>24</sup>.

## **2.2 Importancia a nivel intrahospitalario y enfermedades asociadas a la bacteria**

De acuerdo con el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), en el año 2017 *Pseudomonas aeruginosa* fue el microorganismo mayormente aislado de muestras de pacientes con neumonía adquirida en la UCI, en donde, el porcentaje de incidencia varió dependiendo del país destacando los casos de Eslovaquia (33,3%), Hungría (32,4%), Portugal (29,2%), España (24,0%) y Rumania (23.3%). Así mismo, también se ha descrito la presencia de esta bacteria en otras infecciones como infecciones del torrente sanguíneo, infecciones del tracto urinario adquiridas en UCI, e infecciones en piel, pero con una menor frecuencia<sup>25</sup>.

Además, es de gran importancia destacar que *P. aeruginosa* es considerado como uno de los patógenos de gran importancia a nivel intrahospitalario, ya que produce infecciones nosocomiales tales como, queratitis, otitis externa y media, neumonía asociada al ventilador (VAP), también se ha visto presente en pacientes con enfermedades que modifican el tracto respiratorio, como es el caso de la fibrosis quística, otras asociadas a la inmunosupresión de los pacientes, como por ejemplo las quemaduras<sup>5,7</sup> y también se encuentra colonizando catéteres e implantes<sup>26</sup>.

### **2.2.1 Fibrosis Quística**

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por la mutación en el *gen CFTR* (gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), el cual se expresa en diferentes órganos como, riñones, el páncreas, el intestino, el corazón y los pulmones, y normalmente regula el paso de potasio y sodio y los canales de cloruro<sup>27</sup>.

La mutación más comúnmente encontrada en el *gen CFTR* es la eliminación de una fenilalanina en la posición 508 ( $\Delta F508$ ), la cual genera una disfunción del CFTR y,

provocando la incapacidad de regular el transporte de iones cloruro y bicarbonato a través de los epitelios, causando en última instancia la disfunción de múltiples órganos. Junto con la disfunción de CFTR, se presenta un déficit en la respuesta inmune, la cual, al combinarse con productos inflamatorios y factores de virulencia bacterianos, en caso de infección, se genera un daño pulmonar progresivo que desencadena una insuficiencia respiratoria y, por último, la muerte<sup>28</sup>.

#### 2.2.1.1 Manifestaciones clínicas

Dentro de algunas manifestaciones clínicas clásicas que presentan los pacientes se encuentran la insuficiencia respiratoria o las alteraciones gastrointestinales, que conducen en el caso respiratorio a la presencia de sibilancias o neumonía recurrentes, disnea de esfuerzo, bronquiolitis y en el caso gastrointestinal, a la distensión abdominal, esteatorrea, cirrosis biliar, además del signo de mayor importancia para el diagnóstico, como lo son las altas concentraciones de cloruro en el sudor<sup>29</sup>. Cabe destacar que dentro de los eventos tempranos que se presentan más comúnmente en los pacientes está, el atrapamiento del aire, obstrucción de las vías respiratorias por la producción excesiva de moco, bronquiectasias (agrandamiento de las vías respiratorias) y altos niveles de marcadores inflamatorios, como, por ejemplo, la elastasa de los neutrófilos<sup>28</sup>.

#### 2.2.1.2 Diagnóstico

De acuerdo con las directrices del consenso de la Cystic Fibrosis Foundation, en primera instancia se evalúa la presentación clínica de la F.Q, en donde se correlacionan los signos y síntomas, con la historia familiar y el cribado neonatal. Luego, se realiza una prueba de cloruro en sudor, en donde si se obtiene un resultado mayor o igual a 60 mmol/L, se hace el diagnóstico de la F.Q. Sin embargo, existen otras pruebas que se pueden realizar, como lo son los análisis genéticos del *gen CFTR* y las pruebas fisiológicas de CFTR<sup>30</sup>.

## **2.3 Infección de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes en F.Q**

La adquisición de la bacteria se da por dos razones, el contacto con otro paciente infectado y el contacto con algún reservorio natural de *P. aeruginosa* (lagos), luego, se presenta la colonización del aparato respiratorio superior (orofaringe) y por medio de la microaspiración, la bacteria entra al tracto respiratorio inferior y coloniza nuevamente<sup>31</sup>.

Al ingresar la bacteria dentro del hospedero, se da la activación de la respuesta inmune, la cual se ve controlada por los diversos factores de virulencia que tiene *P. aeruginosa*, como lo es el caso de las exotoxinas, que se encargan de lisar los neutrófilos, la piocianina, que induce la apoptosis de los neutrófilos y la presencia de los ramnolípidos, que necrosan a los neutrófilos.

### **2.3.1 Etapas de la infección por *P. aeruginosa***

La infección por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ presenta dos etapas, una aguda y una crónica. La aguda se caracteriza por que los aislados son sensibles a los antibióticos, también por la presencia de un fenotipo no mucóide o salvaje de la bacteria, la expresión del flagelo que le permite desplazarse para así llegar al lugar en el cual se va a instaurar y la expresión activa de factores de virulencia, la cual se ve regulada por varios sistemas sensores de quórum (QS)<sup>32</sup>.

En el caso de la etapa crónica producida por *Pseudomonas aeruginosa*, ésta es definida como la persistencia de la misma en los pulmones de los pacientes con F.Q por más de 6 meses y/o la presencia de más de 2 anticuerpos precipitantes de *P. aeruginosa*<sup>33</sup>.

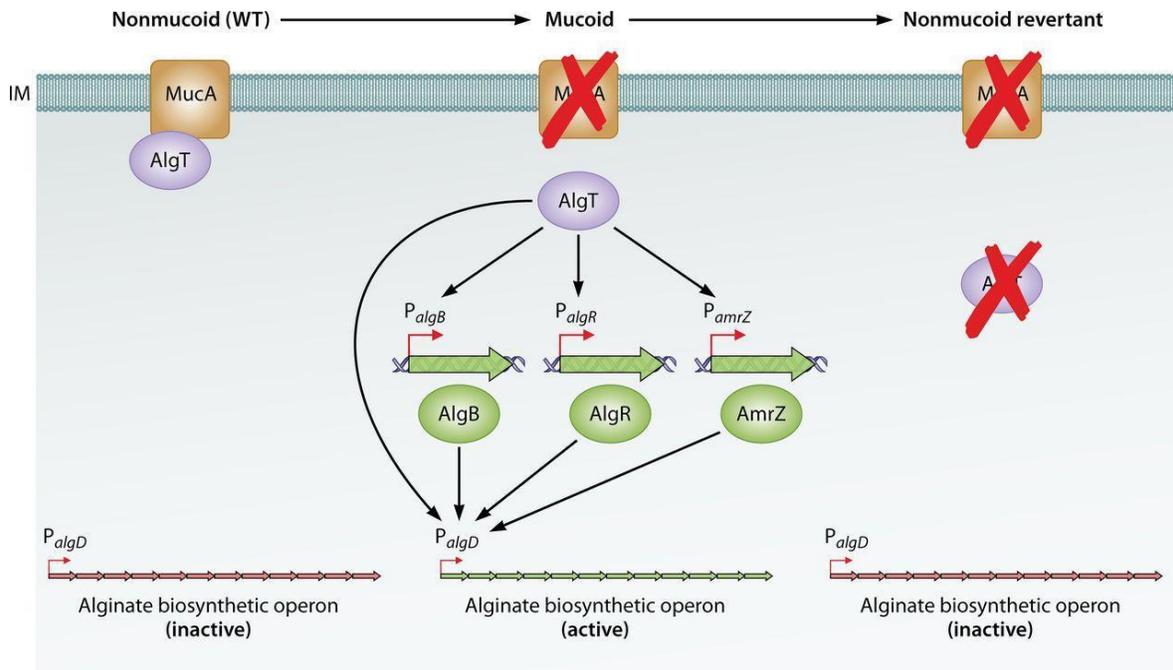
Durante la adaptación a infección crónica por parte la bacteria, ésta se enfrenta a diferentes presiones selectivas o tensiones ambientales como, la competencia intra/interespecie, el ambiente anaerobio dado por la acumulación de moco dentro

de los pulmones, el estrés osmótico, la alta concentración de antibióticos y, por último, el ataque por parte del sistema inmune. Debido a la exposición prolongada a las presiones anteriormente mencionadas, se ve favorecida la presencia de mutaciones espontáneas en genes como *mucA*, que permiten la selección de variantes más adecuadas para una colonización a largo plazo, trayendo consigo la regulación a la baja de los factores de virulencia y la presencia de variantes mucoides<sup>34</sup>.

Uno de los factores que influye de manera directa en la generación de mutaciones, es la respuesta inmune, la cual en este caso está mediada principalmente por polimorfonucleares (PMN), y se encargan de producir especies reactivas de oxígeno (ROS), dentro de las cuales cabe destacar el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que daña directamente al ADN<sup>35</sup>, produciendo como consecuencia la presencia de mutaciones aleatorias, en donde en el caso de pacientes con F.Q se ve afectado el *gen mucA*, generando así la conversión mucoide.

## 2.4 Regulación y biosíntesis del alginato

El alginato es un polímero compuesto por los ácidos D-manurónico y L-gulurónico, el cual en el caso de *P. aeruginosa*, juega un papel fundamental en la maduración de las biopelículas. La producción del alginato es controlada por un operón de 12 genes y éste a su vez por el promotor *algD*. Para que este operón se exprese, es necesaria la actividad del factor sigma AlgT, el cual está codificado en el operón *algT/mucABCD*<sup>28, 36</sup>.



**Figura 1. Regulación de la biosíntesis del alginato en *Pseudomonas aeruginosa* no mucoide, mucoide y no mucoide revertante**

**Fuente:** Malhotra S, *et al.*, 2019

En condiciones normales, AlgT es secuestrado por factor anti-sigma MucA, permitiendo así que el operón se mantenga inactivo. Sin embargo, cuando la bacteria se encuentra causando una infección crónica en pacientes con F.Q y por lo tanto se mantiene en una constante exposición a estresores, la bacteria adquiere mutaciones en el *gen mucA*, dando como resultado que MucA se encuentra truncado y que no sea capaz de unirse al factor sigma AlgT, permitiendo así, que este quede libre y se una a la RNA polimerasa, dirigiendo la transcripción de los genes de la biosíntesis de alginato, favoreciendo así su sobreproducción<sup>28,36</sup>.

Sin embargo, es posible que se presente el fenotipo no mucoide en la bacteria, pero que se encuentren mutaciones dentro del *gen mucA*, estos casos ocurren cuando existe una mutación secundaria en AlgT, que no permite que éste pueda activar los factores de transcripción auxiliares y tampoco, directamente al operón *algTmucABCD*<sup>36</sup>.

### **3. DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **3.1 Universo, población, muestra**

##### **Tipo de investigación**

La investigación es de tipo mixta, debido a que por medio de ésta se podrán identificar las mutaciones que se producen en el gen *mucA* y a su vez realizar una descripción de la presencia o ausencia de las mismas con el fenotipo presentado por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

##### **Nivel, alcance o enfoque de la investigación**

La investigación es de tipo descriptivo y experimental, ya que permite identificar las mutaciones en el gen *mucA* presentes en las cepas en estudio, describir la relación entre las mutaciones obtenidas y el fenotipo observado, por medio del uso de diferentes metodologías como la secuenciación y bioinformática.

##### **Población objeto de estudio**

Cepas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

##### **Muestra**

Cepa de referencia ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* 27853, la cual fue donada por la Secretaría de Salud y tres aislados clínicos provenientes de pacientes con Fibrosis Quística y con infección por *Pseudomonas aeruginosa* donadas por la Clínica de la Mujer de Bogotá.

## **3.2 Técnicas y procedimientos**

### **3.2.1 Conservación de la muestra clínica**

La conservación de los aislados clínicos se realizó en la Secretaría de Salud de Bogotá, en donde se llevó a cabo el protocolo de congelamiento de la misma, la cual consiste en sembrar por agotamiento la muestra en un agar MacConkey. Posteriormente al crecimiento del microorganismo, se realizan crioviales con el medio Skim milk y la bacteria y, por último, se lleva a -70°C, para su preservación<sup>37</sup>.

### **3.2.2 Cultivo e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens***

Para el cultivo e identificación de las cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, se siguió el protocolo descrito por Hatite y col; brevemente, las bacterias se sembraron en agar Cetrimide a 37°C por 24 horas<sup>37</sup>, posteriormente, la identificación y confirmación del género y especie de bacteria se realizó, por método automatizado, usando el equipo VITEK, el cual utiliza tarjetas de identificación por medio de pruebas bioquímicas<sup>38</sup>, que a su vez, permite determinar el perfil de resistencia de los aislados.

### **3.2.3 Curvas de crecimiento de los aislados clínicos y ATCC 27853**

Para realizar la curva de crecimiento de la cepa ATCC 27853, se utilizó el equipo *Thermo Labsystems Type FP-1100-C Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System*, en donde se tomó como blanco del ensayo el medio Luria Bertani sin inocular y se hicieron 3 réplicas de los inóculos. Se llevó a cabo, la curva de crecimiento con las siguientes condiciones: incubación a 37°C, agitación de 10 segundos antes de realizar la medición de la absorbancia, el tiempo de duración de 2 días, velocidad de agitación alta y se toma una medición de la absorbancia cada 15 min.

En el caso de las curvas de crecimiento de los aislados, se sigue el protocolo utilizado en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), el cual se basa, en utilizar una microplaca de 96 pozos, la cual es inoculada por duplicado con 100ul de un cultivo por cada una de las cepas, se realizan las mediciones de la absorbancia cada hora en un lector de microplacas (Multiskan Go) a una longitud de onda de 620nm, para tener un total de 15 mediciones. Se usó como control de esterilidad el medio LB sin inocular.

### **3.2.4 Amplificación del *gen muca* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

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

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit de la casa comercial Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1mL de cultivo fue centrifugado a 14.000 xg durante 5 min, el pellet resultante se resuspendió en 600µl de la solución de lisis y se mezcló, se incubó por 5 min a 80°C y se enfrió a temperatura ambiente; luego, se adicionaron 300µl de solución de RNasa, se mezcló e incubó por 15 min y se enfría a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 200µl de solución de precipitación de proteínas, las muestras se colocaron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 13.000xg por 3 min. Una vez centrifugadas las muestras, se transfirió el sobrenadante de cada muestra en un tubo limpio con 600µl de isopropanol, se mezcló y se volvió a centrifugar para decantar el sobrenadante; el pellet obtenido fue mezclado con 600µl de etanol al 70%, y se centrifugó nuevamente por 2 min a 14.000xg; se retiró el etanol y se dejó secar el pellet al aire por 10 min, para luego, rehidratar el ADN con 100µl de solución de rehidratación<sup>39</sup>.

Por otro lado, y con el fin de mejorar el rendimiento en la obtención de ADN se utilizó un segundo método de extracción de ADN genómico, Salting Out, en donde se parte de 2 mL de cultivo bacteriano, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante (se repite este paso). El precipitado o pellet se incubó en baño serológico a 65°C y con nitrógeno líquido (se repite 3 veces); luego, se adicionó a cada muestra 400 µL de la solución de lisis celular y 10 µL de proteínasa K (20 mg/mL), se mezcló por inversión. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 37°C por 60 min, transcurrido este tiempo se agregó 130 µL de NaCl 5M a cada muestra, se mezcló por medio de vortex por 20 segundos y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido en un nuevo tubo el cual contenía 400 µL de isopropanol, luego de mezclar por inversión, las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y descartó el sobrenadante. A los tubos anteriormente obtenidos, se les agregó 400 µL de etanol al 70 % y mezclar por inversión, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Los tubos se invierten y se dejan secar con aire seco sobre un papel limpio. Por último, se agregan 150 µL de Buffer TE para realizar la Resuspensión del ADN.

#### **3.2.4.2 Cuantificación de ADN de los productos de extracción**

Para realizar la cuantificación de los productos de extracción de ADN de los aislados clínicos y la cepa ATCC 27853, se utiliza el uDrop Plate. Se agregan 2ul de cada una de las muestras por duplicado y se lee la absorbancia a 260nm y 280nm en un lector de microplacas. Se toma como blanco a la solución de rehidratación del Kit utilizado. A partir de los resultados obtenidos, se calcula la concentración del ADN obtenido (µg/ml) y la pureza de los mismos.

#### **3.2.4.3 Búsqueda y comparación de las secuencias nucleotídicas del *gen mucA* mediante herramientas bioinformáticas**

Para diseñar los primers específicos que permitan la amplificación del gen *mucA* en los diferentes aislados se realizó la búsqueda de las secuencias nucleotídicas del gen en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *fluorescens* a partir de las bases de datos genómicos como [genomes.atcc.org](http://genomes.atcc.org) (<https://genomes.atcc.org/genomes/a96dd3fec62a4470?tab=annotations-tab>) para la cepa ATCC 27853 y [pseudomonas.com](http://pseudomonas.com) (<https://www.pseudomonas.com/feature/show?id=104276>) para la cepa PAO1.

#### 3.2.4.3.1 Alineamiento de la secuencia del gen *mucA* de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC PAO1 y 27853 y *Pseudomonas fluorescens* SBW25

Se realizó el alineamiento de las secuencias del gen *mucA* provenientes de cada una de las cepas ATCC (*P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* 27853 y *Pseudomonas fluorescens* SBW25), utilizando el programa Clustal-Omega, el cual permite determinar el grado de similitud entre las dos secuencias en cuanto al gen evaluado.

#### 3.2.4.4 Diseño de primers

Para el diseño de los primers, se obtuvo la secuencia del gen *mucA* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 por medio de GenBank de NCBI y la página [pseudomonas.com](http://pseudomonas.com) y a partir de éstas, se utilizó la plataforma Primer-Blast para obtener los primers (forward y reverse). Para la elección de los primers adecuados para la amplificación, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros, tamaño de primers, porcentaje de Guanina-Citosina (%GC), temperatura melting, autocomplementariedad.

#### 3.2.4.5 Amplificación del gen *mucA* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación por PCR del gen *mucA* se llevó a cabo utilizando una BlasTaq 2X PCR MasterMix (abm). Se utilizaron los siguientes cebadores (Invitrogen):

forward (5'-ATGAGTCGTGAAGCCCTGC-3') y reverse (5'-TCAGCGGTTTTCCAGGCT-3') con una concentración de 10pmol/ul cada uno, la concentración de ADN depende de cada una de las muestras y no se agregó agua libre de nucleasas.

El programa utilizado en el termociclador fue: desnaturalización inicial (1 ciclo de 10 min a 94°C), seguido de 40 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C) y, por último, una extensión final de, 10 min a 72°C.

#### **3.2.4.6 Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de PCR del *gen mucA* fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 voltios, durante 30 min utilizando el marcador de peso molecular HyperLadder I, el cual permite una corrida de hasta 10.000pb.

#### **3.2.4.7 Purificación y secuenciación del *gen mucA***

La purificación y secuenciación del *gen mucA* de las muestras provenientes de los aislados 1, 2, 3 y la cepa ATCC 27853, se llevó a cabo en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (SSiGMoL), en donde la tecnología que utiliza es la secuenciación por electroforesis capilar y Sanger.

#### **3.2.4.8 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas del *gen mucA***

El análisis bioinformático de las secuencias, se realizó en el software Bioedit, en donde se visualizó el resultado de la secuenciación (electroferograma), posteriormente se depuraron las diferentes secuencias, se alinearon los resultados de la secuenciación de cada uno de los primers evaluados (forward y reverse) y se determinó la secuencia consenso entre los dos. Además, se comparó la secuencia consenso obtenida en la NCBI, para determinar si ésta podía ser identificada por género y especie. Una vez obtenidos los datos, se realizó el alineamiento de la

secuencia consenso con la secuencia correspondiente a la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 de la base de datos pseudomonas.com utilizando el programa de Clustal-Omega, para determinar el porcentaje de identidad y por medio de este, se identificaron cambios o mutaciones en la secuencia del aislado.

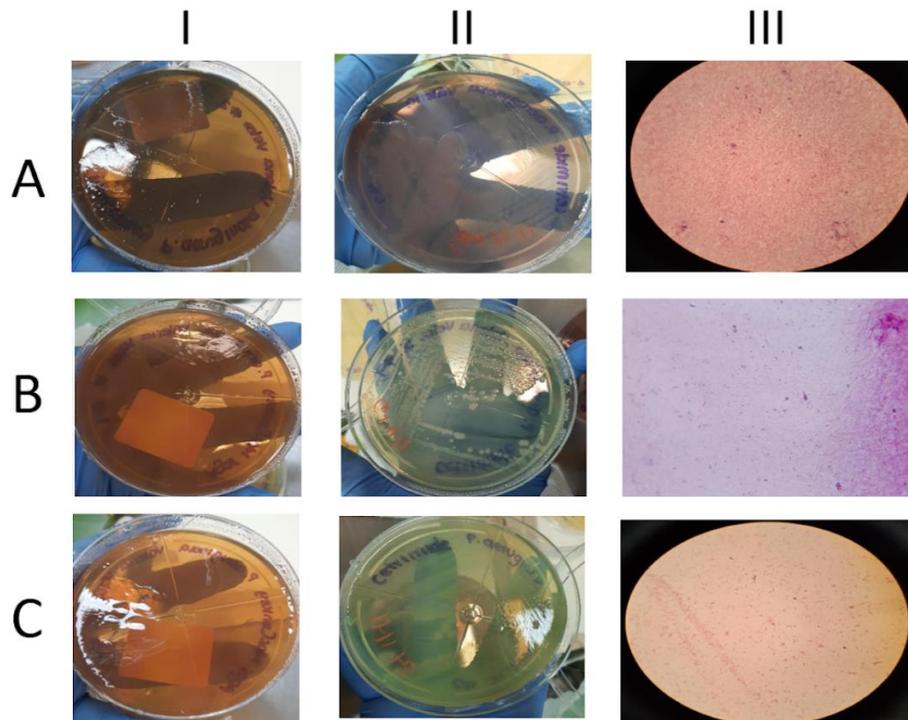
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cultivo e identificación de aislados clínicos

Se partieron de 3 crioviales que previamente fueron mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , cada uno correspondiente a los aislados obtenidos al inicio del proyecto. Luego, se prosiguió a hacer la reactivación de los mismos en agares MacConkey y Cetrimide, por siembra en agotamiento y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

En la figura 2AI, BI y CI, se observa en el agar MacConkey, un crecimiento de colonias translúcidas correspondientes a una bacteria no fermentadora; en la figura 2AII, que corresponde al agar Cetrimide, no se observa la producción de colonias con pigmento, a diferencia de la figura 2BII, en donde se observan las colonias de color rosado claro en Cetrimide, características de *Pseudomonas aeruginosa*, cuando produce pirrubina y de igual forma, en el caso de la figura 2CII, se observa la producción del pigmento piocianina típica de *P. aeruginosa*. En la figura 2AIII, 2BIII y 2CIII y con coloración de Gram, se confirma morfológicamente la presencia de bacilos Gram negativos típicos de *Pseudomonas spp.*

A continuación, se observan las imágenes correspondientes a las colonias obtenidas en cada uno de los agares previamente mencionados, acompañados del Gram realizado para confirmar su morfología microscópica.



**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)

#### 4.1.1 Perfil de resistencia de los aislados clínicos

El perfil de resistencia y sensibilidad de cada uno de los aislados, los resultados permitieron determinar que la mayoría presentaron perfil de sensibilidad frente a los antibióticos de las familias de las penicilinas, cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas, sin embargo, el aislado de *Pseudomonas fluorescens* presentó resistencia intermedia a ciprofloxacino (Tabla 1).

**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	<b>CMI</b>	8	8	8
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Ceftazidima	<b>CMI</b>	2	4	4
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Cefepima	<b>CMI</b>	8	2	2
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Doripenem	<b>CMI</b>	<=0,12	0,25	0,5
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Imipenem	<b>CMI</b>	1	1	2
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Meropenem	<b>CMI</b>	<=0,25	<= 0,25	0,5
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Amicacina	<b>CMI</b>	<=2	<=2	<=2
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Gentamicina	<b>CMI</b>	<=1	<=1	<=1
	<b>Interpretación</b>	Sensible	Sensible	Sensible
Ciprofloxacino	<b>CMI</b>	<=0,25	<=0,25	<=0,25
	<b>Interpretación</b>	Intermedio	Sensible	Sensible
Colistina	<b>CMI</b>	<=0,5	N/A	<=0,5
	<b>Interpretación</b>	Sensible	N/A	Sensible

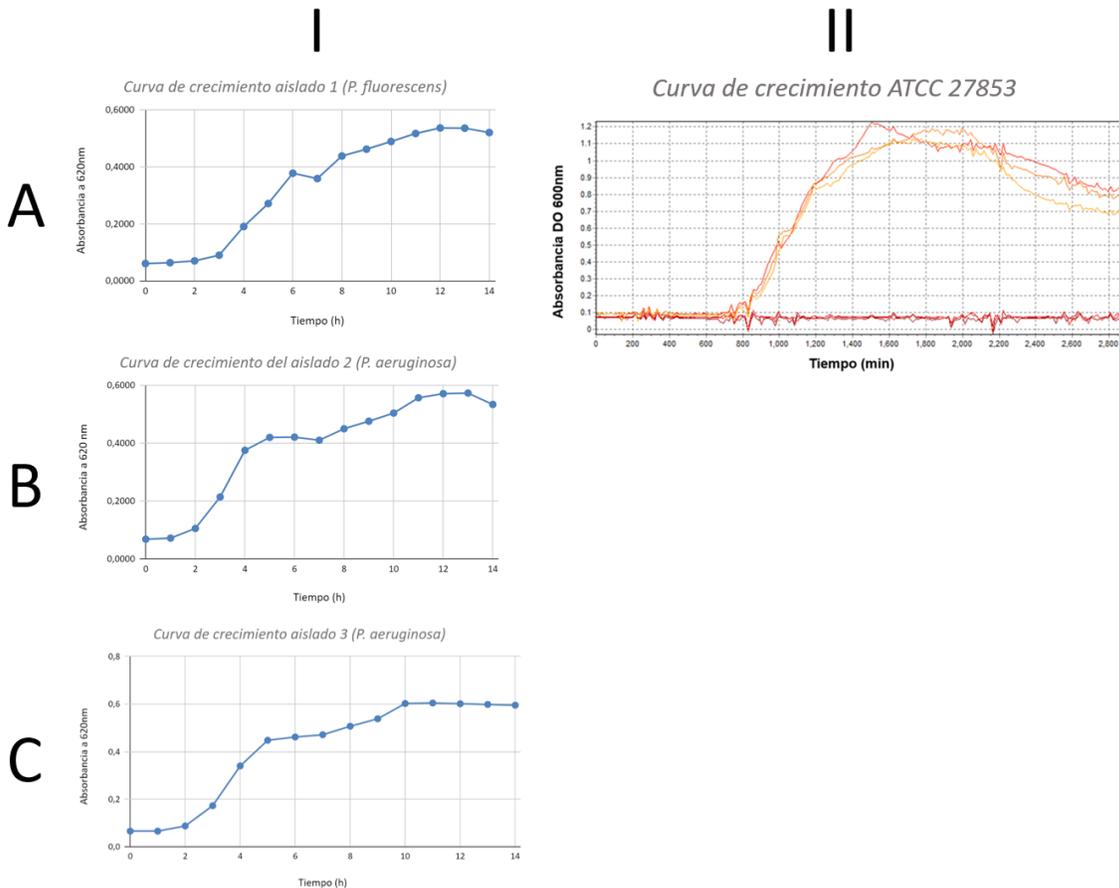
## 4.2 Curvas de crecimiento de cepa ATCC 27853 y aislados clínicos

En la figura 3, se observan las curvas de crecimiento de los aislados clínicos y la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En la figura 3AI, se encuentra la curva de crecimiento del aislado 1, correspondiente a *P. fluorescens*, en donde, se determina que tiene una *fase lag* de 3 horas, una *fase log*, que va desde la hora 3 hasta la hora 12 y una fase estacionaria, desde la hora 12 en adelante. No fue posible observar la fase de muerte en la curva, debido a la limitación de tiempo disponible para realizar la curva.

En la figura 3BI, la gráfica corresponde a la curva de crecimiento del aislado 2 (*P. aeruginosa*). Al observar la gráfica, es posible apreciar 3 de las fases de crecimiento de la bacteria; *fase lag*, que va desde la hora 0 hasta la hora 2; la *fase log*, que va desde la hora 2 hasta la hora 12; y una fase estacionaria, desde la hora 12 en adelante. Al igual que en la anterior gráfica, no fue posible observar la fase de muerte en la curva, debido a la limitación de tiempo disponible para realizar la curva.

La figura 3CI, corresponde a la curva de crecimiento del aislado 3 (*P. aeruginosa*). En esta gráfica, se observa: *fase lag* (hora 0 a 1), *fase log* (hora 1 a 10) y fase estacionaria (hora 10 a 14). No fue posible observar la fase de muerte en la curva, debido a la limitación de tiempo disponible para realizar la curva.

En el caso de la figura 3AII, se observa la curva obtenida por método automatizado de la cepa ATCC 27853, en donde se determina que tiene una *fase lag* (latencia) de aproximadamente 800 min (13 horas); una *fase log* (exponencial) a partir, de aproximadamente el minuto 820 hasta el minuto 1700, correspondiente a 14,6 horas, para terminar en una fase estacionaria entre los minutos 1.800 y 2.200 (6,6 horas).



**Figura 3. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* spp.** La figura 3I, corresponde a las curvas de crecimiento de los aislados clínicos, las cuales fueron realizadas por

método manual y la figura 3II, corresponde a la curva de crecimiento de la ATCC 27853, la cual fue realizada por método automatizado.

**Fuente:** construcción propia, Vélez VA, 2021

Al realizar una comparación de las diferentes curvas obtenidas por cada uno de los aislados y la cepa ATCC, es posible apreciar que el comportamiento de los aislados 1 y 2 es parecido, ya que las fases lag y log no se encuentran tan distantes la una de otra en cuanto al tiempo (3h y 2h), respectivamente. Sin embargo, en el caso del aislado 3, se evidencia que tiene un crecimiento más rápido, debido a que a la hora se haber sido incubado, ya se encontraba en el paso de fase lag a log y acabando esta última a las 10 horas a diferencia de los otros dos aislados que se demoran dos horas más en terminarla.

Además, cabe destacar la diferencia que existe entre las curvas de crecimiento de la cepa ATCC y los aislados clínicos, ya que el crecimiento de la cepa ATCC fue más lento comparado con las otras cepas, lo cual puede evidenciarse con una curva más extensa y unas fases lag, log, estacionaria y de muerte de mayor duración.

### **4.3 Aislamiento del *gen mucA* por PCR**

#### **4.3.1 Cuantificación y electroforesis del ADN genómico**

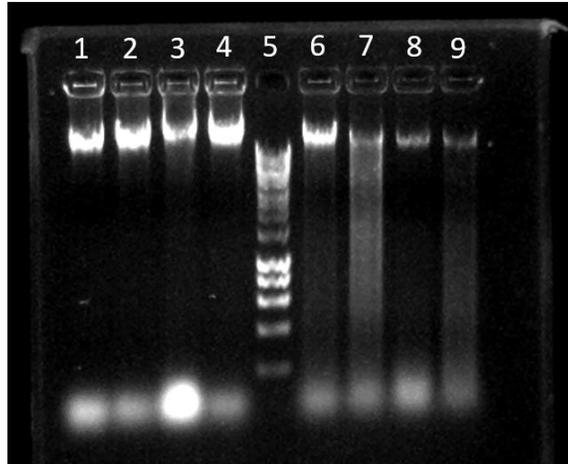
Se realizó la cuantificación del ADN por el método de uDrop Plate, a partir de los dos métodos de extracción empleados, Kit Promega y Salting Out (tabla 2), en donde se hacen las mediciones por duplicado y se leen en las longitudes de onda de 260 y 280nm, cada longitud de onda, permite determinar diferentes parámetros, en el caso de  $\lambda=260\text{nm}$  la luz UV es absorbida por el ADN, a diferencia de  $\lambda=280\text{nm}$ , que nos da una estimación del contenido de proteína. Al hallar la relación 260/280, este valor es tomado como indicador de contaminación por proteínas.

**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	Pureza	Medición 1	Medición 2	Promedio	Promedio-blanco	µg/mL	Pureza
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		

A partir de lo observado en la tabla 2, se evidencia que se obtuvo una gran cantidad de ADN genómico haciendo uso del Kit de Promega, estando en un rango de 193,90 µg /ml y 815,10 µg /ml y la pureza se encuentra dentro de los valores óptimos. A diferencia de lo obtenido por el método de Salting Out ya que el rango en cuanto a cantidad de ADN varía de 126 µg /ml a 233 µg/ml y también se observa una baja pureza, incluso mayor a la obtenida a partir del kit, la cual está relacionada con contaminación de ARN.

Al comparar la cantidad de ADN obtenido a partir del Kit y por Salting Out, se puede concluir que el mejor método de extracción de ADN es por el Kit Wizard de Promega, ya que hay una mayor pureza obtenida en cada una de las extracciones y a su vez, hubo una mayor concentración de ADN por parte de cada una de las muestras; además, se corroboró la integridad del ADN, por medio de una corrida en gel de agarosa, en donde se utilizó la agarosa al 1% (figura 4). En donde, se evidencia una mayor resolución y fluorescencia de las bandas obtenidas por el KIT, en comparación con las bandas de Salting Out.



**Figura 4. 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.

#### **4.3.2 Comprobación de primers forward y reverse *in silico* mediante herramientas bioinformáticas.**

##### **4.3.2.1 Alineamiento de las secuencias del *gen mucA* de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC PAO1 y 27853**

De acuerdo, con los resultados obtenidos en el alineamiento de las secuencias del *gen mucA* de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* ATCC PAO1 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (figura 5), se determina que el grado de similitud entre las dos cepas con respecto al gen evaluado es de 99,83%, esto debido a que en la posición 342, en el caso de la cepa PAO1, hay una Adenina y la ATCC 27853, hay una Guanina.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

mucA27853      ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATGAA      60
PA0763         ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATGAA      60
*****

mucA27853      CTCGAGTTGCGGCGGGTGCCTCGCAGCTTGCGGCGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCACC TGG      120
PA0763         CTCGAGTTGCGGCGGGTGCCTCGCAGCTTGCGGCGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCACC TGG      120
*****

mucA27853      TCGCGTTACAGTTGGCGCGGTCCGTATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAGCTGGAT      180
PA0763         TCGCGTTACAGTTGGCGCGGTCCGTATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAGCTGGAT      180
*****

mucA27853      ATCGCTGCGGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGAAG      240
PA0763         ATCGCTGCGGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGAAG      240
*****

mucA27853      GGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCTGGCGGTGCTGCCTCGGTGACCCTGGCGGTGCTG      300
PA0763         GGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCTGGCGGTGCTGCCTCGGTGACCCTGGCGGTGCTG      300
*****

mucA27853      GCCGGCGTGCCTCTGTACAACAGAACGACGCCCTGCCGCAATGGCGCAACAGGGGACC      360
PA0763         GCCGGCGTGCCTCTGTACAACAGAACGACGCCCTGCCGCAATGGCGCAACAGGGGACC      360
*****

mucA27853      ACCCCGAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGGCCGTGCTGGCCGGCTACAGCGAA      420
PA0763         ACCCCGAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGGCCGTGCTGGCCGGCTACAGCGAA      420
*****

mucA27853      GAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGATACCCGCTGGCATGAG      480
PA0763         GAGCAGGGGGCGCCGAGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGATACCCGCTGGCATGAG      480
*****

mucA27853      CAGCGTCTGCCGATCTACCTGCGTCAGCAGTGAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAGAG      540
PA0763         CAGCGTCTGCCGATCTACCTGCGTCAGCAGTGAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAGAG      540
*****

mucA27853      AGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAACCGCTGA      585
PA0763         AGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAACCGCTGA      585
*****

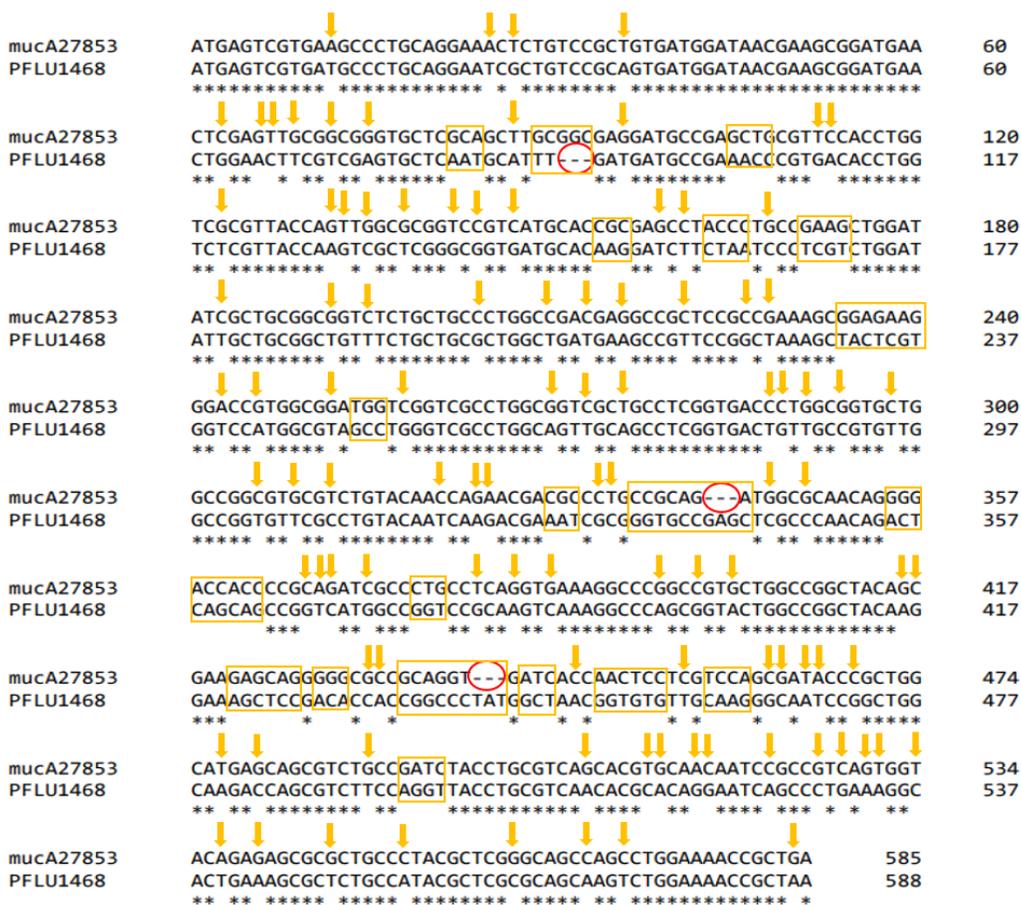
```

**Figura 5. Alineamiento de las secuencias de los genes *mucA* de las cepas ATCC PAO1 y ATCC 27853**

#### 4.3.2.2 Alineamiento de secuencia del gen *mucA* de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Pseudomonas fluorescens* SBW25

Se realiza el alineamiento de las dos secuencias del gen *mucA* provenientes de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. fluorescens* SBW25, para evaluar el grado de similitud entre cada una. En donde, en la figura 6 se observa el resultado obtenido y se determina que el grado de similitud entre las dos cepas con respecto al gen evaluado es de 68,38%, lo cual se correlaciona con la variabilidad de la secuencia entre una cepa y otra.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment



**Figura 6. Alineamiento de las secuencias de los genes *mucA* de las cepas *P. fluorescens* SBW25 y ATCC 27853.** Las flechas y cuadrados de color amarillo representan los cambios que hubo entre las dos secuencias y de color rojo, se encuentran las regiones que no poseen bases.

Existen 192 pares de bases (pb) que no coinciden al realizar el alineamiento y una de las principales diferencias entre el *gen mucA* de *P. fluorescens* SBW25 es que tiene una longitud mayor, siendo esta de 588pb, a diferencia del *gen mucA* de la cepa ATCC 27853 que tiene una longitud de 585 pb.

### 4.3.3 Diseño de primers

De acuerdo con lo descrito en el ítem de diseño de primers de la metodología, se eligieron los siguientes primers:

- Forward (5'-ATGAGTCGTGAAGCCCTGC-3')
- Reverse (5'- TCAGCGGTTTTCCAGGCT-3')

Cabe destacar las características obtenidas, como el tamaño (19 y 18 nucleótidos), el porcentaje de Guanina-Citosina (57,89% y 55,56%), la temperatura melting (60,08 °C y 59,16°C) y la baja auto complementariedad entre los dos primers (3,00), respectivamente para primer forward y primer reverse. En la figura 13, se observa la ubicación o sitio de anillamiento del primer forward y reverse, en la secuencia del *gen mucA*.

```
ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATGAACTCGAGTTGC
GGCGGGTGCTCGCAGCTTGC GCGGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCACCTGGTCGCGTTACCAAGTTGGCGCG
GTCCGTCATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAGCTGGATATCGCTGCGGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCG
ACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGAAGGGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCTGGCGGTGCTGCTGCTG
CGGTGACCCTGGCGGTGCTGGCCGGCGTGCCTGTGTACAACAGAACGACGCCCTGCCGCAAATGGCGCA
ACAGGGGACCAACCGCAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGCCGTGCTGGCCGGCTACAGCGAA
GAGCAGGGGGCGCCGCAGGTGATCAACCACTCCTCGTCCAGCGATACCCGCTGGCATGAGCAGCGTCTGC
CGATCTACCTGCGTCAGCACGTGCAACAATCCGCCGTGAGTGGTACAGAGAGCGCGCTGCCCTACGCTCGG
GCAGCCAGCCTGGAAAACCGCTGA
```

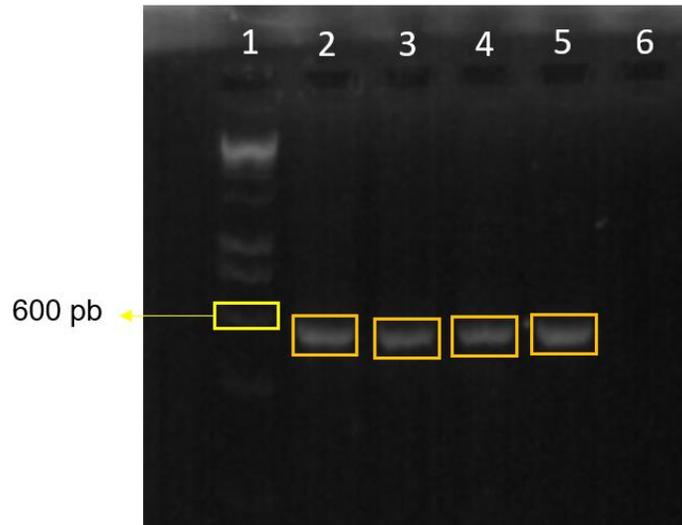
**Figura 7. Ubicación de primer forward (amarillo) y primer reverse (azul) en la secuencia fasta del *gen mucA*.**

**Fuente:** construcción propia, Vélez VA, 2021

#### 4.3.4 Amplificación del *gen mucA* por medio de PCR

El *gen mucA* fue amplificado bajo las siguientes condiciones: 50µl de master mix Go taq 2X, 1µl de primer forward y primer reverse (concentración de 10pmol/ul cada uno), no se agrega agua libre de nucleasas y se utilizaron los ADN genómicos obtenidos por el método de extracción del Kit Promega (cada ADN tiene una concentración diferente, la cual puede ser observada en el ítem de cuantificación de

ADN genómico). Posteriormente, los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, la cual permitió confirmar la presencia de las bandas de 585 pb correspondientes al gen *mucA* en cada aislado, como se observa en la figura 8.



**Figura 8. Electroforesis del gen *mucA* de las cepas ATCC 27853 y aislados clínicos amplificados por PCR.** En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (HyperLadder I); el carril 2, corresponde al aislado 1 (*P. fluorescens*); el carril 3, correspondiente al aislado 2 (*P. aeruginosa*); 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.

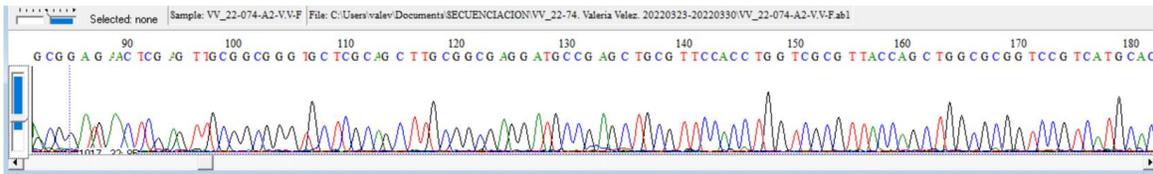
#### 4.4 Purificación y secuenciamiento

De las cuatro muestras enviadas al Instituto de Genética de la Universidad Nacional (SSiGMoL), para purificar y secuenciar solamente se obtuvo la secuencia del aislado 2 y la cepa ATCC 27853; en el caso de los aislamientos 1 y 3, no fue posible determinar la secuencia debido a que se observan picos superpuestos.

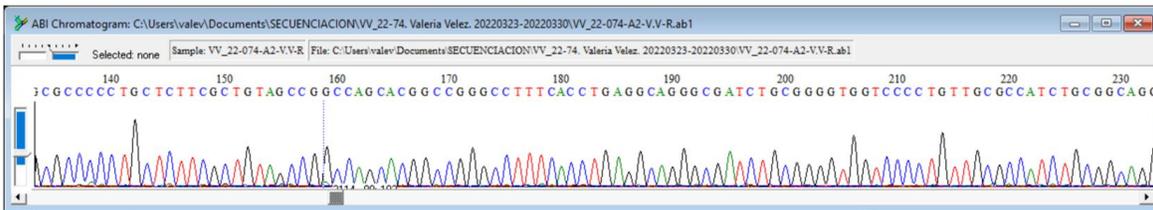
Con relación a los resultados de la secuenciación del aislado 2, en la figura 9 se observa un fragmento del electroferograma enviado por SSiGMoL y visualizado en

con ayuda del software Bioedit, en donde cabe resaltar la diferenciación clara de cada uno de los picos correspondientes a la base nitrogenada que indica y a su vez, una buena concentración del amplificado, esto se evidencia en el tamaño de los picos.

A. Electroferograma aislado 2 – Primer Forward



B. Electroferograma aislado 2 – Primer Reverse



**Figura 9. 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.**

A continuación, se observa en la figura 10, el resultado del alineamiento de las dos secuencias obtenidas del primer forward y reverse, en donde la secuencia obtenida tomó el nombre de consenso, y la cepa ATCC 27853 de la base de datos. A partir de esta figura, se puede concluir que hubo 17 mutaciones presentes a lo largo de la secuencia consenso (flecha de color rojo) y 10 bases las cuales no fueron identificadas en la secuencia (color amarillo). Sin embargo, en la figura 11, se observa el porcentaje de identidad entre las dos secuencias evaluadas, siendo esta de 95,56%, es decir que las dos secuencias son casi idénticas, permitiendo concluir que el gen secuenciado es el *gen mucA*



**Figura 10. 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.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: Consensus	100.00	95.56
2: ATCC27853	95.56	100.00

**Figura 11. Porcentaje de identidad entre la cepa ATCC 27853 de la base de datos y el aislado 2 obtenido al hacer el alineamiento en Clustal-Omega.**

En la tabla 3, se observa la distribución en cuanto al tipo de mutación observada, la frecuencia con la que se encontró y la posición en la secuencia. A partir de esto, se concluye que de las 17 mutaciones que hubo en total, 16 fueron sustituciones, siendo 9 por transversión, es decir que hubo una sustitución entre bases pirimidinas y 7 por transición, que significa que hubo una sustitución entre una base purina y otra pirimidina o viceversa y, por último, hubo una inserción de una Adenina en la posición 386.

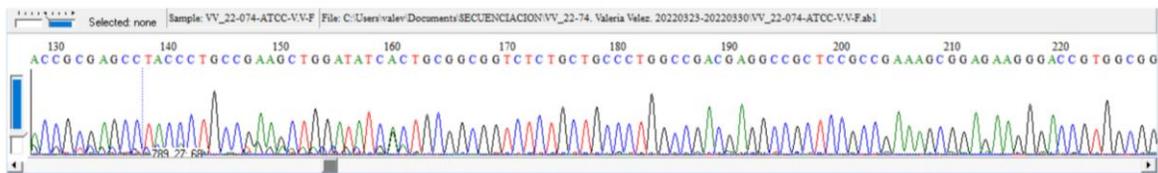
**Tabla 3. Frecuencia de mutaciones presentes en el aislado 2.**

Frecuencia de mutaciones presentes en el aislado 2									
SUSTITUCIONES									INSERCIÓN
Transversión					Transición				
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

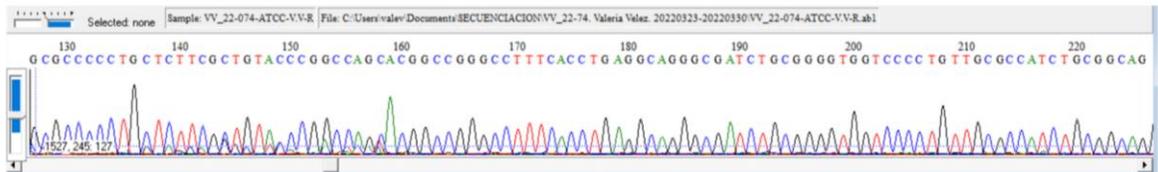
(p) posición en la secuencia observada en el alineamiento.

Por otra parte, en el caso de la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853, se visualizaron los electroferogramas correspondientes tanto al primer forward como al primer reverse con ayuda del software Bioedit. En la figura 12, se observa un fragmento del electroferograma obtenido del *gen mucA* con cada uno de los primers utilizados, en donde es posible apreciar los picos definidos correspondientes a cada una de las bases nitrogenadas y a su vez, se identifica por medio de colores cada una de las bases.

### A. Electroferograma cepa ATCC – Primer Forward



### B. Electroferograma cepa ATCC – Primer Reverse



**Figura 12. Electroferogramas de un fragmento del *gen muca* 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.**

Posteriormente, en la figura 13, se observa el resultado del alineamiento obtenido por el Clustal-Omega de la secuencia consenso y la secuencia de *P. aeruginosa* ATCC 27853 obtenida a partir de la base de datos pseudomonas.com. Se puede observar, que existen algunas bases nitrogenadas que en la secuencia consensus no se pudieron determinar, esto se debe a que al hacer el alineamiento de las secuencias del primer forward y reverse, en esa posición se encontraban bases diferentes provenientes de cada una. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas, en la figura 14, se observa el porcentaje de identidad entre las dos secuencias evaluadas, siendo esta de 98,97%, es decir que las dos secuencias son casi idénticas, permitiendo concluir que el gen secuenciado es el *gen muca*.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

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

Consensus      WACTCGAGTTGCGGCGGGTGCTCGCAGCTTGCGGCGAGGATGCCGAGCTGCGTCCACCT   120
ATCC27853     AACTCGAGTTGCGGCGGGTGCTCGCAGCTTGCGGCGAGGATGCCGAGCTGCGTCCACCT   118
*****

Consensus      GGTGCGTTACCAGTTGGCGCGGTCCGTCATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAGCTGG   180
ATCC27853     GGTGCGTTACCAGTTGGCGCGGTCCGTCATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAGCTGG   178
*****

Consensus      ATATCAGTCGCGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGA   240
ATCC27853     ATATCGCTGCGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAGCGGAGA   238
*****

Consensus      AGGGACCGTGCGGATGGTCGGTCGCTGGCGGTGCTGCCTCGGTGACCCTGGCGGTGC   300
ATCC27853     AGGGACCGTGCGGATGGTCGGTCGCTGGCGGTGCTGCCTCGGTGACCCTGGCGGTGC   298
*****

Consensus      TGGCCGGCGTGCGTCTGTACAACCAGAACGACGCCCTGCCGAGATGGCGCAACAGGGGA   360
ATCC27853     TGGCCGGCGTGCGTCTGTACAACCAGAACGACGCCCTGCCGAGATGGCGCAACAGGGGA   358
*****

Consensus      CCACCCCGCAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGCGCTGCTGGCCGGTACAGCG   420
ATCC27853     CCACCCCGCAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGCGCTGCTGGCCGGTACAGCG   418
*****

Consensus      AAGAGCAGGGGGCGCCGACAGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGATAACCGTGGCATG   480
ATCC27853     AAGAGCAGGGGGCGCCGACAGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGATAACCGTGGCATG   478
*****

Consensus      AGCAGCGTCTGCCGATCTMCTGCGTCAGCACGTGCAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAG   540
ATCC27853     AGCAGCGTCTGCCGATCTACTGCGTCAGCACGTGCAACAATCCGCCGTCAGTGGTACAG   538
*****

Consensus      AGAGCGCGCTGCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAACCGCTGAA 588
ATCC27853     AGAGCGCGCTGCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAACCGCTGA- 585
*****

```

**Figura 13. Alineamiento de secuencia consenso ATCC 27853 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.

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.**

## 5. DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los microorganismos con mayor prevalencia en pacientes con Fibrosis Quística (F.Q) de acuerdo con un reporte de la Cystic Fibrosis Foundation, ya que desde el año 1994 a 2020 la prevalencia se encuentran un rango entre 60 a un 30%, cabiendo destacar que a pesar de ser una de las bacterias más aisladas en estos pacientes, con el paso de los años su prevalencia ha disminuido, siendo por ejemplo en el caso del año 2020 de aproximadamente 30%<sup>40</sup>. No obstante, *P. aeruginosa* no es la única especie que es posible encontrar del género *Pseudomonas*, también se encuentra a *Pseudomonas fluorescens*, aunque en menor proporción cuando se compara con *P. aeruginosa*, ya que es mayormente *P. fluorescens* catalogada como una especie ambiental<sup>41</sup>.

Por otro lado, cabe destacar la variabilidad que existe entre las diferentes cepas evaluadas en cuanto a la duración de fases de crecimiento. De forma particular, la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la cual al compararla con el estudio realizado por Liu y col. en donde evaluaron la cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), es posible apreciar una variación en la durabilidad de cada una de las fases, siendo por ejemplo en el caso de la fase lag de 4 horas y la fase log desde la hora 5 hasta la hora 36, a diferencia del presente estudio, en donde la fase lag tuvo una duración de aproximadamente 13 horas, la fase log de 14,6 horas. De igual forma, al comparar los resultados obtenidos por parte de los aislados evaluados, también es posible determinar que las fases correspondientes a la curva de crecimiento, son mucho menores<sup>42</sup>.

Por otro lado, cabe resaltar en primera instancia que en el estudio se emplearon dos métodos diferentes de extracción de ADN genómico: uno a partir de kit comercial (Promega) y otro, que se basaba en el método de Salting Out pero que fue adaptado para poder ser utilizado con bacterias, esto con el fin de determinar el método por el cual se podía obtener un mejor rendimiento y calidad del ADN. De acuerdo con los datos obtenidos y al compararlos con el estudio realizado por Becker y col,

difieren los resultados obtenidos, ya que, en el caso de ellos, al utilizar el kit, la pureza lograda para la muestra evaluada fue de 1,5, encontrándose fuera del rango óptimo y la concentración de ADN fue de 18,1µl, por el contrario, en el presente estudio, los dos parámetros evaluados, como lo son la pureza se encuentra entre un rango de 1,8 y 2,0 y, la concentración de ADN entre 815 µg/ml y 193,90 µg/ml, siendo en el caso de Becker y col, mucho menor los resultados obtenidos<sup>43</sup>.

Por otro lado, en cuanto a las mutaciones identificadas en el *gen mucA* del aislado 2, cabe resaltar que la mayoría de mutaciones identificadas en el presente estudio son sustituciones de los dos tipos (transiciones y transversiones) y en menor medida una inserción, lo cual concuerda con el estudio realizado por Candido y col, ya que en dicho estudio no solamente evaluaron las mutaciones presentes, sino cómo estas producen un cambio de la secuencia, por ejemplo, codones de parada, cambios en el aminoácido que se sintetiza y cambio de marco, sino que también afectaba el fenotipo de la bacteria<sup>44</sup>, sin embargo, en el presente estudio no se observó un cambio fenotípico, además, es importante mencionar que las mutaciones que se presentaron son diferentes a las encontradas en el estudio de Candido. Por lo tanto, se presume que las mutaciones descritas en el presente estudio no han sido descritas anteriormente en literatura.

Lo anteriormente descrito, se confirma también con el estudio realizado por Bragonzi y col., ya que, en dicho estudio en el caso del *gen mucA*, encontraron mutaciones de tipo sustitución, pero de forma predominante las transiciones, teniendo una frecuencia de 168<sup>45</sup>. Este dato difiere del obtenido en este estudio, ya que en nuestro caso predominan las transversiones por encima de las transiciones, pero es necesario tener en cuenta que la cantidad de muestras evaluadas y por lo tanto el número de mutaciones encontradas comparadas con el estudio son mucho menores.

## 6. CONCLUSIONES

En conclusión, esta investigación permitió evidenciar la variabilidad en cuanto a las cepas que se pueden presentar en pacientes con F.Q, ya que a pesar de que *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias con mayor prevalencia en estos pacientes, de igual forma es posible encontrar otra especie del género *Pseudomonas spp.* que se cree es netamente ambiental, como lo es *Pseudomonas fluorescens*. Asimismo, se destaca las altas concentraciones de ADN genómico que pueden llegar a ser obtenidas utilizando kits comerciales, sin dejar de lado otros métodos que también pueden ser utilizados, como, por ejemplo, Salting Out y a su vez, la variación que puede tener los aislados en cuanto a sus fases de crecimiento, las cuales pueden depender del método que sea utilizado y el tiempo que se evaluado, destacando que en el presente estudio el comportamiento de cada aislado en cuanto a su crecimiento, destacando que los aislados tuvieron una curva más rápida comparado con la curva de la cepa ATCC 27853.

Por último, 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 y a su vez, se concluye que no necesariamente todas las mutaciones presentes en el gen 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*. Y que es posible que los aislados obtenidos y estudiados, estén en una fase de infección aguda, ya que cumplen con las características de la misma (aislado no mucoide y sensibles a antibióticos).

## Referencias

1. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & Diseases* [internet] 2019; 6 [cited 20 april 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304219300170>
2. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* [internet] 2012; 10 [cited 20 april 2021] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23147702/>
3. Sautter R, Ramos D, Schnepfer L, Ciofu O, Wassermann T, Koh CL, et al. A complex multilevel attack on *Pseudomonas aeruginosa* *algT/U* expression and AlgT/U activity results in the loss of alginate production. *Gene* [internet] 2012; 498 [cited 08 oct 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968699/>
4. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences* [internet] 2021; 22 [cited 20 april 2021] Available in: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/3128#cite>
5. Gellatly SH, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* [internet] 2013; 67 [cited 02 jan 2021] Available in: <https://academic.oup.com/femspd/article/67/3/159/2398791>
6. Sol Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, et al. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is Associated with Decreased Fitness. *Cell Physiol Biochem* [internet] 2013; 31 [cited 02 jan 2021] Available in: <https://www.karger.com/Article/Pdf/343372>

7. Chang C. Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* [internet] 2018; 8 [cited 17 jan 2021] Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02671/full>
8. Tacconelli E, Magrini N, Carmeli Y, Harbarth S, Kahlmeter G, Kluytmans J, et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO [internet] 2017 [cited 17 jan 2021] Available in: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)
9. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* [internet] 2019; 37 [cited 17 jan 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301976>
10. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report to the Center Directors 2019. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry [internet] 2020 [cited 17 jan 2021] Available in: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2019-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>
11. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula Y, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulmonary Medicine* [internet] 2016; 16 [cited 17 jan 2021] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5139081/>
12. Panmanee W, Su S, Schurr MJ, Lau GW, Zhu X, et al. The anti-sigma factor MucA of *Pseudomonas aeruginosa*: Dramatic differences of a *mucA22* vs. a  $\Delta$ *mucA* mutant in anaerobic acidified nitrite sensitivity of planktonic and biofilm bacteria in vitro and during chronic murine lung infection. *PLOS ONE* [internet] 2019; 14 [cited 20 april 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0216401>

13. Vidya P, Smith L, Beaudoin T, Yau YCW, Clark S, Coburn B, et al. Chronic infection phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* are associated with failure of eradication in children with cystic fibrosis. *EJCMID* [internet] 2016; 35 [cited 17 jan 2021] Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-015-2509-4>
14. Yin Y, Withers TR, Wang X, Yu WD. Evidence for Sigma Factor Competition in the Regulation of Alginate Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* [internet] 2013; 8 [cited 17 jan 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072329>
15. Cross AR, Raghuram V, Wang Z, Dey D, Goldberg JB. Overproduction of the AlgT Sigma Factor Is Lethal to Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* [internet] 2020; 202 [cited 20 april 2021] Available in: <https://jb.asm.org/content/202/20/e00445-20>
16. Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL. Mucoidy, Quorum Sensing, Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections. *PLOS ONE* [internet] 2010; 5 [cited 20 april 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012669>
17. Pozuelo MJ, Jiménez PA, Valderrey AD, Fernández-Olmos A, Cantón R, Rotger R. Polimorfismo de los genes *mucA* y *fpvA* en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [internet] 2011; 29 [citado 20 abril 2021] Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X10004015>
18. Candido N, Capizzani CP, Gomes LA, Marin M, Galetti R, Ciofu O, 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 17 jan 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0208013>
19. Schofield MC, Rodríguez D, Kidman AA, Cassin EK, Michaels LA, Campbell EA, et al. The anti-sigma factor MucA is required for viability in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv* [internet] 2021 [cited 20 april 2021] Available in: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.17.253617v3.full>
  20. Weihui W, Yongxin J, Fang B, Shouguang J. Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology* [internet] 2015; 2 [cited 20 april 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012397169200041X#!>
  21. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology* [internet] 2016; 24 (5) [cited 19 jan 2021] Available in: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(16\)00021-4?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X16000214%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(16)00021-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X16000214%3Fshowall%3Dtrue)
  22. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today* [internet] 2019; 24 (1) [cited 20 april 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644618302356>
  23. Su SS, Wynn KZ, Ngwe H. Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from the Clinical Soil. *Research Gate* [internet] 2018 [cited 19 jan 2021] Available in: [https://www.researchgate.net/publication/335619903\\_Isolation\\_and\\_Identification\\_of\\_Pseudomonas\\_aeruginosa\\_from\\_the\\_Clinical\\_Soil](https://www.researchgate.net/publication/335619903_Isolation_and_Identification_of_Pseudomonas_aeruginosa_from_the_Clinical_Soil)

24. Zheng P, Raudonis R, Glick BR, Tong-Jun L, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* [internet] 2019; 37 [cited 20 april 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301976>
  
25. European Centre for Disease. Prevention and Control Annual Epidemiological Report for 2017 Healthcare-associated infections in intensive care units. ECDC [internet] 2019 [cited 19 jan 2021] Available in: [https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER\\_for\\_2017-HAI.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-HAI.pdf)
  
26. Tran MT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *MDPI* [internet] 2020; 21 [cited 19 jan 2021] Available in: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8671/pdf>
  
27. Catellani C, Assael BM . Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell. Mol. Life Sci* [internet] 2017; 74 [cited 19 jan 2021] Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-016-2393-9>
  
28. Malhotra S, Hayes Jr D, Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clinical Microbiology Reviews* [internet] 2019; 32 [cited 19 jan 2021] Available in: <https://cmr.asm.org/content/32/3/e00138-18>
  
29. Brown S, White R, Tobin P. Keep them breathing. Cystic fibrosis pathophysiology, diagnosis, and treatment. *AAPA* [internet] 2017; 30 [cited 05 may 2021] Available in: [https://journals.lww.com/jaapa/fulltext/2017/05000/keep\\_them\\_breathing\\_\\_cystic\\_fibrosis.4.aspx](https://journals.lww.com/jaapa/fulltext/2017/05000/keep_them_breathing__cystic_fibrosis.4.aspx)
  
30. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis

- Foundation. The Journal of Pediatrics [internet] 2017; 181 [cited 19 jan 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347616310484>
31. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Review* [internet] 2011; 4 (1) [cited 19 jan 2021] Available in: <https://cmr.asm.org/content/24/1/29>
  32. Jackson L, Waters V. Factors influencing the acquisition and eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* [internet] 2020 [cited 19 jan 2021] Available in: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.10.008>
  33. Taccetti G, Denton M, Hayes K, ECFS-CTN, Drevinek P, Sermet-Gaudelus I. A critical review of definitions used to describe *Pseudomonas aeruginosa* microbiological status in patients with cystic fibrosis for application in clinical trials. *Journal of Cystic Fibrosis* [internet] 2019; 19 [cited 19 jan 2021] Available in: [https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993\(19\)30867-7/fulltext](https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993(19)30867-7/fulltext)
  34. Schick A, Kassen R. Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. *PNAS* [internet] 2018; 115 (42) 19 [cited 19 jan 2021] Available in: <https://www.pnas.org/content/115/42/10714.full>
  35. Limoli DH, Rockel AB, Host KM, Jha A, Kopp BT, Hollis T, et al. Cationic Antimicrobial Peptides Promote Microbial Mutagenesis and Pathoadaptation in Chronic Infections. *PLOS Pathogens* [internet] 2014; 10 (4) [cited 19 jan 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004083>
  36. Hay ID, Wang Y, Moradali MF, Rehman ZU, Rehm BHA. Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology* [internet]

- 2014; 16 (10) [cited 19 jan 2021] Available in:  
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.12389>
37. Hatite WA, Abdulkadhim MS. Molecular Detection for Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and its Relationship with multidrug Resistance, Isolated from Hospitals Environment. Medico-legal Update. [internet] 2020; 20 (1) [cited 06 may 2021] Available in:  
<https://ijop.net/index.php/mlu/article/view/433>
38. Moehario LH, Boestami HP, Edbert D, Tjoa E, Robertus T. Automation for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of TDR-300B, VITEK®2 and VITEK®-MS. BioRxiv. [internet] 2019; [cited 06 may 2021] Available in:  
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/510107v1.full>
39. El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plésiat P. Cumulative Effects of Several Nonenzymatic Mechanisms on the Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Internet] 2020; 51 [cited 28 jan 2022] Available in:  
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.00704-06>
40. 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>
41. 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>
42. 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>

43. 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>
44. 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>
45. 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=5cplGMZ6xeYgWJqDxIHLVGw8.mbslive-10-240-10-188>