UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MICROBIOS PATÓGENOS OPORTUNISTAS ASOCIADOS A INFECCIONES PULMONARES EN NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA EN EL PERÚ, 2014-2015”

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DEL CANON

RESPONSABLE

Dra. Yrene Esperanza Urbina Rojas
Profesora Principal de la Universidad Nacional de Tumbes.

CORRESPONSABLES

M.Sc. Cesar Javier Rodríguez Azabache
Biólogo. Profesor Principal Universidad Nacional de Tumbes.
Lic.Enf. Darwin Federico Quevedo Queneche
Profesor Auxiliar Universidad Nacional de Tumbes.
Dr. Juan Rivera Medina
Médico Pediatra- Gastroenterólogo
Jefe Unidad de Desarrollo de Investigaciones. Instituto Nacional de Salud del Niño.
Lic.Cecilia Nestarez Del Río
Obstetra. Presidenta de la Asociación de Padres de niños con Fibrosis Quística (FIQUI Perú).
Ph.D. Dr., CAILLON Jocelyne
Profesor de microbiología y Responsable del servicio de microbiología asociada a la Fibrosis Quística del departamento de Bacteriología del Centro Hospitalario Universitario de Nantes (Francia).

TUMBES, 2016

ASESOR

M.Sc. Benoit Diringer, Coordinador de proyectos de Investigación (INCABIOTEC SAC).

COLABORADORES

Blga. Ruth Elizabeth Aquino Ordinola, MSc (c).
Br. Biotec. Emely Gonzáles Gómez
Br. Blga. Ingrid Joyse Meza Guzmán

ÁREA DE INVESTIGACIÓN

Ciencias de la Vida y Biotecnologías.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Salud Pública y Prevención de Enfermedades Endémicas

LOCALIDAD E INSTITUCIÓN

Universidad Nacional de Tumbes (Facultad de Ciencias de la Salud)

Universidad Nacional de Tumbes (Facultad de Ingeniería Pesquera).

Hospital Rebagliati Martins (ESSALUD).

Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN)

Asociación de Padres de niños con Fibrosis Quística (FIQUI PERÚ).

Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Brest. (Francia)

INCABIOTEC SAC

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las Instituciones como FIQUI PERU y al Instituto Nacional de Salud del Niño quienes nos apoyaron con el acercamiento a los pacientes con FQ, y por brindarnos sus instalaciones para poder realizar la toma de muestra.

También queremos agradecer a la Universidad Nacional de Tumbes por el financiamiento otorgado para llevar a cabo el presente estudio.

Finalmente a la empresa INCABIOTEC por comprometerse con la formación científica y humanística de cada investigador, por la asesoría brindada y por cedernos sus instalaciones para el desarrollo del presente estudio.

RESUMEN

En los pacientes que sufren de fibrosis quística (FQ) la morbilidad y la mortalidad se asocian principalmente a infecciones microbianas crónicas de las vías respiratorias inferiores causadas por patógenos oportunistas. En el presente trabajo se caracterizaron las comunidades bacterianas cultivables a partir de muestras de esputo procedentes de 21 pacientes pediátricos peruanos con FQ registrados en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (ESSALUD) y en el Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN). Las bacterias fueron cultivadas y aisladas mediante técnicas de cultivo microbiológico estándares, mientras que la caracterización de las cepas puras se realizó por secuenciación del gen 16S ARNr y análisis por espectrometría de masas MALDI TOF y MALDI TOF/TOF. Se lograron aislar 127 cepas que fueron diferenciadas en 35 especies mediante secuenciación del gen 16S ARNr. Los patógenos predominantes fueron *Pseudomonas aeruginosa* (31.5%), *Staphylococcus aureus* (12.6%), *klebsiela oxytoca* (3.1%) y otras especies poco comunes como *Acrhomobacter xylosoxidans* (0.8%) y *Paenibacillus sp.* (0.8%). El análisis por espectrometría de masas MALDI TOF permitió obtener espectros representativos de cada especie aislada de pacientes peruanos, lográndose también recuperar y caracterizar por MALDI TOF TOF secuencias de proteínas de las especies más comunes. Nuestros datos muestran que los microorganismos colonizadores de las vías inferiores de los pacientes con FQ son parte de un ecosistema microbiano complejo. La caracterización de estos microorganismos es un paso importante para entender la progresión de la enfermedad. Con los resultados obtenidos por los análisis del 16S ARNr y MALDI TOF logramos, por un lado, obtener espectros específicos de las bacterias de los pacientes peruanos que servirán para la construcción de una base de datos de cepas patógenas nativas para futuros estudios y, por otro lado, identificar por la técnica de MALDI TOF/TOF una gran diversidad de proteínas que nos permitirán establecer la relación entre el proteoma bacteriano y su patogenicidad. Finalmente conocer la diversidad bacteriana conduciría a la mejora en el tratamiento antibiótico y al incremento de la esperanza de vida de los pacientes peruanos con FQ.

Palabras clave: *Fibrosis quística; bacterias, 16S ARNr, Maldi tof, Maldi tof/tof, Perú*

ABSTRACT

In patients affected by cystic fibrosis (CF), morbidity and mortality are mainly associated with chronic microbial infections of the lower respiratory tract caused by opportunistic pathogens. In this study the cultivable bacterial communities were characterized from sputum samples from 21 Peruvian pediatric patients with CF registered in the National Hospital Edgardo Rebagliati Martins (ESSALUD) and National Institute of Child Health (INSN). Bacteria were grown and isolated by standard microbiological culture techniques, while the characterization of inbred strains was performed by sequencing the 16S rRNA gene and analysis by MALDI TOF and MALDI TOF/TOF mass spectrometry. It was possible to isolate 127 strains which were differentiated into 35 species by sequencing the 16SARNr gene. The predominant pathogens were *Pseudomonas aeruginosa* (31.5%), *Staphylococcus aureus* (12.6%), *Klebsiela oxytoca* (3.1%), and other rare species as *Acrhomobacter xylosoxidans* (0.8%) and *Paenibacillus sp.* (0.8%). MALDI TOF mass spectrometry analysis allowed us to get mass spectra representative of each isolated species of Peruvian patient, also being achieved to recover and characterise protein sequences of the most common species by MALDI TOF/TOF. Our data show that microorganisms colonizing the lower airways of CF patients are part of a complex microbial ecosystem. The characterization of these microorganisms is an important step to understand the progression of the disease. With the results obtained by the analysis 16S rRNA, and MALDI TOF we achieved obtain specific spectra of bacteria of Peruvian patients which will serve to build a database of native pathogenic strains for future studies and, on the other hand, identify by MALDI TOF/TOF technique a wide diversity of proteins which will allow us to establish the relationship between bacterial proteome and its pathogenicity. Finally, knowing bacterial diversity would lead to improvement in the antibiotic therapy and increases the life expectancy of CF patients Peruvian.

Keywords: *Cystic Fibrosis, bacterial, 16S rRNA, MALDI TOF, MALDI TOF/TOF, Peru*

ÍNDICE

	PÁG
RESUMEN	
ABSTRAC	*1*
INTRODUCCIÓN	*2*
ANTECEDENTES	*6*
MATERIAL Y MÉTODOS	*9*
RESULTADOS	*17*
DISCUSIÓN	*31*
CONCLUSIONES	*40*
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	*42*
ANEXO	*52*

INTRODUCCIÓN

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad genética letal más frecuente y es provocada por mutaciones recesivas en el gen de la CFTR (Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Este gen codifica por una proteína transmembrana que controla el transporte de cloro y regula indirectamente el intercambio de sodio entre la célula y el medio extracelular. La FQ se expresa solo en los pacientes que posean sus 2 alelos del CFTR mutados (generalmente heredados de los padres). Los defectos de la CFTR inducen la acumulación de Cl^- y Na^+ en las células epiteliales de los órganos que producen secreciones mucosas como pulmones, páncreas, hígado, intestinos, canales deferentes, glandes de sudor. Las importantes concentraciones en iones intracelulares inducen la entrada de agua en las células por ósmosis resultando en un mucus deshidratado y espeso en estos órganos. Esta contextura provoca disfunciones digestivas severas, y acumulación de mucus en las vías respiratorias lo que se traduce en faltas de crecimiento y ganancias de peso, bronquitis, rinitis, cirrosis, diabetes, esterilidad, y más importante disminución de la función pulmonar. En consecuencia, los pacientes con FQ exhiben un promedio de vida de 38 años en los Estados Unidos o la Unión Europea, mientras que raramente superan algunos años sin tratamientos adecuados (Hoffman, 2013).

De manera normal existe un gran número de especies bacterianas colonizando el tracto respiratorio superior como *Staphylococcus epidermidis*, estreptococos y otros tipos de bacterias mientras que el tracto respiratorio inferior es prácticamente libre de microorganismos debido a la acción de limpieza eficiente que realizan las células epiteliales ciliadas que recubren el tracto respiratorio inferior (Todar, 2008). Sin embargo este panorama cambia cuando esta acción de limpieza es deficiente y el tracto respiratorio inferior se ve expuesto a posibles infecciones provocados por la colonización de patógenos bacterianos como en el caso de pacientes con fibrosis quística puesto que las mutaciones en el gen CFTR generan un defecto en el transporte de electrolitos el cual conduce al agotamiento de la superficie líquida de las vías respiratorias es decir a nivel de la superficie de las células epiteliales bronquiales (Oliver *et al*., 2009). Como resultado, los pacientes con FQ tienen un moco seco y espeso lo que perjudica la depuración mucociliar de las partículas, especialmente de las bacterias y los conidios de hongos en las vías respiratorias. Este moco engrosado ofrece un nicho ideal para el establecimiento de las infecciones crónicas y finalmente es esta infección crónica que conlleva a la muerte prematura (niños) de pacientes con FQ (Gilligan, 2014; Oliver *et al*., 2009).

La microbiología de las infecciones de las vías respiratorias en pacientes con FQ, durante muchas décadas ha sido determinado por métodos de cultivo de

bacterias y hongos, centrándose en los organismos más frecuentemente aislados, como *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Haemophilus influenzae* (Hauser *et al*., 2011). Sin embargo, muchos otros organismos oportunistas no recuperados comúnmente de individuos sanos se han asociado con la evolución de la enfermedad de las vías respiratorias en las personas con FQ en la última década, incluyendo bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa tales como el complejo *Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter spp*., y *Limosus inquilinus*, micobacterias no tuberculosas y algunos hongos, mohos y levaduras (Bittar & Rolain, 2010).

Es por ello la importancia de la identificación y la caracterización temprana de los patógenos oportunistas pues son vitales para evitar la instalación y la proliferación microbiana en las vías aéreas que conllevan a la degradación de los pulmones y a la muerte. Y es precisamente para generar un estudio a profundidad de aquellos patógenos que provocan las infecciones pulmonares en niños con FQ que se hace uso de las biotecnologías moleculares las cuales han contribuido ampliamente en la identificación y caracterización molecular de diversos microorganismos, en particular con la posibilidad de detectar genes específicos, de secuenciar genomas completos o de identificar bacterias no cultivables. En la actualidad, el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr se ha impuesto como la técnica de referencia para la taxonomía microbiana bacteriana (Slabbinck *et al*., 2010).

Por otro lado la espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistido por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) ha venido imponiéndose en los laboratorios de microbiología clínica por ser una tecnología rápida, precisa y menos costosa de identificación de microorganismos que las técnicas convencionales (Desai *et al*., 2012; Marko *et al*., 2012). Esta técnica se basa en el análisis espectral de proteínas bacterianas, principalmente proteínas ribosomales. La identificación se realiza por comparación del espectro del microorganismo investigado con espectros en una base de datos de referencia (Desai *et al*., 2012; Fernandez-Olmos *et al*., 2012; Lay, 2001; Marko *et al*., 2012). El MALDI-TOF ha demostrado ser eficiente para la identificación de bacterias, micobacterias y levaduras comunes que son difícilmente identificables por los métodos de rutina (Desai *et al*., 2012, AbduWahab *et al*., 2015).

Varios estudios han reportado el uso de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias en FQ (Sandrin *et al*., 2013, Fernández-Olmos *et al*., 2012). Sin embargo, estos estudios subrayan que la identificación a nivel de especies

sigue complicada para especies nuevas o muy emparentadas (ejemplo *E. coli y Shiguella*), lo que indica que el rendimiento de MALDI-TOF MS no es perfecto para los microorganismos poco frecuentes (AbdulWahab *et al*., 2015).

La identificación de microorganismos patógenos por MALDI TOF necesita de bases de datos robustas de amplia información por ejemplo Alby *et al*. (2013) emplearon tres bases de datos (Viteck MS SARAMIS (RUO), Vitek MS v2.0 (IVD) y Bruker Biotyper) para la identificación de diversas cepas patógenas pertenecientes al grupo de *Burkholderia cepacia complex,* sin embargo, sugirió que se requiere una mejor representatividad en las bases de datos de algunos miembros para hacer una identificación más consistente a nivel de especie. Además, se ha demostrado que bases de datos personalizadas pueden lograr la identificación a nivel de especies > 98% (Degand *et al*., 2008). Así mismo se han reportado ciertas limitaciones por parte de MALDI TOF en la identificación de especies del género Acinetobacter, pues los espectros de cepas reportadas por análisis del gen16S ARNr como del género Acinetobacter fueron inconsistentes con los espectros de microorganismos de la base de datos VitekMS y por ello no pudieron ser identificadas, sugiriendo que la base de datos MALDI TOF contendría información insuficiente que permita la correcta identificación de especies de este género (Hommen *et al*., 2014). Así mismo, la identificación de especies del género Achromobacter resulta ser complicado debido a la disimilitud menor al 1% entre las secuencias de las especies y a la falta de identificación de espectros para estas especies (Rodriguez *et al.*, 2015). Esto demuestra la importancia de crear bases de datos específicas a partir de cepas nativas correctamente identificadas. Esto podría ser realizado por identificación de 16SARNr/MALDI TOF o con una caracterización más profunda del proteoma por MALDI TOF TOF.

La aplicación de técnicas de última generación como el MALDI TOF TOF y Next Generation Sequencing (NGS) permitirán entender la complejidad de la microbiota en aquellos pacientes que muestran una severa disminución de la función pulmonar e identificar dichos factores asociados al rápido deterioro de la capacidad respiratoria (Paganin *et al.,* 2015).

En el Perú, la FQ es una enfermedad poco conocida, con deficiente tratamiento y falta de pruebas de tamizaje neonatal y de centros de diagnóstico de prueba del sudor lo que conduce a que la mayoría de niños con FQ no sean diagnosticados o diagnosticados muy tardíamente. En consecuencia, los pacientes peruanos tienen una esperanza de vida inferior comparada con los europeos (Samieniego S., com.Pers.).

El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar los patógenos bacterianos de las vías respiratorias detectados en el esputo de pacientes peruanos. La composición de la microbiota de un total de 21 muestras de esputo de pacientes peruanos, fue investigada utilizando métodos basados en cultivo, y análisis por espectrometría de masas MALDI TOF y MALDI TOF TOF en niños con fibrosis quística en el Perú.

ANTECEDENTES

La Fibrosis Quística está sujeta a intensas investigaciones alrededor del mundo. El desarrollo constante de nuevas drogas dirigidas a corregir los defectos de las mutaciones del CFTR, nuevos antibióticos o moléculas para eliminar a los patógenos, mucolíticos, broncodilatadores, biomarcadores y otras terapéuticas que disminuyan los síntomas (Penque, 2007, Gomes-Alves *et al*., 2010, Balch *et al*., 2011, Pérez *et al*., 2013, Hoffman *et al*., 2013); Utilización de vectores virales y no virales para estudios de terapia génica (Prickett *et al*., 2013). El cultivo, la transformación y la renovación celular mediante herramientas de terapia y regeneración celular (Duchesneau *et al*., 2010). Tanto el diagnóstico molecular como la microbiología clínica han progresado fuertemente en los últimos años.

El gen CFTR responsable de la FQ fue identificado mediante técnicas de clonación en 1989, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 en el sector denominado q31- q32, (Tsui, 1995). Este gen mide aproximadamente 250 kilobases, 27 exones y transcribe un ARN mensajero de 6,500 bases, se expresa en las células secretoras, senos paranasales, pulmones, páncreas, hígado y tracto reproductivo. El producto del gen es una proteína de membrana que contiene 1 480 aminoácidos, esta proteína es denominada reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) y está ubicada en la porción apical de la membrana de las células epiteliales (Tsui, 1995).

El test del sudor es un procedimiento que se emplea en medicina con la finalidad de diagnosticar la fibrosis quística. Los pacientes que sufren esta afección presentan una concentración de cloruro sódico en el sudor más alta que las personas sanas; basándose en este hecho se realiza la prueba con la intención de demostrar la existencia de la enfermedad en aquellos pacientes que presentan síntomas sugestivos, generalmente niños con infecciones respiratorias repetidas o signos de malnutrición. Resultados inferiores a 30 mEq de cloruro por litro, son considerados negativos, es decir que el paciente no tendría la enfermedad. Cuando los valores están entre 30 y 60 mEq de cloruro por litro se considera que el resultado es dudoso; y, cuando es superior a 60 mEq de cloruro por litro, el resultado es considerado positivo, es decir el paciente padece de FQ (García, 2009).

Hasta los años 1990, la taxonomía microbiana estaba basada en técnicas de cultivo clásicas, medios selectivos, coloración de Gram, y pruebas

fisicoquímicas. Estos elementos siguen vigentes pero han demostrado importantes limitaciones en la identificación de bacterias patógenas. El problema reside en la extraordinaria capacidad de modulación genética de las bacterias gracias a fenómenos de mutación, recombinación, intercambios de genes de las bacterias como lo ilustra la creciente resistencia a antibióticos de numerosas cepas microbianas. Estos complejos fenómenos inducen que dos bacterias “morfológicamente” pertenecientes a la misma especie demuestren comportamientos distintos en términos de virulencia, resistencia relativizando así la noción de “especies” en estos microorganismos.

A falta de una cura confiable, el 95% de los pacientes con FQ siguen muriendo por fallas respiratorias debido a las infecciones microbianas crónicas. La escasez de adultos o pre adultos con FQ en las listas de personas atendidas en los hospitales nacionales es reveladora de la corta edad de fallecimiento de los pacientes. La identificación y la caracterización temprana de los patógenos que colonizan las vías respiratorias inferiores permiten una respuesta rápida y adecuada para evitar eventos de infecciones agudas crónicas (exacerbaciones) que provocan respuestas inmunitarias fuertes y conllevan a la degradación rápida de los pulmones.

Las biotecnologías moleculares revolucionaron este campo, en particular con la posibilidad de detectar genes específicos, secuenciar genomas completos o identificar bacterias no cultivables. En la actualidad, el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr (bacteria) o 18S ARNr (hongos) se impuso como la técnica de referencia para la taxonomía microbiana (Slabbinck *et al*., 2010). En los últimos años, técnicas moleculares emergentes basadas en la caracterización del perfil proteico por MALDI TOF están desplazando la taxonomía clásica y la secuenciación (Khot *et al*., 2012). Numerosos trabajos han demostrado las increíbles ventajas de esta técnica en términos de rapidez (identificación de una cepa en 3 segundos a 2 horas), disminución del costo operativo, simplicidad (Steensels *et al*., 2011, Champion, 2012). Al igual que la secuenciación, la identificación por MALDI TOF compara el perfil proteico de ribosomas de una bacteria con los presentes en un banco de datos de bacterias previamente identificadas. El resultado es expresado en porcentaje de homología para la secuenciación y en un valor absoluto para el MALDI TOF y permite determinar la cercanía del perfil propuesto con los miles existentes en los bancos de datos. En microbiología médica el MALDI TOF demostró ser una herramienta muy eficaz en la identificación en comparación con las otras técnicas (Wieser *et al*., 2012). Desai *et al*., (2012) demostraron que el MALDI TOF permitía identificar la gran mayoría de los microorganismos aislados de esputos de pacientes con FQ, en particular en algunos géneros complicados

como el *Burkholderia cepacia complex* u hongos. En algunos casos, el MALDI TOF ha mostrado dificultades para identificar ciertos tipos de bacterias como *Shigella sp.* requiriéndose la identificación por secuenciación (Welker *et al*., 2011). En teoría, se podría también recurrir al uso de taxonomía por MALDI TOF TOF (identificación basada sobre todas las proteínas) aunque aún no existen tales trabajos, la realización de perfiles microbianos por MALDI TOF TOF y secuenciación permitirá crear una “proteinoteca” completa para cada cepa aislada propia a la UNT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Contactos con pacientes

En un primer tiempo, se realizó una sensibilización de los pacientes y padres de pacientes con FQ a través de reuniones y conferencias en Lima en el Hospital Nacional E. Rebagliati en presencia de los padres de pacientes y doctores pediatras. Luego se reveló la información a través de las redes sociales, del sitio web de la asociación FIQUI PERÚ y de los médicos que contactaron directamente los pacientes y los interpelaron sobre la importancia de participar.

Declaración de ética para la participación en el estudio

Se preservaron las normas médicas y éticas así como los derechos de los pacientes con FQ. Por ello se elaboró cartas de información y de compromiso de participación en el estudio (Anexo 1) de acuerdo con las normas de ética propias a cada hospital para llevar a cabo el proyecto

Muestreo

El análisis fue dirigido exclusivamente a los pacientes con FQ diagnosticados mediante un cuadro clínico característico y un diagnóstico positivo a la prueba del sudor (> 60 mmol/l de cloruro).

Previo al muestreo, los padres de familia firmaron una declaración de consentimiento de participación para la toma de muestra de esputo de sus menores hijos.

Las muestras consistieron en 2-4 ml de esputo fresco colectados en vasos estériles y conservados a 4 ° C hasta su procesamiento.

La toma de muestra fue coordinada con la Asociación FIQUI de acuerdo a las citas médicas de los pacientes con FQ.

Se realizó tres muestreos en la ciudad de Lima, el primer muestreo se realizó la segunda semana de Julio en la cual se recolectaron 11 muestras; el segundo muestreo se efectuó en el mes de octubre y se recolectó 8 muestras y en el tercer y último muestreo en el mes de diciembre, se recolectó 2 muestras de esputo.

Compra y adquisición de equipamientos

Los equipos adquiridos fueron según las áreas de trabajo. En el área de microbiología se adquirió una incubadora marca SHANGHAI ZDAN INTERNATIONAL para la incubación aerobia de las muestras biológicas, una

jarra de anaerobiosis Anaerocult®, Merckj para la incubación anaeróbica, un pH metro marca HANNA modelo N°HI98128, un horno marca SHANGHAI ZDAN INTERNATIONAL para la esterilización de materiales de laboratorio y un refrigerador para almacenamiento de muestras biológicas y microbiológicas. Mientras que para el área de Biología molecular se adquirió un vórtex marca Mixer VX-200 LABNET y un equipo de aire acondicionado portátil marca SOLE.

Desarrollo de las pruebas microbiológicas y moleculares

El desarrollo del siguiente proyecto se efectuó en dos etapas: Aplicación de técnicas microbiológicas y caracterización molecular por 16S ARNr, MALDI TOF y MALDI TOF/TOF.

Evaluación macroscópica de la muestra de esputo

Las muestras de esputo fueron recolectadas de los pacientes con FQ, en vasos de plástico estéril y de boca ancha y en horas de la mañana cuando el paciente se levantó, antes de la primera comida y luego de enjuagarse la boca con agua estéril.

Es conveniente obtener muestras de esputo temprano por la mañana ya que contienen secreciones que se juntaron durante la noche y en las cuales es más probable que se concentren bacterias patógenas así mismo el lavado o enjuague bucal antes de obtener la muestra de esputo reduce la contaminación de la muestra por bacterias orofaríngeas

Una vez obtenidas las muestras de esputo se realizó la caracterización física en cuanto al color y la consistencia de los esputos según la Tabla 1.

Tabla 1: Características macroscópicas del esputo

Características	Descripción
Mucoso	Es transparente o blanquecino
Purulento	Es más o menos fluido y es de color amarillo verdoso
Mucupurulento	Es opaco o amarillento y algo viscoso
Hemoptoico	Contiene rastros de sangre

La evaluación macroscópica se realizó como primer paso para determinar si las muestras recolectadas era efectivamente esputo o solo saliva.

Evaluación microscópica de la muestra de esputo

En esta etapa se hizo la tinción Gram de las muestras de esputo para evaluar la calidad de las mismas en relación al número presente de células epiteliales (CEs) y de leucocitos polimorfonucleares (PMNs); una vez evaluada la idoneidad de las muestras de esputo se realizó el procesamiento de la muestra.

Luego de haber identificado dichas células a 10X en el microscopio óptico, se realizó el conteo de las mismas y se promedió para luego calificar si las muestras de esputo eran las adecuadas o no en base a la Tabla 2.

Tabla 2: Calidad de la muestra de esputo de acuerdo al número de células epiteliales y leucocitos polimorfonucleares

Calidad del esputo	**Nº Células por campo**	
	Nº PMNs	Nº CEs
Buena	<25	<25
Buena	>25	<10
Buena	>25	10-25
Mala	>25	>25
Mala	10-25	>25
Mala	<10	>25

Aislamiento por extensión en superficie

Para el aislamiento de las bacterias patógenas se sembró por extensión, aproximadamente 20 µL del esputo de cada paciente en los diferentes medios de cultivos (Tabla 3) y se incubó a 37ºC entre 24 y 72 h. Las siembras en agar sangre fueron incubadas bajo un medio anaeróbico empleando un gas pack y una jarra anaeróbica.

Tabla 3: Medios de cultivo empleados para el aislamiento de patógenos bacterianos

Medio de cultivo	**Bacterias a aislar**
Agar Burkholderia Cepacia	*Burkholderia cepacia*
Agar Cetrimide	*Pseudomonas aeruginosa*
Agar Sangre	*Streptococcus pneumoniae*
Agar MacConkey	Enterobacterias

Purificación y conservación de bacterias patógenas

Una vez que se obtuvo crecimiento, se seleccionaron diferentes colonias bacterianas por cada medio de cultivo y se sembraron en nuevos medios de cultivo para evaluar las características de las colonias aisladas y obtener cultivos puros, para esta siembra se utilizó la técnica del estriado el cual es el más rápido y el que mayormente se emplea en bacteriología. Así mismo a cada colonia sembrada se le asignó una codificación de acuerdo al medio de cultivo, paciente y número de colonia para su posterior identificación.

Luego de observar crecimiento en las placas sembradas por estrías se sembró una colonia por cada estriado en tubos de 1.5 ml que contenían 1 ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) y se incubó a 37°C entre aproximadamente 24 y 48 h. Posteriormente se realizó la tinción Gram de los diferentes cultivos aislados y se observó en el microscopio. La observación se hizo primero a 40X para localizar las bacterias y después a 100X con aceite de inmersión para determinar si el cultivo es puro o no en base al tipo de tinción (Gram negativo o positivo) y la forma de las colonias en la placa.

Un cultivo es puro cuando contiene una sola especie de microorganismo y si resulta ser así, se hace la conservación del cultivo bacteriano con glicerol 15%. Si el cultivo no es puro se realiza un segundo aislamiento empleando la técnica de siembra por estrías en superficie y así sucesivamente hasta lograr su purificación.

Extracción de ADN bacteriano

En esta etapa se extrajo y purificó el ADN de las bacterias aisladas del esputo de los pacientes evaluados, empleando el protocolo rápido de extracción de ADN (Anexo 2).

Amplificación del gen 16S ARNr por PCR

En tubos eppendorf de 1,5 ml se preparó el máster mix de acuerdo al número de reacciones a efectuar. La preparación se hizo agregando cada componente conforme al orden presentado en la Tabla 4 luego se dispensaron 23 µL en tubos de 0,2 ml de acuerdo al número de reacciones y finalmente se agregó 2ul del ADN bacteriano:

Tabla 4: Componentes del máster mix

Componentes	**Cantidad (µL)**
Agua ultrapura	16,2
buffer 10 X	2,5
ClMg 50 mM	2,5
Taq Polimerasa	0,1
dNTPs 10 mM	0.5
Primers F 15 pmol	0.6
Primers R 15 pmol	0.6
Total	23 µL

Se homogenizó la mezcla en una mini centrífuga y se colocaron los tubos dentro del termociclador. Así mismo se preparó un tubo control negativo de amplificación, donde se reemplazó el ADN por agua ultrapura.

Y finalmente se programaron las temperaturas, tiempos y ciclos de la PCR según la Tabla 5.

Tabla 5: Programación de la PCR

Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
94□C	5 min	1 ciclo
94□C	30 seg	35 ciclos
58C	45 seg	
72□C	1 min	
72□C	4 min	1 ciclo
4□C	∞	

Electroforesis

Para este estudio, los fragmentos (amplicones) a migrar corresponden al del gen 16S ARNr los cuales son de 1500 pares de bases aproximadamente. Así mismo la migración de los amplicones fue hecha en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (BET) al 6% por 30 min y a 90 voltios.

Posteriormente los amplicones fueron observados sobre luz ultravioleta.

Secuenciación

En esta etapa se prepararon los amplicones obtenidos de la PCR y de acuerdo a la intensidad de las bandas se diluyeron en agua ultrapura (AUP). Posteriormente se enviaron las muestras a la empresa MACROGEN en EE.UU. para el secuenciamiento.

Espectrometría de masas MALDI TOF

Para la reevaluación de la identificación bacteriana por la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), los aislamientos y cepas puras previamente obtenidas de los pacientes estudiados, fueron cultivados en medio Tryptic Soy Broth (TSB) durante 24 horas a 37 °C, estas fueron recuperadas, lavadas y resuspendidas con agua HPLC para luego ser espoteadas directamente a la placa MALDI (Figura 1)

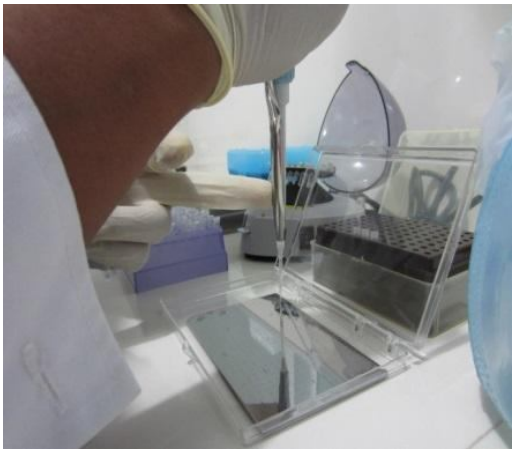


Figura 1: Espoteo de muestra a placa MALDI

Luego de ser espoteadas se secaron a temperatura ambiente y se les adiciono a cada muestra 1ul de matriz Acido sinapínico (10mg/ml disuelta en 70% de acetonitrilo y 30% de agua grado HPLC con 0.1% de TFA (V/V), para posteriormente ser insertada en el espectrómetro de masas MALDI (figura 4).
Las muestras fueron analizadas en un rango de masas de 2000 – 20000 Da. La lectura se hizo en un modo operacional linear positivo, para así obtener espectros de una lectura MS.

Espectrometría de masas MALDI TOF/TOF

Extracción de proteínas bacterianas

Se realizó una extracción de las proteínas totales de las células bacterianas, usando el kit de extracción de proteínas (*Qproteome® Bacterial Protein)*, previamente el cultivo bacteriano se incubó a 24 horas y se midió la densidad óptica (0,6ul/ml). Después de la extracción, se preparó un gel de SDS PAGE 1D para la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular.

Preparación del gel SDS-PAGE 1D

Se preparó un gel de separación al 12% con un volumen de 15 ml y un gel de alineamiento con un volumen final de 5ml, los cuales fueron preparados las concentraciones descritas en el protocolo establecido por Laemmli (1970).

El tratamiento de las proteínas antes de migrarlas en SDS-PAGE 1D, se tomaron 25 µl de muestra y 10 µl de buffer de carga (2X loading protein loading buffer) las cuales fueron calentadas durante 5 min a 95°C y enfriadas por unos minutos. Luego de ello, se migraron por 2 horas a 90 voltios.

Para el revelado del gel, se procedió a hidratarlo, fijarlo (proteínas), colorearlo y lavarlo con las soluciones buffer mencionadas en el manual de métodos inmunológicos según Lomonnte (2007). (Anexo 3)

Terminado el proceso de revelado las bandas fueron claramente presenciadas y diferenciadas debido a los distintos pesos moleculares de las proteínas migradas. (Figura 2)

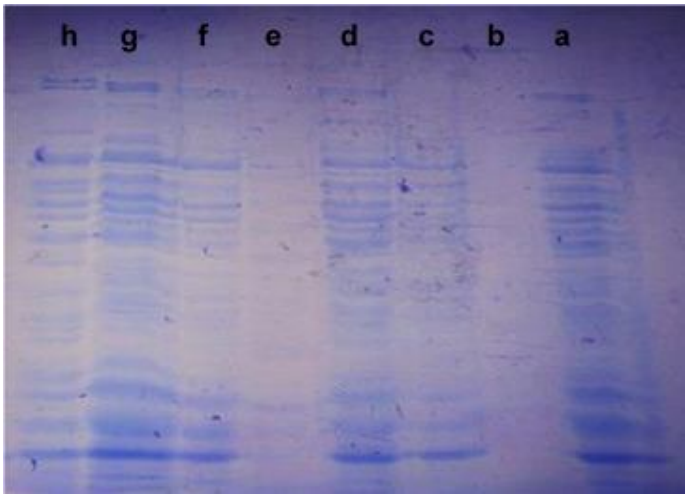


Figura 2: Resultado de las proteínas migradas en SDS-PAGE 1D presentes en (a) *Klebsiella variicola,* (b) *Staphylococcus aureus,* (c) *Klebsiella oxytoca,* (d) *Pseudomonas aeruginosa,* (e) *Enterobacter sp.*, (f) *Pseudomonas aeruginosa,* (g) *Klebsiella pneumoniae,* (h) *Leclercia adecarboxylata,* aisladas de pacientes con fibrosis quística del Perú.

Digestión de proteínas

Luego de ello las bandas fueron cortadas (Figura 3) y procesadas siguiendo el protocolo de Shevchenko *et al.* (2007). (Anexo 4)

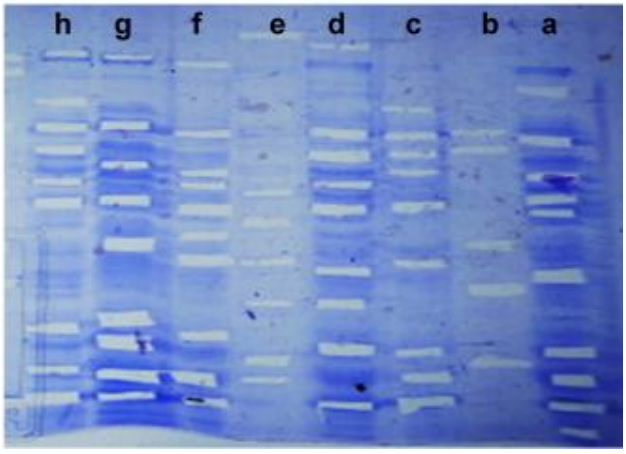


Figura 3: Corte de bandas marcadas con las proteínas migradas en

SDS-PAGE 1D presentes en ocho de las bacterias aisladas de pacientes con FQ del Perú. (a)*Klebsiella variicola,* (b) *Staphylococcus aureus,* (c) *Klebsiella oxytoca,* (d) *Pseudomonas aeruginosa,* (e) *Enterobacter sp,* (f) *Pseudomonas aeruginosa,* (g) *Klebsiella pneumoniae,* (h) *Leclercia adecarboxylata.*

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de las muestras usando el equipo MALDI AB SCIEX TOF/TOF ™ 5800 (Figura 4). Estas, fueron analizadas a un modo reflector MS positivo, interpretadas con modo MS MS 1Kv positivo y los datos analizados con el software protein pilot 4.0 con bases de datos específicas para cada microorganismo.

Figura 4: Ingreso de placa MALDI al equipo MALDI AB SCIEX TOF/TOF ™ 5800 para su respectivo análisis.

Por último, se procedió a corroborar las secuencias de aminoácidos para cada proteína usando el programa de bioinformática protein blast (Figura 5).

Figura 5: Análisis de los datos resultantes, con el software protein pilot 4.0

RESULTADOS

En total se evaluaron los esputos de 21 pacientes con Fibrosis Quística y se efectuó el análisis del esputo según sus características macroscópicas y microscópicas los cuales son mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6: Características macroscópicas y microscópicas de las muestras de esputo de los pacientes con FQ.

ANÁLISIS DE ESPUTO			
N° Paciente	Característica macroscópica	Característica microscópica	
		Promedio	
		CEs	PMNs
1	Verdoso Mucupurulento		-
2	Mucupurelento Espumoso	7	3
3	Mucupurulento Verdoso		-
4	Hemoptoico	8	1
5	Mucupurulento Verdoso	7	1
6	Espumoso Verdoso	6	2
7	Mucupurulento Verdoso	8	0
8	Espumoso Blanquecino	5	1
9	Espumoso Verdoso	8	1
10	Espumoso Amarillento verdoso	7	1
11	Verdoso Viscoso	2	-
12	Verdoso Espumoso	8	-
13	Verdoso Mucupurulento	1	-
14	Espumoso Blanquecino	22	-
15	Espumoso	16	-
16	Verdoso espumoso	3	-
17	Verdoso espumoso	5	-
18	Verdoso Viscoso	5	-
19	Espumoso Blanquecino		-
20	Hemoptoico	5	-
21		12	1

Una vez evaluada la calidad de los esputos de los pacientes se realizaron las siembras por extensión en los diferentes medios de cultivo. Así mismo se observaron diferentes morfologías de crecimiento para cada medio de cultivo (Tabla 7, Figura 6)

Tabla 7: Características de las colonias aisladas en siembra por extensión.

Nº de Paciente	Medio de cultivo	Conteo de colonias	Características de las colonias	Color de colonias
Paciente 1	Agar Sangre	62	Medianas, redondas con halos	blancas
	Agar Cetrimide	Incontables	irregulares	cremas
	Agar Mueller Hinton	Incontables	Irregulares, medianas y pequeñas	cremas
	Agar Burkholderia	10	irregulares	oscuras o marrones
	Agar MacConkey	Incontables	alargadas	fucsias o rosadas
Paciente 2	Agar Sangre	124	grandes y pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	28	pequeñas redondas	incoloras
	Agar Mueller Hinton	61	Pequeñas redondas	blancas
	Agar Burkholderia	Sin crecimiento		
	Agar MacConkey	22	medianas redondas	Fucsias o rosadas
Paciente 3	Agar Sangre	928	Pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	incontables	pequeñas redondas	cremas
	Agar Mueller Hinton	incontables	pequeñas	cremas
	Agar Burkholderia	1	grande circular	blanca
	Agar MacConkey	1504	pequeñas	fucsias o rosadas
Paciente 4	Agar Sangre	incontables	grandes y pequeñas circulares	blancas
	Agar Cetrimide	134	grandes y medianas redondas e	cremas

			irregulares	
	Agar Mueller Hinton	888	pequeñas	cremas
	Agar Burkholderia	incontables	grandes y pequeñas redondas	blancas
	Agar MacConkey	8	pequeñas redondas	blancas
		29	grandes irregulares	fucsias
		incontables	pequeñas redondas	fucsias
paciente 5	Agar Sangre	31	grandes redondas	blancas
		incontables	pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	incontables	pequeñas irregulares	blancas, cremas y amarillas
	Agar Mueller Hinton	170	medianas y pequeñas redondas	blancas
	Agar Burkholderia	7	grandes redondas	blancas
	Agar MacConkey	7	grandes redondas	fucsias o rosadas
		incontables	pequeñas irregulares	fucsias rosadas
Paciente 6	Agar Sangre	incontables	grandes y pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	incontables	pequeñas irregulares	cremas
	Agar Mueller Hinton	incontables	pequeñas y medianas de morfología irregular	cremas
	Agar Burkholderia	68	Grandes y de morfología irregular	blancas y oscuras (marrones)
	Agar MacConkey	9	grandes	fucsias o rosadas
		incontables	pequeñas	fucsias o rosadas

Paciente 7	Agar Sangre	incontables	medianas y pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	incontables	Medianas irregulares y pequeñas redondas	blancas
	Agar Mueller Hinton	220	pequeñas	blancas
		2	grandes	blancas
	Agar Burkholderia	incontables	grandes, medianas y pequeñas de forma irregular	blancas
	Agar MacConkey	2	grandes irregulares	fucsias con halo verde amarillento
		incontables	pequeñas y medianas redondas	fucsias con halo verde amarillento
Paciente 8	Agar Sangre	incontables	pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	no hay crecimiento		
Paciente 9	Agar Sangre	incontables	pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	44	grandes de bordes rugosos	amarillas
	Agar Mueller Hinton	incontables	pequeñas redondas y medianas irregulares	amarillas y cremas
	Agar Burkholderia	14	pequeñas redondas	cremas
	Agar MacConkey	78	medianas irregulares	fucsias
		29	Medianas irregulares	naranjas
Paciente 10	Agar Sangre	incontables	pequeñas redondas	blancas
	Agar Cetrimide	incontables	irregular	Formación de pigmento verde intenso en toda la placa

	Agar Mueller Hinton	1	medianas	blanca
		1	pequeña	amarilla (formación de pigmento verdoso en toda la placa)
	Agar Burkholderia	5	pequeñas	blancas
	agar MacConkey	15	grandes de bordes rugosos	fucsias o rosadas
		incontables	circulares pequeñas	fucsias o rosadas
Paciente 11	Agar Sangre	Incontables	Puntiformes hemolíticas	Blancas
	Agar Cetrimide	1	circular grande	Cremas
	Agar Burkholderia		Irregulares	marrones
	Agar MacConkey	3	Puntiformes	lilas
Paciente 12	Agar Sangre	Incontables	Puntiformes y grandes hemolíticas	blancas
	Agar Cetrimide	2	Puntiformes, grande.	amarilla
	Agar Burkholderia	166	Circulares e irregulares	Plomas, translucidas
	Agar MacConkey	2	Circulares	Colonia con centro fucsia y contorno translucido.
				Colonia con centro lila y contorno plomo.
Paciente 13	Agar Sangre	incontables	Puntiformes	blancas
		79	circulares pequeñas	
		2	circulares grandes	
	Agar	226	Circulares	blancas

	Cetrimide		pequeñas.	
	Agar Burkholderia	Sin crecimiento		
	Agar MacConkey	3	Circulares grandes	Ploma, fucsia
		incontables	Puntiformes	
Paciente 14	Agar Sangre	Incontables	Puntiformes	cremas
	Agar Cetrimide	Sin crecimiento		
	Agar Burkholderia	Sin crecimiento		
	Agar MacConkey	Sin crecimiento		
Paciente 15	Agar sangre	Incontables	Puntiformes	blancas
	Agar Cetrimide	Sin crecimiento		
	Agar Burkholderia	04 colonias	Circulares	Plomas o marrones
	Agar MacConkey	Sin crecimiento		
Paciente 16	Agar Sangre	Incontables	Circulares, medianas, y puntiformes hemolíticas	blancas
	Agar Cetrimide	11	Irregulares	Blancas, cremosas
	Agar Burkholderia	4	Circulares	marrones
	Agar MacConkey	Sin crecimiento		
Paciente 17	Agar sangre	Incontables	Puntiformes,	Blancas
			Circulares pequeñas	
			Hemolíticas	
	Agar Cetrimide	Incontables	Circulares, puntiformes.	Blancas, cremas.
				Verdes
	Agar Burkholderia	Incontables	Manchas.	Plomas translucidas
	Agar MacConkey	Incontables	Circulares y puntiformes	Opacas
Paciente 18	Agar Sangre	Incontables	Puntiformes	Blancas
	Agar Cetrimide	152	Circulares, medianas	Blancas

	Agar Burkholderia	445	Circulares pequeñas	Plomas o marrones
	Agar MacConkey	Incontables	Puntiformes	Translucidas
Pacientes 20	Agar Sangre	Incontables	Puntiformes	plomas
		3	circulares	blancas
	Agar Burkholderia	Sin crecimiento		
	Agar cetrimide	324	circulares	Translucidas
	Agar MacConkey	5	circulares	transparentes
	Agar Muller Hinton	217	circulares	blancas
Paciente 21	Agar Sangre	20	circulares	cremas
		2		blancas
		incontables	puntiformes	transparentes
	Agar Burkholderia	4	circulares pequeñas	plomas
	Agar cetrimide	incontables	irregulares	transparentes
		1	Circulares grandes	amarillo verdoso
	Agar MacConkey	4	Circulares grandes con pigmentación verde	fucsias
		3	circulares pequeñas	
	Agar Chapman	Sin crecimiento		

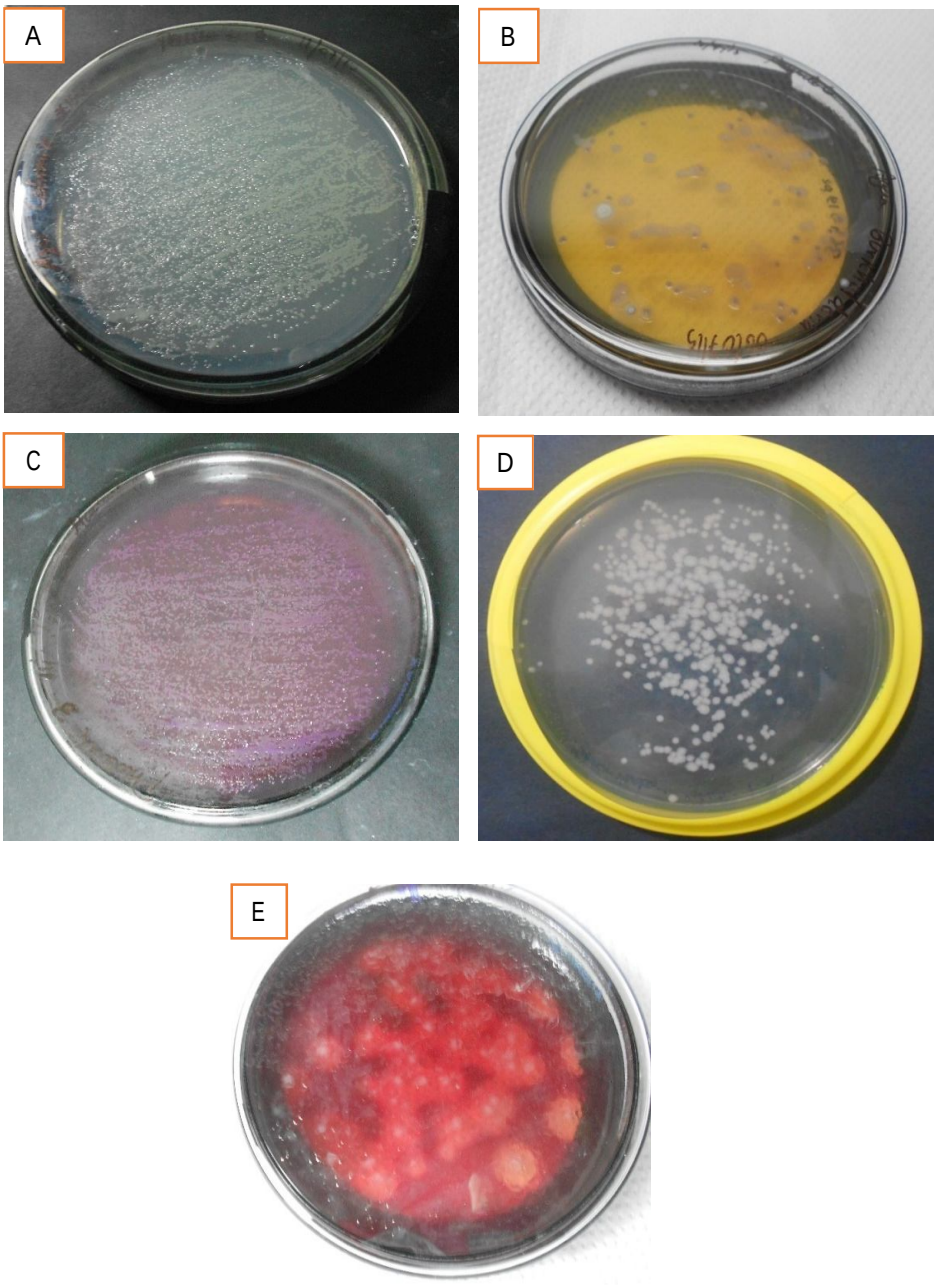


Figura 6: Crecimiento microbiano en agar Cetrimide (A), agar Burkholderia (B), agar Mac Conkey (C), agar Muller Hinton (D) y agar Sangre (E).

Una vez obtenidos los cultivos bacterianos puros, se realizó la extracción de ADN y amplificación del gen 16S ARNr (Figura 7)

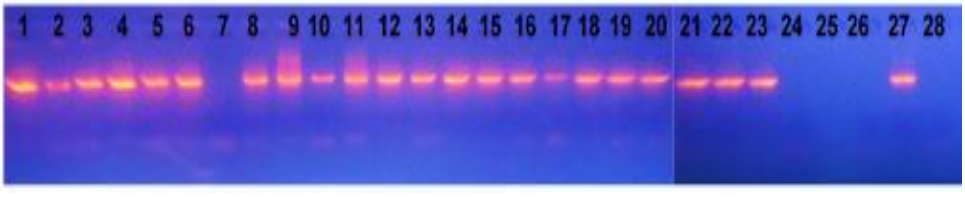
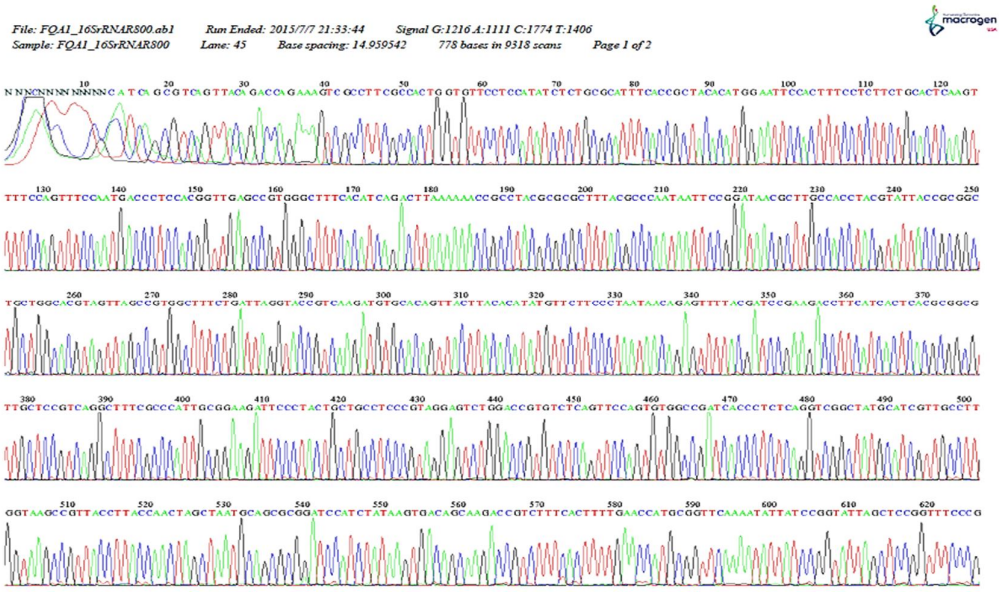


Figura 7: Gel de electroforesis de los resultados de la amplificación del gen 16S ARNr: carril 1 al 25 se muestran las bandas de amplificación de aproximadamente 1500 pb; el carril 26 corresponde al control de extracción de ADN, el carril 27 al control positivo y el 28 al control negativo.

Posteriormente los amplicones se enviaron a secuenciar obteniéndose las secuencias bacterianas en dos tipos de formatos: en texto e imagen conocido como cromatograma (Figura 8)

Figura 8: Cromatograma de la secuencia de ADN bacteriano



Los resultados de la secuenciación de todas las bacterias fueron analizados usando los programas bioinformáticas MEGA 6 y BLAST (Figura 9), con estos dos programas se pudo identificar variedad de bacterias como se muestra en la Tabla 9.

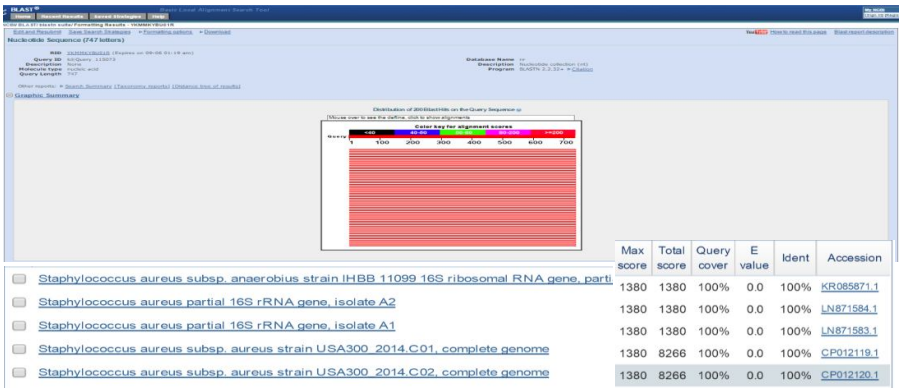


Figura 9: Análisis en programa BLAST correspondiente a la secuencia de ADN de *Staphylococcus aureus*

En este estudio se lograron aislar un total de 127 cepas (basándose en las diferencias del fenotipo de colonias) de 21 pacientes peruanos con FQ. El análisis de secuencias del gen 16S ARNr permitió identificar bacterias a diferentes niveles taxonómicos lo que incluyó 11 familias, 25 especies y 10 identificaciones a nivel de género. La familia Pseudomonadaceae presentó el mayor número de cepas (56), seguido por Enterobacteriaceae (21), Staphylococcaceae (21) y Bacillaceae (8). En términos de diversidad, la familia Enterobacteriacae presentó 11 especies, seguida por Bacillaceae (6) y Streptococcaceae (4). A nivel de cepas las bacterias cultivables más aisladas fueron *Pseudomonas aeruginosa, Stapylococcus aureus, Pseudomona sp, Klepsiella oxytoca*. Otros microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, Bacillaceae, etc se presentaron en menores cantidades (Tabla 8, Figura 10). Las cepas caracterizadas hasta el nivel de especie estuvieron reconocidas con un nivel de similitud (99%-100%) con la principal base de datos mundial NCBI.

Tabla 8. Bacterias aisladas a partir de 21 muestras de esputo de pacientes peruanos con FQ.

Microorganismos	Familia	N° de aislamientos	Frecuencia de aislamientos (%)	N° de pacientes	Frecuencia de pacientes (%)
Pseudomonas aeruginosa	Pseudomonadaceae	40	31.5	13	61.9
Staphylococcus aureus	Staphylococcaceae	16	12.6	7	33.3
Pseudomonas sp.	Pseudomonadaceae	15	11.8	10	47.6
Klebsiella oxytoca	Enterobacteriaceae	4	3.1	2	9.5
Staphylococcus epidermidis	Staphylococcaceae	3	2.4	2	9.5
Enterobacter hormaechei	Enterobacteriaceae	3	2.4	3	14.3
Enterobacter cloacae	Enterobacteriaceae	3	2.4	2	9.5
Enterococcus faecalis	Enterococcaceae	3	2.4	3	14.3
Staphylococcus sp.	Staphylococcaceae	2	1.6	2	9.5
serratia marcescens	Enterobacteriaceae	2	1.6	2	9.5
Klebsiella pneumoniae	Enterobacteriaceae	2	1.6	1	4.8
Klebsiella variicola	Enterobacteriaceae	2	1.6	2	9.5
Enterobacter sp.	Enterobacteriaceae	2	1.6	2	9.5

Neisseria flavescens	Neisseriaceae	2	1.6	2	9.5
Bacillus thuringiensis	Bacillaceae	2	1.6	2	9.5
Bacillus cereus	Bacillaceae	2	1.6	2	9.5
Achromobacter sp.	Alcaligenaceae	2	1.6	2	9.5
Streptococcus mitis	Streptococcaceae	2	1.6	2	9.5
Streptococcus pyogenes	Streptococcaceae	2	1.6	1	4.8
Stenotrophomonas sp.	Xanthomonadaceae	2	1.6	2	9.5
Streptococcus sp.	Streptococcaceae	2	1.6	2	9.5
Bacillus subtilis	Bacillaceae	1	0.8	1	4.8
Achromobacter xylosoxidans	Alcaligenaceae	1	0.8	1	4.8
Achromobacter denitrificans	Alcaligenaceae	1	0.8	1	4.8
Klebsiella sp.	Enterobacteriaceae	1	0.8	1	4.8
Leclercia adecarboxylata	Enterobacteriaceae	1	0.8	1	4.8
Serratia sp.	Enterobacteriaceae	1	0.8	1	4.8
Bacillus vallismortis	Bacillaceae	1	0.8	1	4.8
Bacillus sp.	Bacillaceae	1	0.8	1	4.8
Bacillus pumilus	Bacillaceae	1	0.8	1	4.8
Pseudomonas luteola	Pseudomonadaceae	1	0.8	1	4.8
Stenotrophomonas maltophilia	Xanthomonadaceae	1	0.8	1	4.8
Streptococcus salivarius	Streptococcaceae	1	0.8	1	4.8
Acinetobacter haemolyticus	Moraxellaceae	1	0.8	1	4.8
Paenibacillus sp.	Paenibacillaceae	1	0.8	1	4.8
25 especies, 10 géneros	**11 familias**	**127 cepas**	**100.0**	**21 pacientes**	

En cuanto al análisis epidemiológico, se observó que la población de pacientes peruanos esta principalmente colonizada por *P. aeruginosa* (61,9%), seguida por *Pseudomonas sp. (*47,6%), *S. aureus* (33,3%), *E. hormaechei, E faecalis*

(14.3%) que fueron encontrados en 13, 10, 7 y 3 pacientes, respectivamente.

Entre los patógenos más asociados a la degradación pulmonar resaltan *P, aeruginosa, S. aureus, y Stenotrophomonas maltophilia,* mientras *Achromobacter xylosoxidans* es considerada una cepa patógena emergente *(*Parkins *et al., 2015).*

Varios pacientes contaban con contaminaciones cruzadas de tipo *P. aeruginos/P.spp.* (5) o *P.aeruginosa/S.spp./S.aureus* (3) *P. aeruginosa/S.maltophilia* (1) (datos no presentados).

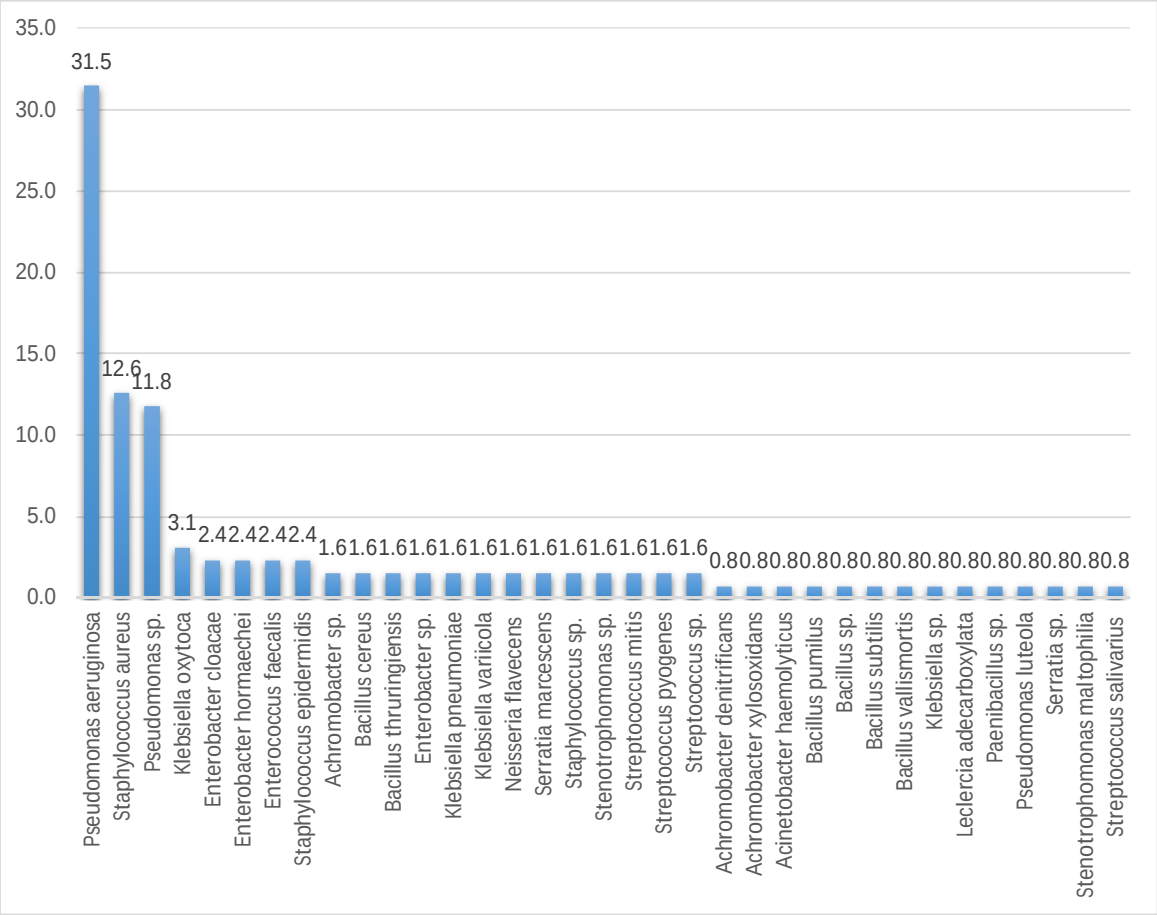


Figura 10: Frecuencia relativa de los patógenos identificados en los pacientes con FQ.

Para el análisis de MALDI TOF se incluyeron 69 cepas bacterianas aisladas de los pacientes con FQ, de las cuales se obtuvo espectros de 25 especies identificadas de las cepas mencionadas.

A continuación se describen las especies analizadas por MALDI TOF (Tabla 9).

Tabla 9: Especies analizadas por espectrometría de masas MALDI TOF

Familia	Especie
Peudomonadaceae	*Pseudomonas aeruginosa*
	Pseudomonas sp
	Pseudomonas luteola
Staphylococcaceae	*Staphylococcus aureus*
	Staphylococcus sp
	Staphylococcus epidermidis
Enterobacteriaceae	*Klebsiella oxytoca*
	Klebsiella variicola
	Klebsiella pneumoniae
Alacaligenaceae	*Achromobacter sp*
	Achromobacter xylosoxidans
	Achromobacter haemolyticus
Bacillaceae	*Bacillus Thuringiensis*
Streptpcoccaceae	*Streptococcus pyogenes*
	Streptococcus mitis
	Streptococcus sp
Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas maltohilia*
	Stenotrophomonas sp
Enterobacteriaceae	*Serratia sp*
	Leclercia adecarboxylata
	Enterococccus faecalis
	Enterococcus cloacae
	Enterobacter sp
Paenibacillaceae	*Penibacilus sp*
Lactobacillaceae	*Lactobacillus sp*

Los espectros visualizados de cada una de las cepas analizadas son mostrados en la parte inferior, donde se puede observar los picos con las masas representativas de las proteínas de cada especie (Figura 11-78). En el caso del análisis por MALDI TOF TOF, se seleccionaron 14 cepas de los cuales se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 10.

DISCUSIONES

La caracterización molecular de los patógenos en niños con Fibrosis Quística se inició con el aislamiento microbiológico utilizando diversos medios de cultivos selectivos y diferenciales para el crecimiento de los patógenos bacterianos habituales, los tiempos de crecimiento fueron en su mayoría entre 24 y 48 horas en algunos se les extendió el tiempo de crecimiento para facilitar la recuperación de microorganismos que se encuentren en baja proporción (máximo 5 días), sobre todo si existe una colonización simultánea con *P. aeruginosa* (Oliver *et al*., 2009). En los medios de cultivo selectivos sembrados como el Agar Cetrimide, el patógeno *P.aeruginosa* creció en la mayoría de pacientes. Algunas colonias de este patógeno presentaban una pigmentación verde producto de la piocianina y aveces podían también mostrar una consistencia mucosa. Esta bacteria es la más prevaleciente en los niños enfermos con FQ y es adquirido en etapas tempranas de vida de los pacientes principalmente de fuentes ambientales (Kidd *et al*., 2014). En nuestra investigación también pudieron ser aisladas en agar Mac Conkey y Sangre según la secuenciación y su análisis en BLAST.

En cuanto a los cultivos realizados en Agar Burkholderia cepacia complex que es específico para el crecimiento del grupo de bacterias asociadas a *B. cepacia,* se observó crecimiento en algunos paciente sin embargo al corroborar con el análisis en BLAST, de las secuencias de ADN de las bacterias aisladas allí, resultaron ser enterobacterias y *Stenotrophomonas sp*. Entre tanto en el medio diferencial Agar Mac Conkey, en el cual se esperaba obtener crecimiento de bacterias patógenas Gram negativas no fermentadores (Cystic Fibrosis Trust, 2010; Burns & Rolain, 2013) obtuvimos enterobacterias como *Klebsiella varicola, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter hormaechei, Achromobacter denitrificans, etc.;* pero en su mayoría el patógeno aislado fue *Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas sp.* Las enterobacterias se pueden aislar del tracto respiratorio de pacientes con FQ, aunque generalmente son colonizaciones transitorias y no están relacionados con enfermedad grave (Oliver *et al*., 2009).

En el medio de Agar Sangre en el cual también crecen diversas bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* se observó crecimiento bacteriano *Staphylococcus aureus* en su mayoría y en menor proporción *Streptococcus pyogenes, Streptococcus mitis y Klebsiella oxytoca mediante secuenciación del ARNr. S. aureus* fue el primer microorganismo reconocido como causante de infección pulmonar crónica en pacientes con

FQ. La persistencia de este patógeno depende fundamentalmente de su capacidad de adhesión al epitelio respiratorio y para evadir la respuesta inmunitaria una vez producida la colonización.

En cuanto al medio de cultivo nutritivo no selectivo Agar Mueller Hinton, el cual promueve el crecimiento de diferentes tipos de bacterias patógenas, se halló amplio crecimiento de bacterias. Las bacterias patógenas que podrían aislarse en este medio son las siguientes: *Staphylococcus aureus*, *P.aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus spp*. Beta hemolítico, *B. cepacia* y *Burkholderia pseudomallei* sin embargo solo se halló *Pseudomonas sp.* y *S. aureus* como bacterias patógenas.

Por otro lado también se identificaron patógenos emergentes en dos pacientes, estos patógenos fueron los siguientes *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans* (Dalboge *et al*., 2011), este tipo de bacterias se encuentran más frecuentemente que *Burkholderia cepacia complex* en pacientes con FQ y en enfermedades pulmonares avanzada. Por otro lado *S. maltophilia* es un bacilo Gram negativo no fermentador que resiste a la mayoría de los antimicrobianos y los factores que predisponen a la colonización por este microorganismo es precisamente el uso prolongado de antimicrobianos (Oliver *et al*., 2009).

Los métodos basados en técnicas de secuenciación de ADN son cada vez menos costosos y más frecuentes en el entorno clínico. La secuenciación del gen 16S ARNr sigue siendo la técnica estándar para la taxonomía bacteriana. Esta técnica es muy útil por el carácter universal del gen 16S ARNr, el cual es lo suficientemente grande y específico para diferenciar especies mediante bioinformática (Janda y Abbott., 2007).

Mediante el secuenciamiento del gen 16S ARNr, se encontraron un total de 25 especies, 10 identifificaciones hasta género, y 11 familias, las especies más predominantes fueron *Pseudomonas aeruginosa* (31.5%)*, Staphylococcus aureus* (12.6%), y *Pseudomonas sp* (11.8%) (Cuadro 1). Es importante notar la presencia adicional de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* que son también considerados patógenos importantes encontrados en este estudio. Estos resultados son los primeros obtenidos a partir de un número significativo de muestras (21 pacientes de los 49 registrados osea (42.8%) (Samieniego S., com.Pers.,) en el país.

La bacteria con mayor predominancia en este estudio fue *Pseudomonas aeruginosa* (31.5%). *P. aeruginosa,* se encontró en 13 de 21 (61.9%) de los pacientes analizados, lo que no es sorprendente por ser uno de los patógenos oportunistas más representativos reportados para esta enfermedad y se encuentra en aproximadamente el 80% de los pacientes con FQ (Hampton *et al*., 2014). Esta bacteria es la presunta causante de la mayoría de las exacerbaciones pulmonares y por lo tanto, el principal objetivo del tratamiento antibiótico en los pacientes con FQ (Hurley *et al*., 2012). La presencia de *P. aeruginosa* en cultivos de las vías respiratorias se ha asociado con una disminución más rápida de la función pulmonar, especialmente cuando el fenotipo mucoide está presente (Emerson *et al*., 2002). Sin embargo, Vandenbranden *et al.,* (2012) encontraron que la presencia o ausencia de *P. aeruginosa* o *P. aeruginosa* mucoide no era predictivo del deterioro de la función pulmonar.

Otro de los patógenos más representativos de los pacientes peruanos fue *Staphylococcus aureus* (12.6% de los aislados) también reportado como uno de los patógenos más virulentos y predominante en pacientes con FQ (Johnson *et al.*, 2016, Sibley *et al*., 2006). Dentro de los *S. aureus*, existen varios fenotipos como los MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus)* antiguamente conocidos como SCV (Small colony variant) que representan una amenaza para los pacientes infectados (Seifert *et al*., 1999). El factor de virulencia se asocia a menudo con la resistencia a la meticilina, otrogada por una exoproteína llamada Panton Valentine leucocidina (PVL). Cepas de MRSA han sido asociadas con el desarrollo de infecciones pulmonares invasivas incluyendo absceso pulmonar en pacientes con FQ (Elisur *et al.,* 2007) y capacidades de resistencias a un amplio espectro de diferentes antibióticos (Proctor *et al*, 2006;. Fusor *et al.,* 2010; Besier *et al.,* 2007; Smyth, 2005; Davies *et al*., 2009). Los pacientes más jóvenes expuestos a antibioterapias severas con antifolatos y aminoglucósidos son más propensos a adquirir MRSA (Kahl *et al*, 1998; Massey *et al*, 2001). En este estudio no pudimos observar MRSA, ni fenotípicamente ni por proteomica. El diagnóstico de este tipo de *S. aureus* en efecto requiere de métodos de diagnóstico dependientes de cultivo o por PCR que podrían ser aplicados a futuro (Harbarth *et al*., 2011).

Bacterias del género Achromobacter, tales como; *Achromobacter sp* (1.6%), *Achromobacter xylosoxidans* (0.8%), *Achromobacter denitrificans* (0.8%), (Cuadro 1) también fueron aisladas. Las especies pertenecientes a este género son microorganismos ambientales cultivados a partir de una gama de hábitats naturales y son patógenos oportunistas que muestran una mayor resistencia a un amplio espectro de antibióticos (Amoureux *et al.,* 2013, Wittmann *et al*., 2014). Por otra parte, *Achromobacter xylosoxidans* es un patógeno emergente

cada vez más aislado de muestras de pacientes con FQ. Su papel e importancia clínica en la patogénesis de pulmón aún no se han aclarado (Magni., 2010).

En la FQ los pacientes están predispuestos a la infección respiratoria crónica por bacilos, Gram negativos no fermentadores incluyendo *Stenotrophomonas maltophilia*. *S. maltophilia* es altamente resistente a la mayoría de los antibióticos, con la excepción de sulfametoxazol-trimetoprima (SXT). Se ha reportado la existencia de S. maltophilia resistentes a SXT sin poder elucidar el mecanismo de resistencia (Anderson *et al.,* 2007). En este estudio también encontramos *S. maltophilia* que fue aislado de la muestra de esputo de un paciente con FQ.

Dentro de las principales especies patógenas se observa la ausencia de *Streptococcus pneumoniae* y *Burkholderia cepacia complex* que no fueron detectados. *Haemophilus influenzae* es considerado problemático a fuertes concentraciones no fue evaluado en este estudio ya que necesita medios y condiciones de crecimiento particulares. (Hogart *et al*., 2009, Denton *et al.,* 2010, Coman *et al*., 2012).

En conjunto nuestros resultados difieren significativamente a los presentados por dos investigadores peruanos; Vela (2002) que determinó que *P. aeruginosa* estaba presente en el 81% de las muestras de esputo analizadas, seguidos por *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus pneumoniae* y Castilla (2008) que identificó que *P. aeruginosa, S. aureus* eran los primeros patógenos colonizadores en 35% y 25% de los casos, respectivamente. También analizó que *P. aeruginosa* estaba presente en el 72% de los casos de fallecimientos. Sin embargo, estos autores habían trabajado sobre número de muestras muy limitadas y evaluando únicamente *S. aureus* y *P. aeruginosa por métodos de cultivo*. La ausencia de análisis genómicos en el estudio sugiere que los 81% de las cepas reconocidas como *P. aeuginosa* sean en verdad *P.aeruginosa* + *Pseudomonas sp*, mientras que las bajas prevalencias de *S.aureus* y *P.aeruginosa* encontradas por Castilla son extrañamente bajas.

En nuestro estudio varios pacientes contaban con contaminaciones cruzadas de tipo *P. aeruginosa/Pseudomonas sp*. (5) o *P.aeruginosa/Pseudomonas sp./S.aureus* (3) *P. aeruginosa/S.maltophilia* (1) (datos no presentados). La presencia de múltiples patógenos en un mismo paciente ha sido evidenciada frecuentemente debido a que todos estos patógenos son bacterias oportunistas ubiquitarias presentes en abundancia en suelos, aguas, que son comensales de la piel o de la boca o de animales domesticados (Ramsay *et al*., 2016, Beck *et al*., 2012). Estas cepas “silvestres” terminan adaptándose a las condiciones

de pulmones y terminan adquiriendo progresivamente resistencia a los antibióticos (Parkins *et al*., 2015, Ramsay *et al*., 2016). Es importante resaltar que probablemente una buena proporción de las cepas de *Pseudomonas sp*. sean en verdad *Pseudomonas aeruginosa* pero con mayor similitud de secuencia con cepas aisladas de muestras ambientales y registradas como *Pseudomonas sp.* (Ramsay *et al*., 2016)

Una particularidad interesante en los aislamientos realizados en pacientes con FQ en Perú y que no ha sido reportada es la presencia de varias cepas de *Bacillus* y *Klebsiellas*. Estos géneros no son muy comunes en FQ, tampoco en la flora de pulmones sanos que son generalmente dominados por *Pseudomonas, Streptococcus Prevotella, Fusobacteria, Veillonella, Haemophilus* y *Neisseria* basados en estudios de metagenómica (Beck *et al*., 2012). Es interesante reportar que estas cepas fueron generalmente aisladas de pacientes más jóvenes que presentaban una mayor diversidad de gérmenes en sus pulmones. La pérdida de diversidad microbiana en las vías respiratorias de pacientes con FQ es característica y resulta de la eliminación no selectiva por tratamientos antibióticos y de la fuerte capacidad de desplazamiento/resistencia a antibióticos de las cepas patógenas como *P. aeruginosa, S. aureus* o BCC (Fodor *et al*., 2012, Rudkjøbing *et al*., 2011).

Además de considerar la edad, la microbiota puede ser fuertemente influenciada por la geografía, debido a que es razonable suponer que las comunidades microbianas podrían diferir en función del clima, la microbiota ambiental, la exposición a otras personas, e incluso animales domésticos (Beck *et al*., 2012). Por ejemplo, en uno de los pocos estudios para evaluar las comparaciones geográficas, muestras de esputo de 19 pacientes con fibrosis quística en un solo centro en el Reino Unido se compararon con muestras de 19 pacientes en un solo centro de Estados Unidos (Stressmann *et al*., 2011). Las diferencias en las especies fueron evidentes entre los dos grupos y los análisis de conglomerados mostraron diferencias geográficas significativas en la composición de la comunidad, abundancia y diversidad (Beck *et al.*, 2012). En un país megadiverso como el Perú, los análisis de metagenómica podrían ser interesantes en particular para evaluar la microbiota de pacientes que viven en ambientes tan diferentes como la sierra, la costa, y la selva.

En el presente estudio también utilizamos la tecnología de espectrometrías de masas MALDI-TOF MS con el fin de obtener espectros de masas representativos de los patógenos bacterianos comunes de los pacientes peruanos, que previamente habían sido caracterizados mediante la

secuenciación del gen 16S ARNr. El desarrollo de la secuenciación del gen 16S ARNr ha logrado proporcionar resultados confiables, pero la espectrometría de masas MALDI-TOF es un método emergente rápido, de bajo costo y confiable para la identificación de especies bacterianas cultivables basada en proteomica (Veloo *et al.,* 2012, Veloo *et al*., 2014, Hsu y Burnham, 2014)

Sin embargo, varios autores reportan que la "no identificación" de algunas cepas por MALDI-TOF MS está asociada con la aún limitada disponibilidad de espectros en las bases de datos. Algunos estudios muestran que usando una base de datos comercial se mejora la identificación rutinaria de aislados de FQ (Fernández-Olmos *et al*., 2012). Estas bases de datos específicas principalmente han sido desarrolladas en los espectrómetros de masa del constructor Bruker. El equipo utilizado en este estudio no cuenta con este tipo de bases. Ello nos condujo a la necesidad de construir nuestra propia base de espectros a partir de bacterias caracterizadas por 16S ARNr. Esta base podrá ser usada en estudios posteriores en particular para la identificación de bacterias recuperadas de pacientes con FQ. Además, esta base requerirá ser actualizada y ampliada continuamente para enriquecerla con una gama más amplia de especies microbianas incluyendo organismos no frecuentes o raros, recuperados con FQ (Fernández-Olmos *et al.,* 2012).

Nosotros obtuvimos espectros de masas de todas las especies aisladas y caracterizadas molecularmente, sin embargo, se presentan los espectros de masas de las bacterias más comunes y más frecuentes de los pacientes peruanos (Figura 1, 2, 3 4). Como se puede observar los perfiles espectrales son muy diferentes y característicos entre las especies. La implementación del sistema de MALDI-TOF MS en los procesos de identificación de rutina de aislados de FQ no sólo reducirá el tiempo de informe sino que también proporcionará información de valor para el tratamiento antimicrobiano. Además, la correcta identificación de los microorganismos se ha destacado en las directrices de control de infecciones de pacientes con FQ como un primer paso en su manejo clínico (Saiman, 2003, Kerem, 2005).

La proteómica basada en espectrometría de doble masa está desarrollándose rápidamente en la investigación médica, en particular la proteómica comparativa que relaciona el proteoma de individuos sanos y enfermos. (Davezac *et al.,* 2004; Sloane et al., 2005; Ollero et al., 2006; Roxo-Rosa *et al*., 2006; *Gharib et al., 2009)*. En este estudio, utilizamos la técnica de MALDI TOF/TOF (MS/MS), con el objetivo de obtener péptidos a partir de las cepas

bacterianas aisladas. Esta técnica involucra el fraccionamiento de proteínas que son separadas por tiras de punto isoeléctrico en función de su carga neta, seguido de la separación de la masa molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Carette, Burkhard, Sánchez, y Hochstrasser, 2006; Holcăpek, Jirásko, y Lısa, 2012).

La subsecuente identificación de los péptidos obtenidos frente a base de datos de los principales patógenos bacterianos, mostró altos porcentajes de confiabilidad de identificación (Cuadro 2). Algunos de los fragmentos de proteínas obtenidas están relacionados con patogenicidad o exacerbaciones producidas por bacterias de las vías respiratorias de los pacientes con FQ.

Dentro del total de proteínas, más conocidas que se encontraron a partir de *P. aeruginosa* (Cuadro 2). La proteína GroEL pertenece a la familia de proteínas de choque térmico bacteriano de 60-65 kDa. Los estudios han reportado que una fuerte respuesta de anticuerpos a GroEL se ha encontrado en pacientes con FQ con infecciones pulmonares crónicas causada por *P. aeruginosa* (Ullanova, 1997). Otro péptido abundantemente encontrado pertenece a la proteína de membrana externa porina F (OprF), que se conserva a través de aislados clínicos (Mutharia *et al*., 1983, Yoshimura., 1983). En una comparación entre las biopelículas de *P. aeruginosa* producidas en condiciones aeróbicas y anaeróbica*s,* la OprF estuvo sobre expresada hasta 39 veces durante el crecimiento anaeróbico (Kathryn *et al*., 2015, Yoon *et al*., 2002). Adicionalmente, la OprF ha recibido atención como un inmunógeno que confiere protección a ratones desafiados experimentalmente para la inmunogenicidad como una vacuna anti *P. aeruginosa* en seres humanos (Krause *et al.,* 2013, Westritschnig *et al*., 2014, Thomas *et al*., 2009, Baumann *et al*., 2004, Weimer 2009, Krause *et al*., 2011, Worgall *et al*., 2005). Es abundantemente expresada en la membrana externa de *P.aeruginosa.*

En *Pseudomonas sp.* se identificó la proteína DNA gyrase subunit B. Estudios anteriores han mostrado que el dominio de unión a ATP N-terminal de la ADN girasa subunidad B, es un blanco terapéutico validado para el descubrimiento de fármacos antibacterianos. Sin embargo, la información estructural para este dominio (pGyrB) sigue limitada (Li *et al*., 2015).

Las proteínas que se encontraron en el patógeno *Staphylococcus aureus* fueron glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 , phosphoglycerate mutase 1 family protein, enolase, class II fumarate hydratase. Se ha reportado

que dos de estas proteínas participan en la patogénesis de la enfermedad; 1) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), tiene una actividad glucolítica clave, es irreversiblemente oxidada bajo estrés oxidativo y es responsable del sostenimiento del patógeno dentro del huésped (Mukherjee, *et al.,* 2010), y 2) Enolasa es una enzima conservada evolutivamente que juega un papel central en la producción de energía a través de la glucólisis. Además, enolasa se encuentra en la superficie de *S. aureus* y participa en los procesos que conduce a la infección (Wu *et al*, 2015).

En las especies de la familia enterobacteraceae, la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, mostró las proteínas; Factor de elongación Tu, OmpK36 porin, Outer membrane protein C, que se asocian con los factores de patogenicidad en la leucopenia que es causada por bacteriemia de Klebsiella (Liu *et al*., 2014). Estudios previos también han reportado otras proteínas como S-adenosilmetionina sintetasa, piruvato deshidrogenasa, glutatión sintetasa, UDP-galactosa-4- epimerasa, acetato quinasa A y factor de elongación Tu (EF-Tu). La proteína EF-Tu podría ser un factor de patogenicidad potencial de leucopenia causada por *Klebsiella pneumoniae* (Liu et al., 2014) y también se reporta en este estudio. Las proteínas OmpK36 porin se relacionan con la resistencia al antibiótico carbapenen. Las porinas más relevantes con resistencia carbapenem en *Klebsiella pneumoniae* es OmpK36 (Yoshimura *et al.,* 1983; Alberti *et al.,* 1995; Domenech-Sanchez *et al*., 2003). Esta porina permite que carbapenem se difunda en la célula bacteriana, por lo tanto, la falta o la disminución de la expresión de porinas conduce a la resistencia a carbapenem. La presencia de esta porina indicaría indirectamente que esta bacteria seria sensible a carbapenem lo que es una importante información para la elección de una terapia antibiótica adecuada.

Otras proteínas identificadas en *Klebsiella pneumoniae* fueron Outer membrane protein C, Outer membrane protein A. La proteína de membrana externa A (OmpA) es una clase de proteínas altamente conservadas en la familia Enterobacteriaceae y al largo de la evolución (Poolman, 1996). De hecho en nuestro estudio esta proteína también se encontró en *Enterobacter cloacae*. Las bacterias Gram-negativas expresan otras proteínas de membrana externa (OMP) como OmpA y porinas (OmpC y OmpF). OmpF fue también identificada en *E. cloacae*. Dentro de las funciones atribuidas a la OmpA están el mantenimiento de la integridad estructural celular y un rol en la conjugación bacteriana en unión a bacteriófagos y en el crecimiento celular. También contribuye a la capacidad de las bacterias Gram-negativas para invadir células de mamíferos (Jeannin *et al.,* 2002)

La familia de reguladores transcripcionales TetR fue identificada en *Achromobacer sp*. Los reguladores TetR están involucrados en el control transcripcional de una multitud de sistemas y vías, incluyendo resistencia a múltiples fármacos, producción de antibióticos, patogenicidad, *quórum sensing*, estrés osmótico, formación de biopelículas, citocinesis y diversas vías catabólicas (Aramaki *et al*., 1995, Deng, *et al*., 2013). Las proteínas TetR exhiben un alto grado de conservación de la secuencia en la región N-terminal de unión a ADN, y están implicadas en la regulación de mecanismos de resistencia a múltiples fármacos. (Ramos, *et al.,* 2005, Yu, *et al.,* 2010)

El análisis por MALDI TOF TOF también permitió encontrar un fragmento de adenilato ciclasa (AC) en *Ahromobacter xylosidans.* AC es una enzima que cataliza la conversión de Adenosin trifosfato (ATP) a adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y pirofosfato inorgánico (PPi). Es mediador de muchas actividades fisiológicas y está implicado en procesos tales como secreción de insulina, respuestas inmunológicas, también está vinculado con condiciones de enfermedades o predisposiciones particulares tales como FQ, diabetes tipo 2 y arritmias (Cooper y Tabbasum, 2014).

Estudios proteómicos han mostrado que para los géneros Bacillus las proteínas de la pared celular, las citosólicas y aquellas ubicadas en el espacio extracelular son similares entre sí. En dichos estudios se identificaron las proteínas citosólicas: enolasa, GroEL, PdhB entre otras (Gohar *et al.,* 2005). Nuestro estudio también encontró las proteinas enolasa, GroEL, en *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus pumilus*.

Es importante, destacar que algunas proteínas encontradas en este estudio, no han reportado la relación en la fisiología de la enfermedad FQ. Son necesarios estudios más amplios y a profundidad de proteomica para lograr comprender la relación que existe entre las proteínas expresadas por las bacterias y la enfermedad.

CONCLUSIONES

El 95% de los pacientes con FQ mueren por fallas respiratorias debidas a las infecciones microbianas crónicas. En Perú, de los 49 pacientes diagnosticados solo 2 son mayores de edad. De hecho la edad promedio de fallecimiento es inferior a 14 años mientras que alcanza los 25 años en América latina y sobrepasa los 35 años en los países del Norte. La identificación y la caracterización temprana de los patógenos que colonizan las vías respiratorias inferiores son centrales para prevenir la degradación rápida de los pulmones de los pacientes con FQ.

Este estudio colectó muestras de esputos de 21 de los 49 pacientes entregados de forma voluntaria por pacientes de todo el país. Las muestras fueron analizadas mediante técnicas de cultivo microbiológico clásicas asociadas a técnicas de identificación moleculares por secuenciamiento del gen 16S ARNr, realización de perfiles proteicos por MALDI TOF y secuenciación de péptidos microbianos por MALDI TOF TOF.

Un total de 127 colonias representando 11 familias, 25 especies y 10 géneros diferentes fueron aisladas y molecularmente caracterizadas. El análisis epidemiológico de cepas patógenas reveló que los pacientes peruanos están principalmente colonizados por *P. aeruginosa* (61,9%), seguido por *Pseudomonas sp.* (47,6%), *S. aureus* (33,3%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4,8%) *Achromobacter xylosoxidans* (4.8%). De los 21 pacientes 9 contaban con al menos 2 patógenos al mismo tiempo.

Se logró obtener el perfil proteómico de cada cepa aislada. La asociación de las secuencias del 16S ARNr y de los espectros de masas permitió elaborar la primera base de datos del país a partir de cepas nativas, abriendo el camino al diagnóstico clínico por análisis MALDI TOF.

La obtención y comparación de las secuencias peptídicas de las principales cepas patógenas con bases de datos de proteínas concordaron con las identificaciones realizadas por 16S ARNr. Es la primera vez que se utiliza el MALDI TOF TOF como herramienta de identificación en diagnóstico de patógenos asociados a la FQ.

Las tecnologías desarrolladas han mejorado la capacidad de diagnóstico del país mientras que los resultados obtenidos correspondieron al primer estudio epidemiológico representativo de la microbiota cultivable presente en las vías aéreas de pacientes con FQ en el Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Anderson S, Stapp J, Burns J, Qin X. Characterization of Small-Colony-Variant *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from the Sputum Specimens of Five Patients. J Clin Microbiol. 2007;45(2):529-35.

Aramaki, H., Yagi, N. and Suzuki, M. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng*. 1995:8;1259–1266.

Amoureux L, Bador J, Fardeheb S, Mabille C, Couchot C, Massip C, Salignon AL, Berlie G, Varin V, Neuwirth C. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2013;79 (23):7142-7149

Azghani A, Idell S, Bains M, Hancock R. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog* 2002;33:109–114.

Baumann U, Mansouri E, von Specht BU. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against Pseudomonas aeruginosa infections. *Vaccine* 2004;22:840–847.

Beck J, Youngc V, Huffnagleb G. The Microbiome of the Lung. *Translational Research*. 2012; 160(4): 258–266

Berens C, Hillen W. Gene regulation by tetracycline. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem*. 2003:270;3109–3121

Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Microbiol* 2007;168:172-45.

Bittar F, Rolain J. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *ClinMicrobiol Infect* 2010; 16: 809–20.

Burns J, Rolain J. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity. *Journal of Cystic Fibrosis*.2013; 13(1): 1-9

Carrette O, Burkhard P, Sanchez J, Hochstrasser D. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: A key tool of proteomics research. *Nature Protocols*. 2006;1:812–823.

Castilla G. Epidemiología de infecciones respiratorias en pacientes con Fibrosis Quística en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. *Rev Peru Pediatr*. 2008; 61(2)

Collazo T, Cuétara E, Bofill A, Hernández Y, Gómez M, Zulueta Y. Detección de las mutaciones 3120 +1g→A Y 3120g→A en pacientes cubanos con fibrosis quística. *Rev Cub Genet Hum*. 2004.

Coman G, Petraru E, Dahorea C, Anton D. Current microbiological data on lower respiratory tract infection in cystic fibrosis. Part II: Recommendations for microbiological diagnosis in cystic fibrosis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2012:116(3);898-901.

Cooper D, Tabbasum V. Adenylate cyclase-centred microdomains. Department of Pharmacology, University of Cambridge. 2014:462;199–213.

Cystic Fibrosis Trust. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis: report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group. First Edition. 2010

Dalboge C, Hansen C, Presler T, Hoiby T, Johansen H. Chronic pulmonary infection with Stenotrophomonas maltophilia and lung function

in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2011; 10: 318-325.

Davezac N, Tondelier D, Lipecka J, Fanen P, Demaugre F, Debski J, Dadlez M, Schrattenholz A, Cahill M, Edelman A. Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/ΔF508-CFTR to the plasma membrane. *Proteomics*. 2004; 4: 3833-3844.

Davies J, Bilton D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir. Care* 2009;628:640-54.

Deng W, Li C, Xie J. The underlying mechanism of bacterial TetR/ AcrR family transcriptional repressors. *Cell Signal.* 2013:25;1608–1613.

Fernández A, GarcÍa M, Morosini M, Lamas A, Máiz L, R Cantón. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2012; 59:62-11.

Fodor A, Klem E, Gilpin D, Elborn J, Boucher R, Tunney M, Wolfgang M. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotictreatment of exacerbations. *PLoS One*. 2012;7(9):e45001

García, I. Fibrosis quística. Revista de Pediatría Electrónica. 2009.

García P, Fernández M, Paredes F. Microbiología clínica práctica. 2ª ed.Cadiz.1994

Gharib S, Vaisar T, Aitken M, Park D, Heinecke J, Fu X. Mapping the Lung Proteome in Cystic Fibrosis. *Proteome Res*. 2009; 8(6):3020-3028.

Gilligan P. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. Clin Lab Med. 2014; 34(2):197-217

Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis S, Lereclus D. A comparative study of Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis and Bacillus

anthracis extracellular proteomes. *Proteomics* 2005, 5, 3696–3711

Hampton T, Green D, Cutting G, Morrison H, Sogin M, Gifford A, Stanton B, O'Toole G. The microbiome in pediatric cystic fibrosis patients: the role of shared environment suggests a window of intervention. *Microbioma* 2014;2049:2618-2.

Harbarth S, Hawkey P, Tenover F, Stefani S, Pantosti A, Struelens M. Update on screening and clinical diagnosis of meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Int J Antimicrob Agents. 2011; 37(2):110-117.

Hauser A, Jain M, Bar-Meir M, McColley S. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. ClinMicrobiol Rev. 2011; 24: 29–70

Hoffman L. Ramsey B, 2013. Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. Chest. 2013 143(1):207-13.

Hogardt M, Ulrich J, Riehn H, Tummler B. EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3435–8.

Holcăpek M, Jiras´ko R, Lı´sa, M. Recent developments in liquid chromatographymass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*. 2012:1259;3–15.

Hurley M, Ariff A, Bertenshaw C, Bhatt J, Smyth A. Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2012;11:288–292.

Hsu Y, Burnham C. MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria: assessment of pre-analytical variables and specimen preparation techniques, Diag. *Microbiol. Infect. Dis. 79* (2014) 144-148.

Janda J, Abbott S.16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J Clin Microbiol.

2007; 45(9):2761-2764.

Jeannin P, Magistrelli G, Goetsch L, Haeuw J, Thieblemont N, Bonnefoy J, Delneste Y. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. Vaccine. 2002; 20:A23-A27

Johnson E, Zemanick E, Accurso F, Wagner B, Robertson C, Harris J. Molecular Identification of Staphylococcus aureus in Airway Samples from Children with Cystic Fibrosis. PLoS One. 2016; 11(1):1-12

Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2005;4:7–26.

Kahl B, Herrmann M, Everding A, Koch H, Becker K, Harms E, Proctor R, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 1998; 177(4):1023-1029

Kidd T, Ramsay K, Vidmar S, Carlin J, Bell S. Pseudomonas aeruginosa genotypes acquired by children with cystic fibrosis by age 5-years. Journal of Cystic Fibrosis. 2014; 14(3): 361-369

Krause A, Whu W, Qiu J, Wafadari D, Hackett N, Sharma A, Crystal R, Worgall S. RGD capsid modification enhances mucosal protective immunity of a non-human primate adenovirus vector expressing *Pseudomonas aeruginosa* OprF. *Clin Exp Immunol* 2013;173:230–241.

Krause A, Whu WZ, Xu Y, Joh J, Crystal RG, Worgall S. Protective anti-Pseudomonas aeruginosa humoral and cellular mucosal immunity by AdC7-mediated expression of the P. aeruginosa protein OprF. *Vaccine* 2011;29:2131–2139.

Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature. 1970;* 227(5259): 680-685

Li Y, Xuan Y, Ying Z, Wong Y, Yueqi M, Qi Y, Liu B, Hung A, Cherian J,

Hill J, Keller T, Kang C. NMR structural characterization of the N-terminal active domain of the gyrase B subunit from Pseudomonas aeruginosa and its complex with an Inhibitor. FEBS Lett. 2015;2683-9.

Lomonte B. Manual de Metodos Inmunologicos. 2007. 138pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/

Magni A, Trancassini M, Varesi P, Iebba V, Curci A, Pecoraro C, Cimino G, Schippa S, Quattrucci S. Achromobacter xylosoxidans Genomic Characterization and Correlation of Randomly Amplified Polymorphic DNA Profiles of Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(4):1035-1039.

Massey R, Buckling A, Peacock S. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in Staphylococcus aureus. Curr Biol. 2001; 11(22):1810-1814.

Mukherjee S, Dutta D, Saha B, Das A. Crystal Structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 1 from Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus MRSA252 Provides Novel Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism. *J Mol Biol.* 2010;3;401(5):949-68

Mutharia L, Hancock R. Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983;42:1027–1033.

Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnostico microbiológico de la colonización- infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(2):89–104

Ollero M, Brouillard F, Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: New answers to old questions. *Proteomics*. 2006; 6:4084-4099.

Parkins M, Floto R. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015;14 (3):293-304

Poolman J. Bacterial outer membrane protein vaccines. In Novel

Strategies in design and production of vaccines, Cohen S, Shafferman A, editors. *Plenum Press*. 1996;73–77.

Proctor R, Von Eiff C, Kahl A, Becker K, Mcnamara P, Herrmann M, Peters G. Small colony variants: a pathogenic form bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. rev. Microbiol* 2006;295:305-4.

Ramos J, Martínez M, Molina A, Terán W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos M, Brennan R. Tobes R. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol*. Mol. Biol. Rev.* 2005:69;326–356.

Ramsay K, Stockwell R, Bell S, Kidd T. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2016; 1747-6348

Reyes M, Aristizabal G, Leal F. Neumología Pediátrica. Infección, alergia y enfermedad respiratoria en el niño. 5º ed.Bogotá: *Editorial Medica Internacional.*2006

Reyes M, Aristizabal G, Leal F. Neumología Pediátrica. Infección, alergia y enfermedad respiratoria en el niño. 5º ed.Bogotá: Editorial Medica Internacional.2006

Roxo-Rosa M, da Costa G, Luider T, Scholte B, Coelho A, Amaral M, Penque D. Proteomic analysis of nasal cells from cystic fibrosis patients and non-cystic fibrosis control individuals: Search for novel biomarkers of cystic fibrosis lung disease. *Proteomics*. 2006; 6:2314-2325.

Rudkjøbing V, Thomsen T, Alhede M, Kragh K, Nielsen P, Johansen U, Givskov M, Høiby N, Bjarnsholt T. True microbiota involved in chronic lung infection of cystic fibrosis patients found by culturing and 16S rRNA gene analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4352-5.

Saiman L, Siegel J. Cystic Fibrosis Fdn Consensus C. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-topatient-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:S6–S52.

Seifert H, von Eiff C, Fätkenheuer G. Fatal case due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus small colony variants in an AIDS patient. Emerg Infect Dis. 1999; 5(3): 450-453.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, V Olsen J, Mann M. In-gel digestión for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*. 2006; 1(6):2856-60.

Sibley C, Parkins M, Rabin H, Surette M. The relevance of the polymicrobial nature of airway infection in the acute and chronic management of patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:787–794.

Smyth A. Prophylactic antibiotics in cystic fibrosis: a conviction without evidence. Pediatr Pulmonol. 2005; 40(6):471-476.

Slabbinck B, Waegeman W, Dawyndt P, De Vos P, De Baets B, 2010. From learning taxonomies to phylogenetic learning: Integration of 16S rRNA gene data into FAME-based bacterial classification. BMC Bioinformatics. Vol.11: 69.

Sloane A, Lindner R, Prasad S, Sebastian L, Pedersen S, Robinson M, Bye P, Nielson D, Harry J. Proteomic Analysis of Sputum from Adults and Children with Cystic Fibrosis and from Control Subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(11):1416-1426.

Stressmann F, Rogers G, Klem E, Lilley A, Donaldson S, Daniels T. Analysis of the bacterial communities present in lungs of patients with cystic fibrosis from American and British centers. *J Clin Microbiol* 2011;49:281–291.

Thomas LD, Cripps AW, Kyd JM. Immune response mechanisms against *Pseudomonas aeruginosa* associated with mucosal immunization with protein antigens in a rat model of acute lung infection. *Vaccine* 2009;27:3324–3330

Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology [sede web]. Madison: Todar K; 2008 [acceso 28 de Abril de 2015]. Disponible en: http://www.textbookofbacteriology.net/

Torres Vela D. Estudio clínico epidemiológico de la fibrosis quística en el instituto de salud del niño, Lima 1991 – 2001. Paediatrica.2002; 4(3): 7-15

Tsui L. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(3 Pt 2):S47-53

Ulanova M, Petersen T, Ciofu O, Jensen P, Hahn-Zoric M, Hanson L, Høiby N. The clonal antibody response to Pseudomonas aeruginosa heat shock protein is highly diverse in cystic fibrosis patients. APMIS. 1997;105(6):449-56.

Vandenbranden S, McMullen A, Schechter M, Pasta D, Michaelis R, Konstan M, Wagener J, Morgan W, McColley S. Lung function decline from adolescence to young adulthood in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2012; 47(2):135-143.

Vela D. Estudio clínico epidemiológico de la fibrosis quística en el Instituto de Salud del Niño, Lima 1991 – 2001. *Paediatrica.*2002; Vol.4, No.3: 7-15.

Veloo A, Welling G, Degener J, The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS *Anaerobe 17*. 2011:211-212.

Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ, Mizel SB. Immunization of Young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine *2009*;27:6762–6769

Westritschnig K, Hochreiter R, Wallner G, Firbas C, Schwameis M, Jilma B. A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. *Hum Vaccin Immunother* 2014;10:170–183.

Wittmann J, Dreiseikelmann B, Rohde C, Rohde M, Sikorski J. Isolation and characterization of numerous novel phages targeting diverse strains of the ubiquitous and opportunistic pathogen Achromobacter xylosoxidans. *PLoS One* 2014;9 (1):e86935

Worgall S, Krause A, Rivara M, Hee K, Vintayen E, Hackett N, Roelvink P, Bruder J, Wickham T, Kovesdi I,. Protection against *P. aeruginosa* with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. *J Clin Invest* 2005;115:1281–1289.

Yoon S, Hennigan R, Hilliard G, Ochsner U, Parvatiyar K, Kamani M, Allen H, DeKievit T, Gardner P, Schwab U, Rowe J, Iglewski B, McDermott T, Mason R, Wozniak D, Hancock R, Parsek M, Noah T, Boucher R, Hassett D. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 2002;3:593–603.

Yoshimura F, Zalman L, Nikaido H. Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. *J Biol Chem.* 1983;258:2308–2314.

Yu Z, Reicheld S, Savchenko A, Parkinson J, Davidson A. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J. Mol. Biol*. 2010:400;847–864

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Hospital de Nivel IV Rebagliatti Martins. EsSalud.

INFORMACIÒN:

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen CFTR (cystic fibrosis conductance regulator gene), y caracterizada por la producción de sudor con alto contenido salino y secreción mucosa de viscosidad anormal, lo que conlleva a la producción de síntomas respiratorios, secundarios a bronquitis crónica e infección recurrente, síntomas digestivos y retardo del crecimiento.

Usted está siendo invitado a participar de esta investigación que tiene como objetivo identificar las mutaciones más frecuentes del gen CFTR y los principales patógenos que colonizan la vía respiratoria inferior en pacientes con FQ en el Perú. Para realizarlo, requerimos recolectar datos de la historia clínica de su hijo y/o de UD, así como obtener muestra de sangre. En la muestra de sangre se estudiará la causa genética de la enfermedad. Esta investigación podría beneficiar a muchas personas y aportar herramientas útiles para mejorar la calidad y expectativa de vida de los pacientes con FQ. Así, si usted decide participar del estudio firme el Término de Consentimiento abajo, después de leerlo detenidamente y después de aclarar todas sus dudas sobre este asunto con el médico que lo(a) está atendiendo.

CONSENTIMIENTO:

Después de leer, entender y no teniendo ninguna duda sobre la Información que el investigador me ha proporcionado, doy mi consentimiento para participar en el estudio.

Nombre del paciente:_____

Nombre del padre/apoderado: _____Firma: _____

Nombre de la madre/apoderada: _____Firma: _____

Médico Tratante: _____ Firma:_____

Lima, ___/ ____/_____

ANEXO 2

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN BACTERIAS

1. Microcentrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos los tubos que contienen el medio de cultivo en caldo con la bacteria cultivada.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 µl de **PBS 1X.**
3. Vortexear las muestras hasta disolver el pellet.
4. Microcentrifugar a 10000 rpm por 2 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 200 µl de **TE 1X.**
6. Llevar a ebullición por 10 minutos.
7. Inmediatamente colocar sobre hielo por 5 minutos.
8. Microcentrifugar a 10 000 rpm por 2 minuto.
9. Transferir el sobrenadante (100 µL aproximadamente) a un nuevo microtubo.
10. Agregar 1µl de **ARNasa** (0.1mg/ml).
11. Incubar 65 °C por 15 minutos o 1 hora a 37 °C.
12. Realizar la dilución (dependiendo de la concentración) con agua ultra pura.
13. Tomar 2 µl para la PCR.

CONCENTRACIONES DE LOS REACTIVOS:

A. PBS 1X pH 7.4

- 137mM de Cloruro de Sodio ($NaCl_2$).
- 2.7mM de Cloruro de Potasio (KCl).
- 10mM de Fosfato de Sodio Di básico (Na_2HPO_4).
- 1.8mM de Fosfato de Potasio Di hidrogenado (KH_2PO_4).

B. TE 1X pH 8.0

- 10mM Tris-HCL pH 8.0
- 1mM EDTA pH 8.0

ANEXO 3

Preparación de geles para SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Las cantidades que se describen a continuación sirven para el sistema de minigeles de Bio-Rad (Mini-Protean II®). Las mismas pueden adaptarse para otras cámaras de diversa capacidad, conservando las proporciones.

1. Para la preparación del gel separador (5 ml, grosor = 0,75 mm), mezclar los siguientes reactivos, según el porcentaje de gel deseado, en un frasco Kitasato de 50 ml:

Componente	Concentración final						
	20%	15%	12%	10%	7,5%	5%	
agua desionizada	367	1167	1683	2000	2367	2783	µl
amortiguador separador	1250	1250	1250	1250	1250	1250	µl
SDS	50	50	50	50	50	50	µl
acrilamida/bisacrilamida	3333	2500	2000	1667	1250	833	µl

2. Preparar el molde para el gel. Hacer una marca a ~1-1,5 cm debajo del nivel del "peine" de muestras. Retirar el peine.
3. Con la mezcla de reactivos a temperatura ambiente, desgasear aplicando vacío 15min.
4. Iniciar la polimerización agregando 3 µl de TEMED y 15 µl de persulfato de amonio a la mezcla. Inmediatamente mezclar y verter la solución en los vidrios (molde), hasta la marca hecha en el paso #2, sin atrapar burbujas. De seguido, eliminar la curvatura (menisco) en la superficie, con una delgada capa (1-2 mm) de agua destilada o de isobutanol, depositada suavemente sobre la mezcla. Dejar que polimerice el gel (óptimamente en 15-20 min).
5. Una vez que la interfase entre el polímero y el agua se torna visible, esperar 10-15 min adicionales para que se complete la reacción. Luego, decantar el exceso de líquido de la superficie, y colocar el peine para muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas).
6. Mezclar los componentes del gel superior (compactador):

Componente	Cantidad
agua desionizada	1,5 ml
amortiguador superior	630 µl
SDS	33 µl
acrilamida/bisacrilamida	330 µl
TEMED	2 µl
Persulfato de amonio	10 µl

7. Una vez agregados los catalizadores, mezclar y verter de inmediato en el molde, nivelando el peine a su posición horizontal, sin atrapar burbujas. Dejar polimerizar.
8. Quitar el peine deslizándolo suavemente, y lavar los hoyos llenándolos con agua y aspirando luego con una jeringa. Esto elimina residuos de componentes no polimerizados.
9. Preparar las muestras. Estas se pueden analizar en estado **reducido** o **no reducido**, mezclándolas con el respectivo amortiguador de muestras. Si las muestras son sólidas, se pueden disolver directamente en el amortiguador "1x". Si son líquidas, se mezclan partes iguales de muestra y amortiguador "2x". La cantidad de proteína a aplicar depende de la sensibilidad del sistema de detección (ej. µg para tinción de Coomassie, ng para tinción de plata) y de la heterogeneidad de la muestra. Para reducir los enlaces disulfuro de las muestras con amortiguador reductor, colocarlas en baño de agua a ebullición durante 5 min. Para correr muestras no reducidas, se mezclan con amortiguador (sin reductor) y se aplican al gel directamente, sin calentar. La concentración de las muestras a usar depende de su heterogeneidad. Las mezclas complejas de proteínas se pueden preparar a ~5-10 mg/ml.
10. Cargar las muestras en los hoyos (5-15 µl, correspondiendo por ej. a 10-30 µg en el caso de mezclas complejas, o 3-10 µg para proteínas purificadas). Para esto, se puede llenar previamente todos los hoyos con amortiguador de cámara, y luego aplicar las muestras "bajo el amortiguador" (dado que son más densas por la glicerina), con una jeringa Hamilton o con una pipeta de puntas capilares. Es fundamental asegurar que no ocurran contaminaciones cruzadas entre los distintos hoyos. Igualmente, si se utiliza una pipeta Hamilton, hay que lavarla exhaustivamente entre las distintas muestras. Incluir marcadores de PM en uno de los carriles, como referencia.
11. Llenar el tanque con el amortiguador de cámara (180 ml en el tanque inferior y 120 ml en el superior). Colocar el gel en la cámara y correr a 200 v (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegue casi al borde inferior del gel (45-60 min).
12. Sacar el gel y sumergirlo en fijador durante 15 min, en un recipiente tapado (para evitar los vapores tóxicos del metanol), con agitación suave. Además de fijar, esta solución extrae una cierta proporción del SDS del gel, el cual interfiere con la tinción.
13. Teñir el gel durante 1 hr con azul Coomassie R-250. Eliminar luego el exceso de colorante con varios cambios del decolorador. La decoloración es más rápida si se agrega al recipiente unos trocitos de esponja (tipo espuma de poliuretano) limpios, que actúan adsorbiendo el colorante.
14. Registrar los resultados por fotografía. Si se desea guardar el gel por algunos meses, se puede dejar en ácido acético al 7% en cajas o bolsas de plástico selladas. El gel puede secarse sobre un papel filtro grueso, o entre trozos de celofán. Para esto se sumerge el gel durante la noche en 5% metanol con 3% glicerol, se monta sobre el papel filtro o celofán, con otra hoja de

celofán encima, y se coloca en un secador de vacío durante 1-3 hr a 60°C. El secado de geles no está exento de riesgos, ya que pueden ocurrir rupturas que lo arruinen. A mayor concentración del gel, mayor es la dificultad para el secado, y viceversa. Si no se dispone de un secador, se puede emplear un vidrio con peso sobre el celofán para secar a temperatura ambiente, más lentamente.

Reactivos

Solución de monómeros de acrilamida:
29,2 g acrilamida; 0,8 g bis-acrilamida; disolver en agua desionizada y aforar a 100
ml. Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio, en refrigeración (<1 mes).
Amortiguador del gel separador (inferior):
18,15 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 ml.
Guardar en refrigeración.
Amortiguador del gel compactador (superior):
3,0 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 ml.
Guardar en refrigeración.
Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x):
12 g Tris; 57,6 g glicina; 4 g SDS; disolver en ~300 ml de agua. El pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 400 ml. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces al momento de utilizar.
Persulfato de amonio:
Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico (sellar bien el frasco y mantener en desecador). Una alternativa es preparar alícuotas (ej. 200
µl) en viales pequeños y congelarlas.
Solución de SDS:
1,0 g duodecilsulfato de sodio; disolver en 10 ml de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.
Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2x):
10,0 ml amortiguador del gel superior; 16,0 ml solución de SDS; 50 mg azul de bromofenol; 12,0 ml glicerol; 4,0 ml agua; mantener a temperatura ambiente (<2 meses).
Amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x):
El mercaptoetanol es inestable en esta solución, por lo que se prepara una pequeña cantidad del reactivo para una semana. Agregar 0,2 ml de 2-mercaptoetanol a 4,2 ml del amortiguador no reductor. Guardar a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los agentes son 4% SDS y 5% 2-Me. El 2-Me es tóxico y de olor desagradable (usar en campana de extracción).

Fijador:

500 ml metanol; 70 ml ácido acético glacial; 430 ml agua; Guardar a temperatura ambiente en recipiente hermético. *Importante:* Evitar el contacto y la inhalación de vapores de metanol.

Colorante Coomassie Blue R-250:

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 ml metanol; 46 ml ácido acético; 230 ml agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua.

Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Aunque el colorante puede ser reusado varias veces para ciertos fines, la sensibilidad declina (usualmente es del orden de 0,5 µg de proteína), por lo que se prefiere usar una pequeña cantidad y descartarla cada vez. Otro tipo de Coomassie, el G-250, puede ser utilizado como colorante para geles, aunque su sensibilidad es menor.

Decolorador:

200 ml metanol; 100 ml etanol; 50 ml ácido acético; 650 ml agua; guardar a temperatura ambiente.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE DECOLORACIÓN DE LAS BANDAS DE GEL TEÑIDAS CON AZUL DE COOMASSIE SEGÚN SHEVCHENKO

Reactivos a usar:

REACTIVO
100mM de bicarbonato de amonio
Acetonitrilo Puro

Procedimiento:

- Se agrega 100ul de 100mM de bicarbonato de amonio/Acetonitrilo (V/V).
- Se incuba durante 30 minutos vortexeando ocasionalmente a temperatura ambiente.
- Se retira el sobrenadante quedando solo la pieza del gel y agregar 500ul de Acetonitrilo e incubar a temperatura ambiente vortexeando ocasionalmente hasta que la pieza del gel se torne de color blanco y se encojan y eliminar el Acetonitrilo.

✓ ***NOTA:*** Las muestras pueden ser almacenadas a .20°C hasta ser digeridas en un futuro y pueden estar algunas semanas.

❖ ***SATURACIÓN DE LA PIEZA DEL GEL CON BUFFER TRIPSINA***

✓ ***Procedimiento:***

- Agregar 50ul de buffer de tripsina hasta cubrir la pieza de gel por completo.
- Incubar 120 minutos sobre hielo (nevera), observando a los 30 minutos para ver si la pieza de gel ha absorbido el buffer de tripsina si absorbe se agrega más buffer de tripsina hasta cubrir la pieza de gel completamente.

❖ ***DIGESTIÓN DE LAS PROTEINAS EN LA PIEZA DEL GEL***

- Pasado los 120 minutos incubar las piezas de gel a 37°C toda la noche o incubar a 55°C durante 30 minutos.

- Terminado el proceso de digestión se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto, sacar una alícuota de 2ul y espotear a la placa Maldi con matriz CHCA (10mg/ml) (V/V).

❖ ***EXTRACCIÓN DE PEPTIDOS PRODUCTO DE LA DIGESTIÓN***

- Adicionar 100ul de buffer de extracción (5% de Ácido fórmico/Acetonitrilo (1:2 V/V).
- Incubar el tubo a 37°C durante 15 minutos.
- Vortexsear durante 30 minutos y Sonicar durante 5 minutos, sacar una alícuota de 10ul y dejar secar en bomba de vacío hasta que se elimine todo el contenido.
- Resuspender en 3ul de agua HPLC con 0.1%.

ANEXO 5

- CAPACITACION EN PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Figura 4. Instrucciones del manejo de reactivos para la elaboración del mix utilizado en la PCR.

Figura 5. Indicaciones para el buen manejo del pipeteo para cada uno de los reactivos a utilizar.

Figura 6. Preparación del mix por alumnas de enfermería de la Universidad Nacional de Tumbes.

Figura 7. Programación del termociclador a las temperaturas y tiempos adecuadas para la amplificación de ADN bacteriano

- CAPACITACION EN ESPECTROMETRIA DE MASAS MALDI TOF

Figura 8. Capacitación con clases teóricas en el tema de MALDI TOF TOF en las instalaciones de la empresa INCABIOTEC SAC.

Figura 9. Capacitación con clases prácticas en el tema de MALDI TOF TOF en las instalaciones de la Facultad de Limnología y Biología molecular de la UNT.